

研究題目 抗線維化活性を有する新規化合物の細胞内標的分子の同定

研究組織

研究代表者：石崎 敏理（大分大学医学部薬理学講座）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：加藤 明良（大分大学医学部臨床薬理学講座）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

近年の科学技術および医療の進歩により、多くの疾患に対する治療薬が開発され、治療満足度が高まってきている。その一方で、「治療満足度」・「治療に対する薬物貢献度」がともに低く、十分な治療法が確立していない疾患もあり、その中に特発性肺線維症 (IPF) も含まれている。

一般的に組織の線維化は正常な組織修復過程の病的な過剰状態と理解されており、損傷刺激が繰返されると TGF-β 産生は持続的に維持され、慢性の TGF-β 過剰産生の悪循環に陥る。従って、治療への視点として、TGF-β 産生持続の悪循環を断ち切る方法の探索されている。

研究代表者らは、蛋白質間相互作用(PPI)を阻害するヘリックス模倣化合物のライブラリーを独自に作成した。このライブラリーを用い TGF-β 経路阻害活性を有する化合物のスクリーニングを実施し、TGF-β 刺激依存的な情報伝達経路を阻害する遺合成化合物 Y34-1 を見出した。そこで、本研究は、TGF-β 経路阻害薬の細胞内標的分子を同定することを目的として研究を計画した。

[1-2] 研究の方法・経過

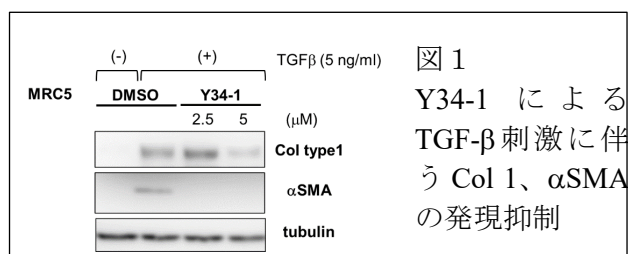
① TGF-β 情報伝達経路を阻害する新規合成化合物 Y34-1 の同定

新規合成化合物ライブラリー（約 2000 化合物）を用い、MRC5 細胞、A549 細胞において TGF-β 刺激に伴うコラーゲンタイプ I (Col1) や αSMA (図 1)、および CTGF の発現を抑制する新規合成化合物 Y34-1 を見出した (図 1)。

② Y34-1 結合蛋白質の同定

Y34-1 結合蛋白質の同定するために Y34-1 にビオチンを付加した TCB1259 を合成した。先ず、TCB1259 が TGF-β 経路阻害活性を保持して

いるかを MRC5、A549 細胞を用い検討した。

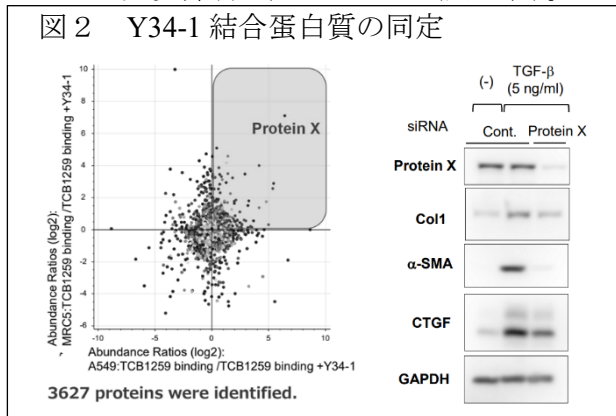


その結果、Y34-1 と同様に TCB1259 添加により、Col 1、αSMA の発現抑制を確認した。次いで、前述の 2 細胞株の細胞懸濁液を調整し、そこに TCB1259 を添加後、ストレプトアビジンビーズを加え、pull down 実験を実施した (TCB1259 binding)。同時に、その pull down 実験時に過剰量の Y34-1 を添加したものを調整し (TCB1259 binding+Y34-1)、それぞれのビーズに結合した蛋白質を質量分析により同定した。は、図 2 に示すように、MRC5、A549 細胞において、得られたそれぞれの蛋白質に対し、(TCB1259 binding) / (TCB1259 binding+Y34-1) の比を求め、プロットした (図 2)。その結果、2 つの細胞株ともに (TCB1259 binding) / (TCB1259 binding+Y34-1) の比が大きいものを Y34-1 結合蛋白質 Protein X (現在特許出願準備中であるため蛋白質名の公表は控える) として同定した。

既報では、Protein X の細胞機能は、複数の代謝経路を調節することが報告されており、欠損細胞では、呼吸不全、解糖代謝シフト、及び TCA 回路と β-酸化の障害を特徴とする代謝異常を示すことが報告されている。

同定した Protein X が TGF-β 情報伝達経路に関与しているかを調べるために、RNAi 法により Protein X を枯渇させた細胞を TGF-β で刺激した。その結果、Protein X 枯渇細胞では TGF-β

刺激により上昇が確認できる Col type1 α SMA CTGF の発現抑制が認められた (図 2 右)。



以上、実験①②により新規合成化合物 Y34-1 は、TGF- β 情報伝達経路を阻害すること、また Y34-1 結合蛋白質として同定した Protein X は TGF- β シグナルに寄与することが判明した。

③ IPF モデルを用いた Y34-1 の効果の検討

SFTPC^{I73T} knock-in マウスを用い、Y34-1 による IPF 病態抑制効果を検討した。本マウスはタモキシフェンにより変異 SFTPC の発現が誘導される。タモキシフェン (TAM) 投与後 14 日までは炎症が増悪している時期であり、投与後 28 日で肺に線維化が確認できる。

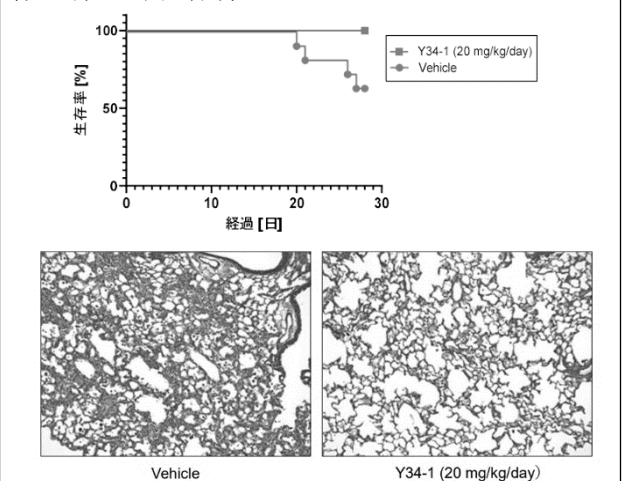
本マウスを TAM 投与後 14 日から Y34-1 を連日投与し、生存への影響を評価した。その結果、Y34-1 未処群 (vehicle) では TAM 投与後 20 日より連日死亡するのに対し、Y34-1 投与群では、死亡例は確認できなかった (図 4 上段)。そこで、TAM 投与後 28 日 (14 日目から Y34-1 投与 (図 4 右)) のマウスより肺を摘出し、その外観を観察したところ、Y34-1 未処群 (vehicle) では病態進行が顕著であり、臓器色が濃赤褐色であるのに対し、Y34-1 投与群の肺では一部に濃赤褐色部位を認めるが、大部分は正常時のそれと近かった。また、肺組織の乾湿重量を測定したところ、Y34-1 未処群 (vehicle) と比較して Y34-1 投与群では有意に小さく、正常値に近かった。さらに、対象群では肺胞壁の肥厚が確認できるのに対し、Y34-1 投与群では、肺胞壁の肥厚が認められなかった (図 4 下段)。加えて、肺胞洗浄液中の細胞数も有意に減少した。

以上のように SFTPC^{I73T} knock-in マウスを用いた解析から、Y34-1 は生存延長効果、炎症の軽減効果も認められた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果
 本共同研究実施により、肺線維化抑制活性を有する新規合成化合物 Y34-1 の結合蛋白質が同定できた。Y34-1 結合蛋白質はこれまで線維化

図 4 Y34-1 投与 SFTPC^{I73T} knock-in マウスの生存曲線と肺組織像



との関連の論文報告はなく、病態改善への新たな経路の発見につながった。Y34-1 結合蛋白質は複数の代謝経路に関与する蛋白質であり、実際、研究代表者はメタボローム解析により、Y34-1 投与により TCA 回路の代謝産物量の変動が起こることを見出している。また、顕著に変動している代謝物はこれまで他臓器の線維化との関係が報告されているものである。

このように本共同研究は、単なる結合蛋白質の同定にとどまらず、Y34-1 による病態改善の分子機序の解明の一助となったと確信している。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

Y34-1 結合蛋白質がどのように線維症の IPF 病態発現に関与することが明らかにできれば、線維症発現機序の解明の一助となるとともに、Y34-1 結合蛋白質が関与する細胞内情報伝達経路が線維症治療薬の新規標的となり得ることが期待される。

【3】主な発表論文等

- [3-1] 論文発表
なし
- [3-2] 学会発表
なし
- [3-3] 成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

- Y34-1 の化合物最適化に向け、Protein X との複合体構造解析の実施に向け、Protein X 中の Y34-1 結合領域の同定を実施している。
- 論文作成は予定しているが、投稿前に特許を申請する予定であり、申請が完了し次第、論文を投稿する。