

厚生労働科学研究費補助金
(政策科学総合研究事業 (臨床研究等 ICT 基盤構築・人工知能実装研究事業))
分担研究報告書

課題名 : 新薬創出を加速する症例データベースの構築・拡充/創薬ターゲット推定アルゴリズムの開発に関する研究
研究分担者名 : 加藤 明良
国立大学法人大分大学 医学部臨床薬理学講座・特任教授

研究要旨

本研究では、創薬ツール化合物候補であるアルカロイド様骨格のビオチン化や PROTAC 化を行った誘導体を用いて、結合候補蛋白質の探索や TGF β シグナリングにおける SMAD 経路の選択的阻害に関する実験を実施した。また、山西グループが行った複数のインシリコ手法を用いた解析で治療標的蛋白質最上位に挙げられた受容体 X の *in vivo* における病態解析を実施した。

A. 研究目的

特発性肺線維症に対するオミックスデータの解析や他の関連疾患との相関解析、ツールとなる可能性の高い化合物を選定する。抗線維化作用を *in vitro* で検証できる実験プラットフォーム構築を目指す。さらに、山西グループの複数のインシリコ手法を用いた解析から見出された受容体 X に着目し、IPF モデルマウスである SFTPCI73T ノックインマウスを用いてアゴニスト/アンタゴニスト投与下での肺の炎症・線維化の増悪や抑制効果を調べ、IA 手法の妥当性を検証する。

B. 研究方法**1. 創薬ツール化合物のビオチン化・PROTAC 化とそれらを用いた結合候補蛋白質の探索・SMAD 経路の検証**

- TGF β シグナリングを抑制する化合物 (TCB-1248、TCB-1259) の結合候補蛋白質を、20,000 蛋白質ライブラリーを対象に α Screen 法により探索した。TCB-1259 のポリエチレンオキシ鎖-(CH₂CH₂O)_n-長を変えた化合物 (TCB-1399, 1400, 1401) を合成し、HPCAL 1 との結合強度を検討した。
- ビオチン結合ポリエチレンオキシ鎖を伸長する部位の変化が HPCAL 1 との結合強度に及ぼす影響を検討するために TCB-1256 と TCB-1257 を合成した。また、TCB-1259 のアルカロイド様骨格部位 (Y34-1) をより脂溶性を高めた F34-1 に変換した TCB-1397 を合成し、HPCAL 1 との結合強度を検討した。
- Competitive assay に関する知見を得るために、ビオチン部位を欠く 3 種類の Y34-1 の誘導体 (TCB-1431、TCB-1432、TCB-1433) を合成し、HPCAL 1 との結合強度を検討した。
- TCB-1259 は TGF β 刺激に伴う collagen type1 (Col1) や α -smooth muscle actin (α SMA) の発現抑制活性を有すること、また *in vitro* の結合実験からは EF-Hand 含有蛋白質との結合が確認されている。TCB-1259 構造を基に PROTAC 活性を有する化合物を合成することで、TGF β 刺激抑制及び抗線維活性が増強することが期待される。そこで TCB-1398 を合成し、その活性を評価することにした。
- エチレンオキシ鎖長-(CH₂CH₂O)_n-が TCB-1398 より 2 ユニット短い TCB-1471 と、TCB-1398 より 1 ユニット長い TCB-1472 を合成し、エチレンオキシ鎖長が PROTAC 活性に及ぼす影響を検討することにした。
- TCB-1398PROTAC を多量に合成し、肺線維症を自然発症する SFTPCI73T ノックインマウスを用いた *in vivo* 実験を行うこととした。
- TCB-1248 と TCB-1259 の評価結果を考慮し、ビオチン部位を含むエチレンオキシ鎖が TCB-1248 とは異なる位置に結合した TCB-1255 を合成し、20,000 蛋白質との相互作用の α Screen 法による評価を株式会社セルフリーサイエンスに再度依頼した。

2. 受容体 X アンタゴニストの肺線維症モデルマウスへの *in vivo* 投与実験

肺線維症を自然発症する SFTPC^{L73T} ノックインマウス及びブレオマイシン誘発肺線維症マウスに対して、受容体 X アンタゴニスト（市販品 Y）投与を行い、肺の炎症及び線維化に対する影響を調べる。肺の炎症は、気管支肺胞洗浄液細胞数、肺病理炎症スコアを用いて、肺線維化の評価は、Picro-Sirius Red 染色によるコラーゲン沈着面積定量及び肺ホモジネートの可溶性コラーゲン濃度定量にて行う。さらには、受容体 X アゴニスト/アンタゴニスト投与後の経時的な体重変化、生存曲線の解析を行う。

3. 受容体 X コンディショナルノックアウトマウスを用いた肺線維化の評価

タモキシフェン誘導性に受容体 X をノックアウトするマウスに対して、上記 2. と同様にブレオマイシンを投与し、肺の炎症及び線維化に対する影響を調べる。肺の炎症は、気管支肺胞洗浄液細胞数、肺病理炎症スコアを用いて、肺線維化の評価は、Picro-Sirius Red 染色によるコラーゲン沈着面積定量及び肺ホモジネートの可溶性コラーゲン濃度定量にて行う。さらには、経時的な体重変化、生存曲線の解析を行う。

4. ヒトの肺線維症サンプルを及び肺線維症モデルマウスサンプル用いた受容体 X 発現の検討

ヒトの肺線維症サンプルとして「肺線維症の診断のために行われる胸腔鏡下肺生検組織」を用いる。対象として「原発性肺癌の治療のために切除された患者肺の正常部分肺組織」を用いる。いずれの肺組織も余剰部分を使用する。受容体 X 発現の解析方法として免疫染色法を用いる。手術肺組織の採取に関しては大分大学医学部附属病院の呼吸器外科と連携して行う準備が整っている。さらには、肺線維症モデルマウスの肺組織に対しても同様に免疫染色を行う。

（倫理面への配慮）

研究内容に関しては既に大分大学の倫理委員会の承認を得ており、患者の同意を得た後に患者サンプルを使用する。

C. 研究結果

1. TGFβシグナル伝達阻害薬の検証

1-1 創薬ツール化合物のビオチン化とそれを用いた結合候補蛋白質の探索

TGFβシグナリングを抑制する化合物（TCB-1248、TCB-1259）の結合候補蛋白質を、20,000 蛋白質ライブラリーを対象にαScreen 法により探索した。その結果、TCB-1259 に関して、表 1 に示す遺伝子産物は S/N 比が高値であることが判明した。通常、S/N 値が 5 以上のものを候補とするが、本試験では表に示すように、S/N 値が 100 を超えるものが複数見つかった。一方で TCB-1248 については、TCB-1259 程 S/N 値が高値のものは見出されず、再現性を確認することはできなかった。さらに、TCB-1248 とはビオチンの結合位置が異なる TCB-1255 についてもαScreen 法により評価を行ったが、非特異的な相互作用しか観察されなかった。

1-2 TCB-1259 結合蛋白質の特徴

1-1 にて得られた蛋白質に関し、共通構造を有するかについてデータベース

| | S/N値 | 遺伝子名 |
|---|-------|---------|
| 1 | 493.1 | NCALD |
| 2 | 341.1 | HPCA |
| 3 | 311.2 | HPCAL1 |
| 4 | 276 | NSC1 |
| 5 | 227.7 | CENT3 |
| 6 | 205.8 | HPCAL4 |
| 7 | 193.2 | S100A10 |
| 8 | 105.2 | CALML3 |

表 1 αScreen法によるTCB-1259(ビオチン化化合物) 結合候補蛋白質の探索

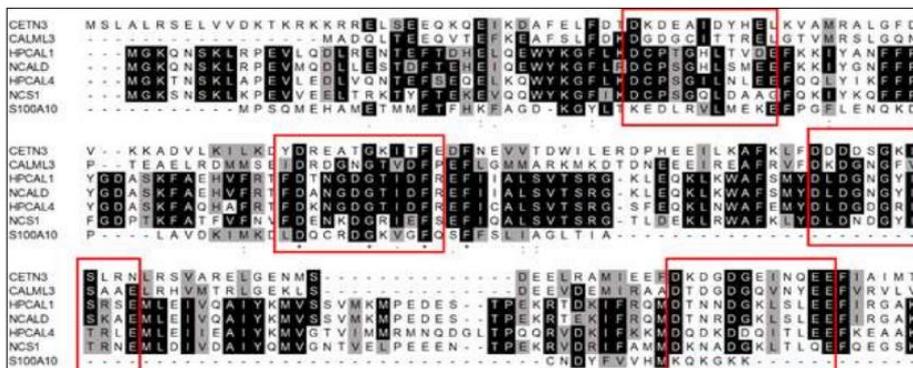


図2 TCB-1259結合候補蛋白質の相同性 (赤枠：カルシウム結合領域)

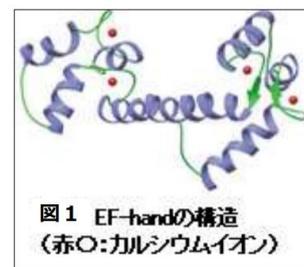


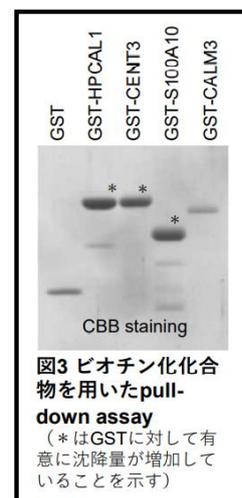
図1 EF-handの構造 (赤○:カルシウムイオン)

解析並びに蛋白質間のアライメントを行った。その結果、これらの蛋白質は EF-hand (図 1) モチーフを有していることが判明した。本ドメインは、互いにおよそ垂直になっている 2つの α ヘリックスからなり、しばしばカルシウムイオンを結合した 12 アミノ酸残基程度の短いリンカーで繋がっていることが知られている。さらに我々が同定した TCB-1259 結合候補蛋白質間のアライメント (CALML3 は生化学的検討により他の蛋白質より結合が弱かったためアライメントから除外している) によると、NCALD, NCS1, HPCAL1、HPCAL4 は高い相同性を有する。一方、これら 4 蛋白質とそれ以外を比較すると、カルシウム結合領域についての相同性は保持されている (図 2 中の赤枠部分) が、それ以外に目立った共通アミノ酸配列を見出せなかった。

