

血漿 TGF-β LAP 断片を用いた PRI724 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 断片をはじめとする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。今年度は、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 μl/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)-β である。TGF-β 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-β が活性化される際に生成する TGF-β のプロペプチド LAP (Latency-associated Protein: 潜在型 TGF-β 分子中で TGF-β 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て TGF-β を放出)の切断断片を特異認識する抗体を作製(国際・国内特許取得)、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-β 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。

2 年目となる平成 26 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 (5, 20 mg/kg/day、または 5 mg/kg/biweekly、7 週間) 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。同時に血漿中 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 効果を評価した。

(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)。この時、non-Tg マウス群と比較して HCV-Tg マウス群で血漿中 L59 LAP 断片量が増加し、PRI-724 投与により増加が抑制された (図 2)。このことから、PRI-724 による抗線維化作用に PLK 依存性 TGF- β 活性化が何らかの関与をしていることが示唆された。ヒドロキシプロリン量と血漿中 L59 LAP 断片量は、個体ごとでは相関が見られなかったが、群毎では緩やかな相関が見られた (図 3)。

これまでの研究から、血漿中 L59 LAP 断片量は fibrogenesis を反映するため、ヒドロキシプロリン量が増加する前段階で増加することが分かっているため、次回、投与試験中に経日的に採血を行い、血漿中 L59 LAP 断片量の推

移と肝中ヒドロキシプロリン量との相関を検討する。

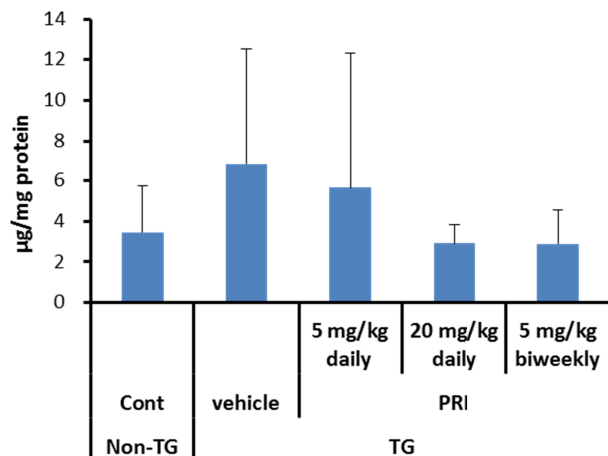


図 1 . PRI-724 投与後の肝中コラーゲン蓄積量

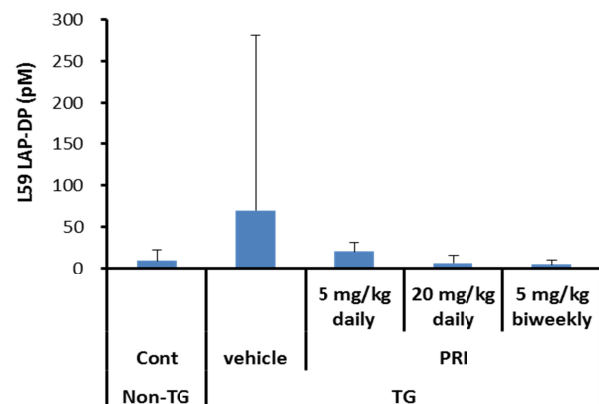


図 2 . PRI-724 投与後の血漿中 L59 LAP 断片量

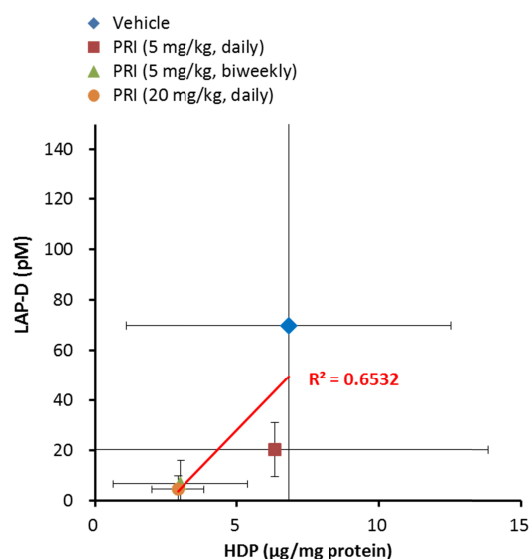


図 3 . 群毎の肝中コラーゲン蓄積量と血漿中 L59 LAP 断片量の相関

D. 考察

L59 LAP断片量の血中半減期は約12時間であり、増えたり減ったり変化するときには、高低波打ちながら変化することが観察されている。したがって、今後動物モデルや患者においてPRI-724の抗線維化効果をL59 LAP断片量で検証する際には、今回のように1時点のみで評価するのではなく、個体ごとに継続的变化を測定して評価することが必要であると考えられる。

E. 結論

PRI-724の動物モデルにおける抗線維化効果を確認できた。HCV-Tgマウスで増加した血漿中L59 LAP断片量はPRI-724により減少した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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-dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis. SpringerPlus 3:221.

2. 学会発表

- 1) 原詳子、結城瑞恵、平野秀典、白水美香子、斎藤臣雄、種村健太郎、水上拓郎、小嶋聡一
LAP結合TGF- β 活性化反応阻害物質の探索と活性評価 第37回日本分子生物学会年会（横浜）

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

