

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861135

研究課題名(和文)肺線維症・間質性肺炎とその急性増悪に対するCNPを用いた新規治療の基盤確立

研究課題名(英文)The development of a new therapy against interstitial lung disease using CNP

研究代表者

木村 亨(Kimura, Toru)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：90580796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：間質性肺炎の急性増悪に対するC型ナトリウム利尿ペプチド(C-type natriuretic peptide; CNP)の治療効果を検討した。まず、肺線維症・間質性肺炎急性増悪のマウスモデルを作製した。次に、肺の急性炎症に対するCNPの治療効果とその機序を明らかにした。また、CNP投与マウスや線維芽細胞CNP過剰発現マウスにおいて、肺の線維化抑制効果を示した。さらに、肺癌切除症例の臨床検体から得られた肺線維芽細胞で、正常肺と間質性肺炎合併肺のいずれにもGC-B受容体が発現し、TGF- β 刺激に対してCNPが抑制的に作用することを示した。

研究成果の概要(英文)：We first developed a new mouse model of acute exacerbation (AE) of interstitial lung disease (ILD) for further investigation of prophylactic interventions. Secondly, our study revealed that C-type natriuretic peptide (CNP) had anti-inflammatory effect against LPS-induced acute lung injury mode (as one of the inflammatory stimulation models which induce AE) and anti-fibrotic effect against BLM-induced pulmonary fibrosis model. Additionally, our data suggest that CNP ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by suppressing TGF- β signaling and myofibroblastic differentiation in lung fibroblasts. Therefore, we propose consideration of CNP for clinical application to treatment for pulmonary fibrosis and its exacerbation.

研究分野：肺外科

キーワード：肺外科

1. 研究開始当初の背景

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP; C-type Natriuretic Peptide) は1990年寒川、松尾(現、国立循環器病研究センター所長、名誉所長)らにより単離同定されたペプチドホルモンで、グアニル酸シクラーゼ B (GC-B) 受容体に結合し、様々な生理活性を発揮することが明らかとなっている。主な作用として、動脈硬化病変での内膜肥厚の抑制効果や心筋梗塞後の心臓肥大・線維化の抑制効果が知られている。また、薬剤誘発性肺炎における炎症細胞浸潤および線維化の抑制や、肺線維症の進行を緩和する効果が報告されている。心・血管に対する CNP の効果として、血管内皮細胞の増殖促進や平滑筋細胞の増殖抑制効果などは明らかにされているが、線維芽細胞に対する効果はこれまで報告がない。CNP と同じファミリーに属する心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP; Atrial Natriuretic Peptide) と脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP; Brain Natriuretic Peptide) は、急性心不全に対する第一選択薬 (ANP) や心不全の診断マーカー (BNP) として広く利用されているが、CNP は未だ臨床応用されていない。

肺線維症や間質性肺炎は、肺間質と呼ばれる肺胞隔壁を炎症・線維化病変の場とする疾患で、その病態において線維芽細胞は、増殖因子や炎症性サイトカイン、細胞外基質を産生し、炎症・線維化の進行に重要な役割を果たすとされている。肺線維症・間質性肺炎には診断後の平均生存期間が 2.5~5 年間という予後不良な難治性・進行性の疾患も含まれ、有効な治療法がないのが現状である。また、経過中に感冒などを契機として急激に病状が進行する急性増悪を来した場合、その平均生存期間は2ヶ月以内とされている。さらに、これらの疾患は高率に肺癌を合併することが報告されているが、間質性肺炎を合併した肺癌の手術療法については、急性増悪を含む合併症の頻度が高いことが知られている。

2008 年度の日本呼吸器外科学会の統計では、間質性肺炎合併肺癌の術後急性増悪は、術後死亡の主因であることが明らかにされている。加えて、肺線維症および間質性肺炎に合併する肺癌の治療において、化学療法および放射線療法は、肺線維症および間質性肺炎の急性増悪を惹起する危険性があることも知られている。これらのことから、肺線維症や間質性肺炎は、その病状の進行抑止や急性増悪の予防・治療が可能な薬剤の創出が必要とされている。