1-3 TCB-1259 と結合候補蛋白質との結合に関する生化学的検討

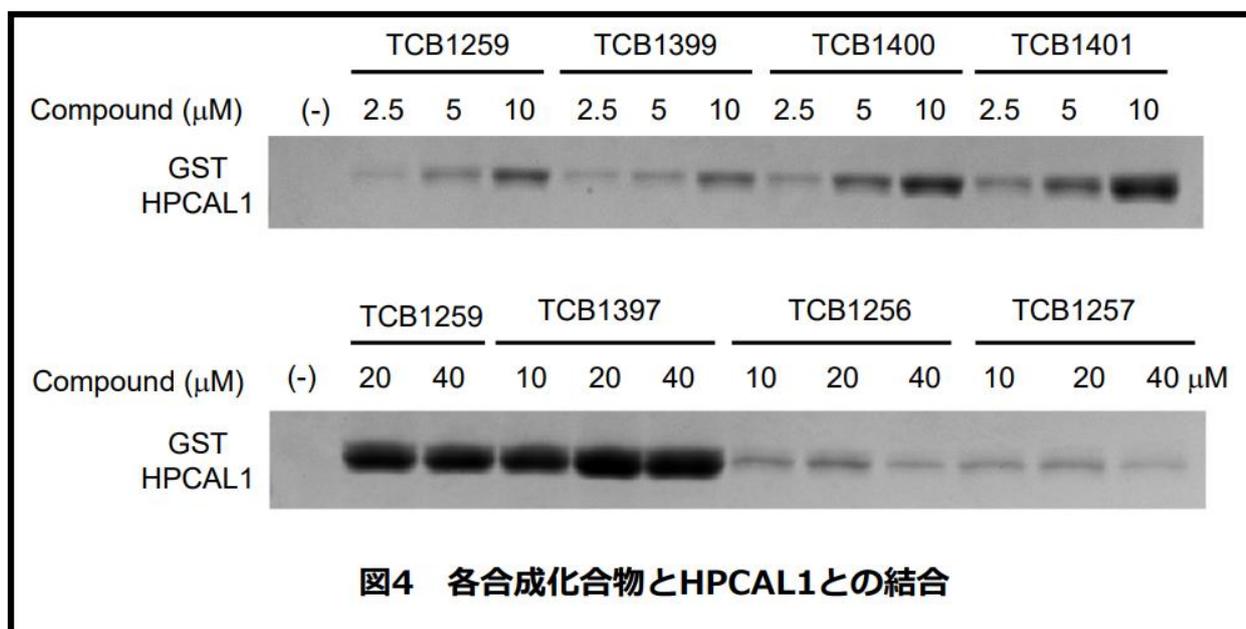
1-1 の結果を参考に、HPCAL1, CENT3, S100A10, CALML3 について 1st cDNA (HeLa 細胞) より PCR にてそれぞれの cDNA を取得し、pGEX-6p1 ベクターに挿入した。本プラスミドを BL21 (DE3) にトランスフォームして、GST 融合タンパク質として発現・精製した。精製蛋白質と TCB-1259 (ビオチン化合物) を混和し、Streptavidin-beads にて沈降させ、沈降物中の蛋白質を CBB 染色で確認した。(図 3) その結果、HPCAL1, CENT3, S100A10 との結合が確認された。一方、CALML3 は GST と比して有意な差を認めなかった。

また、HPCAL1 については、PreScission protease により GST 融合タンパク質を切断した標品を用い結合アッセイを実施し、TCB-1259 が直接 HPCAL1 に結合していることを確認している。また、カルシウム存在下あるいは非存在下で結合を検討したが、カルシウム有無にかかわらず、この結合に変化は認めなかった。



1-4 TCB-1259 結合蛋白質の特徴

TGF β シグナリングを抑制する化合物 (TCB-1259) の結合候補蛋白質は EF-hand を共通して有していることから、この中から HPCAL1 を結合実験に用いることにした。TCB-1259 のポリエチレンオキシ鎖の長さを変えた誘導化合物 (TCB-1399, 1400, 1401) を合成し、HPCAL1 との結合強度を検討した。その結果、ポリエチレンオキシ鎖が長い化合物 (この中では TCB-1401 が最もポリエチレンオキシ鎖が長い) が最も結合が強いことが判明した。(図 4 上段) また、ポリエチレンオキシ鎖の伸長する部位を変えると、HPCAL1 への結合活性が著しく減弱することが判明した (図 4 下段 TCB-1259 vs TCB-1256, TCB-1257)。TCB-1259 のアルカロイド部位 (Y34-1) をより脂溶性を高めた F34-1 に変換した TCB-1397 を合成したところ、TCB-1397 は、TCB-1259 と比して細胞毒性が高く、その後の評価化合物から除外した。一方で、ビオチン部位を欠く TCB-1431, TCB-1432, TCB-1433 は TCB-1259 と HPCAL1 との結合を阻害することが無く、結合様式をより解析することが必要であることが見出された。



1-5 TCB-1398PROTAC 化合物の活性評価

A549 細胞を TCB-1398 で 24 時間処理後、TGFβで刺激し、Smad2/3 のリン酸化を検討した。その結果、TCB-1398 処理細胞では顕著な Smad2/3 のリン酸化の減弱を認めた。(図 5) この結果から、TCB-1398 は TGFβ刺激を抑制する有用な化合物であることが示された。

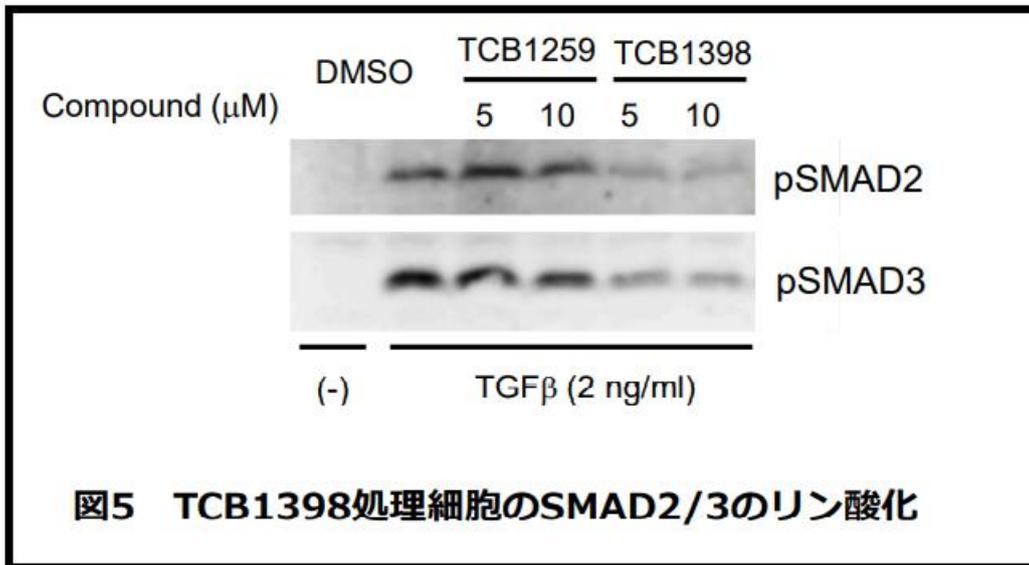


図5 TCB1398処理細胞のSMAD2/3のリン酸化

1-6 TCB-1398・1471・1472 の活性評価

TCB-1398 の類縁化合物 TCB-1471, 1472 を合成し、その活性を TGFβ刺激による SMAD2 のリン酸化の抑制効果で評価した。(図 6) その結果、これら 3 化合物の中ではエチレンオキシ鎖長が最も長い TCB-1472 が最も抑制活性が高く、その活性はエチレンオキシ鎖長に相関していることが判明した。

