

レオマイシン肺線維症マウスモデルにおける Lck 阻害の抗線維化効果の検討

佐藤正大（徳島大学講師）、香川耕造（徳島大学助教）、小山壱也（徳島大学医員）、高橋直希（徳島大学医員）、内藤伸仁（徳島大学助教）、河野弘（徳島大学特任准教授）、軒原浩（徳島大学准教授）、西岡安彦（徳島大学教授）

研究要旨

【背景と目的】特発性肺線維症の治療薬である nintedanib は Lymphocyte specific protein tyrosine kinase (Lck) に対して阻害効果を有する。しかし肺線維症における Lck 阻害の意義は解明されていない。【目的】肺線維症マウスモデルにおける Lck 阻害の効果を検討する。【方法】Lck 特異的阻害剤として A-770041 を用いた。マウスの脾臓から CD4⁺T リンパ球を単離し、リンパ球における Lck のリン酸化を、immunoblot 法を用いて検討した。ブレオマイシン (BLM) を気管内投与して作成した肺線維症マウスモデルに A-770041 を経口投与し、採取した気管支肺胞洗浄液 (BALF) の炎症細胞数の解析を行った。肺組織の線維化は Ashcroft スコアと hydroxyproline 量の測定で検討した。【結果】A-770041 はリンパ球の Lck リン酸化を濃度依存的に阻害した。マウスモデルにおいて、A-770041 の投与は BLM 投与 21 日目の肺線維化を有意に軽減した。A-770041 は BLM 投与後 14 日目の BALF 液中の細胞数や細胞分画に影響を与えなかった。【結論】Lck 阻害は線維化を誘発する肺炎症を抑制することで抗線維化作用を示すと考えられた。

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¹⁾。その病態は、肺上皮の慢性的な傷害に引き続いて起こる、持続的な線維芽細胞巢の増生と進行性の線維化が基本であると考えられている²⁾。その一方で、肺の線維化にリンパ球の関与を指摘する報告がある³⁾。

Nintedanib は IPF 治療に承認された 2 つの抗線維化薬の 1 つであり、血管内皮細胞増殖因子受容体 (Vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR)、線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast growth factor receptor: FGFR)、血小板由来成長因子受容体 (Platelet-derived growth factor receptor: PDGFR) といった 3 つ成長因子受容体を主な標的とする^{2,4)}。これら受容体の阻害は、主に線維芽細胞の活性化を抑制する事が知られている⁵⁾。しかし nintedanib はまた、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ p56^{Lck} (Lymphocyte specific protein tyrosinase: Lck) を含む Src ファミリーのチロシンキナーゼも阻害することが判っており、nintedanib の Lck に対する IC50 は 22 nM と非常に低い⁴⁾。

T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) の活性化は、サイトカイン産生、細胞生存、増殖および分化を調節し、最終的に細胞の運命を決定する多くのシグナル伝達カスケードを促進するが、Lck はこのカスケードの上流において重要な役割を担っている。すなわち、nintedanib の抗線維化作用の一部は、Lck 阻害によるリンパ球の活性化の抑制による可能性があるが、その意義は未だ十分に検討されていない。

従って、本検討ではリンパ球の発現する Lck に着目し、ブレオマイシン肺線維症マウスモデルにおける Lck 特異的阻害剤 A-770041 の抗線維化効果を検討した。

B. 研究方法

CD4⁺T Cell Isolation Kit と Auto MACS (Miltenyi Biotec) を使用して、マウス脾臓から CD4⁺リンパ球を分離した。CD4⁺T 細胞は、CD3 および CD28 抗体によって刺激を受けた後、Lck のリン酸化に対する Lck 阻害剤 A-770041 の効果を、immunoblot 法を用いて比較検討した。

8 週齢雄の C57BL/6 マウスにブレオマイシン (Bleomycin: BLM) 3.0 mg/kg を day 0 に単回経気管支投与することでマウス肺に線維化を惹起した。5.0 mg/kg/day の A-770041 が連日経口投与された。A-770041 の抗線維化効果は、day 21 に摘出されたマウス肺組織を用いて、Ashcroft スコアと hydroxyproline 量計測によって評価された。

ブレオマイシン肺線維症マウスモデルに対して day 0 から 5.0 mg/kg/day の A-770041 が連日経口投与され、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage: BAL) を day 14 に実施した。マウス気管に軟性カニューレを挿管し、1mL の生理食塩水で BAL fluid (BALF) を採取した。Vi-Cell™ cell viability analyzer を用いて BALF 中の生細胞のみの細胞数をカウントした後、含まれる細胞種を検討するためフローサイトメトリー法による検討を行った。

C. 結果

リンパ球の Lck リン酸化に対する A-770041 の阻害効果は 100 nM から認められた (Figure 1: データ未発表)。

A-770041 の連日経口投与により、病理組織像では肺の線維化所見が抑制されていることを確認した。 (Figure 2A: データ未発表)。更に、Ashcroft スコアと hydroxyproline 量計測による線維化の定量を

行ったところ、A-770041 の投与によりいずれも改善傾向を示した(Figure 2B, 2C : データ未発表)。

A-770041 による治療は、day 14 における BALF 中の細胞数や細胞分画に影響を与えなかった (Figure 3 : データ未発表)。

D. 考察

本検討では A-770041 による Lck 阻害が、プレオマイシン誘発肺線維症を抑制することが示された。Lck は TCR シグナル伝達に参与する分子であるため、T リンパ球の抑制が肺線維症の改善に寄与できる可能性が示唆されたと同時に、nintedanib の抗線維化作用の一部が Lck 阻害によるものである可能性も示唆された。

組織の線維化における T リンパ球の役割は十分わかってはいないが、線維化と T 細胞の機能との関連性を示唆する既報告が幾つかある。しかしその役割はそのサイトカイン産生パターンによって様々で、例えば IL-12 を産生する Th1 リンパ球が抗線維化作用を示すとした報告がある一方⁶⁾、IL-4 及び IL-13 を産生する Th2 リンパ球線維芽細胞を活性化することが報告されている⁷⁾。また、Th17 リンパ球によって産生される IL-17 は、炎症を促進し、線維芽細胞を活性化させることが報告されている⁸⁾。

本検討において、A-770041 による Lck 阻害は肺線維症を軽減しえることが示されたものの、BALF 中のリンパ球数には影響を与えなかった。リンパ球のどのサブタイプが最も Lck 阻害の影響を受けるのかを検討するため、治療後の肺組織中の細胞分画とサイトカイン量に関する更なる検討が必要である。

E. 文献

1. Raghu G, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 198: e44-e68, 2018.
2. 佐藤正大, 西岡安彦. 間質性肺炎・過敏性肺炎. 免疫・炎症病態×治療 Update, 熊ノ郷淳 編集 pp77-87, 2019. 南山堂.
3. Desai O, et al. *Front Med (Lausanne)*. The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic

Pulmonary Fibrosis. 20; 5:43, 2018.

4. Wollin L, et al. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 349:209-20, 2014.
5. Sato S, et al. Anti-fibrotic efficacy of nintedanib in pulmonary fibrosis via the inhibition of fibrocyte activity. *Respir Res*. 18:172, 2017.
6. Keane MP, et al. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 281: L92-7, 2001.
7. Saito A, et al. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 132:168-75, 2003.
8. Wilson MS, et al. J Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *Exp Med*. 207: 535-52, 2010.

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

- 1) Kozo Kagawa, Kazuya Koyama, Seidai Sato, Naoki Takahashi, Haruka Nishimura, Nobuhito Naito, Hiroshi Kawano, Yuko Toyoda, Yasuhiko Nishioka. Antifibrotic effects of Lck inhibition on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. ERS International Congress 2019. Madrid, Spain. 2019.10.2
- 2) 香川耕造, 小山壺也, 佐藤正大, 高橋直希, 西村春佳, 内藤伸仁, 河野弘, 豊田優子, 西岡安彦. プレオマイシン肺線維症マウスモデルにおける Lck 阻害の抗線維化効果. 第 61 回日本呼吸器学会中国・四国地方会. 徳島. 2019 年 7 月 15 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 : なし

Figure 1

CD4⁺リンパ球における A-770041 の Lck のリン酸化阻害効果の検討
(Immunoblot 法)

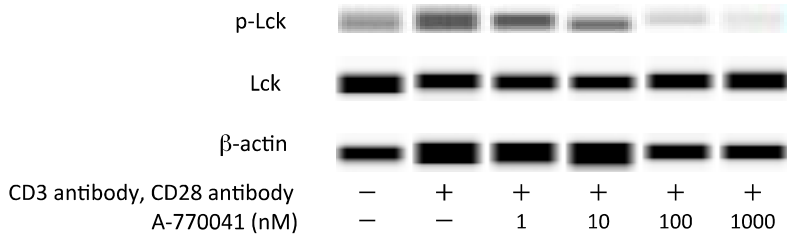
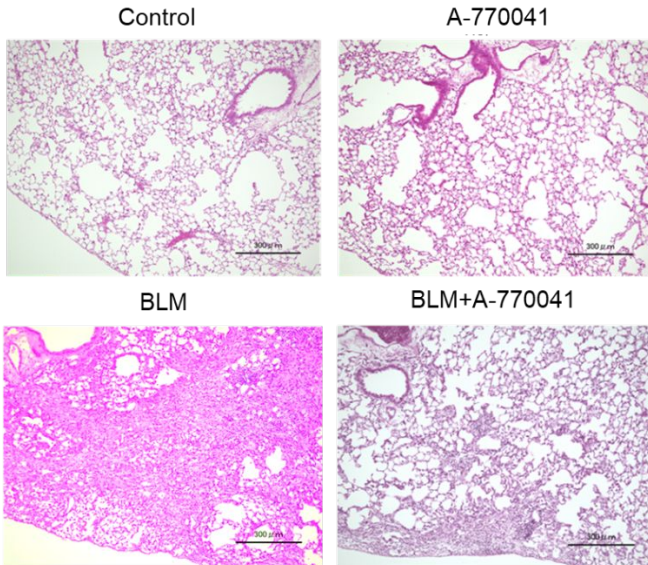


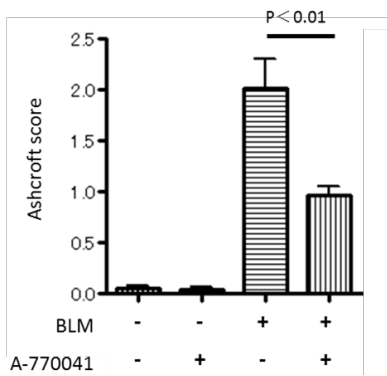
Figure 2

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける A-770041 の抗線維化効果の検討
(Hematoxylin Eosin 染色、Ashcroft score、Hydroxyproline 量測定)

A) Hematoxylin Eosin染色



B) Ashcroft score



C) Hydroxyproline

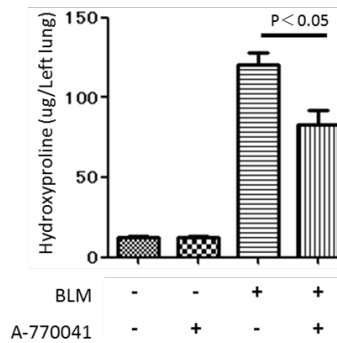


Figure 3

プレオマイシン肺線維症マウスモデルにおける BALF 中の細胞数と細胞分画に A-770041 が与える影響の検討 (フローサイトメトリー法)

