

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249033

研究課題名(和文) 希少難治性炎症疾患に対する新規作用機序治療薬開発

研究課題名(英文) The development of a novel mechanism therapeutic drug for rare intractable inflammatory diseases

研究代表者

宮田 敏男 (Miyata, Toshio)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10222332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)： 治療法がない希少難治性炎症疾患群に対して、有効で安全な治療薬としてのPAI-1阻害薬の適応疾患を特定する研究を進めた。臍帯血移植における骨髄再生促進作用を見出し、医師主導第 Ⅰ相試験を終了した。また、多発性硬化症における薬効を確認し、非臨床安全性試験を実施した。

さらに、卵巣細胞癌由来の細胞株においてPAI-1を抑制した結果、細胞周期が停止し、G2/M期の細胞の割合の増加とアポトーシスにより細胞増殖が抑制されることを見出した。また、PAI-1阻害薬の肺線維症に対する効果の評価をブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスで検討し、肺ハイドロキシプロリン量を有意な減少させることを見出した。

研究成果の概要(英文)： The study was performed to specify an adaptation of PAI-1 inhibitors which were effective and safe against rare intractable inflammatory diseases.

Finding bone marrow regeneration promoted by PAI-1 inhibitors in umbilical cord blood transplantation, led the doctor's investigated phase Ⅰ clinical trials. Non-clinical safety studies were carried out from the discovery of the efficacy in multiple sclerosis models. Furthermore, as a result of PAI-1 inhibition in ovarian carcinoma cell lines, cell proliferation was suppressed by increasing the apoptosis and the G2/M phase cells. Moreover, the evaluation of the effects of PAI-1 inhibitors in bleomycin-induced lung fibrosis models, it was found that the lung hydroxyproline content was reduced significantly.

研究分野：医学(内科学)

キーワード：薬理学 生理活性 生体分子

1. 研究開始当初の背景

Serine protease inhibitor superfamily (SERPIN)は共通構造を有するタンパク群で、ヒトでは36種類が知られ、その生理機能は、主にタンパク分解酵素である各種の serine proteases の活性制御であり、凝固線溶、補体活性、繊維化、炎症などに重要な役割を担っている。

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)はSERPINの1つであり、凝固線溶系や線維化などに重要な役割を演じていることが知られている。申請者らはPAI-1のX線構造情報を基にPAI-1阻害薬のヒット化合物TM5007を発見すると同時に抗血栓作用のみならず、肺線維化モデルでTM5007の有効性を確認した (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 672-677)。

その後さらに、構造最適化を行い、経口投与により血栓モデル動物で抗血栓作用を示す低分子化合物TM5275を得た。TM5275は、カニクイザルの血栓モデル(右図)で、5mg/kg p.o.の低用量で対照薬とした臨床で抗血栓薬とし最も使用されているclopidogrel (10mg/kg p.o.)と同等の確実な抗血栓作用を示した。特筆すべき知見として、投与量を上げて対照薬とは異なり出血時間を全く延長しない (J Cereb Blood Flow Metab 2010; 30: 904-912)。

さらにTM5275をリード化合物として、現在では0.3mg/kgの経口投与で確実な有効性を示し、安全性が高い臨床候補品を複数得ている。これら化合物の肺線維化モデルに於ける有効性に関しては報告済み (Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Aug 18. [Epub ahead of print])。

最近になって、PAI-1遺伝子欠損マウス等を用いた国内外の解析から、PAI-1が活性化マクロファージの遊走に不可欠な蛋白として機能していることが明らかになり、マクロファージ浸潤を伴う激しい炎症と線維化に至る疾患で、ステロイド投与以外に治療法がない疾患、例えば多発性硬化症、クローン病、難治性腎炎/ネフローゼに対する有効性が示唆された。そこで、臨床候補品PAI-1阻害薬を用いて動物での非臨床試験を行った所、preliminaryなデータとして、疾患モデルに対する有効性も取得出来た。

これら疾患群の分子病態の理解は進んでおらず、有効で安全な治療法は未だ確立できていない。申請者らは、線溶系調節蛋白と考えられてきたPAI-1がそれら希少難治性炎症の病態に関わることを見出し、世界に先駆けて経口投与可能な低分子PAI-1阻害薬の開発に取り組んでいる。

2. 研究の目的

希少難治性炎症疾患には、マクロファージ浸潤を伴う激しい炎症の結果から線維化に至り、ステロイド投与以外に治療法がないものが少なくない。それら疾患の分子病

態の理解は進んでおらず、有効で安全な治療法は未確立である。申請者らは、線溶系調節蛋白と考えられてきたPAI-1がそれらの病態に関わることやPAI-1がマクロファージ遊走に不可欠な蛋白として機能している事実を見出し、世界に先駆けて経口投与可能な低分子PAI-1阻害薬の開発に取り組んでいる。本研究では、マクロファージ浸潤を伴う炎症を主体とする多発性硬化症、クローン病、難治性腎炎などの希少難治性疾患の中からPAI-1阻害薬で治療可能な疾患を特定し、非臨床安全性試験(non-GLP)を実施し、安全性試験(GLP)と医師主導型治験のプロトコール作成まで橋わたし研究を行う。

3. 研究の方法

希少難治性炎症疾患群に対する多量の副腎皮質ステロイド療法を補完あるいは代替する有効で安全な新規治療薬の経口低分子PAI-1阻害薬を提供することが本研究の最終目標である。本研究では、これまで治療法のないが、PAI-1との関連が示唆される特発性間質性肺炎(特定疾患治療研究事業対象、以下*)、多発性硬化症*、クローン病*、難治性体腎炎/ネフローゼに着目して、モデル動物を用いた研究から、(1) First-in-man 医師主導治験の対象疾患を絞り込み、(2) 臨床開発候補5化合物から対象とする希少難治性炎症疾患に最も適した化合物を詳細な薬理学的研究と薬物動態試験ならびに簡単な安全性試験(non-GLP)から1つに絞り込み、(3) 希少難治性疾患の研究班委員の協力を得て、本研究計画終了後の医師主導治験に関わるプロトコールの作成までを本研究期間で達成する。

研究達成目標は、PAI-1阻害薬の最も有効な希少難治性炎症疾患を特定することである。PAI-1阻害薬で治療が可能と考えられる希少難治性炎症疾患は、以下の通りであり、下記に示すようなin vivo疾患モデル動物を使用することで、PAI-1阻害薬の予防および治療効果を調べ、薬効薬理学的にFirst-in-man 医師主導治験の対象疾患として最も有効な希少難治性炎症疾患を1つに絞り込む。

(1) 難治性腎炎(ネフローゼ)

理論的根拠: PAI-1遺伝子欠損マウスで抗GBM腎炎発症の抑制 (J Am Soc Nephrol. 2003)

モデル: 抗GBM腎炎ラット、抗Thy-1腎炎ラット(効果実証済 J Clin Invest. 2003)、HIGAマウス

試験法の例: Thy-1腎炎モデルラット

本病態モデルは、メサングウム増殖性腎炎を呈する代表的な糸球体腎炎モデルであり、Wistarラット(雄、体重150g)に抗Thy-1抗体であるOX-7を1.2mg/kg尾静脈投与することによって作製する。抗Thy-1抗体を

投与し、その後被検化合物を 0.5 % カルボキシメチルセルロースに懸濁させ、ゾンデにより 5 日間連続強制投与、6 日目に採材し、腎臓を採取、病理解析（糸球体細胞数のカウント）を行う。併せて血液・尿の生化学的解析も施行する。対照群は、賦形剤投与群を採用して薬効評価を行う。

（2）特発性間質性肺炎

理論的根拠：PAI-1 遺伝子欠損マウスで肺線維症発症の抑制（J Cell Physiol 2010）

モデル：ブレオマイシンマウス（効果実証済 ATVB 2008）

試験法の例：bleomycin 肺線維症モデル

動物は雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、ペントバルビタールナトリウム（40mg/kg 体重、i. p.）麻酔下で、ラットの咽頭部を切開し、気管を露出する。bleomycin 塩酸塩（日本科薬）を 29G インスリン用マイジェクターにて気管内投与する。投与後、切開部を縫合し、傷口はイソジン液を用いて消毒する。0.5 % カルボキシメチルセルロースに懸濁させた被検化合物を bleomycin 投与直後からゾンデにより経口投与を開始し、14 日連続投与する。試験終了後、肺組織を採材し、Azan 染色した病理標本から肺組織の病理解析（間質の繊維化）を行う。凍結肺組織からヒドロキシプロリン含量を測定する。