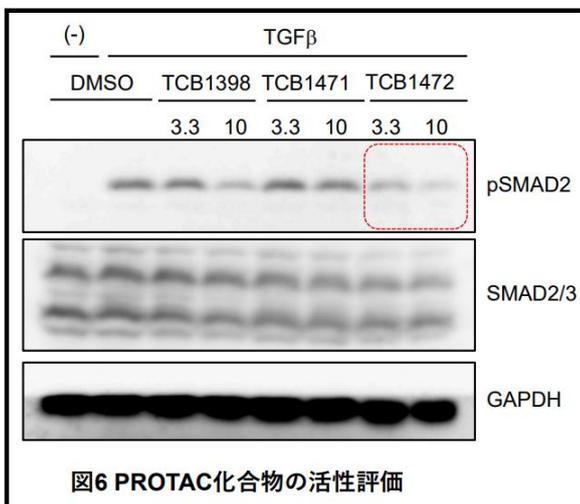


図6 PROTAC化合物の活性評価

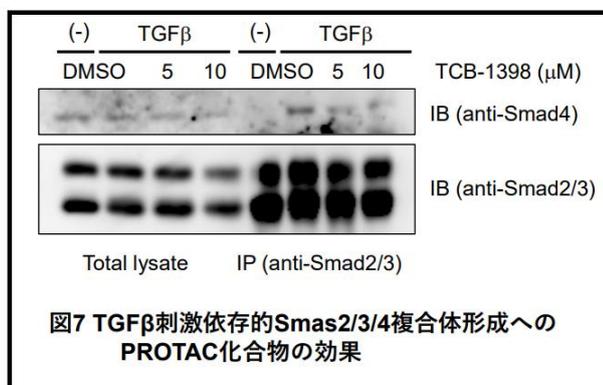
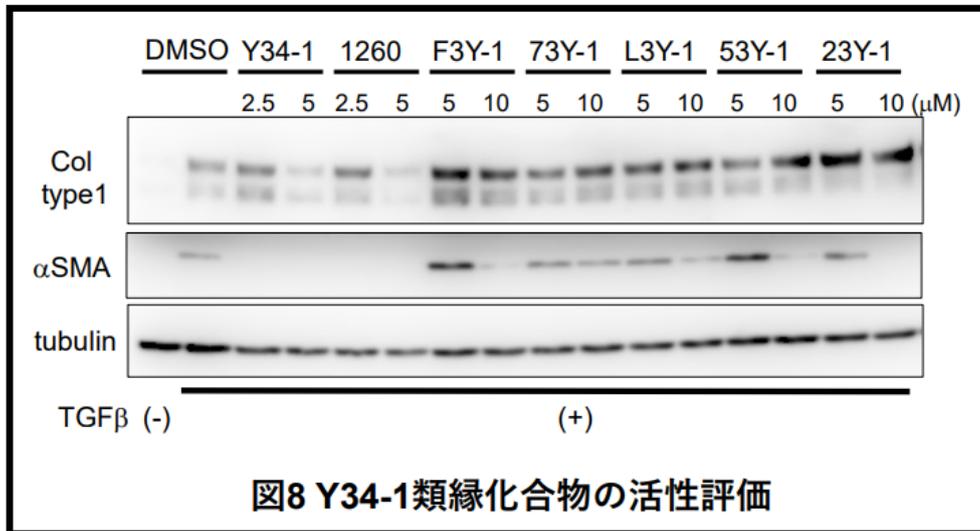


図7 TGFβ刺激依存的Smad2/3/4複合体形成への PROTAC化合物の効果

TGFβ シグナルでは、SMAD2, SMAD3 のリン酸化により、SMAD 2 / 3 / 4 複合体の形成が、標的遺伝子の転写に不可欠である。そこで、TC-1398 処理により TGFβ依存的な SMAD 2 / 3 / 4 複合体の形成への影響について免疫沈降により確認した。(図 7) その結果、TCB-1398 は、濃度依存的に複合体形成を抑制することが判明した。また TGFβ シグナルでは SMAD 経路に加え、Non-SMAD 経路の活性化が見られる。本化合物の Non-SMAD 経路への影響を ERK のリン酸化で評価したところ、SMAD 経路阻害は確認されたが、Non-SMAD 経路の阻害は観察されなかった。この結果から、本化合物は TGFβ シグナル全般を抑制するのではなく、SMAD 経路を特異的に抑制する活性を有していることが判明した。

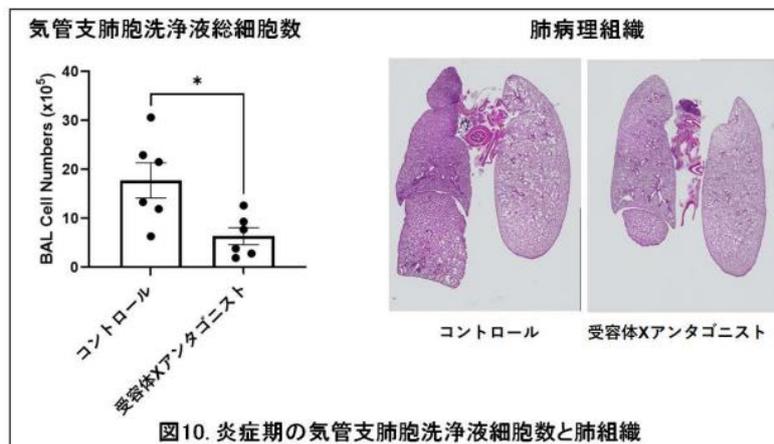
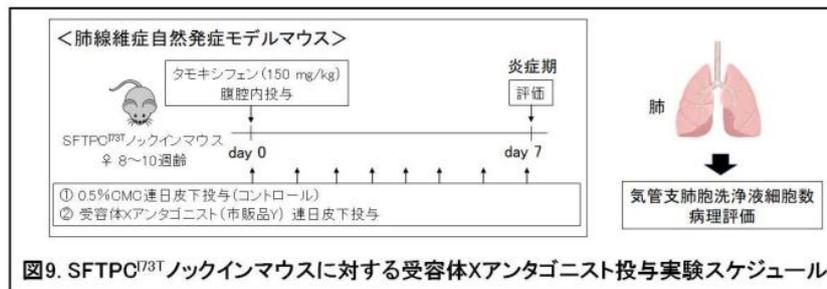
1-7 Y34-1 類縁化合物の TGFβシグナル抑制効果の検討

