

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08769

研究課題名(和文) 上皮間葉移行阻害薬は全身性強皮症の新規治療薬となりうるか

研究課題名(英文) Could epithelial-mesenchymal transition inhibitors be a novel treatment for systemic sclerosis?

研究代表者

長谷川 稔 (Hasegawa, Minoru)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：50283130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は、皮膚や内臓臓器に線維化をきたす膠原病である。最近我々は、ハイスループットスクリーニングにより、上皮間葉転換を阻害しうる化合物LG283を見出した。LG283は、ヒト皮膚線維芽細胞においてTGF- β による細胞外基質蛋白、 α -SMAの発現とSmad3のリン酸化を抑制した。また、LG283は培養上皮細胞において、TGF- β による上皮間葉移行を阻害した。さらに経口LG283はブレオマイシン誘導皮膚線維化マウスモデルの皮膚線維化を有意に抑制したことから、本化合物が強皮症の治療薬候補となる可能性が示唆された。そして我々の薬剤スクリーニング法が、線維化疾患の治療開発に有用と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は、皮膚や内臓が線維化によって硬くなる膠原病で、厚労省の難病にも指定されている。そして、膠原病の中でも治療が難しく、新しい治療薬の開発が望まれている。本研究は多数の化合物の中から、線維化を抑制する可能性のある薬剤を独自の方法でスクリーニングし、細胞実験と動物実験で、線維化を抑制する化合物LG283を見出したものである。さらに詳細な検討を行うことにより、LG283を実際の臨床試験に発展させたい。また、本研究成果は、我々の薬剤スクリーニング法が、抗線維化薬の開発に有用な可能性があることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is a collagen disease that exhibits fibrosis in the skin and internal organs. Recently, our high-throughput in vitro screening discovered a small compound, LG283, that may disrupt the differentiation of epithelial cells into myofibroblasts (EMT). LG283 suppressed TGF- β -induced expression of extracellular matrix and α -SMA, and Smad3 phosphorylation in cultured human dermal fibroblasts. LG283 was also found to block EMT in cultured human epithelial cells. During these processes, Smad3 phosphorylation was inhibited by LG283 treatment. In the bleomycin-induced skin fibrosis model, oral LG283 efficiently protected against the development of skin fibrosis. The LG283 compound exhibits antagonistic activity on fibrosis through inhibition of TGF- β signaling pathways and thus, may be a candidate therapeutic for treatment of SSc. We also propose that the screening of EMT regulatory compounds may result in additional therapeutic approaches for tissue fibrosis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：強皮症 線維化 治療薬 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚や内臓臓器の線維化と血管障害を特徴とする膠原病である。その病態はいまだ明らかではなく、治療法も十分に確立されていない。これまでに、Transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad シグナルが、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化とそれからのコラーゲンなどの細胞外基質の産生誘導に中心的な役割を果たしていると考えられている。

最近我々は、共同研究者らが開発した上皮間葉移行 (EMT) を抑制する薬剤の *in vitro* のハイスクリーンにより、多数の化合物の中からクルクミン化合物のひとつである LG283 を抗線維化薬の候補として見出した。

2. 研究の目的

LG283 の線維化抑制作用を、ヒトの皮膚由来の培養線維芽細胞に添加して明らかにする。また、ブレオマイシン (BLM) 誘導性の皮膚線維化モデルのマウスに経口投与し、皮膚線維化の治療薬としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) LG283

LG283 は、Okuda や Sugimoto らにより作製されたクルクミン誘導体のひとつで PE859 の名前で報告されている (3-[(1E)-2-(1H-indol-6-yl)ethenyl]-5-[(1E)-2-[2-methoxy-4-(2-pyridylmethoxy) phenyl] ethenyl]-1H-pyrazole)¹⁾。

(2) 線維芽細胞を用いた実験

ヒトの正常包皮皮膚由来の培養線維芽細胞に TGF- β 1 を加えて、筋線維芽細胞への分化やコラーゲン、ファイブロネクチンなどの発現を誘導し、同時に添加した LG283 がそれらを抑制するかどうかを確認した。

(3) 上皮間葉移行 (EMT) の実験

ヒトの非小細胞肺癌細胞株である A549 にリコンビナント TGF- β 2 を添加して EMT を誘導した。その際に 0.5 μ M の LG283 を加えることにより、それが抑制されるかどうかを検討した。

(4) マウス実験

8-10 週齢の C57BL/6 マウスの背部に BLM を 28 日間皮下注射 (1mg/ml 生食を 150 μ l) して線維化を誘導し、それが LG283 の経口投与 (40mg/kg または 80mg/kg) を同時に開始することでどの程度抑制されるか、副作用がみられるかどうかを確認した。

(5) 評価方法

細胞や組織のサンプルについて、蛍光免疫染色、組織染色、免疫組織化学染色、Western blotting、ELISA、フローサイトメトリーなどを用いて、線維化に関わる評価や病態について詳細に解析した。

4. 研究成果

(成果)

ヒトの皮膚由来の培養線維芽細胞に TGF- β 1 を加えると p-SMAD3 の核内移行がみられるが、LG283 はそれを抑制した(図 1a)。また、p-SMAD3

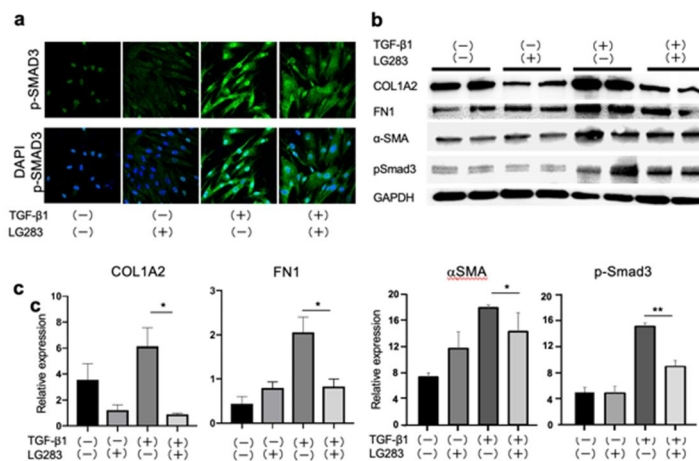


図 1

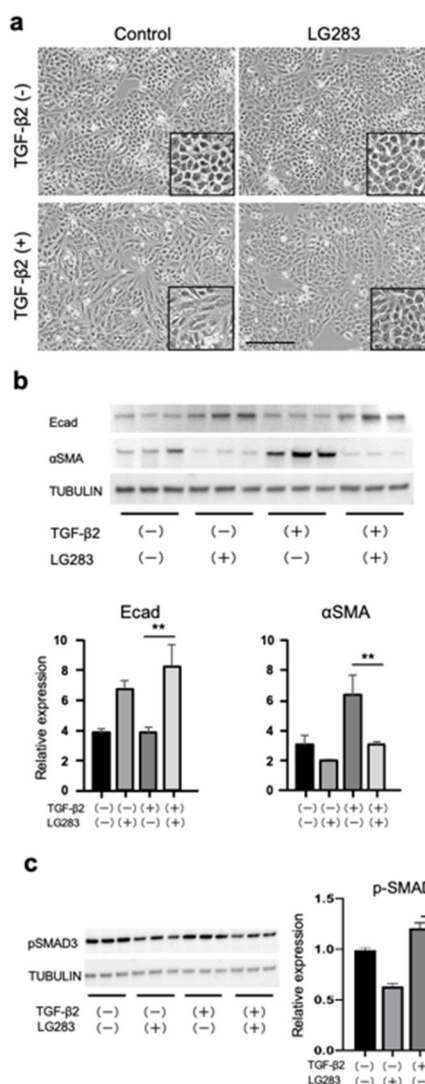


図 2

に加え、細胞外基質である I 型 collagen (COL1A2) や fibronectin 1 (FN1)、筋線維芽細胞の指標である α SMA の蛋白の TGF- β 1 による発現増加が、LG283 で抑制されることが Western blotting で示された (図 1b, c)。

次に、LG283 は EMT を抑制する薬剤としてスクリーニングされたことから、EMT の阻害作用を確認することとした。肺の上皮細胞に TGF- β 2 を加えると細胞同士の接着が弱くなり、紡錘形状の間葉系細胞に似た形態に変化する。しかし、LG283 を添加した場合はそれが抑制された (図 2a) また、それらの細胞を Western blotting で検討すると、TGF- β 2 による上皮マーカーの E-cadherin (Ecad) の発現低下と間葉系マーカーの α SMA の発現上昇が LG283 で是正されていた (図 2b) また、TGF- β 2 による p-SMAD3 の発現増加も LG283 で抑制された (図 2c)。

これらの *in vitro* の結果を踏まえ、BLM 誘導性強皮症モデルに対する LG283 経口投与の有用性を検討した。BLM による皮膚の肥厚、COL1A2 や FN1 の蛋白発現は、LG283 による治療で有意に抑制された (図 3) 。なお、フローサイトメトリーや免疫組織染色による検討で、LG283 は浸潤細胞のプロファイルや数には明らかな影響を示さなかった (データ非表示) 。また、LG283 は BLM による α SMA 陽性の筋線維芽細胞の増加を抑制した (図 4a) 。LG283 は、組織中の TGF- β 1 や SMAD3 の蛋白量には有意な影響を及ぼさなかったが、BLM による p-SMAD3 の発現増加を有意に抑制した (図 4b, c) 。なお、LG283 投与による明らかな副作用は認められなかった。

(考察)

本研究において、クルクミン化合物の LG283 が *in vitro* と *in vivo* の両方で皮膚の線維化を抑制する作用が示された。LG283 は、皮膚線維芽細胞において TGF- β 依存性の筋線維芽細胞への分化、SMAD3 のリン酸化、I 型 collagen (COL1A2) や fibronectin 1 (FN1) の発現を抑制した。また LG283 の経口投与は、BLM 誘導性強皮症モデルの皮膚の線維化の進行を有意に抑制した。最近の研究では、ヒトの全身性強皮症患者皮膚の筋線維芽細胞のほとんどが局所の線維芽細胞に由来する可能性が示されている。しかし、肺などの他臓器では上皮細胞に由来する可能性も想定される。

LG283 は肺上皮細胞の EMT を有意に抑制したことから、本モデルでは評価ができなかったが、全身性強皮症にみられる間質性肺炎などの抑制にも有用な可能性があり、今後検討が必要と考えている。また、本研究成果は、我々の EMT を抑制する薬剤のハイスループットスクリーニングが、抗線維化薬を見出すうえで有用な方法であることを示唆するものと考えられた。

(参考文献)

1) Okuda M, Hijikuro I, Fujita Y, Wu X, Nakayama S, Sakata Y, et al. PE859, a novel tau aggregation inhibitor, reduces aggregated tau and prevents onset and progression of neural dysfunction *in vivo*. PLoS One. 2015;10(2):e0117511.

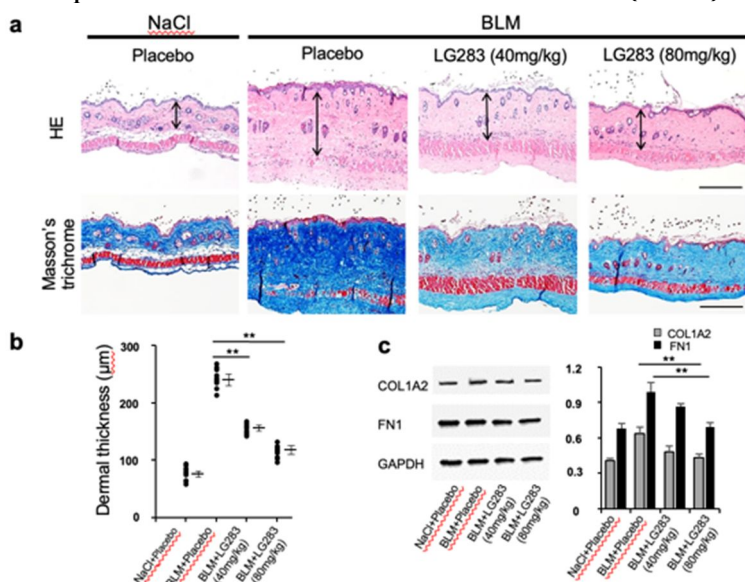


図 3

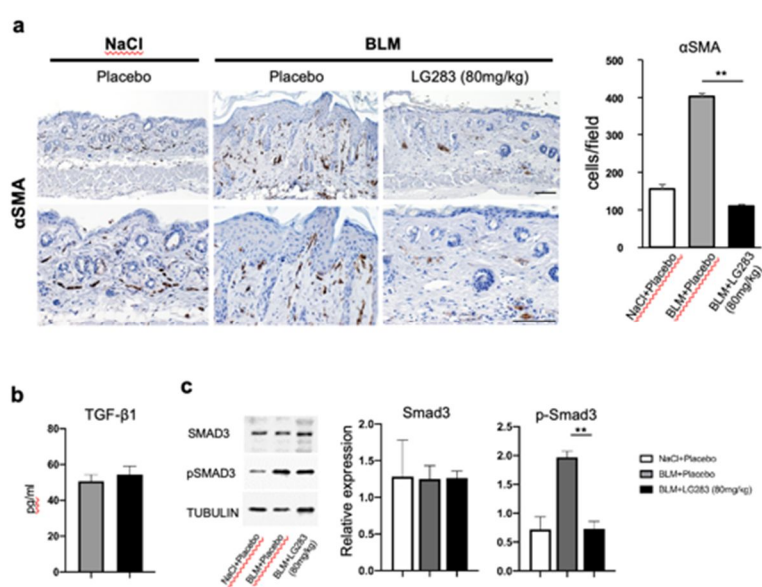


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Utsunomiya A, Chino T, Kasamatsu H, Hasegawa T, Utsunomiya N, Luong VH, Matsushita T, Sasaki Y, Ogura D, Niwa SI, Oyama N, Hasegawa M.	4. 巻 24
2. 論文標題 The compound LG283 inhibits bleomycin-induced skin fibrosis via antagonizing TGF- signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-022-02773-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 A. Utsunomiya, T. Chino, N. Oyama, S. Niwa, M. Hasegawa
2. 発表標題 A curcumin-derivative LG283 that inhibits TGF- /Smad/Snail-dependent mesenchymal transition ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis and vascular injury
3. 学会等名 2021 SID Virtual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------