

別紙 4

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 タンパク質架橋化酵素および抗線維化薬に着目した
肺線維化の分子メカニズムの解明

氏 名 竹内 大修

論 文 内 容 の 要 旨

線維症はコラーゲンなどの細胞外基質が過度に蓄積することにより、柔軟な組織が硬化し、正常な機能が失われる疾患である。線維症は様々な組織で生じ、そのうち肺において原因不明の線維化を来す特発性肺線維症は予後不良の難治性疾患である。病態形成における詳細な分子メカニズムは不明であり、特発性肺線維症に対しては現在二種類の薬剤が認可されているが、根本的な治療効果に乏しい。本論文では肺線維症の進行における病態分子機構を明らかにするため、線維化の亢進に関わる酵素であるタンパク質架橋化酵素と、既存の肺線維化治療薬であるピルフェニドンに着目し、独立した2つの研究課題を実施した。

一つ目の研究課題で着目したタンパク質架橋化酵素(トランスグルタミナーゼ, TGase)は、特定のタンパク質間に架橋構造を形成する酵素である。哺乳類では8つのTGaseアイソザイムが存在し、血液凝固などの多様な生体現象に寄与する一方で、過度な酵素活性は線維化を始め種々の疾患の原因となる。アイソザイムの一つであるTG2は肺線維化において細胞外基質を架橋安定化して硬化させ、呼吸機能不全につながる事が報告されている。TG2の架橋活性は細胞外基質の安定化以外にも様々な生命現象に関わるが、肺線維化の増悪に関わるTG2の詳細な分子メカニズムは明らかでない。本研究では肺線維化におけるTG2基質タンパク質の同定解析を行うと共に、TG2が基質として認識するアミノ酸残基まで解析対象を拡大することにより、酵素反応の規則性を見出した。本研究は肺線維化におけるTG2の架橋活性メカニズムを理解し、線維化病態を制御することを目標とする。

初めに、先行研究と同様にTG2欠損マウスにおいて肺線維化が抑制されることを確認した後、肺線維化におけるTG2の架橋基質タンパク質の解析を行った。TG2の活性が上昇することを見出した肺線維化モデルマウスの肺切片を用いてTG2の架橋産物を抽出する手法を確立し、野生型とTG2欠損マウスを使用し、質量分析による基質解析

を行った。その結果、TG2 依存的に架橋される基質タンパク質を同定し、さらにパスウェイ解析の結果から、活性化した TG2 の架橋修飾により線維化の進行に関わる可能性のある新規因子を明らかにした。次に架橋活性の規則性を調べるため、TG2 がタンパク質中のどのような配列中の基質アミノ酸残基を架橋しやすいかを解析した。基質分子の精製フローを改変し、線維化肺切片由来の TG2 の基質ペプチド配列を網羅的に同定した。得られた配列情報から、TG2 架橋基質モチーフ配列を作成し、天然に存在する基質に対する TG2 の架橋活性の指向性を初めて明らかにした。

さらに、疾患進行時における TG2 の機能を詳細に解析するため、培養細胞やマウス個体をモデルとして用い、生理的条件下で架橋される TG2 基質の同定を行った。培養細胞を用いる場合には、基質同定に十分な酵素活性がないことから、TG2 活性を人為的に増加させた実験系を用いた。この実験において、生きた細胞での TGase 活性により架橋される基質分子を捉えることに成功し、同定された TGase 基質は過去の *in vitro* の実験系で同定できなかった新たな架橋部位の存在を示唆していた。このことは、これまで報告された架橋反応の標的的同定法では、生体内で TGase により架橋される基質を完全には捉えられていなかったことを示唆する。

最後に肺線維化誘導マウスの肺組織中で架橋される基質分子の同定解析を行った。この実験により、生体内で肺線維化の進行に伴って活性化する TG2 に架橋される基質分子を同定することに初めて成功した。