2. 研究の目的

C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP; C-type Natriuretic Peptide) は、動物実験モデルでの肺線維症の抑制効果が報告されているが、その作用機序は明らかにされていない。今回申請者は、肺線維症・間質性肺炎に対する CNP の治療効果について、動物モデルを用いて作用機序を解明す

るとともに、CNP による肺線維症・間質性肺炎の急性増悪抑制効果を検討する。さらに、CNP の臨床応用を目指し、ヒト検体を用いた解析を併せて行う。

3. 研究の方法

CNP (C 型ナトリウム利尿ペプチド) による肺線維症および間質性肺炎の急性増悪に対する治療効果を明らかにし、臨床応用の可能性を探索することを目的として、以下に示す in vitro および in vivo モデルの実験系を確立し、作用機序の解明につなげる。

(1) 肺線維症および間質性肺炎において、肺の急性炎症が急性増悪の契機になると考えられている。急性増悪の予防効果・治療効果を検討するため、まず急性増悪の動物モデルを作製した。ブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルマウスに対してリポポリサッカライド (LPS) を投与し、急性増悪モデルを作製、ヒトにおける急性増悪の臨床像と比較・検討した。

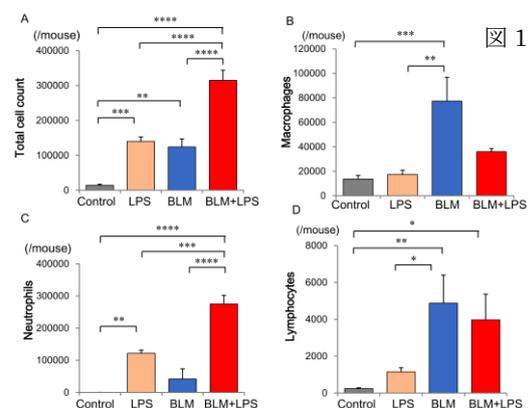
(2) 肺の急性炎症に対する CNP の治療効果を検討する。LPS を投与した急性肺障害モデルに対して CNP を投与し、治療効果とその機序について解析する。

(3) これまでに報告されている CNP による肺線維症に対する抗線維化効果について、肺および初代培養した線維芽細胞における各種増殖因子・炎症性サイトカイン・細胞外基質産生を解析してその機序を明らかにする。

4. 研究成果

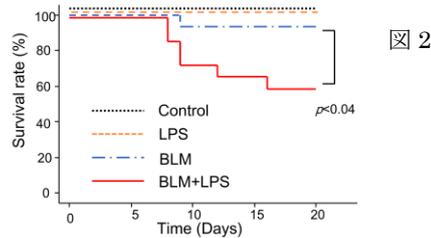
(1) 肺線維症・間質性肺炎急性増悪の動物モデル作製

マウスに BLM、LPS、両者を経気道投与し、コントロールを含めた 4 群で肺における炎症反応を比較した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数は、BLM/LPS 群において LPS 群または BLM 群より有意に増加し、またその分画では好中球数が BLM/LPS 群で LPS 群、BLM 群より増加した (図 1)。CT 画像では BLM/LPS 群



において BLM 群や LPS 群に比べ肺野の透過性低下を認め、組織所見においても BLM/LPS 群で肺胞隔壁の浮腫や著明な好中球浸潤を認めた。また、BLM/LPS 群は他の群に比べて有意に予後不良であった (図 2)。BLM 誘発肺線維症マウスに対して LPS を経気道投与し、急

性増悪の臨床像に類似する反応を認めた。同モデルは間質性肺炎・肺線維症急性増悪の予防・治療薬の前臨床的探索に有用と思われた。この結果は論文業績(3)として発表した。



(2) 肺の急性炎症に対する CNP の治療効果とその機序の解明

マウスに対する LPS 投与により増加した BAL 中の総細胞数は、CNP 投与群で有意に減少し、免疫組織学的検討による肺組織内浸潤好中球数 (MPO 陽性細胞数) は有意に少なかった (図 3)。

