

別紙1-1

## 論文審査の結果の要旨および担当者

|      |    |   |   |
|------|----|---|---|
| 報告番号 | ※甲 | 第 | 号 |
|------|----|---|---|

氏 名 竹内 大修

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

### 論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院創薬科学研究科 教授 人見清隆

委 員 名古屋大学大学院創薬科学研究科 教授 饗場浩文

委 員 藤田医科大学医学部 教授 橋本直純

委 員 名古屋大学大学院創薬科学研究科 助教 辰川英樹

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1 - 2

竹内大修氏による本論文は、肺線維症を対象として、病態進行過程で生じる線維化についてタンパク質架橋化酵素(トランスグルタミナーゼ、以下 TGase と略記)の関与を調べ、また並行して、これまで有効とされてきた薬剤(ピルフェニドン: *pirfenidone*)作用メカニズム解明を最終目的に、そのターゲットとなる細胞内の分子を探索した研究内容である。

TGase は、カルシウム依存的に、異種または同種のタンパク質どうしの特定のグルタミン残基とリジン残基の架橋化反応を触媒する酵素ファミリーである。ヒトにおいては複数のアイソザイムが組織特異的に存在し、細胞死制御、細胞外マトリクス強化、血液凝固や皮膚表皮形成など多彩な生理機能に関与している。そのため、正常なレベルで活性が発現されることが生体の恒常性に必要であり、その活性が異常に発揮される場合には、様々な形での疾患状態をもたらす。そのため本酵素の発現や活性を制御する研究は国内外を問わず広く行われてきた。

一方、本研究で対象とされた線維症は、肺・肝臓・腎臓などの組織で、細胞を取り囲む細胞外マトリクスの異常な蓄積・硬化化がもたらされた結果、構成細胞が最終的に生存できない状態にする疾患である。その発症や進行の機構は不明な点が多く、様々な手法での研究がその発症機構を明らかにするために行われ、同時に有効な薬剤の開発も国内外を中心に競争的に行われている。本論文で対象とされた特発性肺線維症 (IPF) は未だ原因が明確に特定されない難病とされている。

竹内氏は本論文の中でまず、モデル生物としてのマウスを研究材料として用い、肺線維症状態を模倣するべく、薬剤ブレオマイシンの投与による肺組織の線維化が、実際の病態を模して行われるための条件設定を行った。肺組織における線維化が進行する状態は、細胞外マトリクスの蓄積状態レベルを基本にして、特異的染色試薬により評価をしつつ形態的特徴を解析して確認した。

そのうえで、ブレオマイシン投与後に線維化が進行されると共に、TGase の発現と活性の変動を明らかにした。先述のとおり、複数のアイソザイムが存在するが、この線維化状態の進行においては、TG2 という全組織に存在して多彩な機能をもつ酵素が最も活性を有することを標識基質を用いることで明確に示した。さらに保有する TG2 ノックアウトマウスを用いても明らかに示している。また、酵素活性がコラーゲンを中心とする細胞外マトリクスの蓄積部位と重複することも合わせて示すことができた。これらは線維化とタンパク質架橋化の明確な関連を初めて示した知見としてきわめて重要なものである。

竹内氏はさらに解析を進めて、「どのような分子(基質)が架橋されるのか」を、標識基質を利用した親和性クロマトグラフィーによって探索・同定することにも成功した。これは標識基質としてグルタミン側基質に取り込まれるピオチン一級アミンを線維症組織切片に加えて、架橋産物をアビジン固相化のクロマトグラフィーによって精

製するものである。この解析をTG2ノックアウトマウスを比較対象に置くことで、正確に肺線維化に伴う基質群を初めて明らかにした。得られた基質の中には細胞外マトリクス成分など予測される基質の他に、新たなカテゴリーに含まれるものも得られ、発症や進行の機構解析にきわめて有用な知見である。

さらに竹内氏は基質となるタンパク質の中にある、酵素がより反応しやすいグルタミン残基の同定にも成功した。TGaseは、グルタミン残基とリジン残基をランダムに架橋化するのではなく、アイソザイムの種類によって反応を好んで行うグルタミン残基の周辺構造に一定の傾向があることが知られている。竹内氏はビオチン標識一級アミンを用いて、質量分析により特定の反応しやすい残基を同定し、その傾向および反応しやすいペプチド配列群を明らかにした。これらの情報は線維化を防御するためのペプチド情報として有用なものとなりうる。

これらの研究と並行して竹内氏は、肺線維症の特効薬とされているピルフェニドンの作用機構を解明することにより、線維症の発症機構や進行についてのメカニズムを明らかにすることをめざした。すなわち低分子のピルフェニドンがどのようにして肺における線維化を阻害するのかを分子レベルで解明した研究成果はこれまでにはなく、生化学的なアプローチを初めて適用した例である。すなわち、抗線維化作用を有する構造を保持した形でのピルフェニドン類似体を合成して、肺上皮細胞内において結合するタンパク質を精製するべく、クリックケミストリー技術を駆使して複合体を形成させ、親和性クロマトグラフィーにて固相化担体に結合・溶出する方策をとった。この間、多くの試行錯誤を繰り返し、当初は困難と思われた精製同定へと進展させることに成功した。

精製された分子を質量分析により解析した結果、類似体に親和性のある分子群を同定することができた。それぞれについて遺伝子導入を行い、実際にピルフェニドンとの親和性がどの程度あるかを評価した。その結果、いくつかの分子の中からRAB11Bというsmall G proteinの一つが有力な候補と判明させた。今後線維症の増悪を抑制する薬剤開発にあたり、手法の開発と今回の知見は大きな貢献をしようるものである。

以上のように竹内氏は、タンパク質架橋化酵素反応の関与並びにピルフェニドンという薬剤の作用という2つの切り口から、線維症と言う疾患への創薬科学的研究において大きな進展を与える成果をあげたと言える。よって、本論文は博士（創薬科学）を授与するに十分な内容であると高く評価するものである。