Y34-1 の標的蛋白質の同定のため、Y34-1 の類縁化合物であるが、TGFβシグナル抑制活性を有さない化合物の同定を行った。(図 8) 類縁化合物のうち、73Y-1 は TGFβシグナル抑制活性を有さないことが判明した。この結果を踏まえ、Y34-1 を positive control に、73Y-1 を negative control にすることで、特異的な標的結合蛋白質の同定の実施が可能になった。



2-1 肺線維症自然発症 SFTPC^{I73T} ノックインマウスに対する受容体 X アンタゴニストの *in vivo* 投与実験

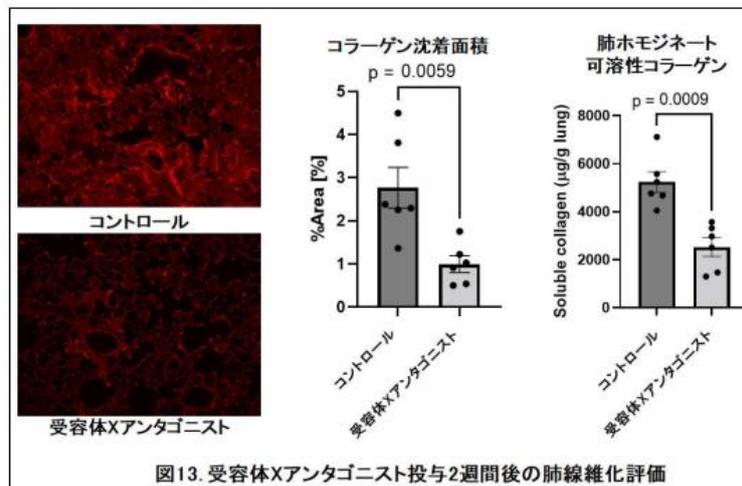
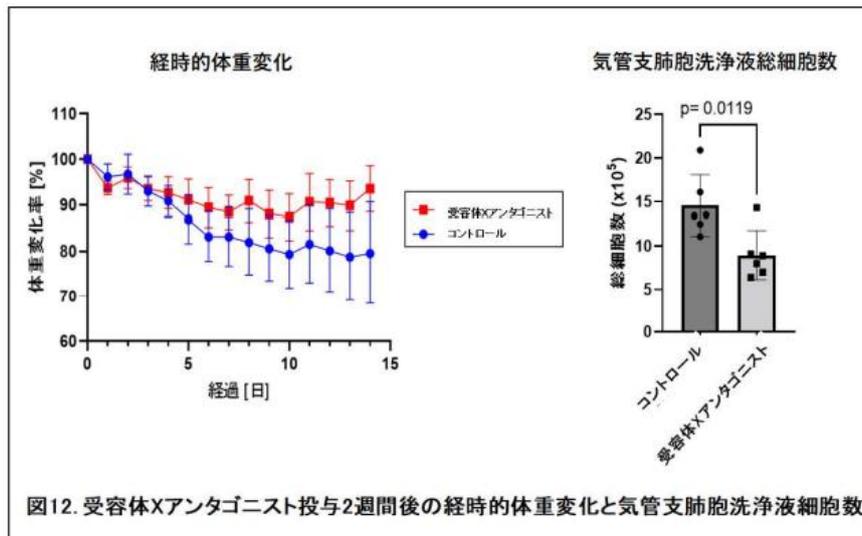
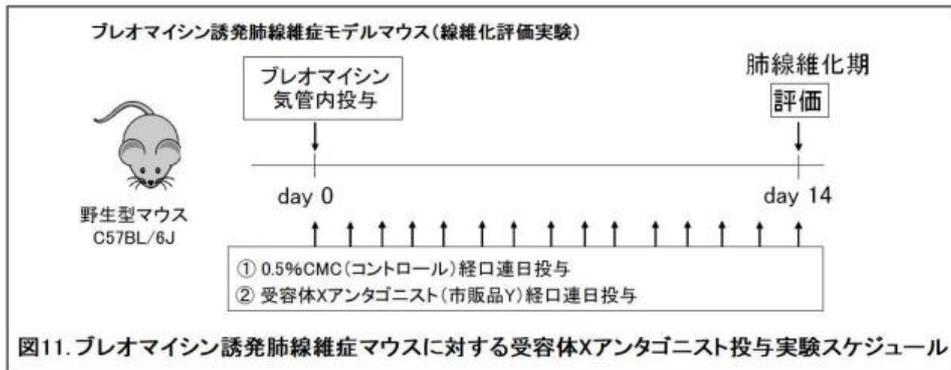
肺線維症モデルマウスへの受容体 X アンタゴニスト投与は、肺病変を軽快させるという仮説を立てた。タモキシフェン誘導性に肺線維症を自然発症する SFTPC^{I73T} ノックインマウスに対して、タモキシフェン腹腔内投与後に、0.5%カルボキシメチルセルロース (コントロール) 及び受容体 X アンタゴニスト (市販品 Y) を連日皮下投与し、炎症期である 7 日後に評価した。(図 9) その結果、コントロール群と比較して、受容体 X アンタゴニスト投与群において気管支肺胞洗浄液中総細胞数は有意に低下し、肺病理組織所見の炎症性変化は軽微であった。(図 10)



