

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

国内既承認薬ライブラリーを用いた治療薬スクリーニング

研究分担者 佐谷秀行 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 教授

研究要旨

先天性異常疾患群の治療薬の開発を行うための薬剤スクリーニングシステムを確立し、実施することが、本分担研究の役割である。基本的には、それぞれの先天性異常疾患の患者由来iPS細胞を用いて詳細な形質変化を見出し、その病的特性を是正できる薬剤を、既承認薬剤ライブラリーをスクリーニングすることで見出すことが目的である。本年度は、マルファン症候群の原因遺伝子である*FBNI*に変異を導入したブタの線維芽細胞を用いてモデル実験系を構築し、マルファン症候群患者から樹立したiPS細胞由来の線維芽細胞あるいは血管内皮細胞で薬剤探索を行うためのシステム構築の準備を行った。

A．研究目的

先天性異常疾患群の治療薬を、既に承認された薬剤の中から見出し、早期に実臨床に応用することが本分担研究の最終的な目的である。具体的には、本研究事業において取り扱うそれぞれの先天性異常疾患を持つ患者の細胞から線維芽細胞を採取し、iPS細胞を樹立する（研究分担者 赤松らが担当）疾患特有の障害が生じる臓器（組織）の細胞へとiPS細胞を分化させ、その細胞の各種特性を正常のiPS細胞から分化させた細胞と比較を行うことで、病的性質を指標化できるバイオマーカーあるいは表現型を明らかにする。で見出したバイオマーカーあるいは表現型を評価できるアッセイ系を構築する。樹立したアッセイ系を用いて、バイオマーカーあるいは表現型を是正できる化合物のスクリーニングを行う。この際、化合物は既に本分担研究者らのグループが構築している既承認薬ライブラリーを用いて行う。既承認薬は安全性や薬物動態に関するデータが豊富であることから、前臨床試験において良好な結果が得られた場合は、実臨床に応用するまでの障壁が少なく、早期に臨床試験に持ち込むことが可能である。

B．研究方法

本年度はシステムのインフラを構築する目的でブタの遺伝子改変及び核移植技術をベースにして樹立した（明治大学農学部長嶋比呂志教授らより提供を受けた）*FBNI* 遺伝子変異線維芽細胞を用いて、その特性解析を行った。*FBNI* 遺伝子変異することで得られる形質変化について評価を行った。また、TGF- β シグナルの下流でマトリクス産生などの間葉系性質を抑制できる候補薬を見出したので、それらの*FBNI* 遺伝子変異ブタ線維芽細胞に対する作用を、形態並びに遺伝子発現レベルで検討した。

C．研究結果

線維芽細胞はもともと間葉系の細胞ではあるが、*FBNI* 遺伝子変異を持つ線維芽細胞は、正

常のブタ線維芽細胞に比べて、更に間葉系性質が強いことが分かった。細胞外マトリクスの産生が高く、TGF- β シグナルを増強した際に見られる変化に合致することが観察された。

私たちは以前、ヒト網膜色素細胞にTGF- β とTNF- α を同時に作用させることで、強い間葉性変化を短時間で誘導できる事を見出した（Takahashi et al., *J Biol Chem* 285: 4060-4073, 2010）。その間葉系誘導システムを用いることで、既承認薬の中に、血中濃度と同じ程度あるいは低い濃度で間葉系性質を阻害できる薬剤を既に4つ見出している。これらの薬剤のうちの一つ（compound A1）は血中濃度値と同程度の範囲で、線維芽細胞の形質並びに遺伝子発現をより上皮性に变化させることを見出した。特に細胞外マトリクスの発現を有意に抑制することがわかり、TGF- β を起点とするシグナルが抑制されていることが示唆された。

現在、*FBNI*変異ブタが誕生してきているので、本薬剤の動物実験を開始するための準備を進めている。

D．考察

本分担研究は各疾患患者の細胞から樹立したiPS細胞を用いて標的細胞へと分化させ、それをベースに既承認薬でスクリーニングすることで、実臨床に応用可能な薬剤を、迅速に見出そうとする試みである。本年度は、まだ疾患患者からiPS細胞を樹立するステップであったことから、ブタの変異細胞を用いてアッセイのインフラ構築を行った。

マルファン症候群は細胞外基質蛋白であるfibrillin 1をコードする遺伝子（*FBNI*）変異あるいはTGF- β 受容体の変異を原因とする遺伝性疾患であり、大動脈瘤とこれに伴う大動脈弁閉鎖不全症を伴う。fibrillin 1はTGF- β を細胞外でトラップすることにより、TGF- β シグナルの強度を制御する。そのため、*FBNI*変異やTGF- β 受容体変異によって、TGF- β シグナルが細胞内で過剰になることが、マルファン症候群の病態を形成する重要な原因となっているのではないかと考察される。現実にはTGF- β の中和抗体や、TGF- β の上流に位置するアンジオテンシンII受容体1型（AT1R）

活性のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) による制御が治療法として有効であることが示唆されている。

私たちは TGF- β シグナルが増強した際に、間葉系反応が増強することを、ヒト網膜色素細胞を用いた検討によって明らかにしている (Takahashi et al., J Biol Chem 285: 4060-4073, 2010)。本実験系では TNF- α 存在下で TGF- β シグナルが増強することで、細胞の運動性増加、フィブロネクチンやヒアルロン酸などを中心とした細胞外マトリックスの集積、などの特徴的な変化が誘導され、培養皿上で細胞の集塊形成が安定して見られる。この現象を fibrotic focus formation (FFF) と称して報告している。この FFF を有意にしかも血中濃度の範囲で抑制する化合物が既承認薬の中に見出されており、これらの薬剤の FBNI 変異細胞に対する効果を検討したところ、マトリクス産生など TGF- β の下流で活性化されるシグナルが抑制できることが分かった。

現在はマルファン症候群患者から樹立した iPS 細胞から線維芽細胞、あるいは血管内皮細胞を誘導する実験を行っている。これらが樹立できれば、マルファン症候群患者由来細胞は、TGF- β シグナルが正常の iPS 細胞に比べて増強しているか？ 候補となる薬剤はその性質を抑制できるか？ について検討を行う。

また、明治大学の長嶋研では既に FBNI 変異ブタが誕生しており、その形質の一部はマルファン症候群と類似の病態であることが分かったので、ブタを用いた前臨床試験を現在計画中である。

他の疾患についても本年度の研究で構築したインフラを用い、iPS 細胞の樹立、適切な細胞への分化、疾患由来細胞の特性検索、アッセイ系の樹立、薬剤スクリーニング、前臨床試験モデルの構築、前臨床試験による概念の証明、というフローで薬剤開発を今後進める予定である。

E . 結論

FBNI 変異を持つブタ細胞を用いて TGF- β シグナルが活性化することで生じる間葉系性質を抑制できる可能性のある候補薬剤を見出すことができた。今後疾患由来の iPS 細胞を用いて同様の実験を行い、概念の確認を行う。また、本年度の研究を通じて、iPS 細胞を用いた既承認薬スクリーニングのインフラ構築を行うことができた。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H and Oshima M: TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 2013 (doi: 10.1038/onc.2013.356)
- 2) Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K: Multiple cafe' au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet* 164: 392-396, 2014 (doi: 10.1002/ajmg.a.36288)

2. 学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし