

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460664

研究課題名(和文) 抗線維化薬ピルフェニドンの筋ジストロフィーおよび内視鏡治療後食道狭窄への治療応用

研究課題名(英文) A novel therapy using Pirfenidone for muscular dystrophy and esophageal mucosal stenosis after endoscopic therapies

研究代表者

内田 友二 (UCHIDA, Yuji)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70433026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーおよび内視鏡治療後の食道粘膜狭窄の増悪過程に共通する病態であるマクロファージが関与する炎症反応に焦点を当てた。THP-1をマクロファージ様に分化させた細胞をpoly(I:C)やCSEなどで刺激した際に誘導されるサイトカインの生成量をELISA法にて評価した。その結果、IL-8の誘導が顕著であった。そこでIL-8を指標として、抗線維化薬のピルフェニドンによるIL-8の抑制効果を検討したところ、IL-8の抑制傾向が認められた。この系は簡便な系であり、炎症性サイトカインの分泌抑制については慢性炎症が関与する疾患の対する候補薬物のスクリーニングに有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused the inflammation concerning macrophage that is the common key cell between muscular dystrophy and esophageal mucosal stenosis caused after endoscopic therapies. We investigated the amount of cytokine secreted by THP-1 cells induced by CSE or poly(I:C) by ELISA. The result showed that the increase of IL-8 is most obvious. So, we used IL-8 as a parameter of the effect of pirfenidone. Pirfenidone reduced IL-8. The system is simple and useful for the screening of drugs for chronic inflammation.

研究分野：神経内科

キーワード：ピルフェニドン

1. 研究開始当初の背景

Pirfenidone(ピレスパ)を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー(以下 DMD) および早期食道癌(粘膜内癌)への内視鏡治療後の食道狭窄に対する治療研究は、細胞、疾患モデル動物、臨床試験いずれのレベルにおいても、PubMed を用いて検索した範囲では国内外いずれも報告されていない。

DMD の患者さんに対する根本治療としては、本研究課題のような薬物治療、申請者がこれまでに研究を進めてきた遺伝子治療、iPS 細胞などを利用する再生医療などの研究開発が進められている。しかしながら、骨格筋組織の線維化が顕著な進行期の患者さんに対しては、いずれの治療法も単独では治療効果が十分には得られない可能性が高い。遺伝子治療や再生医療に比べて本薬物治療法は忍容性が高く、倫理上の障壁が低いことが特徴である。また、この治療研究は疾患特異的なものではない。申請者が本研究課題で提案している投与方法や評価法は、既承認薬の他疾患への適応拡大(off-label use)に向けてのスクリーニングにも応用が可能である。筋ジストロフィーや早期食道癌に対する粘膜剥離術後の食道狭窄にとどまらず、慢性炎症や線維化がその病態に深く関与している様々な疾患に苦しむ多くの患者さんの新規治療法に発展していくことが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず慢性炎症の鍵となるマクロファージを CSE, poly(I:C)などで刺激した際に顕著に誘導される炎症性サイトカインを調べ、その発現の増加が Pirfenidone(ピレスパ)もしくは他の炎症抑制作用を有する薬物によって抑制されるかどうかを明確化することである。さらに炎症の抑制(治療)効果が証明された薬物については、その細胞内情報伝達系における作用点

や作用機序について追求することである。

3. 研究の方法

まずヒトリンパ球系の細胞株である THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)で 48 時間分化誘導をかけてマクロファージ様に分化させた細胞に poly(I:C)や CSE などの各種刺激を加えた後に誘導されるサイトカインやケモカインの生成/分泌量を ELISA 法にて蛋白レベルで評価する。その結果、誘導が顕著であったサイトカインなどを指標として、Pirfenidone(ピレスパ)をはじめ、従来から抗炎症薬として用いられているシクロオキシゲナーゼ阻害薬やステロイドとは異なる機序で炎症抑制効果が期待できる各種薬物を用いて、指標となるサイトカインの抑制効果を解析する。

4. 研究成果

筋ジストロフィーおよび内視鏡治療後の食道粘膜狭窄の増悪過程において共通する病態と考えられているマクロファージが関与する炎症反応に焦点を当てて研究を展開した。ヒトリンパ球系の細胞株である THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)で 48 時間分化誘導をかけてマクロファージ様に分化させた細胞に poly(I:C)や CSE などの各種刺激を加えた後に誘導されるサイトカインやケモカインの生成/分泌量を ELISA 法にて蛋白レベルで評価した。その結果、インターロイキン(以下、IL)-8 の誘導が顕著であった。そこで IL-8 を指標として、従来から抗炎症薬として用いられているシクロオキシゲナーゼ阻害薬やステロイドとは異なる機序で炎症抑制効果が期待できる各種薬物について IL-8 の抑制効果を検討したところ、抗線維化薬のピルフェニドンにおいて、

IL-8 の抑制傾向が認められた。ただし濃度依存性は認められなかった。

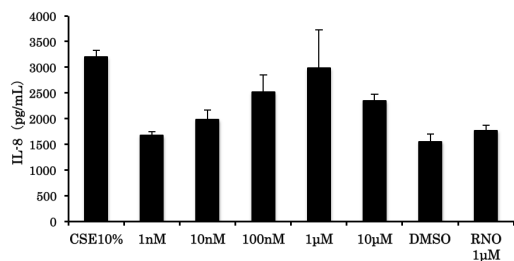


図 1.

ピルフェニドン (1nM~10 µ M) による IL-8 の抑制効果、横軸：ピルフェニドンの濃度、縦軸：IL-8 の分泌量

また、ホスホジエステラーゼ(以下 PDE)4 阻害薬のロフルミラストについても同様の検討を行ったところ、濃度依存性を有する IL-8 の抑制効果がみられた。

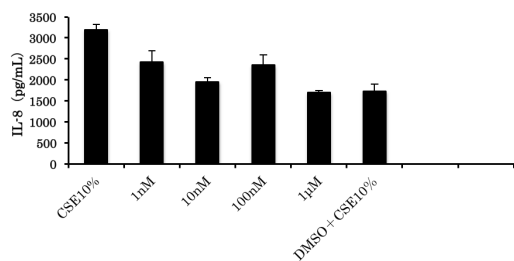


図 2.

ロフルミラスト(1nM~1 µ M) による IL-8 の抑制効果、横軸：ロフルミラストとの濃度、縦軸：IL-8 の分泌量

(溶媒である DMSO の最終濃度：0.1%)

しかしながら、詳細に検討したところ、この抑制作用には溶媒(DMSO)の影響が関与した可能性が高いと考えられた。

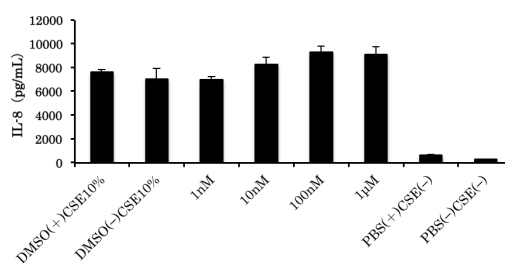


図 3.

ロフルミラスト(1nM~1 µ M) による IL-8 の抑制効果、横軸：ロフルミラストとの濃度、縦軸：IL-8 の分泌量

(溶媒である DMSO の最終濃度：0.001%)

この系は CSE 処理において炎症性サイトカインの 1 つである IL-8 を著明に増加させる簡便な系であることが確認された。さらに IL-8 を指標として用いることで、炎症性サイトカインの分泌抑制については慢性炎症が関与する疾患の対する候補薬物のスクリーニングに有用であることが示唆された。今後は引き続き、これまでの実験では測定が困難であったコラーゲンタンパクに対する評価方法の確立を続け、上記薬物により IL-8 のみならず最終的な治療標的であるコラーゲンタンパクの生成抑制効果が認められるかどうかの解析を行う予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田友二 (UCHIDA Yuji)
崇城大学・薬学部・准教授
研究者番号：70433026

(2)研究分担者

木村 円 (KIMURA En)
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・トランスレーショナルメディカルセンター・室長
研究者番号：60433025