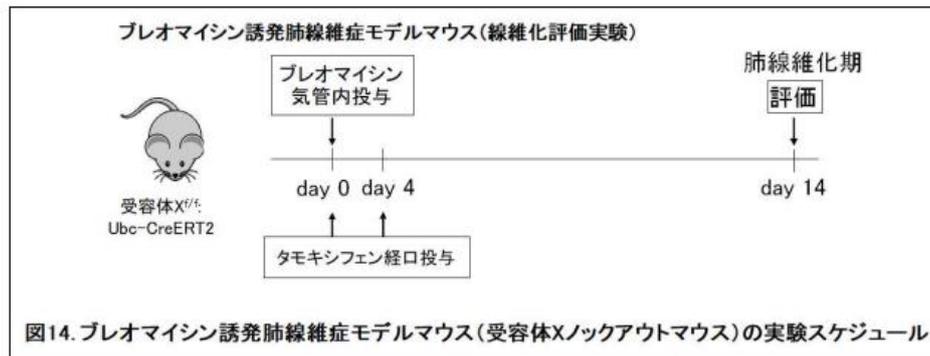
現在、肺線維化がより安定して得られるタモキシフェン経口誘導での SFTPC^{173T} ノックインマウスに対する、受容体 X アンタゴニストの肺線維化抑制効果の検討実験を進行中である。

2-2 プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスに対する受容体 X アンタゴニストの *in vivo* 投与実験

プレオマイシン肺線維症モデルマウスに対して、受容体 X アンタゴニスト連日投与を行い、線維化期である 2 週間後にマウスの肺病変を評価した。(図 11) その結果、コントロール群と比較して、受容体 X アンタゴニスト投与群では経時的な体重減少が軽微であり、気管支肺胞洗浄液細胞数の有意な低下を認めた。(図 12) さらには、肺組織中コラーゲン沈着の有意な低下、肺ホモジネートの可溶性コラーゲン濃度の有意な低下を認めた。(図 13)



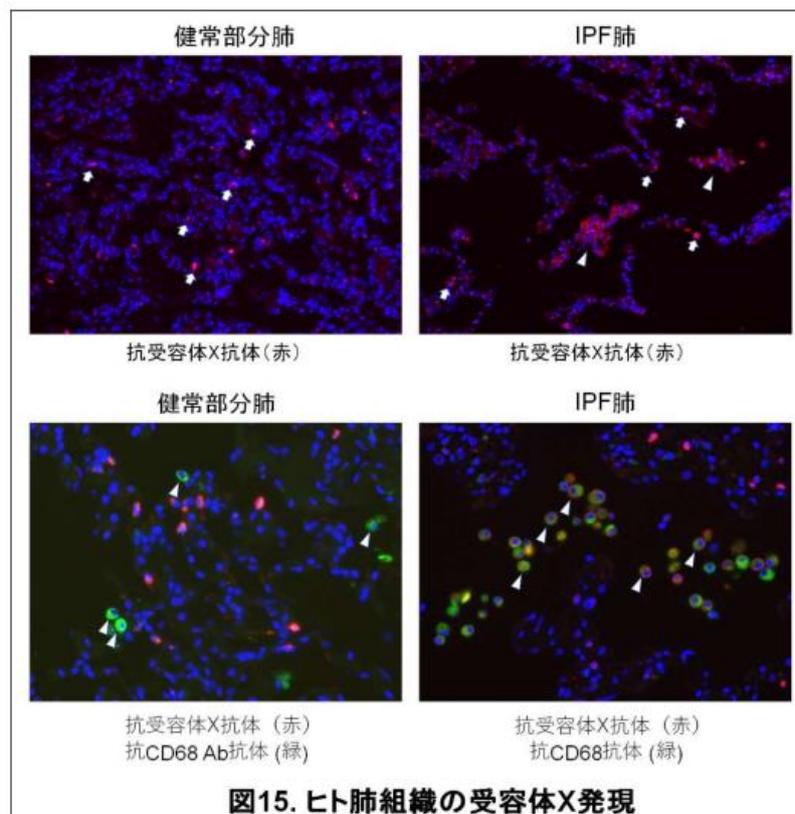
3. 受容体 X コンディショナルノックアウトマウスを用いた肺線維化の評価



受容体 X コンディショナルノックアウトマウス及び野生型マウス (C57BL6/J) に対して、Day 0 にタモキシフェン経口投与、Day 4 にタモキシフェン経口投与とプレオマイシン気管内投与を行い、プレオマイシン投与から2週間後のDay 18に肺線維化の評価を行う予備実験を開始している。(図14) 野生型マウス(コントロール)と比較して受容体 X コンディショナルノックアウトマウスでは、気管支肺胞洗浄液中総細胞数が少ない傾向を認めている。現在、病理学的評価を行っている。