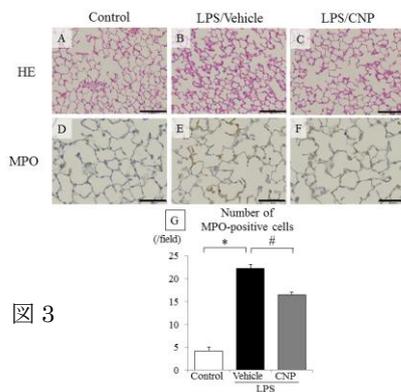


図 3

ELISA 法での BAL 上清の定量で、interleukin-6 (IL-6) は約 0.32 倍、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は約 0.38 倍と、CNP 投与群で有意に定値を示した (図 4)。CNP は LPS により誘発

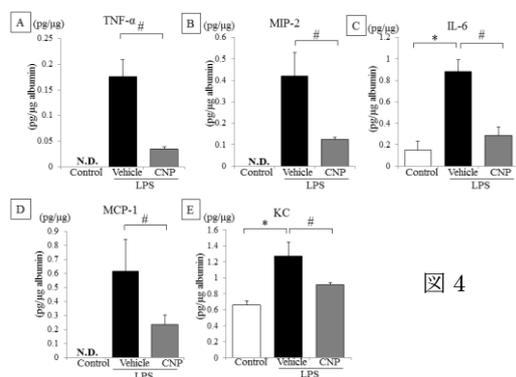


図 4

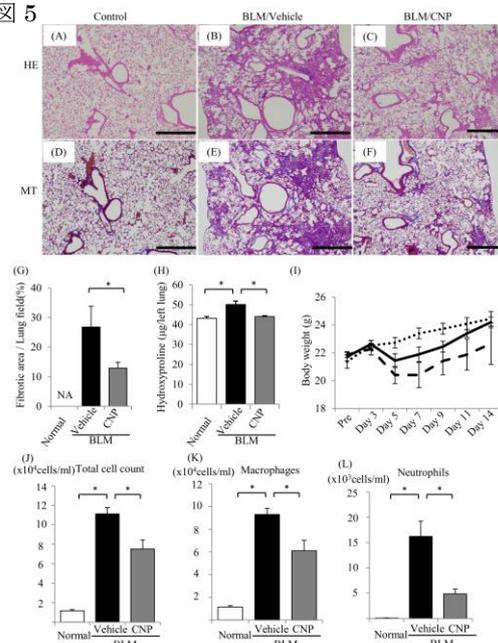
される肺での急性炎症に対して抗炎症効果を発揮することから、CNP が急性肺障害の有効な治療法につながる可能性が示唆された。この結果は論文業績(1)として発表した。

(3) 肺線維症における CNP の治療効果とその機序の解明および臨床応用可能性の検討

マウスに対する BLM 投与で増加して肺線維

化の指標となる hydroxyproline は、CNP 投与で有意に減少した (図 5)。肺組織における

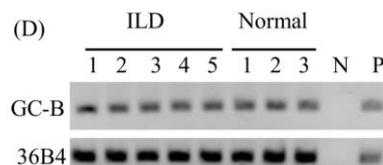
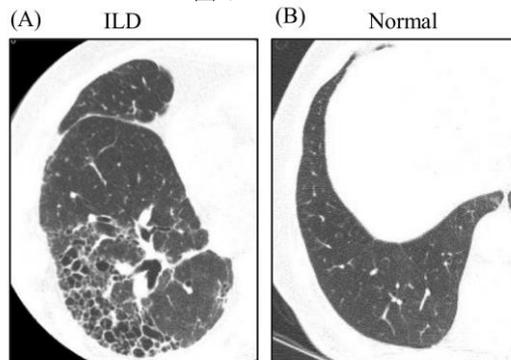
図 5



basic fibroblast growth factor、interleukin-6 の遺伝子発現が CNP 投与で有意に減少した。線維芽細胞特異的 CNP 過剰発現マウスを用いた検討でも、同様の結果が得られたことから、肺線維症に対する CNP の抑制効果は、肺線維芽細胞に対する作用であると考えられた。