（3）多発性硬化症

理論的根拠：PAI-1 遺伝子欠損マウスで脳脊髄炎発症の抑制（Neuropathol Appl Neurobiol. 2008）

モデル：脳脊髄炎（EAE）モデルマウス

（4）クローン病

理論的根拠：PAI-1 遺伝子欠損マウスでのマクロファージ遊走抑制と抗炎症（EMBO J 2006）

モデル：TNBS クローン病マウス（効果実証済）

4. 研究成果

（1）Thy1 腎炎ラットモデルにおいて、PAI-1 阻害薬を経口投与することにより、腎糸球体に対する炎症性マクロファージの浸潤を抑制できることを明らかにした。また、腎臓における微小血栓形成や上皮細胞傷害を寛解するなど、抗炎症効果と抗血栓効果の両面でその病態の改善に効果を発揮することが明らかとなった。In vitro マクロファージ遊走阻害実験や、変異体 PAI-1 を用いた分子生物学的解析によって、炎症部位で発現が上昇した PAI-1 そのものがマクロファージに対する遊走因子として働いていることを見出した。また、PAI-1 の遊走因子としての作用が、マクロファージの細胞膜上に存在する LRP1 との相互作用によって発揮されていること、PAI-1 阻害薬がこの分子間相互作

用を阻害することでマクロファージの遊走を阻害するという分子薬理的メカニズムを解明し、難治性腎炎に対する治療効果を明らかにすることが出来た。

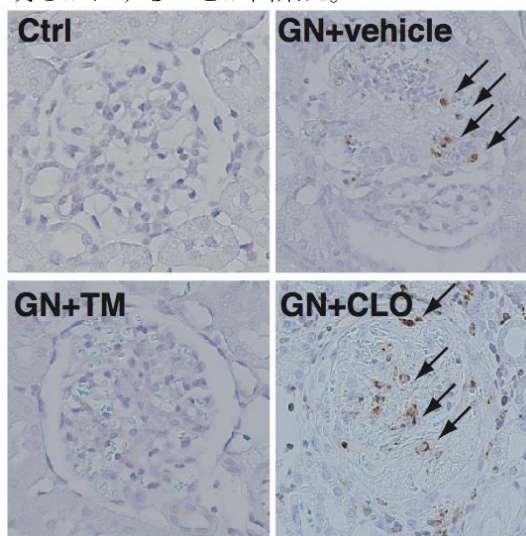


図 1 マクロファージマーカー CD68 の免疫組織染色 GN: Thy1 腎炎, TM: TM52575 投与群, CLO: クロピドグレル投与群

更に、Thy1 腎炎モデル以外の腎疾患モデルの検討を広範に実施した。難治性腎疾患の巣状糸球体硬化症（FSGS）モデルである NEP25 マウスをはじめとして、LPS 腎症マウス、虚血再灌流（IR）マウス、腎間質障害モデルの片側尿管結紮（UUO）マウスおよび急性腎障害（AKI）モデルのシスプラチン腎障害マウスの検討を行った。その結果、Thy1 腎炎で薬効を示した PAI-1 阻害薬の TM5441 の 30 mg/kg/日経口投与は、LPS 腎症マウスで陽性対照の edaravon と同様に再現性ある有効性を示し、血中 BUN、クレアチニン・クリアランス並びに尿中アルブミンで有意な改善を示した。また、その作用は腎臓での Tnf- α の発現亢進に対する抑制効果であることが示唆された。しかし、TM5441 は、NEP25 マウス、IR マウス、UUO マウスおよび AKI マウスでは効果を示さず、適応できる腎疾患がかなり限られる可能性が示唆された。

（2）ブレオマイシンマウス肺線維症モデルを用いた解析により、TM5614が 0.75mg/kg/dayの経口投与により、肺組織中でのヒドロキシプロリン増加をほぼ完全に抑制することが出来ることを見出した。また、急性喫煙曝露モデルにおいても炎症性細胞浸潤と血管透過性亢進を抑制することを示唆する結果を得た。これらの結果から、呼吸器・肺関連疾患がPAI-1阻害薬の有望な標的であることを見出した。