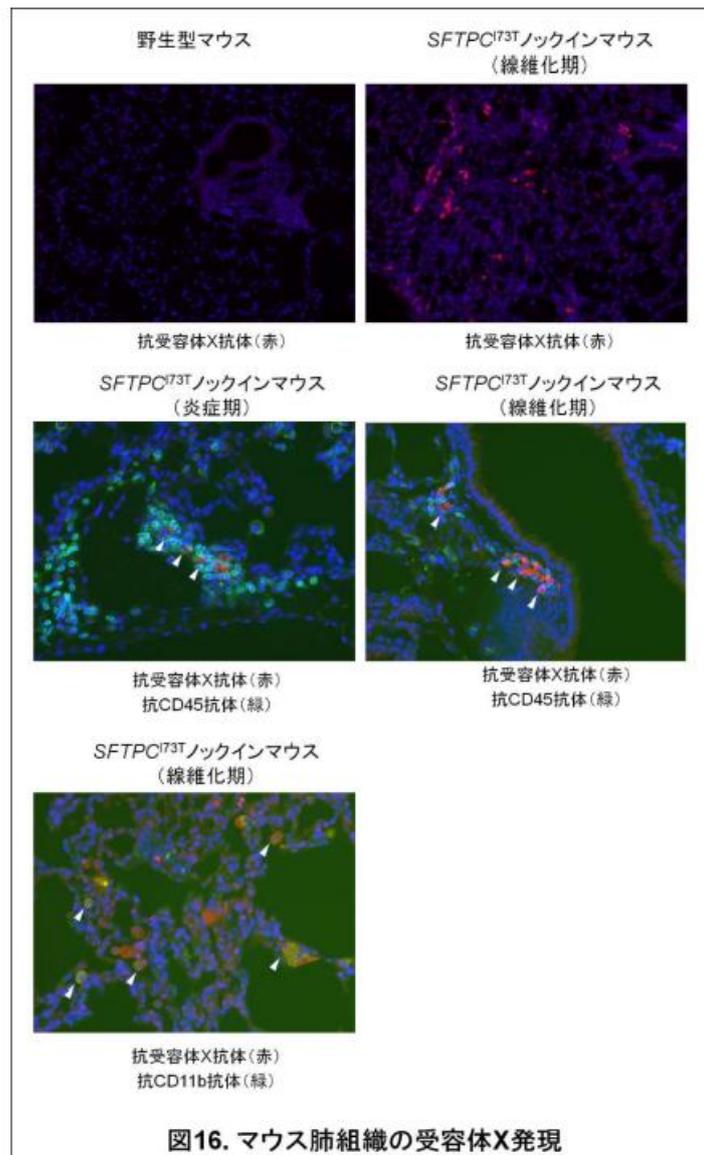
4-1 ヒトの肺線維症組織における受容体 X の発現

ヒトの「特発性肺線維症の胸腔鏡下肺生検組織」及び「原発性肺癌切除肺の健常部分肺(コントロール)」に対して抗受容体 X 抗体を用いた免疫染色を行った。健常部分肺においては間質の炎症細胞と思われる細胞に受容体 X 陽性であり、特発性肺線維症ではそれに加えて CD68 陽性肺胞マクロファージに受容体 X 陽性であった。(図15)



4-2 肺線維症モデルマウスの肺組織における受容体 X の発現

肺線維症自然発症 SFTPCI73T ノックインマウス肺組織に対する抗受容体 X 抗体を用いた免疫染色を行った。野生型マウス肺では受容体 X 陽性細胞を認めなかったが、SFTPC^{I73T} ノックインマウスでは、炎症期・線維化期ともに CD45 陽性細胞において受容体 X 陽性であった。肺線維化期においては、CD11b 陽性細胞において受容体 X 陽性であった。(図 16)

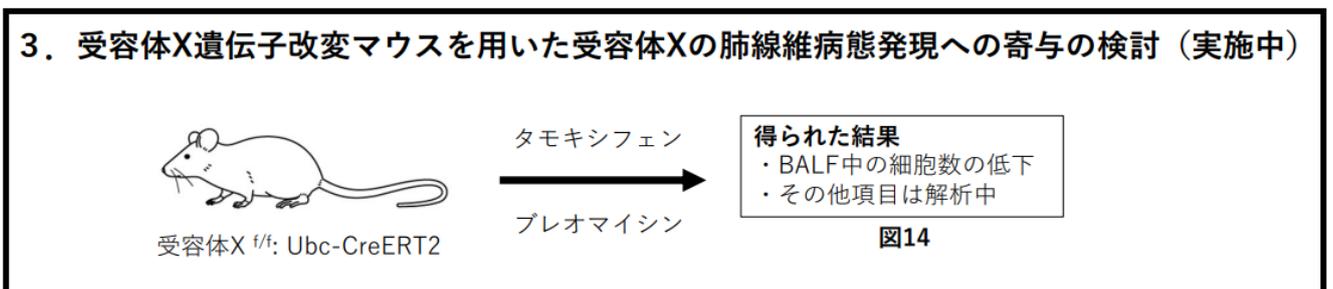
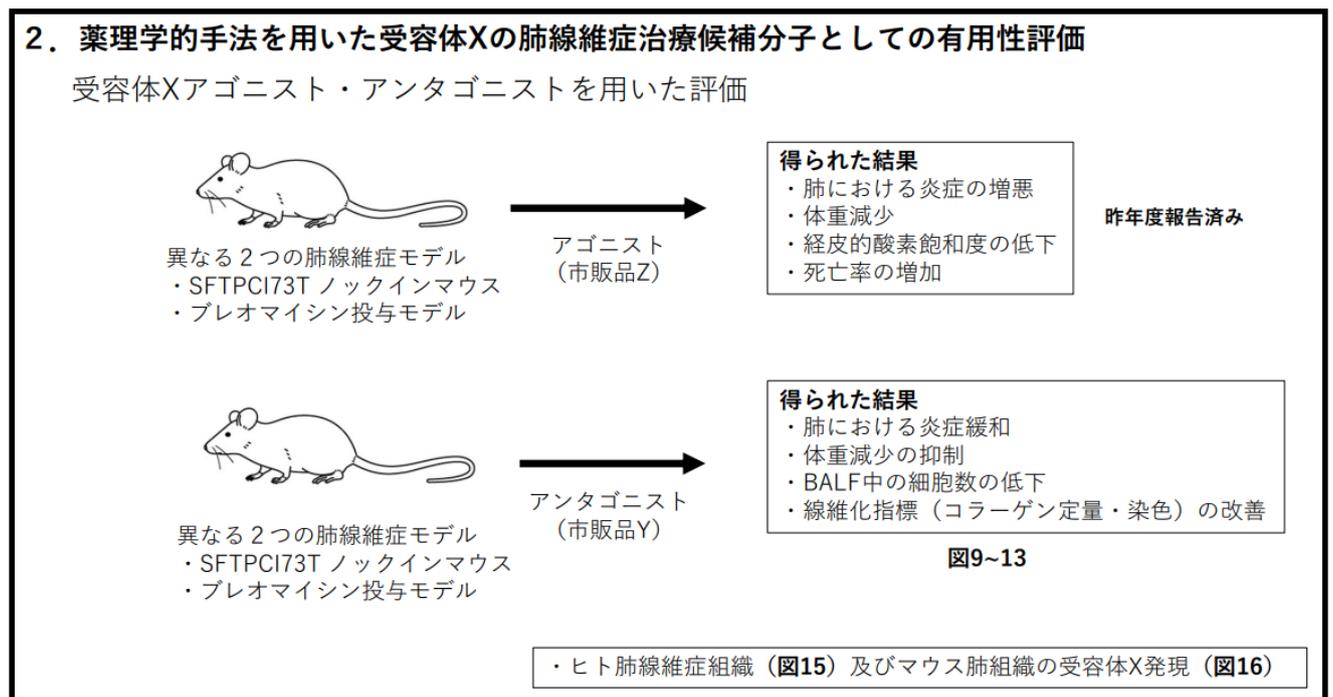
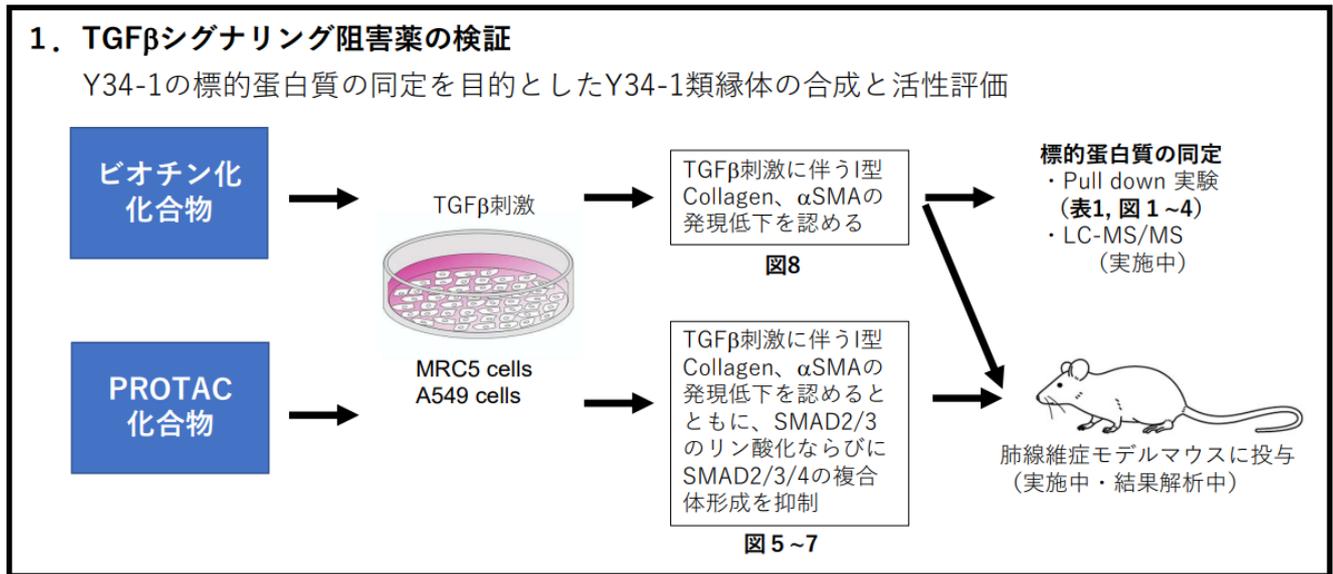


