

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17226

研究課題名(和文)特発性肺線維症の肺線維芽細胞に対する新規BET阻害剤の抗線維化作用の解明

研究課題名(英文)Nox4-Brd4 interaction induced lung fibroblast-mediated lung fibrosis

研究代表者

金丸 良太 (Kanemaru, Ryota)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70869156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：線維化に關与するターゲットとしてBET蛋白に着目した。肺線維症肺線維芽細胞にTGF- $\beta$ 1または、TGF- $\beta$ 1及びBRD4受容体拮抗薬を投与しRNAを抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子変動を解析した結果より、NOX4(fold change=14.99)に着目した。ヒストンH4K16のアセチル化がNox4の転写に關与していること述べた既報告がある(JCI Insight 2020;5(14):e137127.)。我々は、肺線維芽細胞において、BRD4受容体拮抗薬はNox4阻害を介して線維化を制御する重要な治療標的になりうることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症の線維化メカニズムの基礎的研究から創出される革新的な新規薬剤への開発へとつながることが多いに期待される。本研究は、実際のヒト肺線維症患者の肺線維芽細胞を用いて検証する説得性と、肺線維芽細胞及び無レオマイシン誘発肺線維症を用いた直接的な線維化メカニズムの解明により、BRD4のNOX4を介した線維化を制御する重要な治療標的となりうることを証明した。本研究の成果は更なる抗線維化作用をもつ新規薬剤の開発へ直結する、医学的貢献度の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that bromodomain-containing protein 4 (Brd4), a kind of the bromodomain and extraterminal family of proteins that function as epigenetic gene regulator, plays an important role in lung fibrosis and Brd4 inhibitor suppressed lung fibrosis of mice induced by bleomycin. The recent paper suggested that Brd4 inhibition in lung fibroblasts downregulate Nox4 gene expression, but its details was not clarified. Brd4 inhibitors suppressed TGF- $\beta$ 1-induced collagen gel contraction, chemotaxis and SMA, fibronectin through the down-regulation of Nox4 in lung fibroblast. Nox4 inhibitor suppressed lung fibrosis and 4-HNE, a stable marker for oxidative stress in the BLM induced fibrotic lung. Brd4/Nox4 inhibition might be as an effective strategy for the treatment of fibrotic lung.

研究分野：呼吸器疾患、間質性肺疾患

キーワード：肺線維芽細胞 BRD4 NOX4

## 1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎(idiopathic interstitial pneumonias; IIPs)のうち最も頻度の高い特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)は、慢性経過の進行性線維化を生じ、発症後の平均生存期間は3-4年と予後不良である。現時点では、生存率や健康関連QOLに寄与する有効性を証明した薬物療法はなく治癒は期待出来ない。したがって、進行を阻止することを治療目標とする難治性肺疾患である。近年、新たな創薬のターゲットとしてエピジェネティック機構が注目されており、特にBET(Bromodomain and Extra-Terminal)蛋白質は線維化との関連性が示唆されている。本研究では特発性肺線維症における線維化機序を解明し、抗線維化作用を有する創薬につながる研究を行う事を目的とする。

線維芽細胞は細胞外基質に存在する間質細胞である。肺の線維化を強力に促進させるTGF- $\beta$ 1は線維芽細胞を、活性型筋線維芽細胞への分化を誘導し、線維化部位に遊走させる。そして、細胞外基質産生と収縮性ストレスファイバーである平滑筋アクチンを産生させる。線維芽細胞自体、収縮能を持つことで気腔内の線維化から気道狭細化をもたらし、その収縮性病態は肺機能や肺構造の変化に大きく影響し、肺活量低下から呼吸不全死の経過に至らしめる。肺線維症の病態において活性化された筋線維芽細胞は肺の線維化進行に極めて中心的な役割を担っており、遊走、増殖、細胞外基質(ECM)の産生を亢進させて肺線維化を促進する。近年の創薬ターゲットとして、DNAのメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化等のエピジェネティック機構が注目されている。HDAC阻害剤はMDS治療薬として既に実用化されているが、他にもBET阻害剤やKMT阻害剤など、次々と新規阻害剤が創出されている。その中でも、我々は次世代の抗線維化薬として新規BET(BRD4)阻害剤OTX015の可能性に着目している。BET(Bromodomain and Extra-Terminal)蛋白質はそのブロモドメインを介してヒストンN末端のアセチル化リジンと結合し、さまざまな蛋白質複合体と協調することで遺伝子の転写伸長を制御する。BETファミリータンパク質としてBRD2, BRD3, BRD4, BRDTが知られており、炎症関連遺伝子発現、細胞分裂、ウイルス宿主相互作用などの様々な細胞内プロセスにおいて重要な役割を果たしている。BRD4については、腎線維芽細胞の活性化を阻害し腎線維化を軽減した報告(Xiong C et al. Oncotarget 2016)や、肝線維化を抑制した報告(Ding N et al. Proc Natl Acad Sci USA 2015)等があるが、肺線維芽細胞に関する報告は未だ無く、特発性肺線維症におけるエピジェネティック薬の役割は未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

申請者は肺線維化の病態に直接深く関与する肺線維芽細胞の機能活性に着目した。特発性肺線維症由来の肺線維芽細胞を用いて *in vitro* で生理機能解析 (Collagen gel contraction assay、Chemotaxis assay)を行い、正常肺線維芽細胞と比較検討すること

で、病態機序解明や抗線維化薬の効果予測因子を同定することを本研究の主目的とする。2群間において、線維化促進因子である TGF- $\beta$ 1 刺激への反応性や、BRD4 受容体拮抗薬 (OTX015) による抗線維化作用の差異について、マイクロアレイ解析による遺伝子制御レベルからタンパク質レベルまで比較し、臨床背景と照らし合わせることで、BRD4 受容体拮抗薬が新規抗線維化薬としての新たな機序の解明から創薬につながる標的因子や効果予測因子を探索することを目的とする。しかしながら、BRD4 受容体拮抗薬の肺線維芽細胞に対する作用機序は未解明な部分も多く、本研究では、特発性肺線維症患者由来の肺線維芽細胞を用いて、病態機序や効果予測因子を探索する。また、肺線維芽細胞を介する線維化機序の解明の為に *in vitro* における線維化モデルの評価法として、高精度で再現性の高い肺線維芽細胞含有 Collagen gel 収縮能と遊走能の評価を中心に導入した。肺線維症の肺線維芽細胞の特性を健常の肺線維芽細胞と比較検討し肺線維芽細胞を介した病態の解明及び新規治療薬の開発につながる抗線維化作用を、特に BRD4 受容体拮抗薬に着目して、検討する事を目的とする。ヒト肺線維芽細胞の生理機能は生体外培養環境下においてもその表現型を維持することが知られており、本研究では、独自の手法を用い、ヒト肺線維症患者由来の肺線維芽細胞を生体外分離培養して、直接抗線維化薬の感受性を検証する直接臨床に反映する説得性を持つ。肺線維芽細胞を介する線維化メカニズムの解明により、この成果のブレイクスルーが、更なる新規抗線維化薬の開発へと直結する意義のある研究である。

### 3. 研究の方法

#### (1)肺線維芽細胞を介する線維化制御 Gene の網羅的探索

本研究ではまず、肺の線維化に重要な役割を担う線維芽細胞における 1) 遺伝子レベル 2) 転写プロモーター活性レベルの網羅的プロファイリング解析を行い、肺線維芽細胞の線維化に関わる生理機能活性制御因子の探索を行った。1) では肺線維芽細胞の生理機能活性を強力に促進させる TGF- $\beta$ 1 刺激を行い、非刺激下と比較して変動する Gene を線維化にかかわる制御候補因子としてマイクロアレイを用いて探索した。2) では、正常肺線維芽細胞/肺線維症肺線維芽細胞の両群間の転写プロモーター活性の表現型解析として CAGE を導入した。正常肺線維芽細胞と比較して肺線維症肺線維芽細胞において変動する転写活性制御 Gene を肺線維症の病態形成にかかわる制御候補因子として探索した。

#### (2)線維化制御因子の肺線維芽細胞生理機能活性の解析

上記 1) 2) の手法を用いて新たな線維化促進制御因子が実際に肺線維芽細胞の生理機能活性どう関わっているか検討を行った。肺線維芽細胞の生理機能解析として以下の解析を行った。(1)遊走能、(2)コラーゲンゲル収縮能に着目し *in vitro* による TGF- $\beta$ 1 刺激に対する生理機能活性解析を行った。肺線維芽細胞の Fibronectin に対する遊走能を Boyden chemotaxis chamber 法を用いて評価した。コラーゲンゲル収縮能はゲル中の肺線維芽細胞

が細胞外基質の産生と収縮性ストレスファイバーとして 平滑筋アクチンの産生により誘導されるゲルの収縮の程度を測定する。ゲルの収縮の程度が強ければ線維芽細胞の活性化が亢進したと考えられ *in vitro* における、肺の線維化に關与する肺線維症肺線維芽細胞の分化及び活性化の仮想モデルとして採用した。また、非小細胞肺癌の手術症例より、正常肺線維芽細胞(Control 群)及び肺線維症肺線維芽細胞の分離培養を行った。正常肺線維芽細胞に対する肺線維症肺線維芽細胞の生理活性機能を行った。また、肺線維芽細胞を介する線維化を制御する、平滑筋アクチンや ECM 産生能、制御シグナル等の解析も行った。

### **(3)肺線維芽細胞生理機能活性制御因子の機序の解明から抗線維化作用候補薬の機能を検証**

肺線維芽細胞の機能活性制御 Gene 及び肺線維症肺線維芽細胞の特異的マーカーとしての Gene の網羅的解析結果から、線維化に關与するシグナルを探索した。TGF- $\beta$ 1 刺激下での遊走能やコラーゲンゲル収縮能の抗線維化作用につながるシグナル阻害剤の抑制効果を検証した。

