

論 文 内 容 要 旨

題目 Antifibrotic Effects of Focal Adhesion Kinase Inhibitor in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice

(ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルにおける FAK 阻害剤による抗線維化効果)

著者 Katsuhiko Kinoshita, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma, Jun Kishi, Akio Takezaki, Masami Kishi, Hideki Makino, Hiroyasu Okazaki, Hisanori Uehara, Keisuke Izumi, Saburo Sone, Yasuhiko Nishioka
平成 25 年 10 月発行 Am J Respir Cell Mol Biol 第 49 巻第 4 号
536 ページから 543 ページに発表済

内容要旨

特発性肺線維症は過剰な細胞外マトリックスの沈着とリモデリングに特徴付けられる、原因不明かつ予後不良の疾患であり、有望な治療法の開発が喫緊の課題である。一方 Focal Adhesion Kinase (FAK) は細胞の増殖、運動、接着、生存など様々な要素に関わる非レセプター型のチロシンキナーゼであり、transforming growth factor β (TGF- β) による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に重要な働きを持つことが知られている。これまで FAK が線維芽細胞によるマトリックスのリモデリングに関わるとする報告や、腎臓でのメサンギウム細胞によるコラーゲン産生に関わるとする報告などはなされているが、肺の線維化と FAK シグナルの関係について述べられた報告はない。そこで今回申請者は FAK 阻害剤 (TAE226) による肺線維化抑制効果について検討した。

In vitro での細胞増殖の評価には ^3H -チミジン取り込み試験を用いた。また肺線維芽細胞での α -smooth muscle actin 及び collagen I の発現を Western Blot にて確認した。肺線維症モデルはブレオマイシンを含んだ浸透圧ポンプをマウスの皮下に留置し、約 7 日間持続投与することにより作成した。TAE226 はブレオマイシン投与後 14 日目～28 日目にかけて連日経口投与した。28 日目にマウスを sacrifice し、右肺のコラーゲン含有量の定量を行うと共に、左肺組織片の H&E 染色による組織学的な線維化の評価を Ashcroft score を用いて 2 人の病理医により判定した。また 7 日目と 28 日目に気管支肺胞洗浄を行い細胞数と細胞分画を評価した。肺組織についてはさらに Ki67 染色を行い増殖細胞を

様式(8)

評価すると共に、マウス肺及び特発性肺線維症患者の肺組織に対して prolyl 4-hydroxylase とリン酸化 FAK 抗体による二重染色を行い評価した。

その結果、TAE226 は各種増殖因子による増殖刺激を受けたマウス及びヒト肺線維芽細胞の増殖を抑制することを確認した。また Western Blot では TAE226 が collagen I の発現を抑制すると共に、 α -smooth muscle actin の発現を抑制することが確認され、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制することが示された。

動物実験では TAE226 が肺の組織学的な線維化を抑制し、Ashcroft score を有意に低下させた。また肺組織中のコラーゲン量も減少させた。28 日目の気管支肺胞洗浄では、TAE226 は洗浄液中のリンパ球分画を有意に減少させ、マウス肺組織中の Ki67 陽性の増殖細胞数は TAE226 投与により減少していた。また免疫染色では、線維化巣において prolyl-4-hydroxylase 陽性の間質細胞に一致して FAK の Tyr397 のリン酸化がみられ、肺線維芽細胞で FAK が活性化されていることが示唆された。さらに、これらの細胞の FAK-Tyr397 のリン酸化は TAE226 投与群では明らかに抑制されていた。また IPF 患者の肺組織について同様の染色を行ったところ、肺胞隔壁の線維化部位ならびに線維芽細胞巣において prolyl-4-hydroxylase 陽性の線維芽細胞に一致して FAK-Tyr397 のリン酸化が確認され、IPF 患者肺線維芽細胞においても FAK が活性化されていることが示唆された。一方、線維芽細胞巣を覆う再生上皮にも同様の変化が確認された。

以上より、FAK 阻害剤による線維芽細胞増殖抑制作用、線維化マーカーの発現抑制作用、ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルでの組織学的な肺線維化抑制作用が示され、FAK が今後非常に有望な肺線維症の治療標的になり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1185 号	氏名	木下勝弘
審査委員	主査 玉置俊晃 副査 香美祥二 副査 坂下直実		

題目 Antifibrotic Effects of Focal Adhesion Kinase Inhibitor in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice

(ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルにおける FAK 阻害剤による抗線維化効果)

著者 Katsuhiko Kinoshita, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma, Jun Kishi, Akio Takezaki, Masami Kishi, Hideki Makino, Hiroyasu Okazaki, Hisanori Uehara, Keisuke Izumi, Saburo Sone, Yasuhiko Nishioka

平成 25 年 10 月発行 Am J Respir Cell Mol Biol 第 49 巻
 第 4 号 536 ページから 543 ページに発表済
 (主任教授 西岡安彦)

要旨 特発性肺線維症は過剰な細胞外マトリクスの沈着とリモデリングと特徴とする予後不良の疾患であり，有望な治療法の開発が望まれている．Focal Adhesion Kinase (FAK)は細胞の増殖，運動，接着，生存などに関わるチロシンキナーゼであり，線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に重要な働きを持つことが知られているが，FAK と肺線維化の直接的な関連については明らかにされていない．そこで申請者らはブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルを用いて FAK 阻害剤 (TAE226) による肺線維化抑制効果について検討し，以下の知見を得た．

1) TAE226 はマウス及びヒト肺線維芽細胞の血小板由来増殖因子

およびインスリン様増殖因子-1 による増殖反応を濃度依存的に抑制した。また TGF- β によるコラーゲン発現および α -smooth muscle actin の発現を抑制し、筋線維芽細胞への分化を抑制した。

- 2) ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルにおける組織学的検討および肺のコラーゲン含量の定量から、TAE226 の抗線維化効果が示された。
- 3) TAE226 投与によりブレオマイシン誘発線維化肺における Ki67 陽性の増殖反応を示す間質細胞が減少していた。
- 4) TAE226 投与によりブレオマイシン誘発線維化肺の prolyl-4-hydroxylase 陽性間質細胞において、FAK-Tyr397 のリン酸化が抑制されていた。
- 5) 特発性肺線維症患者の肺組織の検討では、肺間質の prolyl-4-hydroxylase 陽性細胞に FAK-Tyr397 のリン酸化が観察された。

以上の結果から、FAK が線維化肺において活性化されるとともに線維化病態に重要な役割を果たしていること、また FAK 阻害により肺線維症に対する抗線維化効果が期待できることが示唆された。本研究は、肺線維症に対する疾患分子病態の解明と、新たな治療法の開発研究に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。