

総説 (教授就任記念講演)

難治性呼吸器疾患の分子病態解明と新規治療法の開発

西岡安彦

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部呼吸器・膠原病内科学分野

(平成25年4月1日受付) (平成25年4月5日受理)

はじめに

呼吸器疾患には、悪性疾患である肺がんに加え、良性肺疾患の中にも予後不良の急性・慢性疾患が数多く存在する。実際に WHO から発表されている2020年の世界の予測10大死因には、COPD (慢性閉塞性肺疾患), 肺炎, 肺がん, 結核の4つの呼吸器疾患が位置付けられている¹⁾。特に肺がんは本邦における悪性腫瘍による死因の中では最も多く、2011年の死亡者数は年間7万人以上である。一方、特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) の一つである特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は良性肺疾患でありながら5年生存率が約30%であり、肺がんにも匹敵する予後不良の疾患である。これらの難治性呼吸器疾患に対

する新規治療法の開発には、疾患の細胞分子病態解析を基にした新たな治療標的分子の同定が重要となる。本稿では、このような難治性呼吸器疾患に対するこれまでの筆者らの細胞分子病態に関する基礎的研究の一端を紹介し、今後の展望について概説する。

肺がん転移モデルと臓器特異的転移メカニズム

肺がんは診断時に70%以上症例で転移を認め、その転移は多臓器にわたることが特徴である (図1)²⁾。転移を有する肺がん症例の予後は不良で、平均生存期間も1年未満であることが多い。従って、転移の克服が肺がん患者の予後を改善するための重要な課題である。筆者らは、これまでに SCID マウスを用いたヒト肺がんの多臓

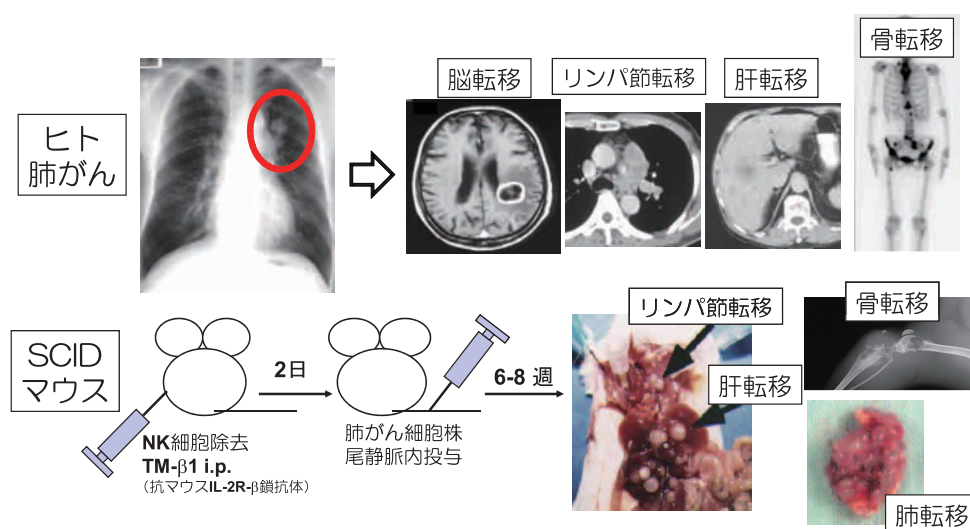


図1 肺がんの多臓器転移と多臓器転移モデル

ヒト肺がんでは初診時に約70%の症例で転移を認め、多くの症例で転移は多臓器に生じる。SCID マウスのNK細胞を除去後、ヒト肺がん細胞株を尾静脈から静脈内投与することで多臓器にわたる転移モデルが作成できる。