（3）PAI-1阻害薬の適応疾患候補として、難治性神経疾患の1つである多発性硬化症（

MS) に効果がある可能性を新たに見出した。すなわち、MSモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスにおいて、TM5441は神経症状発症後の50 mg/kg/日経口投与において、症状改善(治療)効果を示した。また、化学構造からTM5441よりも血液脳関門を透過しやすいことが考えられたTM5484は、特記すべきことに5 mg/kg/日経口投与から治療効果および予防効果を発揮した。更に、既存薬であるフィンゴリモドと併用した場合相加的な寛解効果を示すことから、リンパ球を標的とするフィンゴリモドとは標的細胞が異なることを示した。更に、ラットMSモデルにおいてマウス同様の有意な寛解効果を示すことを見出し、種差を超えた薬効を發揮することを示した。これらのことから、PAI-1阻害薬の多発性硬化症への適応の可能性を示し、実用化へ向けて厚生労働省難治性疾患治療薬開発プロジェクトへの橋渡しを行った。

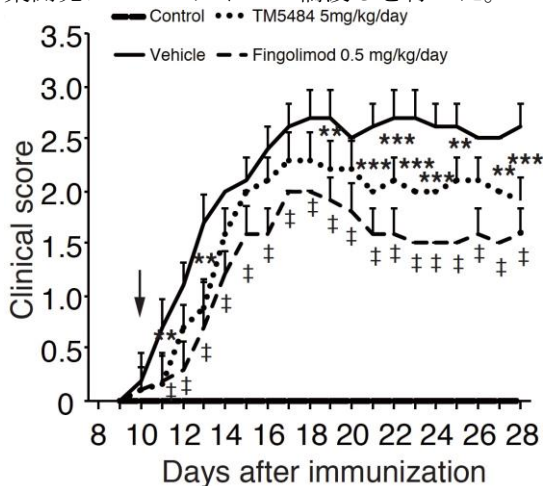


図2 多発性硬化症モデルEAEにおけるクリニカルスコア

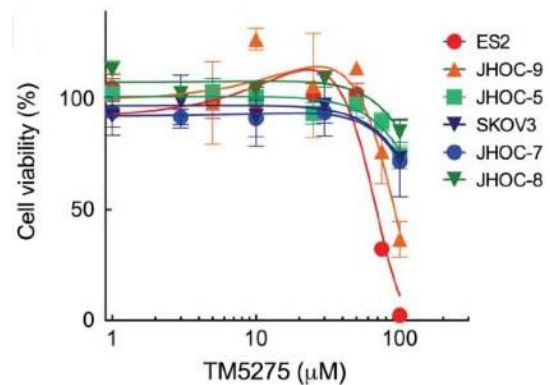
(4) TNBS 誘導性クローン病モデルについて、TM5275 30mg/kg/day の投与により、ステロイド薬であるプレドニゾロンと同等レベルに病態スコアを低下させる効果があることを見出した。

(5) 当初の計画になかった希少難病に対しても適応の可能性を以下の通り検討した。

骨髓再生時のPAI-1阻害薬投与により、造血幹細胞の増殖分化が促進されることを発見した。致死量の放射線照射後、造血幹細胞移植したマウスにおいて、PAI-1阻害薬が血球再生を促進することを見出した。更に、骨髓内のtPA-PAI-1系が幹細胞因子(SCF)の活性制御に関わっており、PAI-1阻害薬の経口投与により造血再生を促進できることを明らかにした。これらの知見から、TM5509を臍帯血輸血時の造血再生を適用疾患とし、PMDAとの事前面談を経て、医師主導臨床治験を開始し、第一相臨床試験を

