

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461192

研究課題名(和文) PAR-2アンタゴニストはIPF急性増悪新規治療薬になりうるか？

研究課題名(英文) The potential of PAR-2 antagonist for treatment of IPF-acute exacerbation

研究代表者

鈴木 朋子 (Suzuki, Tomoko)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：10400342

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)：特発性肺線維症急性増悪の新規治療薬の可能性を探るべく、ブレオマイシン(BLM)マウスモデルを用いPAR-2アンタゴニストの抗炎症、抗線維化作用を検証した。PAR-2阻害ペプチド(IP)を吸入させたBLMマウスでは、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球数が有意に低下、病理でも炎症細胞の浸潤抑制がみられ抗炎症作用が示唆された。またPAR-2IP投与群では肺コラーゲン量も有意に抑制していた。さらにPAR-2IP処理群ではBLM単独群に比しVimentin発現が抑制されていたことからPAR-2IPはBLMマウスモデルに対し抗炎症作用を示し、上皮間葉転換抑制を介して抗線維化作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate a potential of PAR-2 antagonist for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis-acute exacerbation, we studied anti-inflammation and anti-fibrotic effects for bleomycin-treated mice. The number of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of BLM mice treated intranasally with PAR-2 inhibiting peptide (IP) was significantly reduced, and infiltrations of inflammatory cells in lung were also suppressed. Total collagen in lungs of PAR-2IP-treated BLM mice was significantly reduced. Furthermore, Vimentin on PAR-2IP-treated BLM mice was less expressed than in BLM mice. Therefore, PAR-2 IP has anti-inflammatory effect, and inhibits BLM-induced fibrosis through the control of epithelial-mesenchymal transition.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺線維症急性増悪

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の急性増悪は、未だその機序が明らかになっておらず、難治性病態の一つとされている。急性増悪を来たした後の平均生存期間は2ヶ月以内と、予後は非常に厳しく、依然有効な新規治療の開発が急務である。われわれは、以前より肺障害において protease activated receptor (PAR)s に注目していた。PARs は血小板、血管内皮細胞や上皮細胞にも発現しており、凝固系のみならず炎症全般に広く関与することが知られている。PARs はトロンピンやトリプシン・トリプターゼのレセプターであり、臨床的に経験する IPF 急性増悪時のような激しい肺の炎症と凝固線溶系の亢進を結びつける key molecule の一つと考えられる。

われわれはこれまで、*in vitro* の急性肺傷害モデル実験にて、好中球エラスターゼが PAR-1 を介して上皮細胞のアポトーシスを促進することを発表していた (Suzuki T et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:231-247, Suzuki T et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:742-755)。一方 PAR-2 は創傷治癒に関わることも知られており、FXa による PAR-2 を介した上皮細胞の修復促進、PAR-2 agonist による fibrin 形成増強や、(Ewen D et al. *Clin Exp Allergy* 2010;40:435-449) FXa は PAR-2 を介し線維芽細胞の増生、筋線維芽細胞への分化を促すことなども知られている (Borensztajn K et al. *Am J Pathol* 2008;172:309-320)。そこでわれわれは、IPF と PARs の関係を解明すべく、H23 ~ 25 年度基盤研究 C で「PAR-2 制御による IPF 急性増悪新規治療法の探究」のタイトルで、*in vitro* において PAR-2 の活性化が Transforming growth factor (TGF)- $\beta_1$  の合成を促進し線維化の一因とも考えられている上皮細胞の epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導することまで証明し得た。

2. 研究の目的

*in vitro* において PAR-2 の活性化が線維化の一因とも考えられる EMT を誘導することが証明されたことを受けて、本研究では、IPF 急性増悪において PAR-2 の *in vitro* に引き続き *in vivo* あるいは実臨床での働きを明確にし、PAR-2 アンタゴニストの IPF 急性増悪における新規治療薬としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) C57Bl/6 マウス (野生型 WT) を用いブレオマイシン (BLM) 肺障害モデルを作製する。三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン + ミダゾラム + 酒石酸ブトルファノールの混合薬) を腹腔内投与し、BLM 溶液 (1mg/body in 45 $\mu$ l of PBS) を経気管的に投与、コントロールとして等量の生理食塩水を投与したのも合わせて作製する。