先行研究では、TG2 は細胞外基質の架橋安定化を介して肺線維化を亢進することが報告され、架橋基質の修飾残基の詳細な情報については議論が不足していた。これに対して、本研究では TG2 の基質タンパク質あるいは基質ペプチド配列を網羅的に同定する手法を確立し、TG2 が関わる数ある生体现象の一つである線維化について、TG2 の架橋活性による翻訳後修飾の変容がその進行に関わる可能性を示した。また、本手法は様々なモデルおよび他の TGase アイソザイムに対しても適応可能であることから、広範な生体现象における TGase の役割を解析する上で重要な手法であると考えられる。

もう一方の研究課題では、既存の肺線維症治療薬であるピルフェニドンについて、未だ同定されていない作用標的分子の探索を行った。ピルフェニドンは 2008 年に認可された世界初の特発性肺線維症治療薬であり、複合的な薬理作用により肺線維化の進行を抑制する。一方で、頻繁な副作用が課題であるため、より良い治療戦略の創出のためにはピルフェニドンが直接作用する分子を同定し、その薬効機序を理解することが重要であると考えた。本研究では、ピルフェニドンと相互作用することが示唆される標的因子を同定するために、クリックケミストリーを活用したプローブ分子を作製した。プローブ分子と近接する標的因子に対して、光誘導性の化学架橋によりピルフェニドン標的を捕捉した。その後、質量分析を用いて標的因子を同定し、その詳細な機能を解析することにより、肺線維化の未知の分子メカニズムを理解することを目指した。

初めにピルフェニドン分子に機能付加するために、リンカーの位置や構造について構造活性相関解析を行った。元の構造と類似した抗線維化活性を有するピルフェニドンアナログに反応性の異なる 2 つのアジド基を修飾し、ピルフェニドン類縁体プローブを取得した。ヒト肺線維芽細胞株の培養上清にプローブ分子を添加し、2 つのアジド基を用いた標的分子との光誘導性化学架橋および後の精製のためのクリック反応の可否を確認した後、質量分析を行った。プローブによりピルフェニドンの標的因子を不可逆的に捕捉した後に磁気ビーズに固定化し、プルダウンによる精製後に同定解析を行ったところ、多数の標的候補因子が同定された。統計的処理を行うことにより、この中から競合阻害化合物の存在時に結合が抑制された因子を 29 個抽出し、これらを中心にピルフェニドンの結合性の検証実験を行った。

標的候補因子群についてそれぞれタンパク質発現ベクターを作製し、HEK293T 細胞において過剰発現させて類縁体プローブとの結合性を評価したところ、ピルフェニドンと相互作用する可能性がある因子として **RAB11B** を同定した。過去の報告から、**RAB11B** が線維化誘導性のサイトカインである TGF- β の受容体 T β RI の細胞内輸送に関わることが知られている。そこでピルフェニドンが **RAB11B** に結合し、機能阻害することにより、線維化抑制作用を発揮する可能性を考え、詳細な解析を進めた。肺線維化細胞株を用いて過剰発現を行ったところ、線維芽細胞の活性化マーカーの上昇が見られたが、一方で **RAB11B** の発現抑制系においても同様に活性化が認められた。このことから細胞内における **RAB11B** の存在量のバランスが線維芽細胞の活性化に影響することが考えられた。

以上のように本研究では、重要な課題でありながらこれまでに成し遂げられていないピルフェニドンの作用標的分子の同定解析を、共有結合による標的の捕捉を指向した新規分子プローブを用いて遂行した。さらに、今回着目した **RAB11B** の他にもピルフェニドンの結合標的候補を複数同定した。これらを詳細に解析することにより、ピルフェニドンが直接作用する分子あるいは未知の抗線維化活性のメカニズムの解明に貢献し、ひいてはより特異性の高い新規肺線維症治療薬の創出につながることを期待される。

本論文では、未だ不明な点が多く残る肺線維症の病態メカニズムの理解を目的とし、タンパク質架橋化酵素と治療薬ピルフェニドンという 2 つの独立した肺線維症の関連因子に着目することにより、共に独自のアプローチから病態メカニズムの一端を明らかにしてきた。得られた研究成果は、治療選択肢の少ない特発性肺線維症に対する新規治療戦略の創出に繋がると共に、両課題を通して確立した新規実験系が他の生命現象や疾患モデルにおいて応用され、新しい知見が得られることが期待される。