

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合研究報告書

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。最終的には、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を目的とした。そのモデルとして、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の構築を行った。

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

iPS細胞を用いたスクリーニング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。主として細胞の形態観察、培地中の代謝物の測定、サイトカイン産生、細胞外マトリクス産生などを解析し、*FBNI* 遺伝子変異することで変化する形質、数値について評価を行った。また、既承認薬スクリーニングによって、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

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、より間葉系性質が強いことが判明した。特に、細胞外マトリクスの産生が高く、理論通り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、強い間葉系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）。指標としては培養プレート上で通常は単層に増殖する細胞が、TGF- β とTNF- α を作用させることで、細胞の凝集塊を作る。その時、多くの細胞外マトリクスの分泌が上昇し、間葉系反応時に発現する転写因子が上昇することを確認している。その凝集塊形成（フォーカス形成と呼ぶ）能を、間葉系性質を定量化するシステムとし、保有している既承認薬をスクリーニングした。これらの薬剤の中に、血中濃度と同じ程度あるいは、血中濃度より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、細胞の形質並びに遺伝子発現をより上皮性に変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。しかし現実には、まだ疾患患者からiPS細胞を樹立し、適切な標的細胞に分化させるステップに時間を要したため、ブタの核移植に

基づく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 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。この現象をフォーカス形成と称して報告している。このフォーカス形成能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、これらの薬剤が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を抑制できることが分かった。

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。

今後、本研究で樹立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薬剤の効果を検討した。本研究で構築したインフラにより、今後疾患由来の iPS 細胞を用いて同様の実験を行い、薬剤の取得を目指す。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagama H, Taya Y and Saya H: Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J Biol Chem* 287: 7896-7906, 2012
- 2) Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, and Baba H: CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 72: 3414-3423, 2012
- 3) 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)
- 4) 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