器転移モデルを作製し、転移メカニズムの解析を行ってきた。一方、近年がんの個別化医療の概念に基づき、肺がんにおいても数多くの臨床試験が行われた結果、oncogenic driver mutationの同定と、それに基づく分子標的治療薬の選択が、従来から使用されてきた抗がん剤による治療より有効であることが示されつつある。特に、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) のチロシンキナーゼ阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) である gefitinib や erlotinib では、1次治療における抗がん剤との比較試験から有意に無増悪生存期間 (progression free survival: PFS) を延長することが報告されている^{3,4)}。一方、がん転移に対する治療を考えた場合、臨床的には有用性を証明し難いとする考えから薬剤開発という面では大きな進展がみられていなかった。しかしながら、近年骨転移特異的治療薬としてビスフォスフォネート製剤に加え、receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) を標的とした抗体製剤 denosumab が日本でも承認され、実施臨床で使用されるようになってきている。この事実は、がん転移に対する治療においても個々の臓器ごとに特異的な治療戦略を取ることで、臨床的に有用な薬剤開発が可能であるということを示しており、臓器別という視点からの個別化医療とも考えられる。今後骨転移に留まらず、臓器特異的がん転移治療薬という視点からの薬剤開発が、がん治療薬開発の一つの方向性として注目されるかもしれない。筆者らが使用している SCID マウスモデルの大きな特徴は多臓器転移モデルであるという点にあり、同時に複数の臓器転移を解析できる利点がある。この利点を生かすことで個々の臓器転移特異的な標的分子の探索が可能である。

Notch シグナルは、細胞の生存、増殖、分化に重要な役割をしている。Notch には、Notch1~4の4つのレセプターが知られており、そのリガンドはDeltaファミリーであるDelta-like (Dll)1, Dll3およびDll4とJaggedファミリーであるJagged1およびJagged2の5つが報告されている⁵⁾。Notch シグナルの肺がん転移に及ぼす作用を検討するため、小細胞肺がん細胞株にマウス Dll4とヒト IgG1のFc部分を結合させた融合蛋白を過剰発現させることにより、Notch シグナルの阻害を試みた。既に同様のアプローチにより、腫瘍細胞へのDll4-Fcの過剰発現が機能不全の血管を形成することにより腫瘍増殖を抑制することが報告されている⁶⁾。小細胞肺がんの細胞株SBC-3およびH1048にレトロウイルスシステムを用いてDll4-Fcの強制発現株を作製し、SCIDマウスの尾静脈より静脈内投与することにより臓器転移を検討した。その結果、Dll4-Fc強制発現株はコントロール株に比べて有意に肝転移が減少した(表1)⁷⁾。そこでDll4-Fcによる肝転移抑制メカニズムの検討を行うため、Dll4-Fc遺伝子導入株とコントロールベクター導入株の遺伝子発現を定量的RT-PCR法にて比較検討した。その結果、Dll4-Fc遺伝子導入株では、CXCR4, S100A4, MMP1, SERPIN1といったNF- κ Bにより制御を受ける分子の発現抑制が観察された。さらに免疫沈降とWestern blottingによりNotch1とNF- κ B分子の細胞内での結合が確認された。以上から、Notch1/Dll4/NF- κ B経路と肝転移は直接あるいは間接的に関連しており、Notch1/Dll4/NF- κ B経路が肝転移制御の標的となる可能性が示唆された。

一方、マクロファージの遊走および活性化因子であるmacrophage-stimulating protein (MSP-1)⁸⁾を小細胞肺

表1 Dll4-Fc 遺伝子導入による小細胞肺がんの肝転移抑制

Cell line	Incidence	Liver weight (g)	Number of metastatic colonies*		
			Liver	Kidney	Lymph node
SBC-3-vector	7/7	2.6(1.6-5.4)	15.6(2-43)	4.0(0-11)	2.1(1-3)
SBC-3-Dll4-Fc	9/9	1.3(1.1-1.5) ^a	4.0(1-8) ^b	2.8(0-5)	2.0(1-3)
Cell line	Incidence	Liver weight (g)	Number of metastatic colonies*		
			Liver	Kidney	Bone
H1048-vector	6/6	1.1(0.8-1.4)	4.8(2-7)	59.8(39-77)	9.5(8-12)
H1048-Dll4-Fc	7/7	0.8(0.6-1.1)	1.6(1-3) ^c	49.9(19-84)	7.7(3-14)

ヒト小細胞肺がん細胞株SBC-3およびH1048に、レトロウイルスを用いてDll4-Fcの遺伝子導入を行い、強制発現株を作製した。これらの細胞の臓器転移をSCIDマウスモデルで検討した。

*Values are the mean (minimum-maximum).

^{a,c} $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$,

がん細胞株に強制発現すると、肝転移が有意に増加する(表2)⁹⁾。興味あることに、DII4-Fcの遺伝子導入株においてもMSP-1遺伝子導入株においても多臓器転移の中で変化が認められたのは肝転移のみであり、骨転移や腎転移への影響は認められなかった。これらの事実は、DII4-FcおよびMSP-1が小細胞肺がんの転移の中で、特に肝転移にのみ影響を与える分子である可能性を示唆している。小細胞肺がんは化学療法や放射線療法に感受性の高いがんではあるが、早期に抗がん剤に対する耐性を獲得し、治療抵抗性となる症例がほとんどである。そのような中で、肺の原発巣は制御されているにもかかわらず、肝転移の制御が困難となり死亡される症例を比較的多く経験する。このような患者に対する有効な治療法

の開発のためにも、肝転移制御メカニズムのより詳細な検討が必要である。

IPFの細胞分子病態と新規治療法開発

IPFは、原因不明の間質性肺炎IIPsの中で最も多く、予後不良の難病である。IPFの細胞分子病態においては従来から慢性炎症が重要視されてきたが、2000年代初頭から慢性炎症というよりはむしろ繰り返す肺胞上皮傷害とその異常修復が疾患の本態であるとする仮説が支持されるようになってきた(図2)¹⁰⁾。この異常修復の過程で中心的な役割を果たしている細胞が肺線維芽細胞であり、その増殖、分化、細胞外基質の産生に対して直接作

表2 MSP 遺伝子導入による小細胞肺がんの肝転移増強効果

Cell line	Incidence	Liver weight(g)*	Number of metastatic colonies*		
			Liver	Lung	Bone
SBC-5	6 / 6	1.3(1.0-2.2)	70(50-136)	29(15-48)	6(4-8)
SBC-5-Vector	8 / 8	1.5(1.2-2.4)	66(32-133)	26(8-54)	4(3-6)
SBC-5-MSP	7 / 7	1.5(1.3-1.9)	107(59-139)**	24(10-47)	5(3-7)

Cell line	Incidence	Liver weight(g)*	Number of metastatic colonies*		
			Liver	Kidney	Bone
H1048	6 / 6	0.9(0.6-1.1)	9(5-14)	24(11-30)	3(1-5)
H1048-Vector	6 / 6	1.0(0.7-1.5)	8(2-15)	31(19-36)	5(3-6)
H1048-MSP	8 / 8	1.2(0.8-1.5)	22(9-32)**	29(15-43)	3(1-6)

ヒト小細胞肺がん細胞株SBC-5およびH1048に、レトロウイルスを用いてMSPの遺伝子導入を行い、強制発現株を作製した。これらの細胞の臓器転移をSCIDマウスモデルで検討した。
 *Values are the mean (minimum-maximum).
 **P<0.05

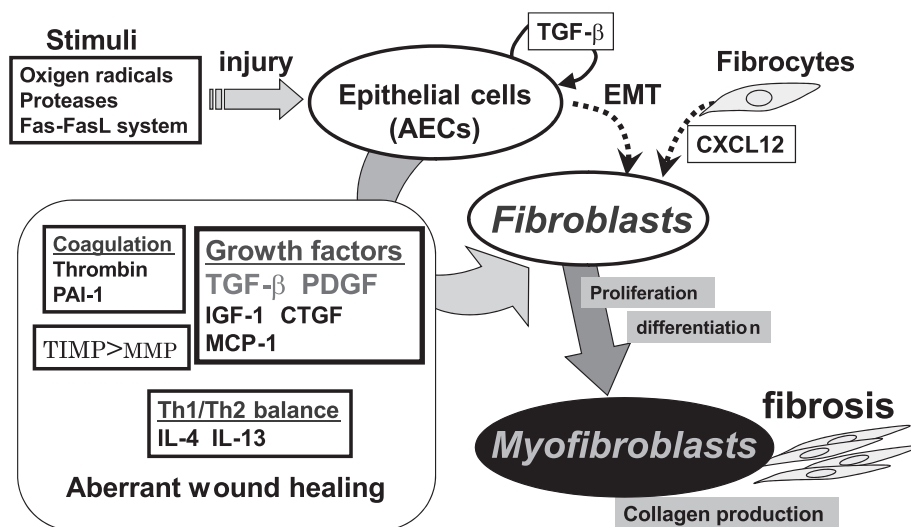


図2 特発性肺線維症 (IPF) の細胞分子病態

用する増殖因子が治療標的候補として検討されている。実際に IPF に対する抗線維化薬の開発においても、増殖因子レセプターに対するマルチキナーゼ阻害薬である Nintedanib (BIBF1120) の国際共同第Ⅲ相臨床試験が進行中である。

一方、近年肺線維芽細胞の起源に関心が注がれるようになってきた。これまでは線維化肺を構成する肺線維芽細胞は、間葉系細胞から分化した肺常在の線維芽細胞と考えられており、その表現型に heterogeneity が存在するものの、線維芽細胞の由来という観点からの議論はなされてこなかった。しかし、2004年以降、新しい肺線維芽細胞の起源として、骨髄由来の線維細胞 (fibrocyte) および上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) による肺線維芽細胞の存在が相次いで報告され^{11,12)}、肺線維芽細胞は複数の起源が存在すると考えられるようになった (図3)¹³⁾。現在、臨床検体を用いた検討も含め、個々の線維芽細胞の役割について検討が進められている。

Fibrocyte は骨髄由来のコラーゲン産生細胞として 1994年に同定された新しい細胞であり¹⁴⁾、マクロファージと線維芽細胞の両方の性格を有する細胞と考えられている。Fibrocyte は循環血液中から肺へ遊走し、細胞外基質を産生することで肺の線維化に関与すると考えられている。一方、fibrocyte は増殖因子を含むサイトカイン、ケモカインの分泌能が高い¹⁵⁾。筆者らは、ヒト末梢血由来 fibrocyte を用いて、fibrocyte が分泌する増殖因子の役割について *in vitro* で検討し、これらの増殖因子

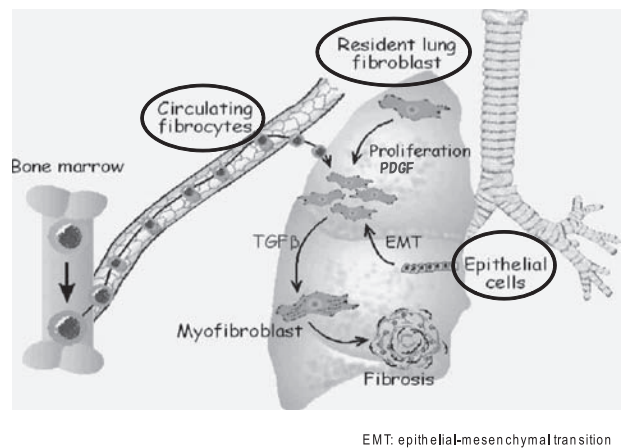


図3 肺線維芽細胞の起源¹³⁾

肺線維芽細胞の起源として、肺常在の resident fibroblast に加え、circulating fibrocyte 由来の線維芽細胞、epithelial mesenchymal transition 由来の線維芽細胞が報告されている。

産生を介して線維芽細胞の増殖・分化を促進することを確認した¹⁶⁾。従って、肺線維化における fibrocyte の役割については、①コラーゲンなどの細胞外基質産生、②サイトカイン・増殖因子などの液性因子産生、③筋線維芽細胞への分化の3つの作用による肺線維化促進作用が考えられる (図4)。抗線維化薬 Nintedanib の標的分子は、platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) のレセプターであることから、治療薬としての抗線維化メカニズムの一つとして、fibrocyte から産生される増殖因子の関与についても検討が必要である。

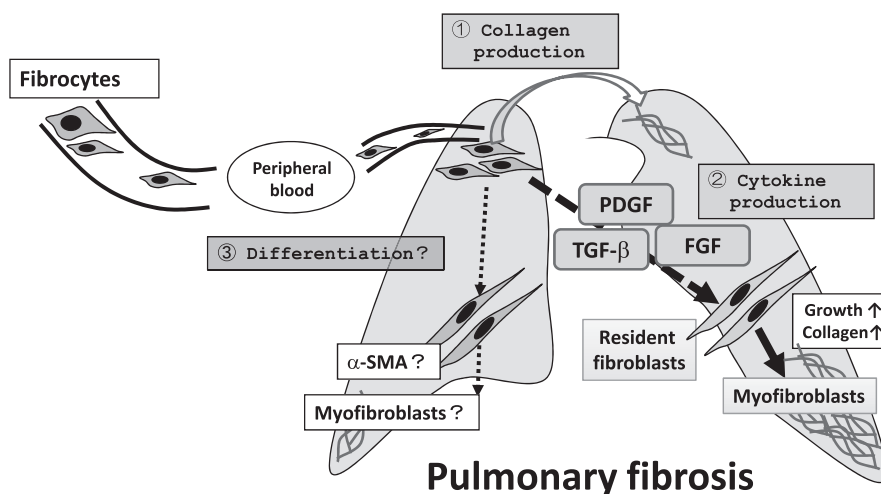


図4 肺線維症における fibrocyte の役割

肺へ遊走した fibrocyte には、①コラーゲンなどの細胞外基質産生、②サイトカイン・増殖因子などの液性因子産生、③筋線維芽細胞への分化の3つの作用による肺線維化促進作用が考えられる。

おわりに

難治性呼吸器疾患として、筆者らが検討を進めている肺がんとIPFについて最新の話題を中心に紹介した。肺がんはもちろんIPFにおいても近年多くの臨床試験が展開されている。できる限り迅速に臨床へ研究成果を還元するためには、基礎研究から臨床へ向けた一方向のトランスレーショナルリサーチではなく、臨床から基礎への逆方向のリバーストランスレーショナルリサーチも取り入れ、効率よく成果を循環させながら研究を進めていくことが重要と思われる。

文 献

- 1) Murray, C. J. L., Lopez, A. D.: Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of disease study. *Lancet*, **349**: 1498-1504, 1997
- 2) Sone, S., Yano, S.: Molecular pathogenesis and its therapeutic modalities of lung cancer metastasis to bone. *Cancer Metastasis Rev.*, **26**: 685-689, 2007
- 3) Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., *et al.*: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG 3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, **11**: 121-128, 2010
- 4) Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., *et al.*: Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.*, **362**: 2380-2388, 2010
- 5) Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J.: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**: 770-776, 1999
- 6) Noguera-Trois, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetzee, S., *et al.*: Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, **444**: 1032-1037, 2006
- 7) Kuramoto, T., Goto, H., Mitsuhashi, A., Tabata, S., *et al.*: Dll4-Fc, an inhibitor of Dll4-Notch signaling, suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through the downregulation of the NF-kappa-B activity. *Mol. Cancer Ther.*, **11**: 2578-2587, 2012
- 8) Skeel, A., Yoshimura, T., Showalter, S. D., Tanaka, S., *et al.*: Macrophage stimulating protein: purification, partial amino acid sequence, and cellular activity. *J. Exp. Med.*, **173**: 1227-1234, 1991
- 9) Sato, S., Hanibuchi, M., Kuramoto, T., Yamamori, N., *et al.*: Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis*, **30**: 333-344, 2013
- 10) Gross, T. J., Hunninghake, G. W.: Idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.*, **345**: 517-525, 2001
- 11) Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S. W., *et al.*: Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **113**: 243-252, 2004
- 12) Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., *et al.*: Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**: 13180-13185, 2006
- 13) Strieter, R. M., Mehrad, B.: New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*, **136**: 1364-1370, 2009
- 14) Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M., *et al.*: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.*, **1**: 71-81, 1994
- 15) Reilkoff, R. A., Bucala, R., Herzog, E.: Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, **11**: 427-435, 2011
- 16) Abe, S., Okazaki, H., Kishi, M., Takezaki, A., *et al.*: Fibrocytes regulates lung fibroblast activation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **185**: A4460, 2012

Analysis of molecular pathogenesis of lung cancer metastasis and pulmonary fibrosis for development of novel therapy

Yasuhiko Nishioka

Department of Respiratory Medicine and Rheumatology, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Respiratory diseases include several intractable diseases such as lung cancer and pulmonary fibrosis. Particularly, lung cancer is a leading cause of death among various cancers. The reason why lung cancer shows poor prognosis could be due to early and multi-organ metastasis. We have performed the research to explore the mechanisms involved in the metastasis using multi-organ metastasis model in SCID mice, which enable us to study the organ-specific mechanism of metastasis. On the other hand, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) also shows the prognosis similar to lung cancer. The molecular pathogenesis in IPF is still unclear. Recent findings show the several origins of lung fibroblasts. Fibroblasts derived from circulating fibrocytes or epithelial-mesenchymal transition are thought to play a role in the fibrogenesis in the lungs. To analyze how these cells contribute to pulmonary fibrosis might lead to develop the novel therapy. Since many clinical trials are now going on worldwide for IPF, the forward and reverse translational research seems to be crucial to rapidly produce the outcome for patients.

Key words : respiratory disease, lung cancer, metastasis, pulmonary fibrosis, fibroblast