また、肺癌切除術によって得られた臨床検体を用いて、背景にある肺から線維芽細胞を初代培養したところ、間質性肺炎合併(5例)および非合併(3例)症例いずれの肺線維芽細胞でも CNP が結合する膜型受容体である GC-B 受容体の発現を確認した (図 6)。

図 6



さらに、ヒト肺線維芽細胞への TGF- β 刺激に対し、CNP 添加で、線維芽細胞活性化の指標である α -smooth muscle actin、SM22 α の遺伝子発現、Fibronectin のタンパク発現と

gel contraction が有意に低下した。また CNP 添加で、TGF- β の細胞内 signal である Smad2 のリン酸化が抑制された。CNP は TGF- β によるヒト肺線維芽細胞の活性化を抑制した(図 7)。CNP はヒト肺においても、線維芽細胞を

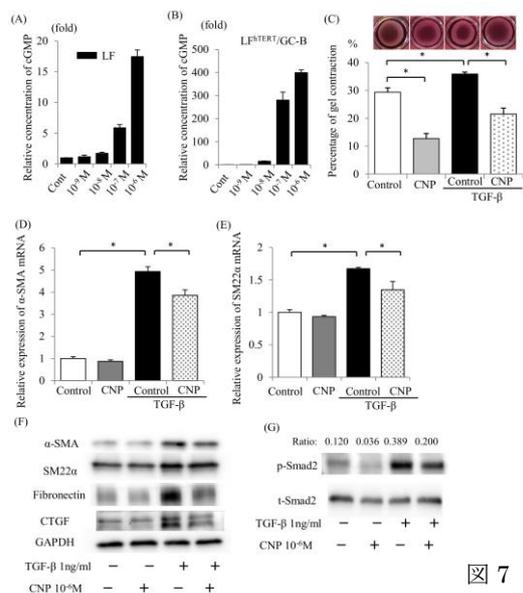


図 7

介する抗線維化効果を有する可能性が示唆された。この結果は論文業績(4)として発表した。

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 4 件)

1. Kimura T, Nojiri T, Hosoda H, Ishikane S, Shintani Y, Inoue M, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. C-type natriuretic peptide attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *J Surg Res* 194(2): 631-7, 2015
2. Kimura T, Nojiri T, Hosoda H, Ishikane S, Shintani Y, Inoue M, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. Protective Effects of C-type Natriuretic Peptide on Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 75(5): 1057-63, 2015.
3. Kimura T, Nojiri T, Hosoda H, Shintani Y, Inoue M, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. Exacerbation of bleomycin-induced injury by lipopolysaccharide in mice: establishment of a mouse model for acute exacerbation of interstitial lung diseases. *Eur J Cardiothorac Surg* 48(4):e85-91, 2015.
4. Kimura T, Nojiri T, Hino J, Hosoda H, Miura K, Shintani Y, Inoue M, Zenitani M, Takabatake H, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. C-type natriuretic peptide

ameliorates pulmonary fibrosis by acting on lung fibroblasts in mice. *Respir Res* 17(1):19, 2016.

[学会発表] (計 13 件)

1. 木村亨, 新谷康, 南正人, 澤端章好, 井上匡美, 中桐伴行, 舟木壮一郎, 川村知裕, 野尻崇, 奥村明之進. 間質性肺炎合併肺癌手術の周術期管理. 日本肺癌学会関西支部会(99). 2014/2/22(姫路)

2. 木村亨, 野尻崇, 細田洋司, 新谷康, 川村知裕, 舟木壮一郎, 中桐伴行, 井上匡美, 澤端章好, 南正人, 寒川賢治, 奥村明之進. Lipopolysaccharide 誘発急性肺障害モデルマウスに対する C 型ナトリウム利尿ペプチドの効果. 日本呼吸器外科学会総会(31). 2014/5/29-30(東京).

3. Toru Kimura, Takashi Nojiri, Hihoshi Hosoda, Yasushi Shintani, Shin Ishikane, Masayoshi Inoue, Mikiya Miyazato, Meinoshin Okumura, Kenji Kangawa. Protective effect of C-type natriuretic peptide on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. 22nd European Conference on General Thoracic Surgery. 15-18 June 2014. Copenhagen-Denmark.

4. Toru Kimura, Takashi Nojiri, Hihoshi Hosoda, Shin Ishikane, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa. Protective effect of C-type natriuretic peptide on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014. 10-12 Sep 2014. Kyoto-Japan.

5. 木村亨, 野尻崇, 細田洋司, 新谷康, 川村知裕, 舟木壮一郎, 中桐伴行, 井上匡美, 南正人, 寒川賢治, 奥村明之進. Bleomycin 誘発肺障害マウスへの Lipopolysaccharide 吸入による間質性肺炎・肺線維症急性増悪モデルの作製. 日本胸部外科学会定期学術集会(67). 2014/9/30-10/2(福岡).

6. 木村亨, 野尻崇, 細田洋司, 新谷康, 川村知裕, 舟木壮一郎, 井上匡美, 南正人, 寒川賢治, 奥村明之進. シスプラチン誘発急性腎障害モデルマウスに対する C 型ナトリウム利尿ペプチドの腎保護効果についての検討. 日本肺癌学会学術集会(55). 2014/11/14-11/16(京都).

7. 木村亨, 野尻崇, 細田洋司, 三浦浩一, 新谷康, 川村知裕, 舟木壮一郎, 井上匡美, 南正人, 寒川賢治, 奥村明之進. 肺線維症に対する C 型ナトリウム利尿ペプチドの効果. 日本呼吸器外科学会(32). 2015/5/14-15(香

川).

8. **Toru Kimura**. C-type natriuretic peptide attenuates acute and chronic inflammatory reactions in murine lung. Thoracic Surgery Seminar in Kyoto. 2015/5/16(Kyoto).

9. **Toru Kimura**, Takashi Nojiri, Hihoshi Hosoda, Yasushi Shintani, Masayoshi Inoue, Mikiya Miyazato, Meinoshin Okumura, Kenji Kangawa. Establishment of a new mouse model for postoperative acute exacerbation in interstitial lung diseases. 23rd European Conference on General Thoracic Surgery. 31 May-3 June 2015. Lisbon-Portugal (Poster).

10. **木村亨**, 野尻崇, 細田洋司, 日野純, 新谷康, 川村知裕, 舟木壮一郎, 別所俊哉, 井上匡美, 南正人, 寒川賢治, 奥村明之進. 間質性肺炎急性増悪モデルマウスの作製と新規治療法の探索. 関西胸部外科学会(58). 2015/6/11-12(岡山)

11. **Toru Kimura**, Takashi Nojiri, Hihoshi Hosoda, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa. CNP attenuates renal toxicity induced by cisplatin in murine kidney. 7th International Conference on cGMP. June 19-21, 2015. Trier, Germany (Poster)

12. **Toru Kimura**, Takashi Nojiri, Hihoshi Hosoda, Yasushi Shintani, Masayoshi Inoue, Mikiya Miyazato, Meinoshin Okumura, Kenji Kangawa. C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced fibrosis and inflammation in murine lung. 16th World Conference on Lung Cancer, September 6-9, 2015; Denver, CO. (Oral)

13. **木村亨**, 野尻崇, 細田洋司, 三浦浩一, 新谷康, 川村知裕, 舟木壮一郎, 別所俊哉, 井上匡美, 南正人, 寒川賢治, 奥村明之進. C型ナトリウム利尿ペプチドによるヒト肺線維芽細胞の活性化抑制効果. 日本肺癌学会(56). 2015/11/26-28 (横浜)

[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

木村 亨 (Kimura Toru)

国立研究開発法人

国立循環器病研究センター研究所

流動研究員

研究者番号 : 90580796

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :