

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790893

研究課題名（和文）ピルフェニドン標的分子の同定

研究課題名（英文）Identification of the pirfenidone targeting molecule

研究代表者

榑原 智博（SAKAKIBARA TOMOHIRO）

東北大学・病院・助教

研究者番号：80422111

研究成果の概要（和文）：

ピルフェニドンの標的分子を同定するために、アフィニティー精製を行った。RAW264.7、PC-9、A549細胞を大量培養し、その細胞質タンパク質画分、核タンパク質画分を得てアフィニティー精製を行った。RAW246.7細胞を用いた実験で、ピルフェニドン結合タンパク質の候補を銀染色で確認することはできたが、再現性が得られなかった。PC-9細胞を用いた実験では、候補タンパク質の質量分析を行ったが、量が不足し同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

To identify the pirfenidone targeting molecule, I conducted the affinity purification from culture cell lysates. RAW246.7, PC-9 and A549 culture cells were cultured to obtain the cytosolic and nuclear protein fractions. The affinity purification from RAW246.7 lysate and subsequent SDS-PAGE and silver stain showed the candidates of the pirfenidone binding protein. But the repetitive experiment did not present the identical candidate proteins. The affinity purification from PC-9 lysate revealed the candidate of the pirfenidone binding protein. The pirfenidone targeting molecule could not be identified by the mass spectrometry due to the insufficiency of the amount of the candidate protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患、肺線維症

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症（IPF）は原因不明の間質性肺炎（IIPs）のなかの一つで、約50～60%と大多数を占める。その多くは喫煙者と高齢者に発症し、慢性進行性に肺組織の線維化を認め、咳嗽、労作時呼吸困難などの症状が出現し、最終的には呼吸不全に至る疾患である。臨床症状出現後約5年以内にその多くの患者が死亡する極めて予後不良の致死性の疾患であるにもかかわらず、これまでIPFの発症メカニズムは解明されておらず不明の

ままである。治療法もステロイドと免疫抑制剤が使用されるものの、呼吸機能低下抑制効果や増悪抑制効果を示したエビデンスは存在せず、経験的に使用されているにすぎない。このような治療は抗炎症作用に重きを置いた治療法であり、一部の患者には効果を認めるものの、期待する効果が得られないことが多く、IPFの本態である線維化に重点を置いた治療薬、すなわち抗線維化作用をもつ薬剤の臨床開発が期待されてきた。ピルフェニドンは約40年前に抗炎症作用

をもつ低分子有機化合物として開発されたが、動物実験で抗炎症作用よりも抗線維化作用が認められた。その後 IPF に対して抗線維化作用を期待して臨床試験が行われ、肺活量低下抑制作用、IPF 増悪抑制作用を認め、2008 年 10 月に IPF に対して初めてエビデンスのある薬剤と IPF 患者の胸部 CT 像として日本で承認に至った (*Eur Respir J* 35: 812, 2010)。その薬理作用は、動物実験において、炎症性サイトカイン (TNF- α 等) の産生抑制、抗炎症性サイトカイン (IL-10) の産生亢進、線維化形成に関する増殖因子 (TGF- β 等) の産生抑制を示し、複合的な作用により抗線維化作用を示すとされている。このサイトカインの産生をコントロールするとう事実からは、ピルフェニドンは細胞内で特定の分子、タンパク質と結合して、サイトカインの転写、翻訳、分泌などの過程に関与していることが予想されるものの、これまでにピルフェニドンの標的細胞、標的分子に言及した報告はなく、生体内での薬理作用の詳細なメカニズムは不明のままである。従って、この具体的かつ明確なエビデンスをもつピルフェニドンの標的細胞、標的分子を同定することは、ピルフェニドンの薬理作用解明のみならず、線維化をきたす難治性疾患である IPF の分子病態解明や、更なる治療方法、新規薬剤の開発にも寄与する可能性があると考えられる。一方近年の薬剤開発は、各疾患の分子生物学的な病態解明とともに、病態に関与する分子 (酵素、受容体、リガンドなど) を標的とした分子標的薬 (酵素阻害薬、受容体阻害薬、抗体薬など) が主流となっている。すなわち標的細胞、標的分子が創薬の段階から決まっているものがほとんどで、今後も主流となっていくものと考えられる。ピルフェニドンのように約 40 年前に発見され、臨床試験でエビデンスが確立されたにも関わらず、標的細胞や標的分子が不明な薬剤は現在では少ない。これまでの基礎研究ではピルフェニドンの標的分子は同定されておらず、従来方法では今後も標的分子の同定は困難であることが予想される。しかしピルフェニドンのように、過去数十年にわたり標的分子が同定されていなかった低分子有機化合物であるサリドマイドの結合タンパク質が最近同定され報告された (*Science* 327: 1345, 2010)。この論文ではアフィニティー精製法により結合タンパク質を同定するという極めて基本的、古典的な方法論により、サリドマイドの結合タンパク質を同定しているが、その最大の特徴はサリドマイドの構造に側鎖を導入した誘導体を合成し、それをナノ磁性微粒