### **(4)プレオマイシン誘発肺線維症動物モデルによる抗線維化作用の検証**

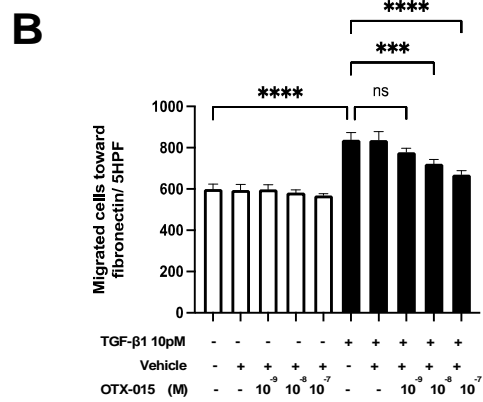
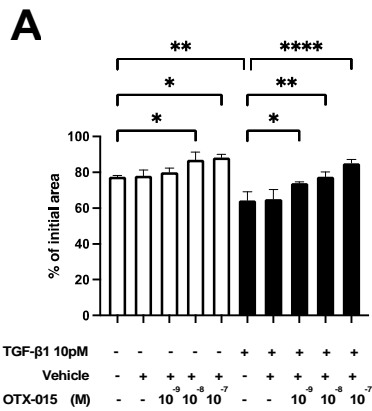
プレオマイシンにより誘発された肺線維症モデルを用いて、阻害剤の抗線維化作用を検証した。また *in vitro* 結果から得られたマイクロアレイ結果、及びタンパクレベルで解析した結果得られた BRD4 制御因子に關連する標的因子やパスウェイの変動を *in vivo* においても検証する。

## **4. 研究成果**

本研究では、まず TGF- $\beta$ 1 刺激によるコラーゲンゲル収縮・遊走が、OTX-015(BET 阻害剤)により有意に抑制されることを証明した(下図 A、B; \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\*\* $p < 0.0001$ )。

肺線維症線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 または TGF- $\beta$ 1 及び OTX-015 を投与し反応させた後、RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにより 2 群間の遺伝子発現解析を行い、MAPK シグナル、Rho シグナル、及び Wnt シグナルはパスウェイ解析により、有意に変動を認めた。また単一遺伝子としては、NOX4 (fold change = 14.99) の Gene 発現の変動に着目した。ヒストン H4K16 のアセチル化が Nox4 の転写に關わっており、BRD4 はそのアセチル化リシンの読み取りタンパクであることを、正常胎児肺線維芽細胞を用いて証明した既報告があることもこの結果を支持する(JCI Insight 2020;5(14):e137127.)。TGF- $\beta$ 1 刺激で亢進したゲル収縮・遊走は、NOX4 阻害剤及び Wnt- カテニン阻害剤で抑制された。OTX-015 は、TGF- $\beta$ 1 刺激で発現が亢進した NOX4 を抑制した。MAPK シグナル、Rho シグナル、Wnt シグナルはタンパクレベルでは抑制されなかった。OTX-015 及び GKT-137831(Nox4 阻害薬)は、TGF- $\beta$ 1 刺激により増強した SMA・Fibronectin 発現

を抑制した。次にプレオマイシンにより誘発された肺線維症モデルにおいて Nox4 阻害剤の抗線維化作用を確認した。阻害剤投与により肺線維化スコアである Ashcroft score を優位に抑制した。これらの結果より、OTX-015 は Nox4 を介して抗線維化作用を示す可能性が示唆された。本研究成果は現在論文投稿準備中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Issei Sumiyoshi, Shinsaku Togo, Kotaro Kadoya, Izumi Kaneko, Tomoya Komatsu, Motoyasu Kato, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Yusuke Ochi, Junko Watanabe, Moe Iwai, Ryota Kanemaru, Yuichiro Honma, Ryo Koyama, Kazuhisa Takahashi.
2. 発表標題 The lung fibroblast-mediated antifibrotic effects of extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 The 63rd annual meeting of the Japanese Respiratory Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ochi, Shinsaku Togo, Motoyasu Kato, Issei Sumiyoshi, Junko Watanabe, Moe Iwai, Ryota Kanemaru, Ryo Koyama, Yuichiro Honma, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Hitomi Yoshikawa, Kengo Koike, Kazuhisa Takahashi.
2. 発表標題 NOX4-Brd4 interaction induced lung fibroblast-mediated lung fibrosis.
3. 学会等名 The 63rd annual meeting of the Japanese Respiratory Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊純子, 十合晋作, 住吉一誠, 越智裕介, 金丸良太, 加藤元康, 小山良, 高橋和久
2. 発表標題 肺線維芽細胞におけるRho/ROCKシグナルを介したオートタキシン-リゾホスファチジン酸経路による肺線維化機序の解明
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------