

## 【要約】

Effect of nintedanib via eosinophils for  
chronic lung allograft dysfunction in  
murine orthotopic lung transplantation

(マウス同所性肺移植における

慢性移植肺機能不全に対する

好酸球を介したニンテダニブの効果)

# 千葉大学大学院医学薬学府

## 先端医学薬学専攻

(主任：鈴木秀海教授)

山中 崇寛

学位申請論文の要約

### 【背景】

肺移植は末期呼吸不全に対する治療として確立しているが、その予後は他臓器と比較して不良である。予後不良である最大の原因の1つに慢性移植肺機能不全

(CLAD)がある。CLADは慢性的な呼吸機能の低下と定義されるが、その発症には免疫学的要因と生理学的要因の両方が関与しており、その病態が複雑であるため、有効な治療法が確立していない。CLADの制御に関するこれまでの研究はCLADの背景にあるとされる慢性拒絶に着目されてきたが、臨床応用に至る有効な結果は得られなかった。そこで本研究ではCLADの最終的に pathway が CLAD の発症原因や機序に関わらず気道および肺実質の線維化に至ることに着目し、線維化の制御をすることでCLADの治療になりうると考えた。進行性の線維化を伴う間質性肺疾患の治療薬であるニンテニブはその進行を緩和する有望な介入と位置づけられ、本研究では抗線維化薬であるニンテダニブのCLAD緩和における治療効果を評価し、その抗線維化効果を媒介する好酸球の役割を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

過去にマウス CLAD モデルと知られている主要抗原不一致マウス同所性肺移植モデル (ドナーマウス: B6D2F1 [H-2b/d] → レシピエントマウス: DBA/2 [H-2d]) を

用いた。レシピエントマウスは、無処置群、ニンテダニブ投与群、ニンテダニブと抗インターロイキン-5抗体（抗IL-5抗体）の併用による好酸球抑制群の3群に分けられた。ドナーマウス、レシピエントマウスともDBA/2としたコントロール群を作成した。ニンテダニブの投与は肺移植の翌日から連日の経口投与とし、抗IL-5抗体は術後1、8、15、22日目に1mg/kgの腹腔内投与を行った。また、ドナーマウス、レシピエントマウスともDBA/2としたコントロール群を作成した。予備実験では、ニンテダニブ投与が肺の好酸球数を増加させることが示された。術後28日目に犠牲死し、摘出した肺の組織学的評価（Ashcroftスコア、fibrosisスコア、OBスコア）、コラーゲンの定量化、フローサイトメトリーによる肺移植片の免疫細胞のプロファイリングを行い、ニンテダニブと抗IL-5抗体の投与の効果を検証した。

### 【結果】

無処置群対ニンテダニブ群は、Ashcroftスコア ( $4.13 \pm 0.30$  vs.  $3.00 \pm 0.32$ ,  $p = 0.030$ )、fibrosisスコア ( $2.63 \pm 0.18$  vs.  $1.80 \pm 0.20$ ,  $p = 0.013$ )、およびOBスコア ( $2.13 \pm 0.13$  vs.  $1.40 \pm 0.24$ ,  $p = 0.014$ )であり、ニンテダニブの投与により病理学的に有意に気道および肺の線維化が抑制されていた。また、ニンテダニブ群では無処置群に比べてコラーゲン沈着が  $0.59 \pm 0.12$  倍減少していた ( $p = 0.036$ )。肺内の好酸球の割合はニンテダニブ投与マウスで増加したが ( $6.03 \pm 0.96$  vs.  $2.46 \pm 0.32$ ,  $p = 0.002$ )、ニンテダニブと抗IL-5抗体を併用投与することで肺内の好酸球の割合は低下した ( $2.58 \pm 0.43$  対  $6.03 \pm 0.96$ ,  $p < 0.001$ )。ニンテダニブ投与群とニンテダニブ・抗IL-5抗体の併用群を比較すると、併用群でAshcroftスコア ( $3.00 \pm 0.32$  vs.  $4.20 \pm 0.40$ ,  $p = 0.040$ )が有意に高く、またコラーゲン量が  $1.39 \pm 0.20$  倍が増加していた ( $p = 0.036$ )。

### 【考察】

本研究により、CLADのマウス同所性肺移植モデルにおいて、ニンテダニブが肺の線維化の進行を有意に抑制することが明らかになった。さらにコラーゲン定量の結果はこの所見を裏付け、ニンテダニブを投与した肺ではコラーゲンの沈着が減少していることを明らかにした。フローサイトメトリーでは、ニンテダニブ投与後の肺における好酸球数の増加が明らかになった。しかし、抗IL-5抗体を併用投与すると、この好酸球反応が緩和され、線維化が部分的に抑制された。これらの所見を総合すると、ニンテダニブはCLADにおいて、部分的に好酸球経路を介して抗線維化作用を媒介する

ことが示唆された。

これまでの研究の多くが主に免疫機構に焦点を当ててきたのに対し、本研究では CLAD の進行を抑制に、ニンテダニブによる抗線維化作用が有効であることを証明した。ニンテダニブは、すでに進行性の線維化を伴う間質性肺疾患に対する有効性が確立されており、PDGFR $\alpha$   $\beta$ 、FGFR1、2、3、VEGFR を標的とする低分子チロシンキナーゼ阻害剤である。これらの受容体を阻害すると、単核球から M2 マクロファージへの分化、線維細胞の遊走、周皮細胞から筋線維芽細胞への分化、線維芽細胞の増殖と形質転換の阻害、細胞外マトリックスの遊離の阻害、酵素の分解の増加が阻害される。ブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いた先行研究では、ニンテダニブが PI3K/AKT/mTOR 経路を調節することで、炎症、アポトーシス、酸化ストレスを減衰させることが示されている。しかし、好酸球の活性化を含む肺細胞の動態に対する効果を調べた *in vivo* の研究はほとんどないため、本研究の焦点である好酸球を含む肺細胞に対するニンテダニブの *in vivo* 効果や肺の線維化における好酸球活性化経路は、不明である。CLAD に対する抗線維化作用には好酸球が関わっていることが判明したが、好酸球だけがニンテダニブの作用を及ぼす細胞ではない可能性がある。

好酸球は、以前より寄生虫防御やアレルギー性炎症における役割があると認識されてきた。しかし、最近の研究では、好酸球は分泌顆粒タンパク質、サイトカイン、近隣細胞との直接的な相互作用を通じて免疫反応を調節することが示唆されている。マウスの肺内の好酸球は、主に免疫調節や恒常性の維持を示す resident eosinophils (rEos) と、気道における炎症性を示す inflammatory eosinophils (iEos) に分類できる。過去の報告では、トランスクリプトーム・プロファイリング解析により、rEos において発現している遺伝子が免疫応答の負の制御に関与していることが示された。しかし、本研究で観察されたニンテダニブ治療後の好酸球増多が、rEos もしくは iEos、あるいはその両方に対応するものであるかどうかはまだ不明であり、さらなる解析が必要である。

興味深いことに好酸球の枯渇は急性拒絶反応を改善せず、むしろ免疫抑制がない場合には拒絶反応を悪化させることがこれまでの研究で示されている。さらに、好酸球は肺移植片における誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の唯一の産生因子であり、CD8<sup>+</sup> T 細胞はインターフェロン- $\gamma$  を産生し、好酸球に PD-L1 と iNOS を発現させ、CD8<sup>+</sup> T 細胞とのシナプス形成につながり、エフェクター分化を防ぐことが報告されている。これらの知見は、肺移植免疫と線維化における好酸球の複雑で多面的な役割を強調するものである。さらに、これまでの研究で、ニンテダニブが肺移植後や

同種造血幹細胞移植後の CLAD に対する呼吸機能低下の進行を抑制した症例が報告されている。これらの知見を踏まえると、今後実臨床において、CLAD に対してニンテダニブの効果を検証する臨床試験が実現する可能性がある。

本研究において CLAD に対するニンテダニブの効果は示されたが、その効果は限定的であり、CLAD を完全に抑制することはできなかった。ニンテダニブは CLAD の最終経路である気道と肺の線維化を改善したが、CLAD を十分に抑制するには CLAD の原因として長い間考えられてきた慢性拒絶反応に対する免疫抑制を追加することも必要かもしれない。さらに、CLAD における CD26 阻害とメトホルミンの有効性が最近報告されており、これらの薬剤を併用することでさらなる有効性が期待される。

#### 【結論】

本研究は、CLAD に対する抗線維化療法としてのニンテダニブの可能性を浮き彫りにした。CLAD の多因子性を考慮すると、ニンテダニブ療法に免疫抑制剤を追加したり、CD26 阻害剤やメトホルミンのような新規治療薬を併用することで、治療効果が高まる可能性がある。今後の研究では、ニンテダニブの効果の根底にある正確なメカニズムを解明し、実臨床においてその有効性を検証することに焦点を当てるべきである。