子 (アフィニティー微粒粒子) に固定することである。この特徴的な方法により、サリドマイドの固相化を可能にし、また新規磁性微粒粒子を用いて、非特異的に結合するタンパク質を極力排することに成功して、従来方法では同定が困難であった、サリドマイド結合タンパク質を同定している。ピルフェニドンはサリドマイド同様低分子有機化合物であり、この方法に従いピルフェニドンの標的分子が同定し得ると考えられる。さらに研究代表者はこれまで主に SLPI 結合タンパク質の同定、Hot tub lung の原因抗原の同定など、結合タンパク質の同定やタンパク質スクリーニングなどの研究に従事しており上記実験方法に精通している。

以上より本研究ではピルフェニドンの標的分子をナノ磁気微粒粒子を用いたアフィニティー精製法により同定することを目的とし、さらに標的分子の細胞内での機能解析、ピルフェニドンの薬理作用の解明、IPF の病態解明も目的とする。

2. 研究の目的

ピルフェニドンは抗線維化作用をもつ薬剤で、動物実験、臨床試験ではそれぞれ抗線維化作用、肺活量低下抑制効果を示している。しかし生体内での標的細胞、標的分子は未だに同定されておらず、その薬理学的作用の詳細なメカニズムは不明のままである。本研究ではアフィニティー精製法を用いてピルフェニドンの標的分子 (タンパク質) の同定を主な目的とし、さらには標的分子の機能解析、ピルフェニドンの薬理作用機序の解明、特発性肺線維症の病態解明も目指す。

3. 研究の方法

(1) ピルフェニドン誘導体の合成

ピルフェニドンに-COOH 末端を持つ側鎖を導入して、その誘導体合成を行った。合成自体は住化テクノサービス株式会社に依頼した。

(2) アフィニティービーズの作製

(1) で合成したピルフェニドン誘導体 (pirfenidone derivative, PD) を NH₂ 末端をもつアームを有するナノ磁性微粒粒子 (NH₂ ビーズ) に共有結合させビーズを作成した。まずピルフェニドン誘導体、スクシイミド (HOSu) と 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) をジメチルホルムアミド (DMF) に溶解する。上記ピルフェニドン誘導体、HOSu、EDC を室温で 2 時間混合する。この混合液を NH₂ ビーズと混合し、室温で 16 時間混合する。混合後、NH₂ ビーズを遠心分離し、DMF で洗浄。これを 3 回繰り返したのち、再度遠心分離を行う。その後 50%メタノールで洗浄し、最終的に 50%メタノール溶液中に NH₂ ビーズを拡散させ、アフィ

ニティービーズを作成する。

(3) 細胞培養とタンパク質溶液の調整

RAW264.7、PC-9、A549 細胞は 10% の胎児ウシ血清、抗生物質添加した RPMI メディウムまたは DMEM を用い、37 度の CO2 恒温槽で培養した。TGF-β1 を添加した実験では、最終濃度が 1 ng/ml になるように TGF-β1 を加えて培養した。タンパク質の調整は以下の方法で行った。培養細胞を 4℃ のリン酸緩衝バッファー (PBS) で 3 回洗浄。その後セルスクレイパーで細胞を剥がし、遠心分離機で細胞を回収。細胞塊を PBS に分散させ、再度遠心分離を行った。この操作を 2 回行い、細胞塊に細胞溶解バッファーを加え、氷上で 5 分間静置させた。その後遠心分離を行い、その上清を細胞質画分とした。その沈殿物に PIPA バッファーを加え拡散させ、氷上で 5 分間静置させた。その後遠心分離を行い、その上清を核タンパク質画分とした。

