

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17346

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングによる全身性強皮症の新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, alleviates bleomycin-induced skin fibrosis in mice : drug repositioning study for human systemic sclerosis

研究代表者

加藤 卓浩 (Kato, takuhiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：80867820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：全身性硬化症は、皮膚線維化を特徴とする結合組織疾患である。独自のハイスループットスクリーニング法により、アルドースレダクターゼ阻害剤Epalrestat (EPS)が、抗線維化活性を持つ潜在的な化合物であることが特定された。我々は、EPSがBLM誘導性強皮症モデルマウスの皮膚線維化と培養ヒト正常皮膚線維芽細胞の形質転換を阻害するかを検討した。線維芽細胞実験では、TGF- β 1依存性のCollagen1、FN1、SMAの発現増加を抑制した。動物実験では、EPS経口投与で、BLMを注射したマウスの皮膚線維化が抑制された。本研究の結果は、強皮症における線維化抑制の新規治療薬になり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他の膠原病では抗体治療薬や分子標的薬などの治療薬が次々と開発されて使用されているが、強皮症だけはこれまで多くの臨床試験が行われている一方で、ことごとく有用性が証明されない。そのため、これまでとは異なる手段での薬剤の発掘が必要と考える。本研究のように間葉移行を標的とした治療薬の開発はみられず、世界的にも独自性の高い斬新な研究と考えられる。強皮症ではなぜ血管障害が線維化に先行するのかはわかっていないが、この謎を解く鍵の一つは内皮間葉移行ではないかと考える。本課題は、間葉移行を標的とすることで、強皮症の治療薬の開発にブレークスルーをもたらす可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by skin fibrosis. Our original high-throughput in vitro screening method identified the aldose reductases (AR) inhibitor epalrestat (EPS) as a potential compound with antifibrotic activity among numerous commercial drugs. We aimed to examine whether EPS inhibits skin fibrosis in bleomycin-induced SSc model mice and phenotypical alteration on cultured human normal dermal fibroblasts. In vitro EPS treatment suppressed the TGF- β 1-dependent increase in type I collagen, fibronectin 1, SMA. In vivo, oral administration of EPS gave a marked inhibition of skin fibrosis in the bleomycin-injected mouse skin. Our results provide the first evidence that AR may be a major pathogenic contributor and novel therapeutic target for skin fibrosis in human SSc, with a treatment perspective of its inhibitor EPS.

研究分野：皮膚科学

キーワード：強皮症 エパレストット

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きたす膠原病で、病態解明と治療法の確立が急務である。我々は上皮細胞や血管内皮細胞の間葉系細胞への移行が病態に重要であり、治療標的になると考えた。一方で新規薬剤の開発には費用、労力、時間を要し、既存薬のドラッグ・リポジショニングが医療経済上も望ましい。このため、上皮間葉移行を強く抑制する化合物を多数の既存薬の中から独自の方法で網羅的にスクリーニングした結果、候補薬の一つとしてアルドース還元酵素阻害薬の Epalrestat (EPS) に着目した。本薬剤の線維芽細胞に対する抗線維化活性を培養細胞系で検証するとともに、強皮症マウスモデル(プレオマイシン誘導性)に投与し、皮膚や内臓の線維化、血管障害への治療効果や作用機序を明らかにする。臓器による効果の違い、投薬時期、用量の最適化を行い、将来的に全身性強皮症や他の線維化疾患や血管障害の治療へ発展を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、上皮間葉移行を強く抑制する化合物で既存薬の中から独自の方法で網羅的にスクリーニングした結果、有力候補薬の一つと浮上したアルドース還元酵素阻害薬の EPS に着目し、研究を行う。近年の線維化に関する研究から、上皮細胞や内皮細胞は間葉系に段階的に移行し、上皮または内皮細胞と間葉系細胞の両方の性質を様々な程度に併せ持つハイブリッド移行細胞の存在がわかってきた。これらの細胞はサイトカインなどの液性因子を産生することにより、炎症細胞の局所への浸潤や線維芽細胞からの細胞外基質の産生を促進して線維化に作用する可能性が指摘されている(Angela Nieto M, Cell 2016; Lovisa S, Nat Med 2015)。

今回、我々は、EPS が BLM 誘導性強皮症モデルマウスの皮膚線維化と培養ヒト正常皮膚線維芽細胞の形質転換を阻害するか検証することを目的とする。また、EPS に全身性強皮症の治療効果があることが本研究で実証されれば、将来的に他の様々な炎症系皮膚疾患の治療にも、つながるものと考えられる。このことにより、難治性疾患の新規治療法の研究基盤を確立できると期待している。

3. 研究の方法

本研究では、独自にスクリーニングしたアルドース還元酵素阻害薬の EPS を使用して研究を行った。

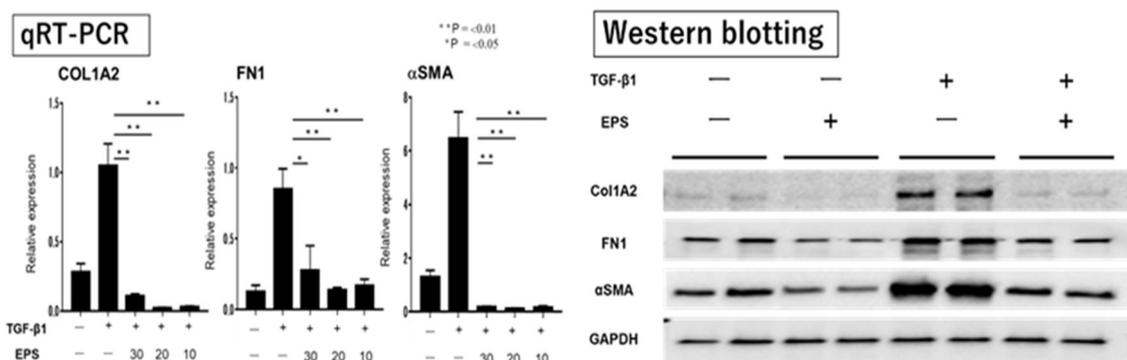
(実験方法)

- (1) 培養ヒト皮膚線維芽細胞を TGF- β 1 で刺激し、形質転換を促す。上清培養中に EPS を添加することで、形質転換を抑制するか検証した。(解析方法) qRT-PCR で、Collagen1, FN1, SMA の mRNA での発現抑制の有無を検証した。同様に Western blotting で、蛋白質での発現抑制の有無を検証した。
- (2) 培養ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞(A549)を TGF- β 2 で刺激し、上皮間葉転換(EMT: Epithelial Mesenchymal Transition)を促す。上清培養中に EPS を添加することで、EMT 抑制の有無を検証した。(解析方法) qRT-PCR で、FN1, SMA, E-Cad, N-Cad の mRNA での発現抑制の有無を検証した。同様に Western blotting で、蛋白質での発現抑制の有無を検証した。
- (3) BLM 誘導性強皮症モデルマウスに、EPS を連日経口投与して、皮膚線維化抑制の有無を検証した。(解析方法) 皮膚 HE 染色で、真皮の厚みを測定した。Masson's Trichrome 染色を使用し、皮膚の線維化の程度を評価した。

4. 研究成果

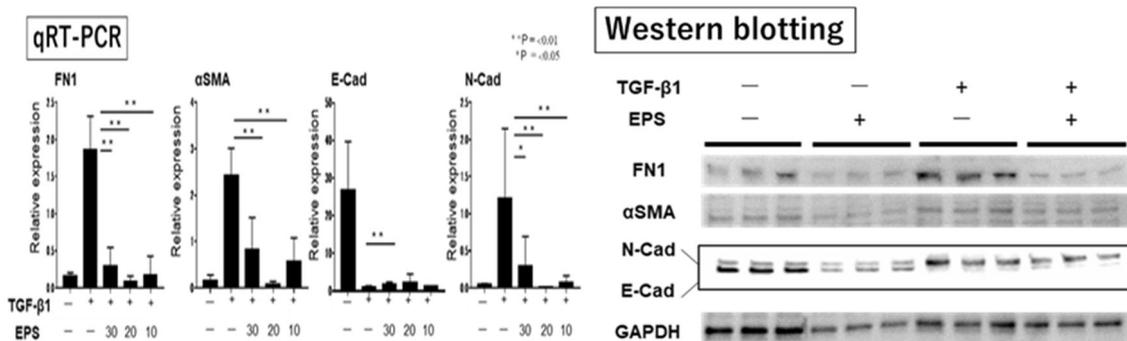
(1) EPS は、皮膚線維芽細胞の形質転換を抑制した。EPS を細胞上清中に添加することで qRT-PCR と Western blotting で Collagen1, FN1, SMA の発現を抑制していた。(図 1)

(図 1)



(2) EPS は、EMT を抑制した。EPS を細胞上清中に添加することで qRT-PCR と Western blotting で FN1, SMA, N-cad の発現を抑制し、逆に E-Cad の発現は上昇していた。(図 2)

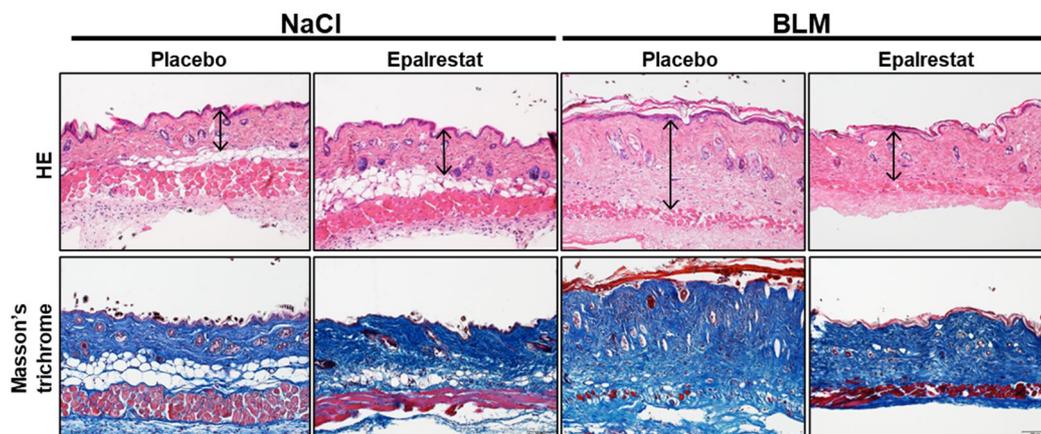
(図 2)



(3) EPS は、BLM 誘導性強皮症マウスの皮膚線維化を抑制した。マウス皮膚 HE 染色で、真皮の肥厚の比較検討をおこなった。EPS を経口投与したマウスで真皮の肥厚が抑制されていた。また、Trichrome 染色では、青色の染色性が減弱しており、線維化抑制も確認された。(図 3)

(図 3)

HE- and Masson's trichrome- staining



本研究結果から、EPS の線維芽細胞に対する抗線維化活性が培養細胞系で実証され、さらに BLM 誘導強皮症マウスでも線維化抑制が確認された。今後、さらに EndMT の抑制の有無についても検討する予定である。将来的に全身性強皮症や他の線維化疾患や血管障害の治療へ発展を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------