D. 考察

- これまでの結果では、TCB-1259 (ビオチン化合物) と EF-hand 含有蛋白質との結合は確認されているが、TCB-1259-EF hand 間の結合を競合的に阻害する TCB-1259 の類縁化合物を見出すに至っていない。結合様式が不明ということとなれば、EF-hand 含有蛋白質が真の標的タンパク質と結論づけることはできない。一方で、Y34-1 の PROTAC (化合物 TCB-1397) は TGFβシグナリングの下流の SMAD2/3 のリン酸化・SMAD2/3/4 の複合体形成が阻害されることから、Y34-1 の標的は TGFβシグナリングに関与すると考えられる。従って、再度 Y34-1 の標的蛋白質同定のため、感度の高い pull down 実験を計画中である。
- 異なる 2 つの肺線維症モデルマウスにおいて、受容体 X アゴニストは *in vivo* 投与は肺病変を増悪させ (昨年度報告済)、受容体 X アンタゴニスト *in vivo* 投与は肺線維化を抑制するという仮説を実証できた。受容体 X 発現細胞は、ヒト肺組織、肺線維症モデルマウス肺組織において炎症細胞 (特にマクロファージ) に発現を認めた。肺線維化は、①肺上皮障害→②炎症→③線維化のプロセスを経て起こるとされている。受容体 X を介した肺線維化メカニズムが、どのプロセスのどのようなシグナリングによるものなのかは明らかになっておらず、今後の検討課題である。

E. 結論

令和3年度得られた結果を以下の3つのポンチ絵にまとめた。図表番号は、「C. 研究結果」で示した番号に対応している。



F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Involvement of activator protein-1 family members in β -catenin and p300 association on the genome of PANC-1 cells. Doi, T., Hojo, H, Ohba, S., Obayashi, K, Endo, M., Ishizaki, T., Katoh, A., Kouji, H. *Helvion*, 8, e08890, 2022.
- 2) Comprehensive exploration of chemical space using trisubstituted carboranes. Asawa, Y., Hatsuzawa, S, Yoshimori, A., Yamada, K., Katoh, A., Kouji, H., Nakamura, H. *Scientific Reports*, 11, 2401-2412, 2021.
- 3) Synthesis of Tree-Dimensional (Di)Azatricyclododecene Scaffold and Its Application to Peptidomimetics. Umedera, K., Morita, T., Yoshimori, A., Yamada, K., Katoh, A., Kouji, H., Nakamura, H. *Chem. Eur. J.*, 27(46), 11888-11894, 2021.

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。）

1. 特許取得

出願番号：特願 2021-175674

発明者：加藤明良、石崎敏理、濡木真一、平山文博、山西芳裕、澤田隆介

発明の名称：抗特発性肺線維症剤

出願人：(共同出願) 国立大学法人 大分大学、国立大学法人 九州工業大学

出願日：2021年10月27日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし