

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21591269

研究課題名(和文)多発性筋炎/皮膚筋炎に伴う急速進行性間質性肺炎の病態解析と新規治療に関する研究

研究課題名(英文)The study of pathogenesis of rapidly progressive interstitial pneumonia associated with polymyositis/dermatomyositis and its novel treatments

研究代表者

亀田 秀人(Kameda, Hideto)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00265795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いてブレオマイシン低用量または高用量を気管内投与したところ、1週後にブレオマイシン低用量の投与では線維化病変が主体に形成され、高用量の投与ではびまん性肺出血の肺病変が形成され、難治性肺疾患の動物モデルが確立された。さらに治療薬のスクリーニング検査法としてヒト肺胞上皮細胞とヒト肺線維芽細胞を3次元で混合培養を行ったところ、血小板由来増殖因子(PDGF)刺激は線維芽細胞の増殖を選択的に促進し、これがイマチニブという慢性骨髄性白血病などの治療薬により抑制され、難治性肺病態に対する分子標的療法の可能性が開かれた。

研究成果の概要(英文)：Intratracheal injection of bleomycin 2 mg/kg (low dose) and 10 mg/kg (high dose) induced fibrotic lung lesions and hemorrhagic lung lesions, respectively. Thus, mice models of rapidly progressive interstitial pneumonia have been established. Moreover, a 3-dimensional mixed culture of human lung epithelial cells and human pulmonary fibroblasts was used as a screening test for novel therapeutic agents for rapidly progressive interstitial pneumonia. Imatinib, a drug for chronic myeloid leukemia, selectively inhibited the proliferation of pulmonary fibroblasts stimulated by platelet-derived growth factor. These results elucidated the possible treatment of rapidly progressive interstitial pneumonia by targeted therapies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病アレルギー内科学

キーワード：間質性肺炎 皮膚筋炎 イマチニブ 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

膠原病、特に多発性筋炎 (polymyositis; PM) / 皮膚筋炎 (dermatomyositis; DM) のうち筋炎の軽微な DM (clinically amyopathic DM) に合併する急速進行性間質性肺炎 (rapidly progressive interstitial pneumonia; RPIP) は副腎皮質ステロイド薬に不応であり、免疫抑制薬を発症早期から併用しても約半数が 2 ヶ月以内に死亡する極めて予後不良な病態であることを、申請者らは報告してきた (Kameda H, et al. *J Rheumatol* 2005; Kameda H and Takeuchi T. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2006)。PM/DM 合併 RPIP に関しては日本からの報告が約 4 割を占めるほど我が国に多い病態であり、海外での研究はあまり行われていない。

従って、RPIP に対しては初期治療から複数の免疫抑制薬を併用するのみならず、生物学的製剤や線維化抑制作用を有する薬剤などを含めた新たな治療法の確立が急務である。一方、有望な併用治療薬の候補として、線維化に重要な TGF (transforming growth factor) - そして PDGF (platelet-derived growth factor) の双方のシグナル伝達を阻害しうるチロシンキナーゼ阻害薬メシル酸イマチニブがある (Kameda H, et al. *Drug Target Insights* 2007)。イマチニブの間質性肺炎に対する部分的有用性が動物モデルで報告されている (Aono Y, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; Azuma M, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2007)。このイマチニブを PM/DM 合併 RPIP の治療レジメンに追加する意義についても本研究で検討し、有望であれば早期の臨床応用を目指す。

## 2. 研究の目的

PM/DM 合併 RPIP の病態解明と新規治療法の確立を目的として、(1) *in vitro* のヒト由来の細胞培養系における検討、(2) 動物モデルを用いた *in vivo* の検討を平行して進めていくことが不可欠である。しかも、(1) の培養細胞系における検討も、可能な限り *in vivo* に近似していることが望ましい。そこで、申請者は昨年までの研究において、コラーゲンゲルにおける線維芽細胞と T 細胞の 3 次元培養という *in vivo* に比較的近似した培養アッセイを確立した。この系にさらにヒト肺胞上皮細胞株を加えることにより、ヒト細胞を用いた *in vitro* での間質性肺炎の病態モデル構築を行う。さらに、昨年よりプレオマイシン誘発間質性肺炎のマウスモデルを作成して、分子レベルでの病態解析を行うとともに、有効性の高い治療薬や併用療法のスクリーニング、ならびに薬剤作用機序の解明につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養系における検討

ヒト型肺胞上皮細胞株である A591 とヒト肺線維芽細胞を 24-well プレートを用いた型コラーゲンゲル中とともに  $1 \times 10^5$  cells/ml で混合培養を行う。PDGF 10 ng/ml をそれぞれの well に添加する。14 日間培養後、コラゲナーゼ処理によりゲルを可溶化し、細胞を回収する。細胞をバッファで洗浄後、FACS によりアポトーシスを生じた細胞 (アネキシン V 陽性) と非アポトーシス細胞を別々にカウントし、ヒト型肺胞上皮細胞と線維芽細胞 (抗 CD90 抗体反応性) の各々の細胞の増殖やアポトーシスを解析する。

### (2) 動物モデルにおける検討

12-15 週齢の雄性 ICR マウスを用いる。麻酔下で day 0 にプレオマイシン 2 mg/kg または 10 mg/kg を気管内投与する。Day 7 に肺の出血および炎症を肉眼的および組織学的に検討し、出血の範囲と炎症をスコア化する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞培養系における検討

PDGF 10 ng/ml 刺激は線維芽細胞の増殖を選択的に促進し、これはイマチニブにより用量依存的に抑制された。また、PDGF 刺激の有無にかかわらず、A591 細胞の共存の有無が線維芽細胞増殖に及ぼす明らかな影響を認めなかった。さらに、一部の A591 細胞を機械的に剝離する傷害モデルを作製して、その線維芽細胞に及ぼす影響も検討したが明らかには認めなかった。従って、間質性肺炎の病態において、肺胞上皮細胞障害と線維芽細胞増殖とは、多くの部分は非依存的に進行していると考えられ、その治療においては肺胞上皮細胞のアポトーシス抑制と線維芽細胞の増殖抑制を同時に行う必要性が示唆された。

### (2) 動物モデルにおける検討

12-15 週齢の雄性 ICR マウスを用いて、麻酔下で day 0 にプレオマイシン 2 mg/kg または 10 mg/kg を気管内投与して、Day 7 に肺の出血および炎症や線維化を検討した。プレオマイシン 2 mg/kg の投与では線維化による小結節状の隆起性病変が主体に形成され、肺出血はわずかであった。一方、10 mg/kg の投与では高度のびまん性肺出血が観測された。肺出血の程度は肺胞洗浄液のヘマトクリット値で 10 mg/kg では 2 mg/kg の 5 倍であった。肺の病理組織学的な検討では、プレオマイシン 2 mg/kg の投与では線維化病変が主体に形成され、一方、10 mg/kg の投与ではびまん性肺出血が主体であった。従って、肺線維症と肺出血の 2 つのモデルが投与量依存性に形成され、間質性肺炎における肺出血の位置づけが

より明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

1. 亀田秀人. 生物学的製剤による薬剤性肺障害 — fake or fact? 医学のあゆみ 2014;248(1):109-113. (査読なし)
2. 亀田秀人. 新規抗リウマチ薬使用時の肺病変. 呼吸器内科 2014;25:138-142. (査読なし)
3. Kubo A, Azuma A, Kanazawa M, Kameda H, Kusumoto M, Genma A, Saijo Y, Sakai F, Sugiyama Y, Tatsumi K, Dohi M, Tokuda H, Hashimoto S, Hattori N, Hanaoka M, Fukuda Y; Japanese Respiratory Society Committee for formulation of Consensus statement for the diagnosis and treatment of drug-induced lung injuries. Respir Invest 2013;51:260-277. (査読あり)
4. 亀田秀人. 抗リウマチ薬による薬剤性肺障害. 呼吸と循環 2013;61(4):341-348. (査読なし)
5. 亀田秀人. 多発性筋炎・皮膚筋炎と肺疾患. 呼吸器内科 2011;20:367-372. (査読なし)
6. 亀田秀人. イマチニブ. 日本臨床免疫学会会誌 2009;32(2):77-84. (査読あり)
7. 西村幸治, 亀田秀人. 間質性肺炎. リウマチ科 2009;41(4):344-350. (査読なし)

〔学会発表〕(計11件)

1. 亀田秀人. 膠原病治療の最新の考え方. つくば免疫炎症と脂質代謝セミナー2014. 2014年1月31日、つくば.
2. 亀田秀人. 新規抗リウマチ薬使用時の肺病変. 第53回日本呼吸器学会学術講演会(日本リウマチ学会との共同企画 リウマチ診療における呼吸器科医の役割). 2013年4月21日、東京.
3. 亀田秀人. 膠原病の診断と治療への最新アプローチ. 第19回埼玉膠原病肺研究会. 2011年10月26日、坂戸.
4. 亀田秀人. 膠原病に合併する間質性肺炎の最新治療. 第11回南栃木肺研究会(SToPC). 2010年3月5日、栃木.
5. 亀田秀人. 膠原病肺の臨床的意義. 第29回日本画像医学会. 2010年2月26日、東京.
6. 亀田秀人. DMにおける急性肺病変の治療. 第20回膠原病肺を考える会. 2010年2月17日、東京.
7. 亀田秀人. 膠原病の難治性病態における免疫抑制療法. 第2回大阪リウマチ・膠原病治療フォーラム. 2010年1月22日、大阪.
8. 西村幸治, 亀田秀人, 倉沢隆彦, 近藤恒夫, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 長澤逸人, 天野宏一, 竹内勤. 皮膚筋炎に合併した急速進行性間質性肺炎に対して多剤併用療

法が奏効した一例. 第20回日本リウマチ学会関東支部学術集会. 2009年12月6日、横浜.

9. 亀田秀人. 膠原病内科からみた呼吸器(膠原病肺). 呼吸生理フォーラム(肺機能セミナー講演会). 2009年8月7日、東京.

10. Nishimura K, Kameda H, Kurasawa T, Kondo T, Okuyama A, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Nagasawa H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Influence of tocilizumab to interstitial pneumonia (IP) complicating rheumatoid arthritis patients. The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月7日、東京.

11. 西村幸治, 亀田秀人, 倉沢隆彦, 近藤恒夫, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 鈴木勝也, 長澤逸人, 阿部治男, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤. 関節リウマチ合併間質性肺炎患者に対するトシリズマブ投与の影響. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009年4月23日、東京.

〔図書〕(計6件)

1. 亀田秀人. 間質性肺炎治療. 上阪等 編. 多発性筋炎・皮膚筋炎. 最新医学社, pp173-178, 2014.
2. 亀田秀人. 日本呼吸器学会薬剤性肺障害の診断・治療の手引き作成委員会. 薬剤性肺障害の診断・治療の手引き. メディカルレビュー社, pp58-61, 2012.
3. 亀田秀人. 多発性筋炎・皮膚筋炎. 宮坂信之 編. 膠原病の肺合併症診療マニュアル. 医薬ジャーナル社, 74-79, 2012.
4. 亀田秀人, 竹内勤. 多発性筋炎/皮膚筋炎. 小池隆夫, 住田孝之 編. GUIDELINE 膠原病・リウマチ治療ガイドラインをどう読むか—改訂第2版. 診断と治療社, 59-64, 2010.
5. 亀田秀人. 多発性筋炎・皮膚筋炎. 泉孝英 編集. ガイドライン外来診療2010. 日経メディカル開発, 463-464, 2010.
6. 亀田秀人. 多発性筋炎(皮膚筋炎). 山口徹, 北原光夫, 福井次矢 編. 今日の治療指針. 医学書院, 610-12, 2009.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀田 秀人 (KAMEDA hideto)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：00265795

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし