

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460104

研究課題名(和文) ストレスタンパク質に着目した、肺線維化抑制機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of suppressing pulmonary fibrosis by stress proteins and its application to IPF therapy

研究代表者

田中 健一郎 (Tanaka, Ken-ichiro)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：30555777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で私は、治療法が確立されていない難病である特発性肺線維症の発症や重症化を抑制しているストレスタンパク質を同定し、その分子機構を解明した。また、既存薬ライブラリーからそのストレスタンパク質を増やし、且つ、線維化ストレスを抑制するものを検索し、新規のIPF治療薬の候補として提案した。さらに、薬剤性肺線維症に関しても、炎症に注目した動物モデルの構築を行い、そのモデルに対するストレスタンパク質の効果を検討した。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and devastating chronic lung condition with poor prognosis; mean length of survival from time of diagnosis is 2.8-4.2 years. Current agents for treatment of IPF, such as steroids and immunosuppressants, have not been found to improve prognosis. In this study, I identified stress proteins that suppress the onset and progression of IPF, and elucidated the molecular mechanism. I also proposed a new candidate for IPF therapy from a library of medicines already in clinical use. Furthermore, for drug-induced pulmonary fibrosis, we also constructed an animal model focusing on inflammation and examined the effect of stress proteins on the model.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：ストレスタンパク質 肺線維症 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症とは：特発性肺線維症 (IPF) は肺が徐々に線維化し、呼吸がなくなる疾患である。現在有効な治療法はなく、診断後5年以内に80%以上の方が亡くなる深刻な疾患である。最近の研究からIPFは、活性酸素などによって傷害された組織を修復するために起こる線維化が異常に亢進するために起こることが分かってきた。また、増加した活性酸素は、肺胞上皮細胞傷害や線維芽細胞の活性化 (筋線維芽細胞への分化やコラーゲンの過剰産生) に大きく関与することが知られている。そこで私は、活性酸素による組織傷害を抑える物質がIPF治療薬として有望であると考えた。

ストレスタンパク質とは：細菌からヒト細胞に至るまで、細胞は様々なストレスに常に曝されている。細胞はこれらストレスに対してストレスタンパク質を産生しストレスに対抗している。熱ショックタンパク質 (HSP) やスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は代表的なストレスタンパク質である。HSPはストレスによってその産生が促進され、細胞をストレスに耐性化する。一方SODは、最も傷害性が高い活性酸素で多くの疾患の根本的な原因になっているスーパーオキシドアニオンを消去する酵素である。様々な疾患部位において、HSPやSODの産生が促進されていることを発見した私は、生体はストレスタンパク質を増やすことにより疾患に対抗しており、このストレスタンパク質が不足すると疾患が発症・重症化する、即ち、ストレスタンパク質を増やすタイプの医薬品は疾患に有効であるという新しいアイデアを提唱した。

IPFにおけるHSPの役割とHSP誘導薬によるIPF治療の可能性：肺線維症に限らず、種々の疾患におけるHSPの役割はほとんど理解されていなかった。そこで私は最も細胞保護作用の強いHSP70に注目し、様々な疾患におけるHSP70の役割を解析した。その結果、IPF、胃潰瘍、小腸潰瘍、及び炎症性腸疾患の動物モデル、及び患者さんから得た臨床サンプルにおいて、HSP70の産生が増えていることを見出した。そして遺伝子改変技術、及

びHSPの産生を増やす薬を用いてHSP70を増加させると、これら疾患の動物モデルにおいて予防・治療効果が見られることを発見した。またHSP70が抗炎症作用を持つことを発見するなど、この予防・治療効果に関する分子機構を明らかにした (JBC 2006; 2007; 2009; 2010; Oncogene 2006; Biochem Pharmacol 2010, 2011, 2012; Nature Communications 2013)。

薬剤性肺線維症について：抗癌剤等の副作用として肺が線維化することが知られており、薬剤性肺線維症と呼ばれている。特にイレッサによる薬剤性肺線維症により多くの方が亡くなり社会問題にもなっているが、その発症機構は全く分かっていなかった。我々はHSP70が肺線維化を抑えているという上述の発見から、「薬剤性肺線維症を起こす薬剤の中には、HSP70を減らす薬剤があるのではないか」と考え、イレッサがHSP70を減らすこと、及びHSP誘導薬を用いてイレッサによるHSP70減少を抑えるとイレッサによる肺線維化を抑制できることを発見した (Cell Death Differ 2010; PLoS ONE 2011)。

この結果は、肺線維化を抑制するストレスタンパク質の発見は、薬剤性肺線維症の発症機構の解明、及び治療薬の開発にも繋がることを示している。

SODによるIPF治療：私はIPF、炎症性腸疾患、COPDの動物モデル、及びこれら疾患の臨床サンプルにおいて、SODの産生が促進されていることを見いだした。またSODにリン脂質を結合させその組織親和性と血中安定性を向上させたDDS製剤・PC-SODを開発し、この薬がこれら疾患の動物モデルで予防・治療効果を発揮することを見出した (JPET 2009; 2011; 2013; Am J Physiol 2010; 2012; Chest 2012)。尚、このタンパク質にリン脂質を結合させるDDS技術は他のストレスタンパク質にも有効であると思われるので、本研究で利用する。

2. 研究の目的

研究計画の概略：これまでの研究成果から私は、IPF患者の肺で増えているストレスタンパク質は、疾患の発症・重症化を抑制して

いると考えた。そこで本研究では、IPF 患者の肺での遺伝子発現解析結果を利用して、産生が増えているストレスタンパク質を同定する。そしてその中から、疾患の発症・重症化を抑制しているストレスタンパク質を同定すると共に、その詳細な分子機構を明らかにする。さらに、同定されたストレスタンパク質を増やし、且つ、線維化ストレスを抑制する物質を発見し、IPF 治療薬の開発へ繋げる。生体が疾患に対抗するために元々持っているストレスタンパク質を増やすタイプの医薬品は安全面で優れていると予想されるが、さらに安全性を担保するため、ドラッグリポジショニング戦略を選択する。尚、上述のイレッサの研究同様、同定されたストレスタンパク質に着目し薬剤性肺線維症の発症機構を解明しその治療法を確立する研究（薬剤による急性増悪モデルの構築と予防薬の検討）も行う。

ドラッグリポジショニング戦略：近年、発売される新薬が減少している（2010 年問題）。この主な原因は、臨床試験で予想外の副作用が発生することである。そこで私は、副作用リスクを減らすために、ヒトでの安全性が十分に確認されている既存薬から目的の薬理作用を持つ薬を発見し、その既存薬を別の疾患治療薬として開発する研究戦略（ドラッグリポジショニング）を推進している。臨床試験で予想外の副作用が発生するリスクが少なく、かつ短時間で開発が完了することがこの研究戦略のメリットである。そこで本研究では、上述のストレスタンパク質を増やす薬（誘導薬）のスクリーニングを、既存薬ライブラリーから行う。

3. 研究の方法

肺線維化に対して抑制的に働いているストレスタンパク質の同定と肺線維化抑制機構の解明

臨床データ（IPF 患者の肺での遺伝子発現解析結果）や過去の報告から肺線維化に対して抑制的に働いている可能性のあるストレスタンパク質の同定を行った。その後、それらのストレスタンパク質の誘導が IPF の発症・重症化の抑制に寄与しているかを、各ス

トレスタンパク質の過剰発現マウスや特異的な誘導剤等を用いて、プレオマイシン依存肺線維化の症状の改善が見られるかを調べた。

個々のストレスタンパク質による肺線維化抑制機構の解明

動物実験において、で候補となったストレスタンパク質が線維化のどのステップを抑制しているのかを明らかにした。肺線維化では、まず上皮細胞死が起こり、次に炎症反応、そして最終的に線維化が起こる。そこで上皮細胞死（TUNEL 法）、肺胞洗浄液中での炎症性細胞数、ヒドロキシプロリン量（コラーゲン量）を調べ、ストレスタンパク質により抑制されている反応を同定する。

特にコラーゲン産生の抑制は肺線維化において重要であるので、より詳細な解析を実施した。具体的には、線維化において、TGF-beta1 の産生、線維芽細胞から線維芽細胞への分化、線維芽細胞における過剰なコラーゲン産生、上皮細胞の間葉系細胞への形質転換（EMT 誘導）などに着目して解析した。

各ストレスタンパク質誘導薬のスクリーニング

既存薬ライブラリーから、で同定した肺線維化を抑制するストレスタンパク質を誘導する（増やす）薬をスクリーニングする。まず、個々のストレスタンパク質遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、それを保持させた細胞を用いた系で 1 次スクリーニングを行い、イムノプロット法で 2 次スクリーニングを行う。また、線維化には TGF-beta1 が非常に重要な役割を果たしているため、線維化ストレス（TGF-beta1）による過剰なコラーゲン産生を抑制することも選択の基準とした（3 次スクリーニング）。さらに、毒性の少ない誘導薬を得たいので、4 次スクリーニングではその既存薬の細胞毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度でストレスタンパク質の産生を誘導するもの、線維化ストレスによる過剰なコラーゲン産生を抑制するものを選択する。5 次スクリーニングではその既存薬をマウスに投与し、目的のストレスタンパク質の肺での産生を誘導するかを検討する。

選択したストレスタンパク質誘導薬等の疾患治療薬としての評価

選択したストレスタンパク質を誘導する既存薬の効果を試験管内で評価した。また、肺線維化に関連する alpha-SMA や smad3 のリン酸化を既存薬が抑制するか検討した。次に、ブレオマイシン依存肺線維化動物モデルでも同様の検討を行った。結果を総合的に判断し、IPF 治療薬の候補を選出した。

薬剤性肺線維症発症機構の解明と、その治療法の確立

薬剤性肺線維症を起こすことが知られているのは、抗癌剤（イマチニブ・ゲムシタピンなど）、抗リウマチ薬（メトトレキサート・レフルノミドなど）、漢方薬（小紫胡湯など）、アミオダロンである。これらの薬剤依存に肺線維化が急激に悪化する（急性増悪する）ことが知られている。また、急性増悪時には炎症反応が亢進することが知られているので、炎症増悪に注目して急性増悪モデルを構築した。具体的には、これらの薬剤や炎症を惹起する物質（LPS など）をこのモデルに投与し誘発された肺線維症の急性増悪症状がストレスタンパク質の DDS 製剤や生理活性物質によって改善されるかを検討した。

4．研究成果

対象とするストレスタンパク質の同定とそのタンパク質による肺線維症抑制メカニズムの検討

臨床データや過去の報告から解析した結果、HSP25、GRP78（小胞体ストレスによって誘導されるタンパク質）、HO-1（ヘムオキシゲナーゼ）、GST（グルタチオン S トランスフェラーゼ）、Catalase（活性酸素除去に働く）である。そこで、これらのストレスタンパク質の誘導が IPF の発症・重症化の抑制に寄与しているかを、これらの誘導剤などを用いて、調べた結果、HO-1 や GST がブレオマイシンによる肺線維化を顕著に抑制することを発見した。また、肺線維症抑制メカニズムを GST に注目して解析した結果、GST が BLM による上皮細胞死の誘導、TGF-beta1 の活性化、alpha-SMA の発現上昇を抑制することを見出した。また、GST による活性酸素の除去がこ

れらの作用に重要であることを見出した。

ストレスタンパク質誘導薬のスクリーニングと BLM モデルでの検討

既存薬ライブラリーからストレスタンパク質を誘導し、且つ、線維化ストレスによるコラーゲン産生を抑制する化合物を上述の方法にしたがってスクリーニングを行い、11種類の化合物を選出した。選出した化合物の中で、Felodipine というカルシウム拮抗薬が最も顕著にブレオマイシン肺線維化を抑制することを見出した。また、私は Felodipine が線維化ストレスによって誘導される alpha-SMA の産生や smad3 のリン酸化を *in vivo*, *in vitro* の系で抑制することを見出した。

