

血漿 TGF- LAP 断片を用いた PRI-724 の抗線維化効果の評価

研究分担者 小嶋聡一 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット
研究協力者 古谷 裕 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット
研究協力者 原 詳子 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット

研究要旨 : PRI-724 投与後のヒトやマウスのサンプルを用いて血漿 TGF- β LAP 断片等の線維化マーカーの測定を行い、PRI-724 の抗線維化効果を示すとともに、作用機序の解明に資することを目的とする。初年度は、HCV-Tg マウス肝線維化モデルにおいて、PRI-724 投与 (1mg/kg; 7 週間; 0.15 μ l/hour Mini-osmotic pump) により、肝ヒドロキシプロリン量 (コラーゲン蓄積量) を減少させることを確認したうえで、現在血漿 TGF- β LAP 断片量 (肝 fibrogenesis 量) の測定を行っている。

A. 研究目的

肝硬変は、年間患者数 30 万人、予備軍 350 万人で我が国死亡原因第 9 位の難病である。その病態は、様々な原因による肝組織の障害と修復の過程において、細胞外マトリックスタンパク質が異常蓄積することによって肝組織が硬化し、機能を失っていく。未だに根治治療法が確立されておらず対処療法のみ施されている。さらに、肝硬変、その前段階である肝線維化を検出する非侵襲的なバイオマーカーならびにそれを応用した非侵襲的検出法が確立されておらず、新薬開発の遅れにつながっている。この状況を克服するためには、肝線維化・肝硬変の病態形成機構に立脚した新しい肝疾患診断法を早急に開発する必要がある。肝硬変の際に細胞外マトリックスタンパク質の異常産生を引き起し、正常肝細胞の再生を阻害しているのがサイトカイン Transforming Growth Factor (TGF)- である。TGF- は、高分子潜在型

分子として産生された後標的細胞上でプロテアーゼの作用で活性化され働く。

小嶋は TGF- が活性化される際に生成する TGF- のプロペプチド LAP ([Latency-associated Protein]: 潜在型 TGF- 分子中で TGF- をトラップ [Nature 2012 年 6/16 号に立体構造]、活性化反応により切断され TGF- を放出) の切断断片を特異的に認識する抗体を作製 (国際・国内特許取得) し、キャラクタリゼーションしたところ、同抗体で検出される LAP 断片は、従来の肝障害マーカー、fibrosis マーカー、肝機能マーカーとは異なる、これまでなかった肝 fibrogenesis を反映する新規バイオマーカーとして TGF- 活性化反応が始まる肝線維化初期段階 (新犬山分類 F1, F2) を反映するマーカーとなりえることが、動物モデル並びに患者検体を用いた解析より判ってきた。

木村班では、肝ヒドロキシプロリン量、肝

切片シリウスレッド染色/ SMA 染色をはじめとした 既存の fibrosis 評価系に加えて、LAP 断片を指標にした fibrogenesis 評価系を用いて

- 1) PRI-724 の抗線維化作用機序解明
- 2) 臨床試験における有用性評価を行う。

初年度は、動物モデルにおける線維化の評価を行った。

B.研究方法

HCV-Tg マウス肝線維化モデルにおいて、PRI-724 投与(1mg/kg; 7 週間; 0.15 μ l/hour Mini-osmotic pump) 後、肝臓を摘出し、肝ヒドロキシプロリン量(コラーゲン蓄積量)を測定した。経時的に血漿 LAP 断片濃度と肝組織の LAP 断片染色の変化を調べ、肝組織シリウスレッド染色や肝ヒドロキシプロリン量(コラーゲン蓄積量)の推移、 α -平滑筋アクチンによる活性化星細胞の変化との比較・検討を行い、PRI-724 の抗体 fibrosis 効果、抗 fibrogenesis 効果を評価する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、理化学研究所の動物実験指針に準拠して行うほか、NIH ガイドライン、並びに「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)」に沿った動物の飼育・実験を行った。すでに、理化学研究所の実験動物委員会において研究計画の承諾は受けており、研究内容に倫理面の問題はない[理研の承認番号: H24-2-002 (最終変更承認 H24.3.23)]

C.研究結果

PRI-724 投与群では、ヒドロキシプロリン量(コラーゲン蓄積量)の減少が観察された(図 1)。

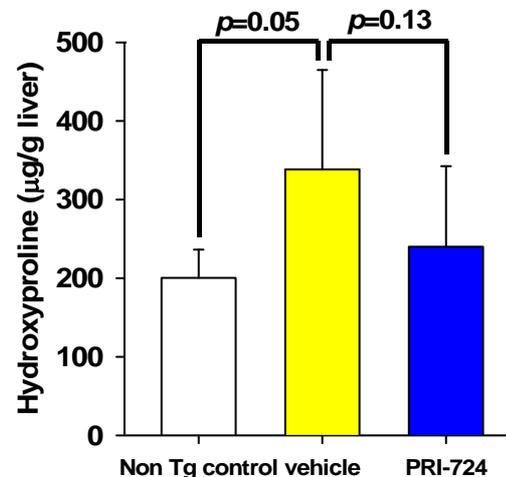


図 1. PRI-724 投与によるコラーゲン蓄積量減少

D.考察

今回の測定では、マウス肝臓の異なる葉を検体としたために、肝ヒドロキシプロリン量データがばらつき、有意差がつかなかったものと思われる。次回は、各群で同じ葉の同じ位置からサンプリングした検体で比較を行うことにより、有意差がある抑制作用がみられると考えられる。現在、血漿 TGF- β LAP 断片量(肝 fibrogenesis 量)の測定を行っている。

E.結論

PRI-724 の抗線維化効果を確認できた。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata K, Hara M., Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, and Kojima S. (2013) HCV NS3 protease enhances

liver fibrosis via binding to and activating TGF- type I receptor. *Sci. Rep.* 3:3243.

- 2) Sakata K, Eda S, Lee E-S, Hara M, Imoto M, and Kojima S. (2014) Neovessel formation promotes liver fibrosis via providing latent transforming growth factor- . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443(3): 950- 956.
- 3) Hara M, Kirita A, Kondo W, Matsuura T, Nagatsuma K, Dohmae N, Ogawa S, Imajoh-Ohmi S, Friedman S. L., Rifkin D.B, and Kojima S. (2014) LAP degradation product reflects plasma kallikrein-de-pendent TGF- activation in patients with hepatic fibrosis. *SpringerPlus* in press.

2. 学会発表

- 1) Sakata K, Eda S, Lee E, Hara M, Imoto M, Kojima S, Neovessels contribute to liver fibrosis via providing latent transforming growth factor-beta to be activated by hepatic stellate cells. American Association for the Study of Liver Diseases. 2013/6/7 Atlanta, USA
- 2) 坂田幸太郎、原詳子、津曲千恵美、寺田貴帆、渡邊則幸、矢口壮一、松本武久、白水美香子、横山茂之、宮澤恵二、相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、小嶋聡一
HCV NS3 protease plus TNF- promotes liver fibrosis via stimulating expression and activation of TGF- type I receptor
The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells

2013年9月27日 大阪

- 3) 坂田幸太郎、相崎英樹、小嶋聡一
C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- 疑似活性を介した肝線維化誘導機構 - TNF- との協調作用による肝細胞の感受性亢進 -
第40回日本肝臓学会西部会 2013年12月6日 岐阜

H. 知的所有権の出願・登録状況

特許取得

小嶋聡一、近藤和嘉子、堂前直「TGF - 活性化制御領域の切断面を認識する抗体」

特願 2003 - 313014 平成 15 年 9 月 4 日出願

JP2004/013189 平成 16 年 9 月 3 日 PCT 出願

US, EP, JP 移行手続き済 US 優先権出願 10/570606

登録番号 7,803,553 (平成 22 年 9 月 28 日)

US 優先権出願 12/856195

登録番号 8,198,412 (平成 24 年 6 月 12 日)

EU EPC 出願 04772928.0

JP PCT 出願 特願 2005-513729 登録番号 4653660 (平成 22 年 12 月 24 日)

実用新案登録 特になし

その他