(2) C57Bl/6 wild type の BLM 投与モデルにおいて、PBS (コントロール) 投与マウスと PAR-2 アンタゴニストを加えたマウスと肺

障害の程度を比較する。PAR-2 アンタゴニストは、PAR-2 inhibiting peptide (IP) (P2pal-18S 1mg or 2.5mg/kg) であり、BLM 投与 30 分前に吸入麻酔下で経鼻的に投与する。BLM 投与後毎日 1 回同様の PAR-2IP を投与し、3 日目、7 日目、14 日目、21 日目に、全身麻酔下で右室からの全血採血、気管支肺胞洗浄を行う。安楽死後に肺を摘出する。

(3) 上記検体を用い以下の実験を行う。

血液：凝固線溶系因子、炎症性サイトカイン測定

気管支肺胞洗浄液 (BALF)：BALF 中の細胞数、細胞分画、凝固線溶系、炎症性サイトカインの測定。抗 PAR-2 切断ペプチド抗体を用い競合 ELISA の実施

肺組織：TGF- $\beta_1$ 、コラーゲン-1 や SMA などの発現確認

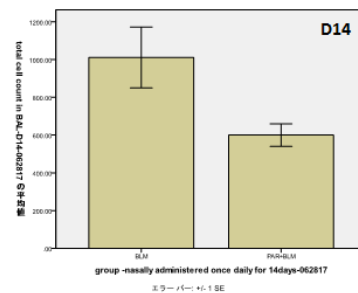
肺病理：肺組織の病理学的所見 EMT (E-cadherin や Vimentin) の免疫染色。N 末あるいは C 末を認識する PAR-2 抗体で、PAR-2 の発現を免疫染色で確認

4. 研究成果 (データは全て未発表。今後発表予定。)

(1) PAR-2 IP は BLM により増加する BALF 中の細胞数、リンパ球の増加を抑制した。

BLM 肺障害マウスモデルでは、BALF 中のリンパ球浸潤が顕著となるが、PAR-2 IP 処理により BLM 投与後 3 日目、7 日目、14 日目、21 日目、すべてのポイントにおいて全細胞数およびリンパ球数が有意に抑制されていた。

PAR-2 IP decreases BLM-induced total cells in BALF

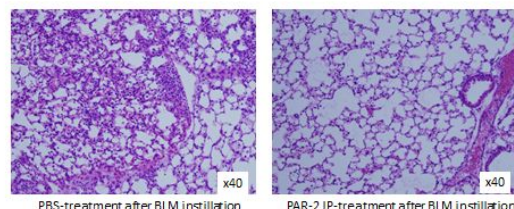


(2) PAR-2 IP は BLM により誘発される炎症細胞の浸潤や線維化を抑制した。

BLM 肺障害マウスモデルでは、初期には炎症性細胞の浸潤が、後期には肺組織の線維化が誘発されるが、PAR-2 IP 処理により BLM 投与後 7 日目、14 日目 21 日目にそれぞれ炎症細胞の浸潤や線維化が抑制されてい

PAR-2 IP reduces BLM-induced lung injury

D7

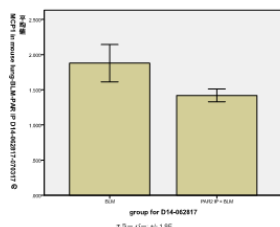


PBS-treatment after BLM instillation

PAR-2 IP-treatment after BLM instillation

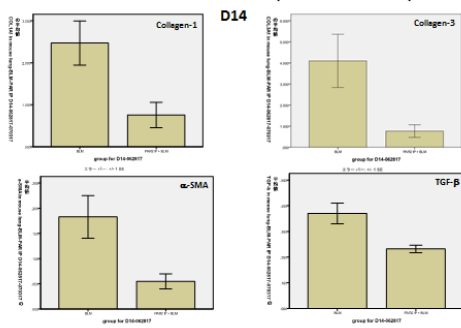
た。  
 (3) PAR-2 IP は BLM により増加する肺組織の炎症性サイトカイン量を抑制した。  
 BLM 肺障害マウスモデルでは、炎症性サイトカインの発現が亢進するが、PAR-2 IP 処理により、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ など、RNA レベルでその発現が抑制されていた。

PAR-2 downregulates MCP-1 expression

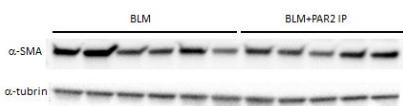


(4) PAR-2 IP は BLM により誘発される pro-fibrotic response を抑制した。  
 BLM 肺障害マウスモデルでは、肺の線維化の前駆症状として  $\alpha$ -SMA や collagen の合成が促進されるが、PAR-2 IP 処理により、RNA・タンパクレベルともにその現象は抑制された。

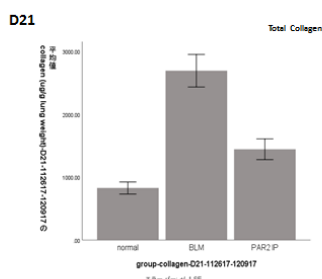
PAR-2 IP inhibits BLM-induced profibrotic responses



PAR-2 IP reduces BLM-induced  $\alpha$ -SMA



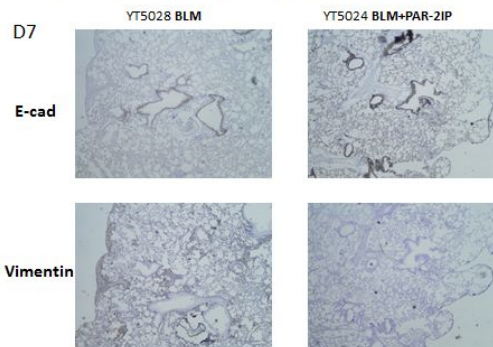
PAR-2 IP inhibits BLM-induced pulmonary fibrosis



(5) PAR-2 IP は BLM により促進される EMT を抑制した。

先行実験で証明された PAR-2 活性によって肺胞上皮の EMT 促進が、BLM 肺障害マウスモデルで起こるのかを確認し、さらにその現象が PAR-2IP にて抑制されることを肺組織の免疫染色で確認した。BLM で誘導された Vimentin の発現は PAR-2IP 処理により抑制されることが示された。

PAR-2 IP reduces BLM-induced EMT



(6) BLM 肺障害モデルにおいて PAR-2 を介して EMT が促進し線維化につながることを示唆されるが、それをつなぐ molecule として HMGB1 に着目した。PAR-2IP により炎症早期には BLM により誘発された HMGB1 の発現は RNA レベルおよびタンパクレベルともに抑制されていた。

(7) 現在は以下の 2 点につき検索中である。  
 BLM マウス肺および IPF 患者肺組織における PAR-2 の活性化につき、免疫染色で確認。  
 IPF 患者および IPF-急性増悪患者の BAL 検体を用い PAR-2 cleaved 抗体を作製し競合 ELISA を施行。

(ヒト検体については倫理委員会にて承認済み)

(8) (7)が終了次第、*in vitro* 実験 (H23~25 年度基盤研究 C で「PAR-2 制御による IPF 急性増悪新規治療法の探究」) のデータとあわせ論文文化に取り掛かる予定である。なお、今回の研究成果については、2019 年度の American Thoracic Society あるいは European Respiratory Society で発表する予定である。

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)

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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 鈴木 朋子  
(Suzuki Tomoko)  
福島県立医科大学 会津医療センター  
漢方医学講座 准教授  
研究者番号：10400342

(2)研究分担者 棟方 充  
(Munakata Mitsuru)  
福島県立医科大学 会津医療センター  
教授・附属病院長  
研究者番号：00209991

研究分担者 谷野 功典  
(Tanino Yoshinori)  
福島県立医科大学 呼吸器内科学講座  
准教授  
研究者番号：10443863

研究分担者 王 新涛  
(Wang Xintao)  
福島県立医科大学 血液内科学講座  
助教  
研究者番号：00448630

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )