

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

小山 尓也より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 625 号

学位申請者 : 小 山 尓 也

学位審査論文 : The tyrosine kinase inhibitor TAS-115 attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice

(チロシンキナーゼ阻害薬 TAS-115 のブレオマイシン誘発性肺線維症マウスモデルにおける線維化抑制効果)

著 者 : Kazuya Koyama, Hisatsugu Goto, Shun Morizumi, Kozo Kagawa, Haruka Nishimura, Seidai Sato, Hiroshi Kawano, Yuko Toyoda, Hirohisa Ogawa, Sakae Homma, Yasuhiko Nishioka

公 表 誌 : American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology

論文内容の要旨 :

【背景・目的】

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis; IPF) は肺間質の線維化を特徴とする予後不良な慢性進行性の疾患である。近年 IPF 治療のために上市された Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)/Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) 阻害効果を有する tyrosine kinase inhibitor (TKI) のニンテダニブは線維芽細胞の活性を抑制し病状の進行を遅らせることがわかった。なかでも PDGFR 阻害は線維芽細胞阻害に強い有効性が指摘されている。ニンテダニブは消化器症状等の副作用も多く、病状進展を完全に阻止することはないため、今なお IPF の新規治療薬の開発が求められている。今回、我々は PDGFR をより選択的に阻害する新規 TKI の TAS-115 に注目し、その抗線維化効果を調べた。

【方法】

マウスは 8 週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いた。細胞株はヒト線維芽細胞として MRC-5 を用いた。Bone marrow derived macrophage (BMDM) は骨髓細胞を M-CSF 添加培地で培養し分化誘導したものを用いた。

TAS-115のIC₅₀はmobility shift assay法にて調べた。線維芽細胞の増殖能は³H] thymidine deoxyribose incorporation assay法、遊走能はtrans-well cell migration assay法で調べた。PDGFRおよびc-FMSのリン酸化はウェスタンブロット法で検出した。CCL2およびM-CSF濃度はELISA法で検出した。マウスbronchoalveolar lavage fluid (BALF) 中のその他のサイトカインはBio-Plex assay法を用いて検出した。

マウス肺線維症モデルはBleomycin (BLM) 3.0mg/kgを気管内投与し作成した。肺の線維化は含有hydroxyproline量の定量化およびAshcroft scoreで評価した。

【結果】

TAS-115のIC₅₀はPDGFRα/β: 0.81±0.10/7.06±0.83nM、VEGFR1/2: 140±40/30±9nM、FGFR1/2/3: >970/340±130/>940nM、c-FMS: 15nMであった。

MRC-5を用いてTAS-115のPDGFRリン酸化阻害効果を調べたところ、3nM以上の濃度でリン酸化阻害を認め、機能的にもMRC-5の増殖を3nM以上で、遊走能は1nM以上の濃度で阻害した。これらのTAS-115の有効濃度はニンテダニブが同様の阻害効果を示した濃度よりもいずれも低値であった。

続いてTAS-115のc-FMS抑制効果に注目した。肺でのM-CSF発現はCCL2産生を介して肺の線維化に関わっており、M-CSF受容体c-FMSの阻害は肺の線維化を抑制することが考えられた。BMDMを用いて検討したところTAS-115は10nM以上の濃度でc-FMSのリン酸化を抑制し、M-CSF誘発性のCCL2産生を10nM以上で阻害した。BLM誘発性肺線維症マウスモデルで検討したところ、day7-9にTAS-115 100mg/kg/day内服した群では無治療群と比べて有意にBALF中CCL2濃度が低く、M-CSF濃度は差が無かった。

TAS-115の抗線維化効果を検討するためBLM誘発性肺線維症マウスモデルで肺線維化を検討した。BLM気管内投与後にTAS-115(day0-21; 30または100mg/kg/day)内服させたところday21のマウス肺でAshcroft scoreおよびhydroxyproline量の低下をみとめた。

【考察】

本研究ではTAS-115がPDGFRおよびc-FMSを濃度で阻害し、肺の線維化を阻害する可能性が示唆された。TAS-115が既に上市されているニンテダニブと異なる点は①PDGFRをより低濃度で阻害すること、②近年肺線維化を増悪させる可能性が指摘されているFGF阻害効果が弱いこと、③c-FMSを阻害する事でM-CSF-CCL2軸の抑制がみられることである。また、癌患者を対象とした臨床試験においてTAS-115は生物学的利用能が高く、消化器毒性が少ないことが示されており副作用が少ない薬剤である事が想定される。

【結論】

TAS-115はIPF治療において有望な治療薬となり得る。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 625 号	氏 名	小 山 壺 也
学位審査担当者	主 査	杉 山 篤
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	赤 坂 喜 清
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	伊 豫 田 明

学位審査論文の審査結果の要旨 :

特発性肺線維症に対する治療薬として、PDGF 受容体、FGF 受容体および VEGF 受容体に対する阻害効果を有する nintedanib が上市されたが、その有効性には限界があり、消化器症状などの副作用も多い。PDGF 受容体の阻害は線維芽細胞の抑制に有効であるので、この受容体を比較的選択的に阻害するチロシンキナーゼ阻害薬 TAS-115 は、新規候補化合物として肺線維症に対する抑制効果が期待されている。本研究では培養細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスの肺線維症モデルであるブレオマイシン誘導性肺炎を用いた *in vivo* の実験により TAS-115 の有用性を、nintedanib と比較検討した。TAS-115 は nintedanib より PDGF 受容体および c-FMS 受容体を抑制したが、線維化を増悪する FGF 受容体にはほとんど作用しなかった。PDGF で誘発される線維芽細胞の増殖や遊走も抑制した。また、ブレオマイシン誘発性肺線維症マウスモデルにおいて、TAS-115 は線維芽細胞の遊走因子であるマクロファージからの CCL2 の産生を抑制した。さらに同じマウスモデルで、TAS-115 は肺の線維化を抑制し、hydroxyproline 含量を低下し、ブレオマイシン肺炎に対する有効性を示した。これらの作用はいずれも nintedanib より強力なものであった。以上の結果から申請者は、肺線維症に対して TAS-115 は nintedanib を上回る薬効を期待できる新規治療薬になり得ると結論づけた。質疑において審査委員からは、線維芽細胞に対しては大きな作用を与えない理由（機序）は何か、PDGF 受容体の線維化における役割は何か、TAS-115 と nintedanib の薬効の差はどこから発生するのか、抗線維化薬の投与のタイミングはいつかまた、その結果からヒトでの治療プロトコルを提案できるか、1 細胞内における TGF- β の量を評価したことはあるか、本研究では PDGF 受容体、c-FMS、CCL2 が肺線維化に関係する因子として研究対象になっているが、本因子以外で線維化に関わる因子は何か、またそれら因子について TAS-115 はどのような効果があるか検討したか、*In vivo* の実験は何回施行して得た結果か、TAS-115 の毒性としてはどのようなものが報告もしくは想定されているのか、TAS-115 は c-FMS シグナルを抑制するとあるが、この薬剤を長期投与するとマクロファージの活性が抑制されて易感染性や破骨細胞の機能障害（例えば大理石病）などが生じてくる可能性があるか、Fibroblast はどこから浸潤して来ると想定しているのか、IL-6 の産生抑制のメカニズムをどのように考えるのか、間接的な抑制として考えて良いか、などの質問が出た。各質問に対して申請者は的確に回答した。TAS-115 の肺線維症に対する抑制効果およびその機序を nintedanib との比較対照実験の結果に基づいて明快に示したことから、本研究の意義は高く、本論文は学位に値すると判断され、学位審査会を終了した。