

氏名（本籍） 小<sup>お</sup>澤<sup>ざわ</sup>知<sup>ち</sup>尋<sup>ひろ</sup>（栃木県）  
学位の種類 博士（薬科学）  
学位記番号 甲第5号  
学位授与の日付 平成28年3月18日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位論文題目 **Study of alveolar regeneration effect of  
PPAR  $\beta$  /  $\delta$  selective agonist on chronic  
obstructive pulmonary disease**  
(PPAR  $\beta$  /  $\delta$  選択的アゴニストの肺胞再生効果の検討)

論文審査委員 (主査) 教授 山下 親正  
教授 牧野 公子 教授 後藤 了  
教授 廣田 孝司 教授 花輪 剛久

## 論文内容の要旨

慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD)は、慢性的な肺の炎症を伴う、不可逆的な肺胞破壊を呈する疾患であり、2013年のLozano教授らの報告によると世界の死亡原因の第4位になった疾患であるが、その根治的な治療薬は、未だ開発されていない。全トランス型レチノイン酸(ATRA)は、COPDモデルラットにおいて、破壊された肺胞の再生効果が報告された。また、当研究室において、このATRAにヒト肺胞上皮幹細胞(human alveolar epithelial progenitor cells; AEPCs)をII型肺胞上皮細胞(alveolar type II epithelial cells; AT-II)に分化誘導する効果があること、およびATRAの経肺投与(2.5 mg/kg、週2回)にはエラストアーゼ誘導性COPDモデルマウスの肺を再生する効果があることが示された。しかし、そのメカニズムの詳細は解明されていない。

そこで本研究では、(1) ATRAによるAEPCsの分化誘導責任核内受容

体を同定し、その(2)分化誘導責任核内受容体のアゴニストによるCOPDモデルマウスの肺胞再生効果を評価することで、より効率的なCOPD根治治療薬の候補を探索した。

#### (1) ATRAによるAEP Csの分化誘導責任核内受容体の同定

ATRAは、細胞内において異なる2つの核内受容体、レチノイン酸受容体(Retinoic acid receptor; RAR)および(Peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR $\beta/\delta$ )、を刺激することが報告されており、RARは造血細胞や胚性癌種細胞の、PPAR $\beta/\delta$ は脂腺細胞や角化細胞の分化との関連がそれぞれ示唆されている。しかし、これらの核内受容体は、分化誘導以外にも、細胞増殖、アポトーシス、サイトカイン産生や代謝などに関与することが報告されており、AEP Csの分化に関わる核内受容体がどちらか1つだった場合、受容体選択制のない薬物を用いることで、分化誘導責任核内受容体以外の核内受容体によって、薬効の減弱や予期せぬ副作用が発現する恐れがある。

そこで、本研究では、それぞれの核内受容体に選択的なアゴニストを用いて、AEP CsのAT-1 Iへの分化誘導効果を比較した。

RAR選択的アゴニスト(TTNPB)処置群は、対照群に対して有意な分化誘導活性は示さなかったが、PPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニスト(GW0742)処置群は、対照群に比較して、AT-1 Iのマーカーとして知られる肺サーファクタントタンパク質(Surfactant protein; SP)-Aが陽性な細胞の割合を、1 $\mu$ M、6日間の処置で2.2倍増加させた。つまり、PPAR $\beta/\delta$ への刺激は、2.2倍の分化誘導促進効果を示した。また、AEP Csに対するGW0742およびATRA処置は、PPAR $\beta/\delta$ 核内受容体の下流に存在する遺伝子(Adipose differentiation-related protein; ADRP)のmRNAの発現量を有意に上昇させた。