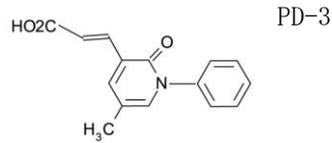
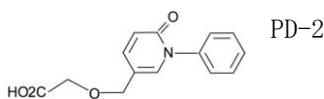
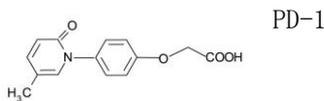
(4) アフィニティー精製とタンパク質銀染色

(3) で得たタンパク質溶液に 100 mM KCl を加え 1 mg/ml に調整する。このタンパク質溶液と (2) で作製したアフィニティービーズを加え、4℃ で 4 時間インキュベーションした。競合実験を行うときは、この 4 時間のインキュベーション前に、フリーのピルフェニドンをタンパク質溶液に加え、2 時間インキュベーションした。その後磁気によりビーズを分離し、そのビーズを 100 mM KCl で洗浄。その後再度磁気によりビーズを分離した。この操作を 3 回繰り返した後に、1 M KCl を加え氷上で 5 分間静置した。その後磁気によりビーズを分離しその上清を破棄。残ったビーズに SDS-PAGE サンプルバッファーを加え 98 度 5 分間煮沸し、その後磁気によりビーズを分離し、この上清をサンプルとした。このサンプルを SDS-PAGE による分離したのちに、銀染色キットを用い、タンパク質を可視化した。

4. 研究成果

(1) ピルフェニドン誘導体の合成

ピルフェニドン誘導体合成し、3 つの誘導体を得た。それぞれ pirfenidone derivatives (PD) -1, -2, -3 とした。



(2) アフィニティー精製法によるピルフェニドン結合タンパク質の候補の同定

① RAW264.7 細胞を用いた実験

RAW264.7 細胞から得た、細胞質タンパク質画分、核タンパク質画分を用いて、PD-1, -2, -3 の各々についてアフィニティー精製を行った。その結果細胞質タンパク質画分を用いた実験では、PD-1 でその結合タンパク質の候補を、また核タンパク質画分を用いた実験では、PD-1, -2 で候補を確認した。(図 1, 2, 3)

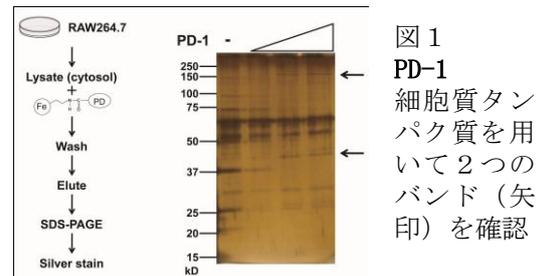


図 1 PD-1 細胞質タンパク質を用いて 2 つのバンド (矢印) を確認

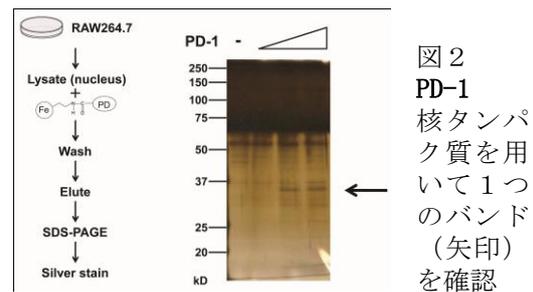


図 2 PD-1 核タンパク質を用いて 1 つのバンド (矢印) を確認

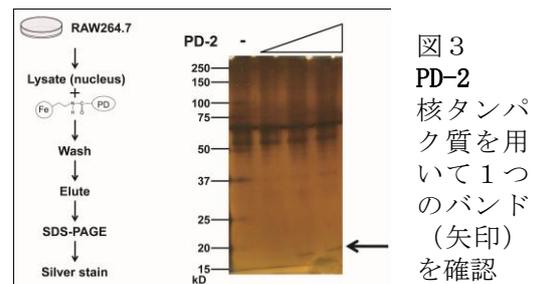


図 3 PD-2 核タンパク質を用いて 1 つのバンド (矢印) を確認

これらの実験で確認されたバンドは、ピルフェニドン結合タンパク質の候補であるが、質量分析でそのタンパク質を同定するには、繰り返しの実験で、同様のバンドを確認しなければいけないが、繰り返し実験において再現性を確認することはできなかった。

② PC-9 細胞を用いた実験

RAW264.7 細胞を用いた実験では、ピルフェニドン結合タンパク質の候補の同定までには至らなかったため、細胞を替えて、上皮系培養細胞である PC-9 を用いて実験を行った。

その結果 PD-1 でその結合タンパク質の候補が同定された。さらにフリーのピルフェニドンを用いた実験で、この候補タンパク質と PD-1 との結合が拮抗され、真のピルフェニドン結合タンパク質の候補である可能性が示唆された。(図4)

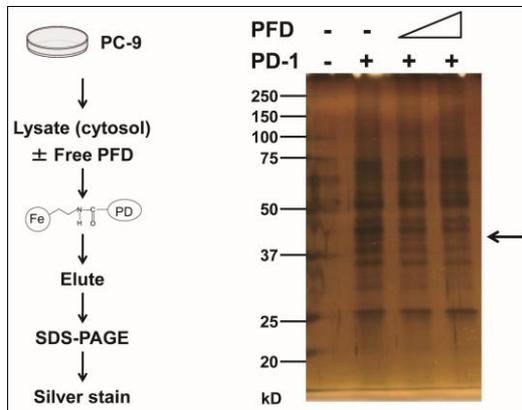


図4
矢印のバンドはフリーのピルフェニドンを加えると、PD-1 との結合が阻害された。

このバンドを切り出し、質量分析を行い、そのタンパク質の同定を試みたが、タンパク質の量 (mol 数) が足りず、同定には至らなかった。

③A549 細胞を用いた実験

発表された先行論文のなかに、ピルフェニドンが上皮間葉転換 (EMT) をおこした細胞に作用して、その効果を発揮したとの報告があったため、A549 細胞に、EMT を誘導する TGF- β を加え、そのタンパク質溶液を得た。このタンパク質溶液を使用して、上記 PD-1, -2, -3 についてアフィニティー精製を行ったが、ピルフェニドン結合タンパク質の候補の同定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Randomized phase II trial of uracil/tegafur and cisplatin versus vinorelbine and cisplatin with concurrent thoracic radiotherapy for locally advanced unresectable stage III non-small-cell lung cancer: NJLCO 0601. Sugawara S, Maemondo M, Tachihara M, Inoue A, Ishimoto O, Sakakibara T, 全14名中6番目

Lung Cancer. 2013 May 1. doi:pil: S0169-5002(13)00160-8.

10.1016/j.lungcan.2013.04.010. [Epub ahead of print] 査読有

2. A phase II study of irinotecan as a third- or fourth-line treatment for advanced non-small cell lung cancer: NJLCO703.

Matsubara N, Maemondo M, Inoue A, Ishimoto O, Watanabe K, Sakakibara T, 全11名中6番目

Respir Investig. 2013 Mar;51(1):28-34. doi: 10.1016/j.resinv.2012.09.004. Epub 2012 Nov 13. 査読有

3. Bilateral peripheral infiltrates refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor.

Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, 全8名中3番目

Intern Med. 2012;51:1737-42.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/13/51_51.6093/_article 査読有

4. Complicated secondary pneumonia after swine-origin influenza A virus infection in an immunocompetent patient.

Igusa R, Sakakibara T, 全6名中2番目

Tohoku J Exp Med. 2012;226:117-20.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/226/2/226_2_117/_article 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 東出直樹、菊地利明、榊原智博、一ノ瀬正和、Whole-exome sequencing of familial non-small cell lung cancer patients with the EGFR genemutations, 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、札幌

2. 東出直樹、菊地利明、榊原智博、一ノ瀬正和、EGFR 遺伝子変異を伴う肺腺癌患者における遺伝学的機序の解析、第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012年4月22日、神戸

3. 小林誠、榊原智博、井上彰、福原達朗、貫和敏博、東北大学病院における EML4 ALK 融合遺伝子陽、第52回日本肺癌学会総会、2011年11月3日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 智博 (SAKAKIBARA TOMOHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80422111

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者