薬剤性肺線維症発症機構の解明と、その治療法の確立

薬剤性肺傷害の原因として知られている薬剤や炎症を惹起する物質（LPS など）を BLM モデルに投与し誘発された肺線維症の急性増悪症状が、ストレスタンパク質の DDS 製剤や生理活性物質によって改善されることを見出した。

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)

Yamashita Y, Tanaka K, Asano T, Yamakawa N, Kobayashi D, Ishihara T, Hanaya K, Shoji M, Sugai T, Wada M, Mashimo T, Fukunishi Y, Mizushima T. Synthesis and biological comparison of enantiomers of mepenzolate bromide, a muscarinic receptor antagonist with bronchodilatory and anti-inflammatory activities. *Bioorg Med Chem*. 2014 Jul 1;22(13):3488-97. 査読有 . doi: 10.1016/j.bmc.2014.04.029.

Ishihara T, Hayashi E, Yamamoto S, Kobayashi C, Tamura Y, Sawazaki R, Tamura F, Tahara K, Kasahara T, Ishihara T, Takenaga M, Fukuda K,

Mizushima T. Encapsulation of beraprost sodium in nanoparticles: analysis of sustained release properties, targeting abilities and pharmacological activities in animal models of pulmonary arterial hypertension. *J Control Release*. 2015 Jan 10;197:97-104. 査読有. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.10.029.

Kurotsu S, Tanaka K, Niino T, Asano T, Sugizaki T, Azuma A, Suzuki H, Mizushima T. Ameliorative effect of mepenzolate bromide against pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Jul;350(1):79-88. 査読有. doi: 10.1124/jpet.114.213009.

Tanaka Y, Ishitsuka Y, Hayasaka M, Yamada Y, Miyata K, Endo M, Kondo Y, Moriuchi H, Irikura M, Tanaka K, Mizushima T, Oike Y, Irie T. The exacerbating roles of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the preventive effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) against pulmonary fibrosis in mice. *Pharmacol Res*. 2015 Sep;99:52-62. 査読有. doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.004.

Uchihara Y, Tanaka K, Asano T, Tamura F, Mizushima T. Superoxide dismutase overexpression protects against glucocorticoid-induced depressive-like behavioral phenotypes in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):873-7. 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.085.

Tanaka K, Sugizaki T, Kanda Y, Tamura F, Niino T, Kawahara M. Preventive Effects of Carnosine on Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. *Sci Rep*. 2017 Feb 16;7:42813. 査読有. doi: 10.1038/srep42813.

Tanaka K, Niino T, Ishihara T, Sugizaki

T, Takafuji A, Takayama T, Kanda Y, Tamura F, Kurotsu S, Kawahara M, Mizushima T. Protective and therapeutic effect of felodipine against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Sci Rep*. 査読有. *in press*.

〔学会発表〕(計 3件)

田中健一郎. Drug discovery and development for COPD by drug re-positioning strategy. 第89回日本薬理学会年会, 2016.3.9-3.11, パシフィコ横浜(横浜)

Niino T, Ishihara T, Tanaka K. PROTECTIVE AND THERAPEUTIC EFFECT OF FELODIPINE AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS IN MICE. アジア太平洋呼吸器学会 (APSR2016), 2016.11.12-11.15, The Queen Sirikit National Convention Center (Bangkok) 神田侑季、川原正博、田中健一郎. LPS急性肺傷害に対する抗酸化ペプチド・カルノシンの予防効果の検討、第91回日本薬理学会年会, 2016.3.15-3.17, 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール アストピア(長崎)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 健一郎 (TANAKA KEN-ICHIRO)

武蔵野大学・薬学部・薬学研究所・講師

研究者番号: 30555777