

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461160

研究課題名(和文) PDGF阻害ペプチドによる肺線維症の新規治療法への展開

研究課題名(英文) A new strategy for treatment of lung fibrosis; Identification of a complementary peptide which inhibited PDGF/PDGFR signaling pathway

研究代表者

東 桃代 (AZUMA, Momoyo)

徳島大学・大学病院・特任講師

研究者番号：10403750

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)：特発性肺線維症は、未だ確立した治療法はなく極めて予後不良の疾患で肺線維化に至る病態解明も完全には明らかとなっていない。しかし、これまでの検討からPDGF/PDGFRシグナルは線維化に至る重要な役割を担っている。今回我々は、PDGF/PDGFRシグナルを阻害するペプチドを見出した。このペプチドは肺線維芽細胞の増殖を抑制し、またペプチドはマウス肺線維芽細胞に接着することを蛍光染色法にて確認した。ブレオマイシン肺線維症マウスモデルを用いた検討ではペプチドの気管内投与でAshcroft scoreの有意な抗線維化効果を認めた。特発性肺線維症に対する治療として疾患応用できる可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive disease with poor prognosis. The molecular mechanisms involved in the progression of IPF are not fully understood. However, the platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptor pathway is thought to play a critical role in fibrogenesis of the lungs. In the present study, we investigated whether the targeted inhibition of PDGF signal by using a complementary peptide, has the potential to regulate pulmonary fibrosis. Complementary peptides inhibited the proliferation of lung fibroblasts in response to PDGF. Additionally, we showed that complementary peptides bind to the surface of lung fibroblasts using immunofluorescence staining. Transbronchial administration of complementary peptides ameliorated the pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. These data suggest that it can become a promising target for therapeutic approaches to pulmonary fibrosis.

研究分野：肺線維症

キーワード：ペプチド 肺線維症 PDGF

1. 研究開始当初の背景

我々が疾患応用を目指している特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis : IPF) は、高度に肺線維化が進行し平均生存期間は 3~5 年と、極めて予後不良の難治性疾患であり未だ明らかな生命予後を延長する治療法は確立されていない。今後、さらなる病態解明と新規抗線維化薬の開発が重要な課題となっている。

申請者は、特発性肺線維症を含む肺線維症に対する様々な分子標的治療の開発を目的に研究を行っている。特に、肺線維化に關与する血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) に着目し、ブレオマイシン肺線維症モデルを用いて病態解析を行ってきた。その結果、PDGF レセプター阻害活性をもつ分子標的治療薬イマチニブが、抗線維化効果を持つことを報告した。 (*Am J Respir Crit Care Med* 171: 1279-1285, 2005, *Am J Respir Crit Care Med* 176:1243-1250, 2007) その後、イマチニブは米国で IPF 患者や難治性の線維性疾患である強皮症で臨床試験が行われた。IPF 患者では、臨床効果が得られなかった (*Am J Respir Crit Care Med* 181: 604-10, 2010) もの、phase IIa で強皮症患者の皮膚線維化や肺機能悪化に治療効果が認められ研究成果は臨床に反映されたものとなっている。

Ann Rheum Dis. 70:1003-9, 2011)

これまでの基礎と臨床研究成果 PDGF-PDGF レセプター経路の阻害が有望な線維化療法の分子標的であることを示している。しかしイマチニブは、慢性骨髄性白血病の治療薬として bcr/abl キナーゼ阻害作用がメインであり、特異的に PDGF レセプター阻害活性を持つ薬剤ではない。そこで我々は、今回、より特異的に PDGF シグナルを抑制する「ペプチド分子標的薬」を探求し疾患応用を目指するという着想に至った。

近年、抗体医薬に代表される高分子薬の弱

点を克服すべく、すでに「ポスト抗体医薬」の一つとして疾患および標的バイオマーカーを特異的に認識し阻害するペプチド創薬の分野が注目され研究開発がなされている。これまでに、蛋白質分子内の Antisense Homology Box (AHB) 部分のアミノ酸配列が相互にアンチセンスアミノ酸となっている部位間で相互反応をおこし、高次構造の形成と維持に重要な働きをしていることが提唱されている。 (*Nature Med.* 1:894-901, 1995) この AHB の概念を基盤に蛋白質の活性を阻害する機能ペプチドの設計が ANTIS/MIMETIC システムにより可能となっている。

(*Microbiol. Immunol.* 46:211-51, 2002)。この AHB の概念から設計された相補性ペプチドは、これまでアナフィラトキシン C5a 不活化ペプチドとして敗血症ショックの分野を中心に様々な臨床病態の解明や治療に向けて研究がすすめられ臨床応用が期待されている。 (*J Immunol.* 172:6382-7, 2004. *Nagoya Med J.* 50; 101-105, 2009)。

2. 研究の目的

今回我々は、今回我々は AHB の概念より合成された PDGF シグナル阻害活性を持つ相補性ペプチドについて検討をすすめ ANTIS/MIMETIC システムにより設計された候補ペプチドから PDGF シグナルの作用を制御できる相補性ペプチド A (18 アミノ酸残基) を見出した。本研究の目的は、相補性ペプチド A の機能解析と、ブレオマイシン肺線維症マウスモデルを用い治療効果を検討し特発性肺線維症に対する「ペプチド分子標的薬」としての疾患応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

PDGF-B 分子中で PDGFR と AHB の関係にある相補性ペプチドの設計を株式会社蛋白科

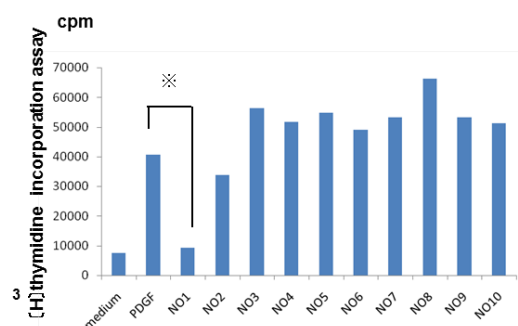
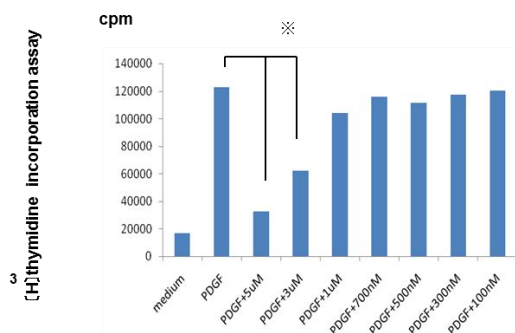
学研究所に依頼した。10 個の候補ペプチドが PDGF の機能を抑制するか、スクリーニング実験を行った。スクリーニングとして PDGF 刺激によるマウス線維芽細胞の増殖抑制効果の有無を相補性ペプチド依存性に検討した。

また肺線維芽細胞と相補性ペプチドの Binding を検討した。FAM で標識したペプチドをマウス線維芽細胞に PDGF-B 存在下で反応させ FACS を行った。陰性コントロールは、配列をランダムに並べ替えた random peptide を用いた。また免疫蛍光染色法も用い表面への接着を検討した。

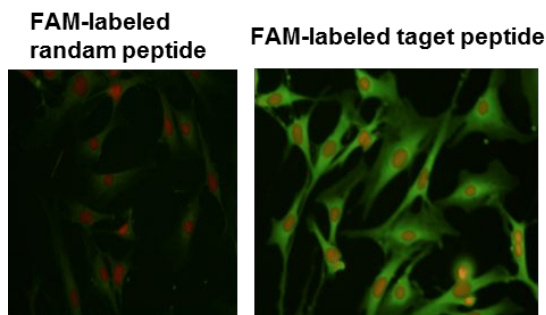
また、ブレオマイシン肺線維マウスモデルに相補ペプチドを経気管支的に投与し治療効果を検討した

4 . 研究成果

PDGF-B 分子中で PDGFR と AHB の関係にある相補性ペプチドの設計を株式会社蛋白質科学研究所に依頼した。10 個の候補ペプチドが PDGF の機能を抑制するか、スクリーニング実験を行った。相補性ペプチド A (18 アミノ酸残基) が、PDGF-BB 刺激による肺線維芽細胞増殖を抑制する効果を認めた。次に相補性ペプチド A による濃度依存性の細胞増殖抑制効果を検討した。相補性ペプチド A は 3~5 μ M の濃度で PDGF-B 刺激による細胞増殖を有意に抑制した。



また、次に、肺線維芽細胞と相補性ペプチド A の Binding を検討した。FAM で標識したペプチドをマウス線維芽細胞に PDGF-B 存在下で反応させ FACS を行った。陰性コントロールは、配列をランダムに並べ替えた random peptide を用いた。また免疫蛍光染色法でも検討した結果、相補ペプチド A の細胞表面への接着が確認された。また免疫蛍光染色でも明らかな細胞表面への候補ペプチドの接着が確認された。



相補性ペプチド A の治療実験では、肺線維症モデルは 8 週齢 C57BL/6 マウスに BLM を mini-osmotic pump にて持続皮下投与し作成した。一般的にペプチドは血中半減期が数分程度と極めて短く、経静脈投与では分解され肺への移行率は、極めて悪いことが予想された。

よって相補ペプチド A100 μ g/body の経気管投与を計画した。投与は線維化期に一致する Day14-28 の後半投与を行った。Trypan Blue 染色液をペプチド溶解液と同量の 200 μ l 投与し肉眼的に末梢肺まで全体的に染色され薬

剤は到達していることを確認した。相補ペプチド A100ug/body の経気管投与を ay14-28 の後半投与を行ったところプレオマイシン肺線維症マウスモデルを用いた検討ではペプチドの気管内投与で Ashcroft score の有意な抗線維化効果を認めた。

今回我々は、PDGF/PDGFR シグナルを阻害するペプチド見出した。このペプチドは肺線維芽細胞の増殖を抑制し、またペプチドはマウス肺線維芽細胞に接着することを蛍光染色法にて確認した。またプレオマイシン肺線維症マウスモデルを用いた検討ではペプチドの気管内投与で Ashcroft score の有意な抗線維化効果を認めた。特発性肺線維症に対する治療として疾患応用できる可能性があると思われる。

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6件)

【欧文原著】

1.Aono Y, Kishi M, Yokota Y, Azuma M, Kinoshita K, Takezaki A, Sato S, Kawano H, Kishi J, Goto H, Uehara H, Izumi K, Nishioka Y. Role of PDGF/PDGFR axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 51(6):793-801, 2014.

査読あり

2.木下勝弘, 青野純典, 竹崎彰夫, 岡崎弘泰, 吉嶋輝実, 岸昌美, 東桃代, 岸潤, 泉啓介, 西岡安彦. プレオマイシン肺線維症モデルにおけるFAKシグナル阻害薬の抗線維化効果. 分子呼吸器病 18(1):154-157, 2014.

査読なし

3.Kinoshita K, Aono Y, Azuma M, Kishi J, Takezaki A, Kishi M, Makino H, Okazaki H.

Uehara H, Izumi K, Sone S, Nishioka Y. Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 49(4):536-543, 2013.

査読あり

4.Nishioka Y, Azuma M, Kishi M, Aono Y. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *J Med Invest*. 60(3,4):175-183, 2013.

査読あり

5.Makino H, Aono Y, Azuma M, Kishi M, Yokota Y, Kinoshita K, Takezaki A, Kishi J, Kawano H, Ogawa H, Uehara H, Izumi K, Sone S, Nishioka Y. Antifibrotic effects of CXCR4 antagonist in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Med Invest*. 60(1-2):127-137, 2013.

査読あり

6.Nishioka Y, Azuma M, Kishi M, Aono Y. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *J Med Invest*. 60(3,4):175-183, 2013.

査読あり

[学会発表](計3件)

1.岸昌美, 青野純典, 東桃代, 木下勝弘, 佐藤正大, 吉嶋輝実, 竹崎彰夫, 西岡安彦. PDGF レセプター- , 阻害抗体のプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける抗線維化効果. 第54回日本呼吸器学会学術講演会. 大阪. 2014年4月26日.

2. Kinoshita K, Aono Y, Goto H, Azuma M, Takezaki A, Yoshijima T, Kishi M, Kishi J, Toyoda Y, Kawano H, Abe S, Tezuka T, Uehara H, Izumi K, Nishioka Y. Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 横浜. 2013年11月12日.

3. 阿部秀一, 青野純典, 岡崎弘泰, 岸昌美, 竹崎彰夫, 木下勝弘, 東桃代, 岸潤, 西岡安彦. 肺線維症における増殖因子産生を介した fibrocyte の役割と検討. 第53回日本呼吸器学会学術講演会, 東京. 2013年4月20日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

東 桃代 (AZUMA, Momoyo)
徳島大学・病院・特任講師
研究者番号：10403750