実施、これを終了した。

卵巣明細胞腺癌やゼノグラフトモデルを用いてPAI-1阻害薬の抗癌作用に関する検討を行った。卵巣明細胞腺癌は本邦で増加傾向にある疾患で、標準的な化学療法が奏功しにくい腫瘍である。公開マイクロアレイデータ並びに予後のデータを用いた解析により、PAI-1の発現レベルは予後不良と有意な相関を示すことを見出した。また、卵巣がん標本のPAI-1の免疫組織染色では明細胞腺癌で最も陽性例が多く、特に腫瘍の細胞質に高発現していることを見出した。そこで、PAI-1阻害薬を用いて卵巣細胞癌由来の複数の細胞株においてPAI-1を抑制した結果、細胞増殖が抑



制されることを見出した。
図3 TM5275濃度と癌細胞生存率

増殖抑制の効果はPAI-1高発現の細胞株で顕著であった。PAI-1阻害薬を用いてPAI-1を抑制した細胞株では細胞周期が停止し、G2/M期の細胞の割合が増加した。

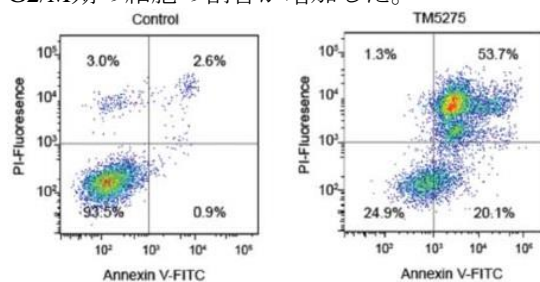


図4 Flowcytometerを用いたPI及びAnnexin V二重染色によるアポトーシス細胞の割合

更に、PAI-1阻害薬の処置によりアポトーシスが誘導された。これらの結果から、PAI-1阻害により、PAI-1を高発現する卵巣細胞癌細胞において、細胞周期停止とアポトーシス誘導が起こり、細胞増殖が抑制されることが示された。更に、複数の腫瘍由来の細胞株を用いてPAI-1阻害薬が細胞増殖に与える影響を調べた結果から、PAI-1阻害薬がヒト線維肉腫由来HT1080細胞及びヒト大腸腺癌由来HCT116細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを見出した。HT1080細胞を

マウスに移植するゼノグラフトモデルを用いた解析により、PAI-1阻害薬は腫瘍内への血管新生を抑制するとともに、腫瘍形成を遅延させ、マウスの生存期間を延長させる傾向を示した。これらの知見から、PAI-1阻害薬が新規の癌に対する有望な治療薬となることを示した。

その他、複数の希少難治性炎症疾患モデルに対して PAI-1 阻害薬の薬効の有無を探索した結果、卵白アルブミン(OVA)感作誘発マウス鼻アレルギーモデルにおいても病態の寛解効果並びに免疫細胞浸潤阻止効果を見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Placencio VR, Ichimura A, Miyata T, DeClerck YA. Small Molecule Inhibitors of PAI-1 TM5275 and TM5441 Elicit Anti-Angiogenic and Anti-tumorigenic. *Journal Molecular Cancer Therapeutics*. In press. 査読有
2. Pelisch N, Dan T, Ichimura A, Sekiguchi H, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C and Miyata T. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Antagonist TM5484 Attenuates Demyelination and Axonal Degeneration in a Mice Model of Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2015; 10: e0124510. DOI:10.1371/journal.pone.0124510. 査読有
3. Mashiko S, Kitatani K, Toyoshima M, Ichimura A, Dan T, Usui T, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase ., Miyata T and Yaegashi N, Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2015; 16:253-260: DOI:10.1080/15384047.2014. 査読有
4. Boe AE, Eren M, Morales-Nebreda L, Murphy SB, Budinger GR, Mutlu GM, Miyata T, Vaughan DE. Nitric oxide prevents alveolar senescence and emphysema in a mouse model. *PLoS One*. 2015; 10: e0116504. DOI:10.1371/journal.pone.0116504. 査読有
5. Kobayashi N, Ueno T, Ohashi K, Yamashita H, Takahashi Y, Sakamoto K, Manabe S, Hara S, Takashima Y, Dan T, Pastan I, Miyata T, Kurihara H, Matsusaka T, Reiser J, Nagata M. Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via beta 1 integrin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 308: F614-F626. DOI:10.1152/ajprenal.00616.2014. 査読有
6. Ibrahim AA, Yahata T, Onizuka M, Dan T, van Ypersele de Strihou C, Miyata T, Ando K. Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Activity Enhances Rapid and Sustainable Hematopoietic Regeneration. *Stem Cells*. 2014; 32: 946-958. DOI:10.1002/stem.1577. 査読有
7. Eren M, Boe A, Murphy SB, Place AT, Nagpal V, Morales-Nebreda L, Urlich D, Quaggin SE, Budinger GS, Mutlu GM, Miyata T, Vaughan DE. PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 7090-7095. DOI:10.1073/pnas.1321942111. 査読有
8. Miyata T, Ando T, Hiragi H, Watanabe K, Yamamoto F, Vaughan D.E, Prof. van Ypersele de Strihou C, Takeuchi M. Drug discovery in renal disease -towards a more efficient framework. *Nature Review Nephrology*. 2014; 10: 290-296. DOI:10.1038/nrneph.2014.36. 査読有
9. Boe A, Eren M, Murphy S, Kamidel C, Ichimura A, Terry D, McAnally D, Smith LH, Miyata T, Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates N ω -nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence. *Circulation*. 2013; 128: 2318-2324. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003192. 査読有
10. Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T, A Small Molecule Inhibitor to Plasminogen Activator Inhibitor 1 Inhibits Macrophage Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: 935-942. DOI:10.1161/ATVBAGA.113.301224. 査読有
11. Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, Uchida K, Kato M, Miyata T, Takahashi S. Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. *J. Biochem* 2012; 152: 549-555. DOI:10.1093/jb/mvs100. 査読有

12. Yasui H, Suzuki Y, Brzoska T, Sano H, Suda T, Chida K, Dan T, Miyata T, Urano T. TM5275 prolongs secreted tissue plasminogen activator retention and enhances fibrinolysis on vascular endothelial cells. *Thrombosis Research* 2013; 132: 100-105. DOI:10.1016/j.thromres.2013.04.003. 査読有
13. Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood* 2012; 119: 6382-6393. DOI:10.1182/blood-2011-12-399659. 査読有
14. Huang WT, Vayalil PK, Miyata T, Hagood J, Liu RM. Therapeutic value of small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor-1 for lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46: 87-95. DOI:10.1165/rcmb.2011-01390C. 査読有

[学会発表] (計 6件)

1. Miyata T. Drug discovery and development: Respective role of academia. Third International Conference on Innovative Biology, Medicine, and Engineering (ICIBME 2015) in Nagoya(Japan). 名古屋大学豊田講堂・シンポジオン(愛知県・名古屋市) 2015 January 15-16. (invited)
2. Miyata T. Drug discovery in kidney disease - From serendipity to rationality -. Karolinska-Tohoku Joint Symposium on Medical Sciences in Sendai(Japan). 東北大学メデイカル・メガバンク棟(宮城県・仙台市) 2014 November 8-9. (invited)
3. Miyata T. Drug discovery : Role and significance of academia. The 13th Kitasato University-Harvard School of Public Health Symposium in Tokyo(Japan). 北里大学薬学部コンベンションホール(東京都・港区) 2014 July 4-5. (invited66)
4. Miyata T. Drug discovery in kidney disease: From serendipity to rationality. ISN Nexus Symposium: New era of drug discovery and clinical trials in kidney disease in Bergamo (Italy). 2014 April 3-6. (invited)

5. Miyata T. Drug Discovery and Clinical Development: Role of Academia and Global Perspective. The 12th Kitasato University-Harvard School of Public Health Symposium in Tokyo(Japan). 大手町日経ビル(東京都・千代田区) 2013 May 13-14. (invited)
6. Miyata T. Drug Discovery and Development from Academia. UK-Japan Workshop: How do we identify new targets for new medicine? in Tokyo(Japan). 英国大使館(東京都・千代田区) 2013 January 28-29. (invited)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 敏男 (MIYATA, Toshio)
 東北大学医学系研究科 教授
 研究者番号 : 10222332

(2) 研究分担者

段 孝 (DAN, Takashi)
 東北大学医学系研究科 准教授
 研究者番号 : 00512451

(3) 連携研究者

市村 敦彦 (ICHIMURA, Atsuhiko)
 東北大学医学系研究科 非常勤講師
 研究者番号 : 10609209