以上の結果から、AEP CsのAT-1 Iへの分化誘導責任核内受容体は、PPAR $\beta/\delta$ であることが明らかとなった。

#### (2) PPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニストGW0742のCOPDモデルマウスの肺胞再生効果評価

COPDモデルマウスは、6週齢ICRマウス(♂)に肺の弾性繊維を構成す

る主要タンパク質であるエラスチンを分解する酵素であるエラスターゼを(分化誘導効果および平均肺胞壁間距離評価では、7.05 U/head、週1回、1週間処置に加え4.5 U/head、週2回、1週間、肺細胞エラストランスおよび0.05秒率評価では7.05 U/head、週1回、1週間、経肺投与し、肺胞を破壊することで作成した。このCOPDモデルマウスに10% DMSOを含む生理食塩水に溶解したGW0742を1.0 mg/kg、週2回、経肺投与した。対照群には、10% DMSOを含む生理食塩水を用いた。

2週間のGW0742処置は、AT-1 IのマーカーであるSP-AおよびDの発現量を肺組織切片において有意に増加させた。また、エラスターゼ処置によって延長した平均肺胞壁間距離(Lm)は、対照群に比べて有意に短縮した。

さらに、3週間のGW0742処置は、エラスターゼ処置によって低下した肺細胞エラストランスを有意に改善した。また、エラスターゼ処置によって低下した0.05秒間における強制呼気量(forced expiratory volume; FEV)と努力肺活量(forced vital capacity; FVC)の比率である0.05秒率(FEV 0.05%/FVC)は、対照群に比べて有意に改善した。GW0742処置による体重変化は観察されなかった。

以上の結果から、COPDモデルマウスにPPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニストであるGW0742を経肺投与することで、AT-1 Iへの分化誘導を促進することで、弾性組織の減少によって広がった肺胞を修復し、肺胞が再生したこと、さらに肺組織の弾性を改善したことで、呼吸機能を改善したことが明らかとなった。

本研究によって、PPAR $\beta/\delta$ 核内受容体への刺激によってAEP CsからAT-1 Iへの分化誘導が促進されること、およびPPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニストGW0742がCOPDモデルマウスの肺胞を修復し、呼吸機能を回復させることが示された。AEP Csから分化したAT-1 Iは、肺胞の表面張力を減少させ、肺胞の形状を維持するために必須な物質である肺サーファクタントタンパク質を産生する。COPD患者において気管支肺胞洗浄液中のSP-D濃度と呼吸機能に正の相関がみられることが報告されている。さらに、AT-1 Iは、肺胞表面の大部分を占めるI型肺胞上皮細胞(alveolar type I epithelial cells; AT-I)に分化することができる。よって、AEP CsのAT-1 Iへの分化を誘導することは、肺胞の修復において重要な役割を担っていると考えられる。

A T R AおよびR A R サブタイプ選択的アゴニストは、その造血細胞分化誘導作用およびアポトーシス誘導作用から急性前骨髄球性白血病治療薬として応用されており、副作用として、造血細胞分化誘導作用によって過剰に産生されるサイトカインとの関連が示唆されているレチノイン酸症候群、R A R  $\alpha$ および $\beta$ 刺激作用に由来する催奇形性やR A R  $\gamma$ 刺激作用に由来する皮膚障害が報告されている。P P A R  $\beta / \delta$ 選択的アゴニストを用いることで、A T R Aを治療薬として用いた際に生じる可能性があるこれらの副作用を回避できると考えられる。

以上の点から、P P A R  $\beta / \delta$ アゴニストは、C O P D治療薬候補となり得る可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、2015年のWHOの報告によると世界の死亡原因の第3位の疾患であり、その治療薬の開発が急務となっている。

現在、COPDの治療法として、薬物療法・、酸素療法・外科療法が用いられている。薬物療法では、主症状の呼吸困難を緩和するための気管支拡張薬や抗炎症薬が用いられており、不可逆的な肺泡破壊に対する根治的な治療薬は、未だ開発されていない。全トランス型レチノイン酸（ATRA）は、COPDモデルラットにおいて、破壊された肺泡の再生効果が報告された。しかし、ATRAは、ヒトCOPD患者を対象にした臨床試験において効果を示さなかった。代謝酵素の自己誘導による作用減弱が原因として考えられたが、単純な高用量化では、副作用の発現が増強を招くことが臨床応用上の問題点となっていた。

本研究では、ATRAのヒト肺泡上皮幹細胞（AEP Cs）からII型肺泡上皮細胞（AT- II）への分化誘導効果に着目した。AT- IIは、肺サーファクタントタンパク質の産生および肺泡表面の大部分を占めるI型肺泡上皮細胞に分化することによって肺泡の表面張力減少および形状維持に寄与する。

したがって、AEP CsのAT- IIへの分化誘導を促進することは、肺泡の修復において重要な役割を担っていると考えられる。そこで、本研究では、その分化誘導メカニズムの詳細を解明し、上記の課題を克服することを目的とした。

第2章では、ATRAが、異なる複数の核内受容体を刺激することに着目した。なかでも、RARは、造血細胞や胚性癌種細胞の、P P A R  $\beta / \delta$ は、脂腺細胞や角化細胞の分化との関連がそれぞれ示唆されている。しかしながら、これらの核内受容体は、分化誘導以外にも、細胞増殖、アポトーシスや代謝などに関与することが報告されている。AEP Csの分化に関わる核内受容体がどちらか1つだった場合、選択制のある薬物を用いた場合と比べて受容体選択制のない薬物では、副作用の発現を招く可能性が高いと考えられた。そこで、本研究では、RARとP P A R  $\beta / \delta$ 、それぞれの核内受容体に選択的なアゴニストを用いて、AEP CsのAT- IIへの分化誘導効果を比較した。

その結果、RAR選択的アゴニスト（TTNPB）処置群は、対照群に対して有意な分化誘導活性は示さなかったが、PPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニスト（GW0742）処置群は、対照群に比較して、AT-1Iのマーカーとして知られる肺サーファクタントタンパク質が陽性な細胞の割合を増加させた。つまり、RARではなく、PPAR $\beta/\delta$ への刺激が、AEP CsのAT-1Iへの分化誘導促進効果を示した。また、この分化誘導促進効果は、PPAR $\beta/\delta$ をノックダウンしたAEP Csにおいては、得られなかった。また、AEP Csに対するGW0742およびATRA処置は、PPAR $\beta/\delta$ 核内受容体の下流に存在し、脂腺細胞や角化細胞の分化過程においてもその発現量が上昇することが報告されている遺伝子のmRNAの発現量を有意に上昇させた。

以上の結果から、AEP CsのAT-1Iへの分化誘導責任核内受容体は、PPAR $\beta/\delta$ であることが明らかとなった。

第3章では、第2章においてAEP CsのAT-1Iへの分化誘導効果を示したGW0742によるエラスターゼ誘導性COPDモデルマウスの肺胞再生効果を肺組織における分化誘導効果・肺組織修復効果・呼吸機能改善効果・毒性の面から評価した。また、薬物の肺内への分布が多くなるよう、経肺投与法を用いた。

その結果、GW0742の経肺投与は、AT-1Iのマーカーである肺サーファクタントタンパク質の発現量を肺組織切片において有意に増加させた。また、エラスターゼ処置によって延長した平均肺胞壁間距離（Lm）を対照群に比べて有意に短縮し、エラスターゼ処置によって低下した肺細胞エラストランスおよびマウスの呼吸器機能の指標である0.05秒率を、対照群に比べて有意に改善した。GW0742処置による体重変化は観察されなかった。

以上の結果から、COPDモデルマウスにPPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニストを経肺投与することで、肺胞再生効果が得られることが明らかとなった。

ATRAおよびRARサブタイプ選択的アゴニストは、その造血細胞分化誘導作用およびアポトーシス誘導作用から急性前骨髄球性白血病治療薬として臨床応用されているが、副作用として、呼吸困難や体重変動などが報告されている。また、ATRAの代謝酵素の自己誘導はRARへの刺激に由来することが報告されている。よって、PPAR $\beta/\delta$ 選択的アゴニストは、これらRAR由来のATRAの問題点を克服する有用なCOPD根治治療薬となることが期待できる。

以上、本研究は博士（薬科学）の学位を与えるに十分な内容を有すると判断される。