

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10210

研究課題名(和文)新規アデノシン類縁体コアクロルによる線維化進展抑制機構の解明 - 強皮症をモデルに

研究課題名(英文) A novel angiogenic agent COA-CI prohibits fibrotic effect induced by CTGF in human fibroblasts.

研究代表者

窪田 泰夫 (KUBOTA, YASUO)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10126047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアデノシン類縁体のシクロプチルプリン誘導体であるCOA-CIがTGFベータ刺激により増加した皮膚線維芽細胞のCTGF産生をmRNA発現とタンパク発現のレベルで抑制することを発見した。COA-CIはTGFベータ刺激による皮膚線維芽細胞のシグナル伝達物質であるSmadやERKの活性化には影響しなかったが、Aktの活性化を抑制した。COA-CIはAkt活性化を抑制することで、NHDFのTGFベータ刺激によるCTGF産生をmRNA発現とタンパク発現のレベルで抑制することが分かった。COA-CIはアンジオテンシンIIにより誘導された全身性強皮症モデルマウスのCTGF発現を抑制し皮膚症状を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維芽細胞の活性化が全身性強皮症の主たる原因である。線維芽細胞はサイトカインTGFベータによって筋線維芽細胞に形質転換し、I型コラーゲンをはじめとした線維状タンパク質を産生する。そこでTGFベータやCTGFを標的とした全身性強皮症治療が試みられている。CTGFの全身性強皮症の病態における多彩な役割はまだ完全には解明されていないが、申請者らはCTGFを抑制することで新しい全身性強皮症の治療法が確立できると考えた。現在のところコアクロルの臨床応用は困難である。しかしながら本研究のような基礎研究の積み重ねにより、近い将来に全身性強皮症患者の新しいひとつの治療法として応用されることが切望される。

研究成果の概要(英文)：COA-CI is a novel nucleic acid analog, which is reported to have pleiotropic beneficial biologic effects. We examine the effects of COA-CI on TGF- $\beta$ 1-induced CTGF expression in normal human dermal fibroblast (NHDF). We also examined the effects of COA-CI on CTGF expression in a mouse SSc model of angiotensin II (Ang II)-induced skin fibrosis. COA-CI attenuated the TGF- $\beta$ 1-induced expression of both CTGF mRNA and protein in NHDF. Although COA-CI did not alter the TGF- $\beta$ 1-induced phosphorylation of Smad2/3 or ERK1/2, it reduced the TGF- $\beta$ 1-induced phosphorylation levels of Akt in NHDF. Notably, COA-CI dephosphorylated the Akt of lysates of TGF- $\beta$ 1-treated NHDF. COA-CI reduced the levels of CTGF mRNA, CTGF protein, dermal thickness, collagen content and Akt phosphorylation in the skin of mice SSc model. These results imply that the inhibition of TGF- $\beta$ 1-induced CTGF expression by COA-CI may be a therapeutic approach for SSc.

研究分野：皮膚アレルギー

キーワード：皮膚 線維化 CTGF コアクロル 強皮症

## 研究実績の概要

### 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は国指定の難病であり、本邦だけでも二万人以上の患者が存在する。皮膚や内臓の硬化を主徴とし、慢性的に進行する。血管障害や免疫異常を生じると内臓の障害により死の転帰を取ることもあるが、症状が皮膚にとどまってもレイノー症状・皮膚硬化・潰瘍によって、患者の生活の質は大きく低下する。現在のところ著効を示す治療法はない。線維芽細胞の活性化が全身性強皮症の主たる病因と認識されている。線維芽細胞はサイトカイン TGF $\beta$  によって筋線維芽細胞に形質転換し、 $\alpha 1$  型コラーゲンをはじめとした線維状タンパク質を産生する。そこで TGF $\beta$  を標的とした全身性強皮症治療が試みられたが、抗 TGF $\beta$  抗体・ALK5 (TGF $\beta$  受容体) 阻害剤のいずれも無効であった (Leask, J. Cell Commun. Signal. (2011) 5:125-129)。CCN2 は当初「結合線維成長因子 (CTGF: connective tissue growth factor)」として同定された、分子量約 37 KDa の糖タンパク質である。CCN2 は現在、六つのメンバーよりなる CCN ファミリーマトリックス細胞タンパク質の一員とされる。マトリックス細胞タンパク質は間質に存在するものの細胞機能を制御する働きも有し、線維化への関与が示唆されている。CCN2 は線維芽細胞で直接的にコラーゲンの産生を促進するわけではないが、TGF $\beta$  の受容体シグナルを強化すると考えられている (Kular et al., Biochimie 93 (2011) 377-388)。全身性強皮症患者で CCN2 の発現が増加していること、抗 CCN2 抗体 FG-3019 が特発性肺線維症に有効とされ非盲検第 2 相試験中であることから、研究代表者らは CCN2 を抑制することで新しい全身性強皮症の治療法が開発できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

当研究の目標は、アデノシン類縁体であるコアクロルの、全身性強皮症治療薬としての可能性を明らかにすることである。コアクロルが CCN2 マトリックス細胞タンパク質の発現抑制を介して、全身性強皮症における線維化進展を阻止することを示す (仮説図)。今回の申請期間では、コアクロルの線維化抑制効果を、培養細胞・実験動物のレベルでそれぞれ確立することを目的とする。新規アデノシン類似化合物であるコアクロルが線維芽細胞における CCN2 発現とコラーゲン産生に及ぼす影響とその分子機作を、正常ヒト皮膚由来培養線維芽細胞で定める。すなわち、以下の三点を明らかにする。

- (1) コアクロルが CCN2 抑制を介してコラーゲン生成を低下させることを、正常線維芽細胞および強皮症患者由来線維芽細胞において示す。
- (2) コアクロルによる CCN2 抑制の仕組みを、分子薬理学的に明らかにする。
- (3) 強皮症モデル動物において、コアクロルが CCN2 およびコラーゲンを抑制することを示す。

### 3. 研究の方法

具体的な研究方法としては、

#### (1) 培養細胞系

ヒト皮膚由来正常線維芽細胞 (NHDF) はロンザ社から入手し、専用培地にて培養する。

#### (2) コアクロルの合成

コアクロルの合成系は、共同研究者の塚本が有し、その供給には問題はない。夾雑物含量が

検出限界以下であることを、核磁気共鳴分光法で毎回確認している。またコアクロルの類縁体も複数種存在し、比較検討も可能である。

#### (3) CCN2・コラーゲンに対するコアクロルの抑制効果

NHDF に、線維化促進因子として知られる刺激を行う(サイトカインとして TGF- $\beta$  および PDGF-BB、また生理活性ペプチドとして endothelin-1 など)。それぞれの刺激の有無にて、CCN2 及びコラーゲンの mRNA・タンパク質の発現を、RT-PCR 法・ウエスタンブロット法にて定める。コラーゲンタンパク質の各アイソフォームの産生については ELISA 法を、可溶性コラーゲンについてはシリウスレッド法をそれぞれ用いる。

#### (4) CCN2 プロモータ解析

NHDF に対して、ヒト CCN2 プロモータ/ホタルルシフェラーゼをコードするプラスミド DNA を導入する。導入にはリポフェクション法の一つである、Mirus 社の transit-x2 試薬を用いる。NHDF は遺伝子導入効率の悪い細胞であるが、予備実験にて transit-x2 試薬によりレポーター遺伝子アッセイが可能な程度の遺伝子導入が生じることを確認している。細胞にコアクロルを投与したのち TGF- $\beta$ ・PDGF-BB・endothelin-1 にて刺激し、ルシフェラーゼアッセイを行う(プロメガ社キット)。コアクロルがヒト CCN2 遺伝子プロモータ活性を抑制することを明らかにする。野生型ヒト CCN2 プロモータは理研より入手済である。ヒト CCN2 プロモータは TGF- $\beta$  の下流で働く SBE シス配列を有する。同配列の変異体も作成し、同様の検討を行う。

#### (5) コアクロルの作用点の分子薬理的な解析

予備実験結果より、コアクロルは TGF- $\beta$  による CCN2 誘導を抑制する。線維芽細胞では TGF- $\beta$  は受容体 ALK5 を介して Smad2・Smad3 分子をリン酸化し、Smad タンパク質複合体が核に移行して遺伝子プロモータの SBE シス配列に結合して発現調節を行う。そこでコアクロルが TGF- $\beta$  受容体シグナルのいずれかを抑制するかを分子薬理的に定める。ALK5 および Smad に対しては、それぞれに特異的な siRNA による遺伝子サイレンシングを行う。ALK5 の特異的な小分子阻害剤として SB-431542 を用いる。Smad2・Smad3 のリン酸化はリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロット法で、Smad 分子の核移行については免疫細胞化学染色法及び核抽出法(ピアス社キット)で、Smad 分子と CCN2 遺伝子プロモータ SBE シス配列との結合についてはクロマチン免疫沈降法(CST 社キット)にてそれぞれ定める。PDGF-BB および endothelin-1 による CCN2 誘導もコアクロルが抑制した場合、各刺激に対応する細胞内エフェクターについて TGF- $\beta$  の場合と同様な検討を行う。

#### (6) in vivo 全身性強皮症モデルマウスを用いた検討

モデルマウスとしては従来の T s K、T s K 2 マウスやプレオマイシン誘導モデルマウスを用い、コアクロルの全身投与(ip)および外用塗布によるマウス皮膚組織の線維化の抑制効果を検討する。組織学的評価として H E 染色やアザンマロリー染色のほか免疫蛍光抗体法による各種タイプのコラーゲン分子の発現を検討する。また採取した皮膚のヒドロキシプロリンを定量する。皮膚粘弾性についてはキュートメータ DUAL MPA(インテグラル社)を用いて皮膚粘弾力への影響を経時的に評価する。

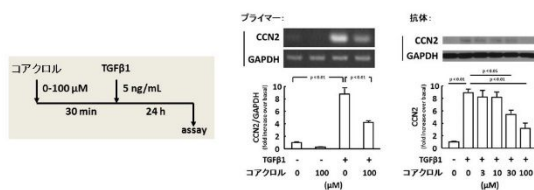
## 4. 研究成果

### (1) コアクロル(COA-CL)の TGF- $\beta$ 刺激による線維芽細胞の CCN2 誘導への作用

まず、新規アデノシン類似化合物コアクロルに強力な血管新生作用を見出した。コアクロルは培養ヒト皮膚由来正常線維芽細胞(NHDF)との共培養においてヒト臍帯静脈由来血管内皮

細胞 (HUVEC) の管腔形成能を促進したことから、線維芽細胞で薬理作用を発揮すると考えられた。NHDF においては、コアクロルは新生血管出芽を強力に促す血管内皮成長因子(VEGF)の分泌を亢進させることが分かった (Igarashi, Kubota et al., *Physiol Rep*, 4 (6), 2016, e12742)。この研究の過程で、我々はコアクロルが NHDF において、定常培養条件下及び TGFβ 刺激下の双方で、CCN2 遺伝子・タンパク質の発現を抑制することを見出した (下図 1)。また、NHDF において COA-CI は血管内皮成長因子の分泌を亢進させることが報告した (Igarashi, *Physiol Rep* 2016 e12742)。これらの報告に続いて、我々は COA-CI が TGFβ 刺激により増加した NHDF の CTGF 産生を mRNA 発現とタンパク発現のレベルで抑制すること

**コアクロルは培養線維芽細胞において TGFβ1によるCCN2誘導を抑制する**



正常ヒト皮膚由来線維芽細胞を左プロトコルのとおりコアクロル・TGFβ1で順に刺激し、RNAまたはタンパク質を回収した。中図はRT-PCRアッセイの結果である。中図上は代表的な核電気泳動イメージを示す。CCN2のmRNA発現をGAPDHにて補正し、無刺激の細胞における各mRNA発現量を1とみなした値を中図下のグラフに示す。右図上・下はウエスタンブロット法の結果である。これらの実験によるTGFβ1によるCCN2遺伝子・タンパク質の誘導をコアクロルが阻害することが分かった。

を発見した (下図 2)。

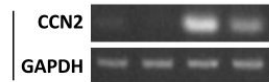
(2) コアクロル(COA-CL)のTGFβ 刺激による線維芽細胞のCCN2抑制の分子メカニズムとマウス強皮症モデルを使った in vivo の解析について

続いて、そのメカニズムの解明も行った。COA-CI は TGFβ刺激による NHDF のシグナル伝達物質である Smad や ERK の活性化には影響しなかったが、Akt の活性化を抑制した。

COA-CI は Akt 活性化を抑制することで、NHDF の TGFβ刺激による CTGF 産生を mRNA 発現とタンパク発現のレベルで抑制することが分かった。さらに、COA-CI はアンジオテンシン II により誘導された全身性強皮症モデルマウスの CTGF 発現を抑制し、皮膚病理学的に皮膚症状の改善を確認した。(各々のデータは COA-CI prevented TGFβ1-induced CTGF expression by Akt dephosphorylation in normal human dermal fibroblasts, and it attenuated skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis. Nakai K, Karita S, Igarashi J, Tsukamoto I, Hirano K, and Kubota Y. *J Dermatol Sci* 2019にて発表)なお、申請時計画していた in vitro 全身性強皮症患者由来培養線維芽細胞を用いた解析は患者培養細胞樹立のための香川大学医学部附属病院倫理委員会手続き中であり、実施ができなかった。これらの成果を踏まえて今後の研究方策は以下のように考えている。全身性強皮症の主たる原因である活性化された線維芽細胞はサイトカイン TGFβによって筋線維芽細胞に形質転換し、I型コラーゲンをはじめとした繊維状タンパク質を産生する。そこでTGFβを標的とした全身性強皮症治療が試みられたが、抗 TGFβ抗体、TGFβ受容体阻害剤のいずれも無効であった (Leask, *J Cell Commun Signal* 2011 5:125-129)。TGFβの次に治療標的となったのが CTGF である。CTGF の全身性強皮症の病態における多彩な役割はまだ完全には解明されていないが、全身性強皮症患者で CTGF 発現が増加していることや (Nikitorowicz-Buniak, *J Invest Dermatol* 2014 134:2693-2702) 抗 CTGF 抗体が特発性線維症に有効であることが確認され、非盲検第 2 相試験中である。このことから、申請者らは CTGF を抑制することで新しい全身性強皮症の治療法が確立できると考えた。現在のところ COA-CI の臨床応用は困難である。しかしながら本研究のような基礎研究の積み重ねにより、近い将来に全身性強皮症患者の新しい治療法が確立されることが期待される。なお、学会発表は 2019 年 12 月に日本研究皮膚科学会総会 (弘前市) にて報告した。

## コアクロルは培養線維芽細胞においてTGFβ1によるCCN2タンパク質誘導を抑制する

プライマー:



抗体:

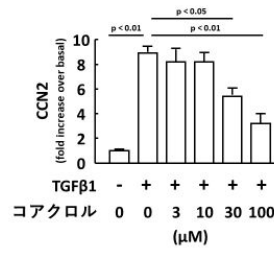
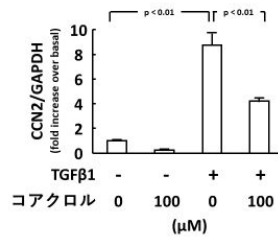


図 2

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakai K, Karita S, Igarashi J, Tsukamoto I, Hirano K, and Kubota Y	4. 巻 94
2. 論文標題 COA-CI prevented TGF- 1-induced CTGF expression by Akt dephosphorylation in normal human dermal fibroblasts, and it attenuated skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 205212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.201902.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	塚本 郁子 (TUKAMOTO IKUKO) (10183477)	香川大学・医学部・寄付講座教員  (16201)	
研究分担者	五十嵐 淳介 (IGARASI JYUNSUKE) (20346638)	森ノ宮医療大学・保健医療学研究科・教授  (34448)	
研究分担者	中井 浩三 (NAKAI KOZO) (40363204)	香川大学・医学部附属病院・講師  (16201)	