

## I Bキナーゼ 阻害薬による抗線維化効果の検討

佐藤正大（徳島大学講師）、西村春佳（徳島大学医員）、小山壱也（徳島大学医員）  
河野弘（徳島大学講師）、豊田優子（徳島大学特任准教授）、西岡安彦（徳島大学教授）

### 研究要旨

【背景と目的】I Bキナーゼ (IKK) は炎症性サイトカイン産生に関わる転写因子である NF- $\kappa$ B の活性を制御する。我々は以前、IKK 阻害剤 IMD-0354 がブレオマイシン誘発性肺線維症モデルマウスにおける肺線維化を改善することを見出し、その作用機序は同薬の抗炎症作用に起因することを報告した。しかし、近年の基礎研究と臨床研究の進歩は、肺線維症の治療において抗炎症作用よりも抗線維化作用が重要であることを示唆している。本研究では IKK 阻害薬の抗線維化作用に着目し、肺線維症モデルマウスにおける新規 IKK 阻害薬 IMD-1041 (IMD-0354 の prodrug) の効果を検討した。線維芽細胞の分化及び TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に対する IMD-0354 の効果をウェスタンブロット法で検討した。IMD-1041 の投与はピルフェニドンよりも有意に肺の線維化を改善した。IMD-0354 は線維芽細胞の TGF- $\beta$  誘導コラーゲン I および  $\alpha$ -SMA 産生を抑制した。これらの結果は、IKK 阻害薬が抗炎症作用と抗線維化作用の両方を有することを示唆している。IKK 阻害は、NF- $\kappa$ B の活性化に関連する線維化促進性サイトカインの発現抑制に加え、線維芽細胞に直接作用しその機能を抑制することにより、傷害肺に起こる炎症及び、それに続発して起こる肺の線維化形成を軽減するのに有用である。

### A. 研究目的

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis : IPF) は、生存期間中央値 3~5 年の進行性致死性肺疾患である<sup>1)</sup>。IPF の病理像が線維芽細胞の増殖および細胞外基質の沈着を特徴とすることは古くから知られていたにもかかわらず<sup>2)</sup>、かつての IPF の治療戦略は抗炎症作用を重視していた<sup>3)</sup>。しかしその後の研究の進歩により、病態における肺の線維化が慢性炎症自体に起因するものではなく繰り返す肺胞上皮傷害と異常な創傷治癒の結果として線維化が進行することが明らかとなってきたため、IPF 治療における抗炎症療法の重要性は否定されることとなった。ステロイドや免疫抑制剤による治療は慢性安定期の IPF に効果を示すエビデンスを構築することができず、2011 年の ATS/ERS/JRS/ALAT の IPF ガイドラインにおいては強く推奨しない治療と明記されるに至った<sup>4)</sup>。現在の IPF 治療戦略においては抗線維化薬の導入が重要とされており、ピルフェニドンは IPF 治療に承認された抗線維化薬の 1 つである。ピルフェニドンが抗線維化作用を有することは既に多くの研究で示されているが<sup>5)</sup>、ピルフェニドンもまた、当初は抗炎症作用を期待して開発された経緯がある<sup>5-6)</sup>。

我々は 2006 年に I $\kappa$ B キナーゼ- $\beta$  (IKK  $\beta$ ) 阻害剤である IMD-0354 がマウスのブレオマイシン誘発性肺線維症を改善することを報告した<sup>7)</sup>。最も普遍的な転写因子の 1 つである NF $\kappa$ B は、炎症反応において重要な役割を果たすことが報告されており、不活化 NF $\kappa$ B を活性化へと導くシグナル伝達経路において I $\kappa$ B をリン酸化する酵素である IKK 複合体の活性化が重要とされている<sup>8)</sup>。したがって我々は以前の報告において、炎症性サイトカインの産生抑制作用が肺線維症治療における IMD-0354 の主な作用メカニズムで

あると結論付けた<sup>7)</sup>。しかしその後の IPF の治療戦略の変遷を鑑みれば、線維芽細胞の分化や細胞外基質に対する IKK $\beta$  阻害の効果も検討する必要がある。

IMD-1041 は IMD-0354 のプロドラッグで、IKK $\beta$  のリン酸化を抑制することで NF $\kappa$ B の活性化を抑制する<sup>9)</sup>。しかし肺線維症における IMD-1041 の効果は未だ検討されたことはない。そこで今回我々は IMD-1041 の肺線維芽細胞に対する効果を検討し、その効果をピルフェニドンと比較した。

### B. 研究方法

8 週齢雄の C57BL/6 マウスにブレオマイシン (Bleomycin: BLM) 3.2 mg/kg を経気管支投与することでマウス肺に線維化を惹起した。IMD-1041 及びピルフェニドンは 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) で溶解した。IMD-1041 (30 mg/kg)、ピルフェニドン (100 mg/kg)、または 0.5% CMC を連日経口投与し、21 日目にマウス肺を摘出した。ヒト胎児肺由来線維芽細胞である MRC-5 細胞を 0.1% FBS を含む培地で培養した後、IMD-0354 (0~0.1  $\mu$ M) および TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) と共に培養した。各細胞群の cell lysate を回収し、ウェスタンブロット法を用いてコラーゲン I 及び  $\alpha$ -SMA の発現を比較検討した。

### C. 結果

IMD-1041 の連日経口投与により、マウス肺線維症の改善を認めた (Figure 1 : データ未発表)。次に IMD-1041 の抗線維化作用をピルフェニドンと比較した。肺線維症の治療におけるピルフェニドンの作用機序は依然として不明な部分があるが、いくつかの既報告は、ピルフェニドンが肺線維芽細胞の増殖と筋線維芽細胞への分化を TGF- $\beta$  シグナル伝達経路

を抑制することで減少させることを示唆している<sup>10)</sup>。また、ピルフェニドンは肺線維症の動物モデルにおいて抗線維化、抗炎症および抗酸化特性を有することが報告されている<sup>10)</sup>。

しかし本検討では、ピルフェニドン投与は、IMD-1041 投与とは対照的に、組織学的にも線維化を改善しなかった (Figure 2 : データ未発表)。

IMD-1041 は IMD-0354 の prodrug であるため、以下の *in vitro* での検討には IMD-0354 を使用した。TGF- $\beta$ 1 が線維芽細胞において線維化促進遺伝子の発現を誘導することは広く知られている。したがって、我々はヒト線維芽細胞 MRC-5 細胞におけるコラーゲン I および $\alpha$ -SMA 産生に対する IMD-0354 およびピルフェニドンの阻害効果を比較した。用量依存的に、IMD-0354 は MRC-5 において TGF- $\beta$ 1 によって誘導されるコラーゲン I 産生を抑制した (Figure 3 : データ未発表)。同様に、IMD-0354 は用量依存的に $\alpha$ -SMA 産生を抑制した (Figure 3 : データ未発表)。

#### D. 考察

本検討におけるマウスモデルを用いた検討では IMD-1041 のみが肺線維症を軽減した。一つの理由として、作用濃度の差が挙げられる。IMD-0354 は *in vivo* において、ピルフェニドンよりはるかに低い濃度で効果を示した。ピルフェニドンは *in vitro* においても線維芽細胞の $\alpha$ -SMA 産生を阻害しえるが、我々の検討の結果、その阻害効果は 100  $\mu$ g/ml で観察された (データ未掲載)。ピルフェニドンの分子量は 185.22 であるため、作用濃度は約 0.54 mM と推定され、これは IMD-0354 のそれより遥かに高かった。これらの結果は、IMD-0354 が肺線維芽細胞に対する直接の効果を有し、そしてその効果がピルフェニド

ンよりも強力であることを示している。

本研究結果は、IMD-1041 または IMD-0354 による IKK  $\beta$  阻害は、抗炎症作用および抗線維化作用の両方を示すことによって肺線維症に対する強い阻害作用を発揮する可能性を示唆する。

#### E. 文献

1. Raghu G, et al. Am J Respir Crit Care Med. 198: e44-e68, 2018.
2. Gross TJ, et al. N Engl J Med. 345:517-25, 2001.
3. Am J Respir Crit Care Med. 161:646-64, 2000.
4. Raghu G, et al. Am J Respir Crit Care Med. 183:788-824, 2011.
5. George PM, et al. Expert Rev Clin Pharmacol. 10:483-491, 2017.
6. Margolin SB, et al. FASEB J 8: A382, 1994.
7. Inayama M, et al. Am J Respir Crit Care Med. 173:1016-22, 2006.
8. Baeuerle PA, et al. Annu Rev Immunol 12:141-79, 1994.
9. Fukuda S, et al. Clin Exp Nephrol 15: 41- 49, 2011.
10. Kolb M, et al. Respir Med. 131:49-57, 2017.

F. 健康危険情報 : なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 : なし
2. 学会発表 : なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 : なし

Figure 1  
プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける IMD-1041 の抗線維化効果の検討  
(H.E 染色)

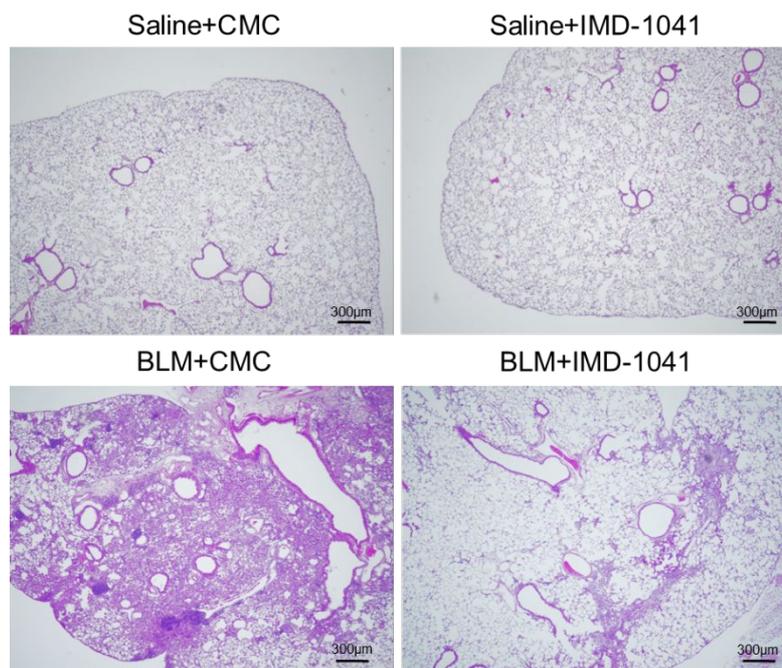


Figure 2  
プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける IMD-1041 とピルフェニドンの抗線維化効果の比較検討  
(H.E 染色)

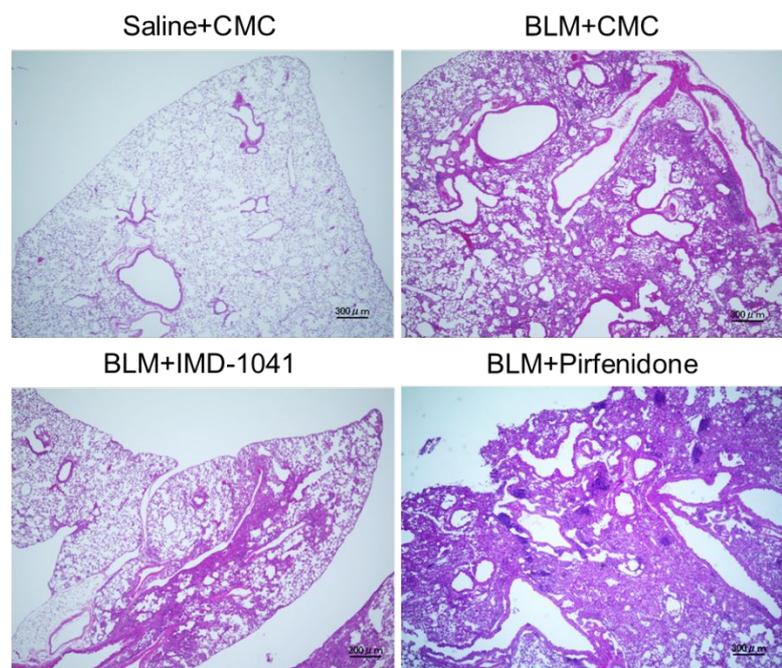


Figure 3

線維芽細胞の TGF- $\beta$ 1 誘発性コラーゲン 及び  $\alpha$ -SMA 産生に対する IMD-0354 の効果の検討 (ウェスタンブロット法)

