

**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**

名古屋大学大学院創薬科学研究科

基盤創薬学専攻細胞生化学分野

竹内 大修

目次

略語.....	2
要旨.....	3
・ <u>第一章</u> タンパク質架橋化酵素の基質同定	
序論.....	6
研究材料および実験手法.....	8
実験結果.....	14
考察.....	17
・ <u>第二章</u> 抗線維化薬ピルフェニドンの標的分子の解明	
序論.....	25
研究材料および実験手法.....	27
実験結果.....	30
考察.....	33
参考文献.....	38
Publication list.....	46
謝辞.....	47
図表およびその説明.....	48

略語

α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
BPA	Biotinylated pentylamine
BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FDR	False discovery rate
FITC	Fluorescein isothiocyanate isomer 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	Gene ontology
HE	Hematoxylin & Eosin
HRP-SA	Horseshoe peroxidase conjugated streptavidin
IAA	Iodoacetamide
IPF	Idiopathic pulmonary fibrosis
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
MT	Masson's trichrome
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T β RI	TGF- β receptor I
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine)
TGase	Transglutaminase
TGF- β	Transforming growth factor beta

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现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ことを報告されている。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、既存の肺線維化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。

第一章 タンパク質架橋化酵素の基質同定

序論

線維症 (Fibrosis)はコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリクス (Extracellular matrix: ECM)が過剰に蓄積することにより組織が硬化し、恒常的な機能が失われる疾患である。線維化は肝臓や腎臓など多くの臓器における慢性的な炎症の終末像としても見られ、その病態は基本的に不可逆で予後不良とされる。線維化を担う主な細胞種は筋線維芽細胞である。線維芽細胞が線維化誘導性のサイトカインである TGF- β (Transforming growth factor-beta)により活性化し、筋線維芽細胞に分化することにより ECM 産生が増強され、線維化につながる¹。また、線維化病態は加齢と共に悪化することが知られており、臓器を構成する細胞が老化することによる代謝の変化が線維化促進的に働く可能性も示唆される^{2,3}。

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)は、肺における原因不明の線維化疾患である。IPF では、肺の間質領域に ECM が沈着して肥厚することにより、ガス交換に障害が起こる結果、肺コンプライアンスが低下し、呼吸機能不全を呈する⁴。IPF は有病率が 10.0 人対 10 万人の指定難病で、診断後の平均生存期間が約 35 ヶ月の難治性疾患である⁵。IPF の発病機序としては、肺胞上皮において慢性的な炎症と修復が幾度も繰り返されることにより、組織のリモデリング異常が生じて線維化が誘導されるという仮説が一般的である⁶。肺線維化においても線維芽細胞の活性化は特徴的な所見であり、肺線維芽細胞に特異的に発現する meflin という分子が線維化形成に抑制的に働くことが明らかにされるなど、線維芽細胞の活性化と肺線維化進行の関連については広く研究が行われている⁷。さらに近年、肺組織の恒常性維持を担う II 型肺胞上皮細胞の遺伝的な機能不全や、疾患特異的に存在するマクロファージあるいは自然リンパ球の活性化など、様々な細胞種がそれぞれ肺線維化の発症に関わることが報告されているが、IPF の複雑な病態メカニズムの全貌については未だ不明点が多い⁸⁻¹¹。現在、IPF に対してはピルフェニドンとニンテダニブの 2 剤が治療薬として用いられているが、共に線維化の進行を遅らせる薬効に限られており、根本的な治療効果はない¹²。これらの低分子の治療薬に続き、抗 CTGF モノクローナル抗体やリン酸化酵素である JNK や ROCK2 などに対する阻害剤の開発が現在行われているが、現時点においては薬剤以外の手段を含めて肺線維症に対する有効な治療選択肢が乏しく、ゲームチェンジャーとなる治療法の開発が求められる¹³。

タンパク質架橋化酵素 (Transglutaminase: TGase)は、カルシウムイオン依存的に特定の標的タンパク質のグルタミン残基とリジン残基との間に共有結合(イソペプチド結合)を形成する酵素である (Supple. Fig. S1)¹⁴。TGase は哺乳類において 8 つのアイソザイムを有しており、各アイソザイムが架橋活性により、皮膚形成や血液凝固など生体内で重要な機能を担っている^{15,16}。また、TGase には特徴的な基質特異性が存在する。過去の研究において、ファージディスプレイ法を用いたランダムペプチドライブラリにより、各 TGase アイソザイムに特異的に架橋される高反応性基質配列が見出されている¹⁷⁻²⁰。各 TGase アイソザイムはそれぞれが特異的な生体内局在と生理的機能を

有しており、これらのことから、多様な生命現象に関わる TGase の各アイソザイムには特異的に架橋する基質分子が存在する可能性が考えられる。

TGase の酵素活性が生体の恒常性に関わる一方、過度な架橋活性は疾患につながる。アイソザイムのなかでも全身に発現が見られる TG2 (Transglutaminase 2, Tissue transglutaminase) は、各組織において細胞外基質タンパク質を架橋修飾して安定化することにより、組織線維化を亢進することが知られる²¹。TG2 はその架橋修飾活性により、分解耐性をコラーゲン線維へ付与あるいは線維化促進性サイトカインである TGF- β の活性化などのメカニズムから、線維化の進展に対して促進的に働く²²⁻²⁴。肺線維化については、TG2 欠損(TG2KO)マウスにおいて野生型(WT)マウスと比較して線維化の形成が抑えられることが示されている²⁵。さらに TG2 の発現や活性を抑える複数の化合物の処理により、マウスモデルにおける線維化抑制あるいはヒト初代肺線維芽細胞の活性化および細胞外マトリクスの蓄積の軽減が見られることが示されており、TG2 が IPF の治療標的となる可能性が示唆された^{26,27}。このような報告から、TG2 の発現および架橋活性が肺線維化の増悪につながると考えられる。

TG2 が架橋する基質分子に着目すると、これまでの報告では試験管内における実験系を用いて TG2 の架橋基質を解析した結果がほとんどであり、複雑系である生体内において TG2 がどのような基質分子をどのような様式で架橋するかについては、これまでほとんど議論がなかった²⁸⁻³⁰。そこで、私は質量分析を用いた TGase 基質の探索手法の開発により、TGase の基質分子を網羅的に同定し、肺線維症病態における TGase の架橋メカニズムについて理解を深めようと考えた。本研究では、肺線維化モデルマウスや培養細胞系を用いて TGase の基質分子の探索を行った。線維化進行時における TG2 の架橋基質タンパク質の網羅的同定による病態機構の解明に端を発し、様々な実験条件下において TGase が架橋しやすい基質ペプチド配列の同定法を確立することにより、様々な生体反応に関与する TGase の架橋メカニズムの解析を進めた。

本研究成果は、TG2 の架橋活性を介した肺線維症の進展メカニズムの理解や新規治療戦略の創出にとどまらず、TGase が関わる多様な生命現象の研究への応用が期待される。

研究材料および実験手法

・ 試薬

試薬は主にナカライテスク株式会社および富士フィルム和光純薬株式会社の製品を使用した。

・ 動物

C57BL/6J 雄マウスは日本エスエルシー株式会社から購入した。TG2KO マウスは Robert M. Graham 博士 (Victor Chang Cardiac Research Institute, Australia)より供与いただいた。いずれのマウスも食餌や水が自由摂取できる環境下で飼育した。

・ 肺線維化モデルマウス

抗生物質であるブレオマイシン(日本化薬)を鼻腔内より投与することにより、肺線維化を誘導した。8-10 週齢の C57BL/6J 野生型および TG2KO 雄マウスにイソフルランを用いて麻酔処理し、ブレオマイシンの鼻腔内投与を行った。ブレオマイシンは生理食塩水で 1.2 mg/mL の濃度に溶解し、50 μ L(60 mg per head)を投与した。コントロール群には生理食塩水を 50 μ L 投与した。投与後は食餌や水を自由摂取できる状態で飼育し、定期的に体重測定を行い、投与後 21 日目に肺組織を摘出した。肺組織は PBS (Phosphate-buffered saline)還流により血液を除去してから、5% Sucrose/50% OCT compound (サクラファインテックジャパン)を肺組織に注入して膨潤させた後、気管支から切除し、OCT compound で凍結包埋した。組織染色に用いた肺組織は 4% Paraformaldehyde (PFA)/PBS で膨潤後、4% PFA/PBS に漬けて置いて組織固定し、パラフィン置換を行った後に包埋してパラフィンブロックを作製した。免疫ブロッティングに用いる場合、1% triton buffer (1% triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), Protease inhibitor cocktail)を加え、テフロンホモジナイザーで右葉 4 葉のうち中葉と後葉を破碎し、bradford assay によりタンパク質量を揃えた後、SDS (Sodium dodecyl sulfate)サンプル化した。

・ ヘマトキシリンエオジン染色 (HE 染色)

パラフィンブロックからマイクロトーム (SM2010R, Leica)を用いて 5 μ m の厚さに薄切し、脱パラフィン、洗浄を行った。HE (Hematoxylin & Eosin)染色には section-lab 社の染色キットを用いた。ヘマトキシリンで 5 分間、エオジンで 3 分間染色した後に脱水し、疎水性封入剤(エンテラン)を用いて封入し、BZ-9000 顕微鏡 (キーエンス)にて観察した。

・ マッソントリクローム染色 (MT 染色)

鉄ヘマトキシリンで核を黒紫色に、細胞質を赤色に、線維性タンパク質を青色に染めて膠原線維を染め分ける MT (Masson's trichrome)染色組織構造の解析を行った。試薬は全て武藤化学株式会社で購入した。パラフィン切片を脱パラフィン処理し、洗浄した後、第一媒染液を添加し、室温で 20 分放置した。次にワイゲルト鉄ヘマトキシリンを加えて室温 10 分間放置し、核染色を行

った。反応液は1液と2液を等量混合することにより要時調製した。流水で10分間洗浄し、第二媒染液を添加して室温で45秒放置した。水、1%酢酸で洗い、オレンジG液を添加して室温で1分間放置した後、1%酢酸で洗い、さらにマッソン染色液Bを添加して室温で20分間放置した。その後に再び1%酢酸で洗い、2.5%リタングステン酸液を添加して室温で10分間放置した。1%酢酸で洗い、アニリン青を添加して室温で5分間放置した後、1%酢酸で洗浄し、上記のように脱水、封入したサンプルを観察した。

・肺ハイドロキシプロリン定量

右肺の4葉のうち前葉と副葉の2葉を72°Cで72時間乾燥させ、2N NaOHを加えて攪拌し、完全に溶解した。一部を別のチューブに移し、オートクレーブにより120°Cで15分間加熱し、塩基性条件で加水分解を行った。次に等量の6N HClを加えて120°Cで15分間加熱し、酸性条件で加水分解を行った。さらに等量の4N KOH/10 mg/mL活性炭を加えて中和した後、4×Acetate-Citrate buffer (pH 6.5)(1.8 M 酢酸ナトリウム, 0.5 M クエン酸, 0.4 M 酢酸, 1.7 N NaOH)を等量加えた。反応液を一部分取し、等量のクロラミンT反応液 (0.1 M クロラミン T, 1-propanol : 1×acetate-citrate buffer = 1 : 9)を加えて室温で25分間インキュベートした。さらに等量のエールリッヒ反応液 (0.1 M p-dimethylaminobenzaldehyde, 過塩素酸 : 1-propanol = 1 : 2)を加えて攪拌した後、65°Cで20分間インキュベートし、マルチプレートリーダー (Viento nano, DS PHARMA BIOMEDICAL)を用いて560 nmの波長で吸光度を測定した。

・イムノブロットイング

SDS化したタンパク質抽出液をヒートブロックにより、95°Cで5分間加熱した後、自作のポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)によりタンパク質の分離を行った。PVDF (Polyvinylidene difluoride)膜 Immobilon-P, Merck Millipore)に転写した後、0.1% Tween/5% skim milk/PBS にPVDF膜を浸し、室温で1時間振とうしてブロッキングを行った。抗体希釈液 (0.1% Tween/0.1% BSA (Bovine serum albumin)/PBS)でそれぞれの濃度に希釈した一次抗体と37°Cで1時間振とうし、抗原抗体反応を行った。PBS-T(PBS-0.1% Tween)で洗浄した後、37°Cで1時間振とうし、二次抗体と反応させた。4回洗浄し、発色試薬 (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific)にPVDF膜を浸し、イメージングシステム (FUSION, Vilber Bio Imaging)により化学発光または蛍光を検出した。用いた抗体は Supple. Table S1 に示した。

・抗体免疫染色

4% PFAで固定した肺組織を薄切して5 μmの切片を作製し、スライドガラス上で風乾した。1 M クエン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.0)を加え、95°Cで15分間加熱して抗原の賦活化を行った。室温に戻してPBSで洗った後、3% H₂O₂/メタノールで15分間処理し、内在性のペルオキシダーゼの活性をブロッキングした。PBSで洗い、ブロッキング液 (2.5% goat serum/PBS-T)で30分間処理し、PBSで洗い流した後、ブロッキング液を用いて1 μg/mLとなるように希釈した一次抗体を室温で1時間反応させた。一次抗体には、Polyclonal anti-TG2 antibody (in house)、Polyclonal α-SMA antibody (Abcam)を用いた。また、ネガティブコントロールとして、ウサギのNon-Immune IgGを

同濃度に希釈して使用した。洗い流した後、ブロッキング液で希釈した二次抗体 (biotinylated anti-rabbit IgG, VECTASTAIN ABC Kit)を室温で1時間反応させた。PBSで洗い流した後、ABC試薬 (VECTASTAIN ABC Kit)をのせ、室温で30分間置いた。洗い流した後、DAB溶液 (VECTASTAIN ABC Kit)を加えて染色し、適当な染色像が得られた所で洗浄し、反応を止めた。その後、サンプルを脱水、封入し、観察に用いた。

・細胞培養

ヒト肺基底上皮腺癌細胞株 A549 は帝人ファーマ株式会社より、マウス胎児皮膚線維芽細胞株 NIH3T3 は名古屋大学 生命農学研究科 分子細胞制御学研究室から供与いただいた。付着用細胞のディッシュに各細胞を播種し、10% FBS (Fetal bovine serum) (Sigma)、Penicilin-Streptomycin (meiji) を添加した low glucose DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)を用いて CO₂ 濃度 5%、37°Cの環境下で培養した。

・TGase 活性染色

OCT compound で包埋した未固定の肺組織をクライオスタットで 5 μm に薄切した。1% BSA/PBS を添加し、室温で 30 分間ブロッキングを行った。次に反応溶液 (2 μM FITC-pepT26(QN) or 200 μM FITC-cadaverine, 500 μM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT (Dithiothreitol))を添加し、37°Cで1時間反応させた。25 mM EDTA/PBS を添加し 5 分間反応させ、酵素反応を停止させた。PBS で 3 回洗浄した後、0.2 μg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)/PBS を室温で 15 分間反応させ、核の蛍光染色を行った。親水性封入剤である Mowiol で封入し、乾燥させた後、観察を行った。

・肺組織切片上における基質の架橋反応と精製

未固定の肺組織をクライオスタット (Leica)で 20 μm に薄切し、スライドガラス上で風乾させた後、Substrate reaction solution (100 μM BPA (Biotinylated pentylamine)、500 μM CaCl₂、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM DTT)を添加し、37°Cで1時間架橋反応させた。その後、25 mM EDTA/PBS を加えて 5 分間インキュベートし、酵素反応を停止させた。PBS で 3 回洗浄した後、Urea buffer (8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Protease inhibitor cocktail)で溶出し、超音波で細胞を破砕した。上清を回収して Bradford protein assay (Bio-rad)によりタンパク濃度を測定し、等量に揃えた後、Urea の終濃度が 1 M になるよう希釈した。Softlink avidin resin (Promega)を加えて 4°Cで2時間反応させ、BPA の架橋によりビオチン標識された TGase の標的タンパク質を結合させた。1 M Urea buffer で 3 回洗浄した後、2×SDS sample buffer を加えて加熱し、溶出した。以下は名古屋大学 WPI-ITbM 分子構造センターにおいて実施していただいた。終濃度 20 mM の DTT で還元し、終濃度 40 mM の IAA (Iodoacetamide)でアルキル化処理した後、アクリルアミドゲルで短時間泳動して全タンパク質を含むゲルを切り出し、トリプシンでゲル内消化した。これから 5% アセトニトリル/0.1% ギ酸で溶出し、GL-tip SDB (GL Sciences)を用いて脱塩した。

・質量分析および統計的解析による TG2 基質タンパク質の同定

脱塩後のペプチドサンプルは、名古屋大学 WPI-ITbM 分子構造センターにおいて Q exactive 質量分析計 (Thermo Fischer Scientific)による測定を行った。得られた MS/MS スペクトルデータを Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific, version PD2.2)により処理し、MASCOT (Matrix Science) と SEQUEST HT (Thermo Fisher Scientific)を用いて、ヒトの Swiss-Prot データベースと一致するスペクトルを検索した。その後、Perseus software (version 1.6.14.0)を用いて線維化誘導群において有意に増加しているタンパク質群を同定した。WT は N=4、TG2KO は N=3 でとった各サンプル内で少なくとも 3 サンプルで同定されたものを抽出し、欠損値は正規分布に従って補填した。WT と TG2KO において線維化肺で増減するデータを比較し、WT に比べて TG2KO の線維化群で抽出されなかったタンパク質群を TG2 により BPA が取り込まれた基質候補タンパク質として抽出した。t-test (FDR (False Discovery Rate) < 0.01)を基準として解析したボルケーノプロットにより有意に変動した因子を抽出し、線維化肺で TG2 依存的に有意に架橋されるタンパク質とした。

・同定した基質タンパク質群のデータ解析

生物学的機能を解析するため、GO (Gene ontology)解析と KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)パスウェイ解析を行った。GO term 内で主要なサブカテゴリである cellular components と biological processes、molecular function の 3 つのカテゴリについて、線維化肺において BPA が取り込まれたタンパク質群内で増加した経路を示した。これらの解析には DAVID online database を用いた。次に Cytoscape software 内のプラグインで、タンパク質間相互作用(PPI)を可視化するバイオインフォマティクスツールである STRING database と NetworkAnalyzer を用いて、同定されたタンパク質群間での PPI 解析を行った^{31,32}。さらに cytoHubba プラグインにより、PPI ネットワーク内でのハブタンパク質を抽出した³³。

・TG2 が架橋するアミノ酸残基の網羅的同定

未固定の肺組織をクライオスタットで 20 μm に薄切し、スライドガラス上で風乾させた後、substrate reaction solution (100 μM BPA, 500 μM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT)を添加し、37 $^\circ\text{C}$ で 1 時間反応させた。その後、25 mM EDTA/PBS を加えて 5 分間インキュベートし、酵素反応を停止させた。PBS で 3 回洗浄した後、Urea buffer (8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Protease inhibitor cocktail)で溶出し、超音波で細胞を破碎した。上清を回収して Bradford protein assay (Bio-rad)によりタンパク濃度を測定し、等量に揃えた後、DTT を添加してジスルフィド結合の還元、IAA を添加してシステイン残基のアルキル化を行った。1 M Urea になるように希釈した後、TrypsinGold (Promega)を 37 $^\circ\text{C}$ で終夜反応させ、タンパク質消化を行った。MagCapture Tamavidin 2-REV (Wako)を用いて消化後のサンプルを精製し、洗浄した後、80% アセトニトリル/0.1% TFA で溶解した。一部を Horseradish peroxidase conjugated streptavidin (HRP-SA)を用いたイムノブロッティングに用いるために分取した後、Q exactive 質量分析計による測定を行った。

・肺線維化時にける TG2 の基質モチーフ配列の作成

同定した WT および TG2KO のコントロール群あるいは肺線維化群の四種類のペプチド群を Perseus software により解析し、コントロール群や TG2KO の線維化群と比較して WT の線維化群において有意に検出されたペプチドを定量値に基づいて統計的に抽出した。有意差は ANOVA 検定を用いた多群間比較 FDR < 0.05 を基準とし、これを満たしたペプチド配列を肺線維化において TG2 依存的に有意に架橋される基質ペプチド配列とみなした。BPA が修飾されたペプチド群において、pLogo を用いて架橋されたグルタミン残基の周辺配列を各アミノ酸残基の出現頻度に応じてスケーリングし、架橋モチーフ配列を可視化した³⁴。

・培養細胞系を用いた TGase 基質分子同定

細胞内あるいは細胞外の基質を同定する二種類の手法について示す。

細胞内の基質同定を行う場合は、肺上皮細胞株 A549 を用いた。細胞を播種し、24 時間後に TGF- β で刺激して線維化を誘導した。さらに 24 時間後に、終濃度 1 mM の BPA を含む培地に交換した。90 分間インキュベートした後に、終濃度 1 μ M になるよう Ionomycin (Adipogen) を直接加えて 30 分間反応させ、Guanidin-TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) buffer (8 M guanidine-HCl, 100 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 10 mM TCEP, 40 mM chloroacetamide) にて細胞を回収した。一度凍結した後、95°C で 5 分間加熱し、その後氷上で 15 分間冷却した。Bioruptor (ソニック・バイオ) を用いて細胞を破碎し、BCA protein assay によりタンパク質濃度を定量した。各サンプルにおけるタンパク質量を揃え、メタノール/クロロホルム沈殿を行い、タンパク質の精製・濃縮を行った。沈殿を風乾後に PTS buffer (12 mM Sodium deoxycholate, 12 mM Sodium lauroylsarcosinate, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を加え、Bioruptor により再溶解した。95°C で 10 分間加熱した後、TrypsinGold を加え、37°C で終夜反応させ、タンパク質消化を行った。95°C で 10 分間加熱し、トリプシンを失活させた後、ペプチド混合物に MagCapture HP Tamavidin 2-REV を加え、4°C で 3 時間混和して吸着させた。GL-tip SDB に通すことにより不純物を除いた 1 mM biotin を加えて、サーモミキサー C (Eppendorf) を用いて 37°C で 15 分間攪拌した後、競合溶出された BPA 標識ペプチドを含む上清を回収した。ペプチドの溶出は二度繰り返した。これを酸性化した後に、GL-tip SDB を用いて脱塩し、Q exactive 質量分析計による測定を行った。

一方で、細胞外に存在する基質の同定を行う場合、線維芽細胞株である NIH3T3 を用いた。細胞を播種し、24 時間後に TGF- β で刺激して線維化を誘導した。さらに 24 時間後に BPA (終濃度 1 mM) に加え、あらかじめ DTT 処理により、還元活性化しておいたリコンビナントヒト TG2 (in-house) を終濃度 1 μ g/ml 含んだ培地に交換した。2 時間インキュベートして架橋反応を行った後、前述した細胞内架橋の場合と同様にサンプル調製を進めた。

・マウス生体の肺組織における TGase 基質分子同定

イソフルラン麻酔下でブレオマイシンをマウス気道内に投与し、肺線維化モデルマウスを作製した。線維化誘導後 21 日目のマウスに、生理食塩水に溶解した 50 mM BPA を 50 μ L (0.82 μ g per head) 気道内から投与し、30 分間インキュベートして架橋反応させた。腹部大動脈の切除によりサクリファイスし、肺組織を回収した。全肺抽出液を作製するため、右肺の中葉と後葉の 2 葉に 1 mL の 1%

SDS-RIPA (Radio-immunoprecipitation assay) buffer (1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1 mM EDTA, Protease inhibitor cocktail) を加え、テフロンホモジナイザーを用いて破碎した。その後、Bioruptor により再度破碎し、DC protein assay によりタンパク質量を揃えてイムノブロッティングを行った。質量分析サンプルの作製の場合、定量後のタンパク質溶液に Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified [E3] Magnetic Particles と Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified Magnetic [E7] Particles (共に Cytiva) の混合溶液を加え、磁気ビーズ上にタンパク質を保持することにより、溶液の置換を行った。ビーズ上にタンパク質が吸着したまま Lys-C と Trypsin を加え、タンパク質消化を行った³⁵。終夜反応させた後のペプチド溶液に MagCapture Tamavidin 2-REV を加えて吸着させた。1 mM biotin 溶液を加えて競合的に溶出することにより、BPA 修飾されたペプチドを濃縮し、脱塩後に質量分析に供した。同定した WT および TG2KO のコントロール群あるいは肺線維化群の四種類のペプチド群を Perseus software により解析した。WT の線維化群対 WT のコントロール群および WT の線維化群対 TG2KO の線維化群の 2 つの比較群において、WT の線維化群で共通して増加したペプチドを、肺線維化において TG2 依存的に架橋される基質ペプチド配列とみなした。有意差は ANOVA 検定を用いた多群間比較 $FDR < 0.05$, $S0 = 0.5$ を基準とし³⁶、WT のコントロール群および TG2KO の線維化群で検出されなかったために有意差がつかなかったペプチドも架橋基質ペプチドに含めた。

実験結果

肺線維化モデルマウスにおける TGase 活性染色

初めに、ブレオマイシンで誘導した肺線維化モデルマウスの病態の評価を行った。ヘマトキシリンエオジン染色とマッソントリクローム染色により、肺組織の病理学的な評価を行ったところ、WT マウスの線維化誘導群で線維化領域の顕著な拡大が見られたが、TG2KO マウスでは抑制された(Fig. 1A)。線維化の進行度の指標となる、肺組織における総コラーゲン量をヒドロキシプロリン定量により解析したところ、組織染色と同様の傾向が認められ、TG2KO マウスはブレオマイシン誘導性の肺線維化を抑制することが示された(Fig. 1B)。また、肺組織切片における免疫染色では、TG2 および筋線維芽細胞マーカーである α -SMA の発現の増大が見られ、免疫ブロットティングでも同様に TG2 のタンパク質発現は線維化誘導群で増加していた(Figs. 1C, D)。

次に、肺線維化を亢進すると考えられる TG2 の架橋活性を調べた。主に上皮細胞に発現する TG1 および TG2 に特異的に架橋される高反応性基質ペプチドあるいは TGase アイソザイム非特異的に架橋される一級アミンのカダベリンに蛍光分子 FITC を標識した基質プローブを用いて、未固定の肺組織切片上の TGase 活性の可視化を行った(Fig. 2A)。その結果、WT マウスにおいて、線維化肺において TG1 (pepK5 により検出)、TG2 (pepT26 により検出)の両方で活性の上昇が見られた(Fig. 2B)。一方で、アイソザイム非特異的基質である FITC-カダベリンを用いた場合に、TG2KO マウスの肺組織ではシグナルの大部分が消失したため、肺線維化において働いているのは主に TG2 であると考えられた。

線維化肺における TG2 基質タンパク質の網羅的同定

線維化肺において TG2 の活性が顕著に上昇していたことから、TG2 の架橋活性が肺線維化の病態形成に寄与していると考え、TG2 が架橋基質とするタンパク質の網羅的な同定を行った。肺線維化モデルにおける病態形成部位の不均一性を考慮し、TG2 の酵素活性の局在分布が保持される肺組織切片上においてビオチン化アミン(BPA)を添加して架橋させ、タンパク質抽出後に HRP-SA を用いて検出した(Fig. 3A)。その結果、線維化肺において化学発光のシグナルの増加つまり TGase の反応による架橋産物の増加を確認した(Fig. 3B)。そこで、次にアビジンレジンを用いたアフィニティ精製により、TGase 基質タンパク質を濃縮し、トリプシン消化と脱塩を行った後に質量分析によるノンラベル定量解析を行った(Fig. 3C)。質量分析により得られた結果を統計的に処理することにより、肺線維化において TG2 依存的に有意に架橋される 126 個の基質候補タンパク質を同定した(Fig. 3D, Table 1)。126 個の基質候補タンパク質群から各種データベースを用いて GO 解析を行い、それぞれのカテゴリにおいて上位 5 個のタンパク質を示した(Table 2)。同定されたタンパク質は小胞体や膜面分、細胞外エクソソームに有意に局在しており、代謝や免疫系、脂質代謝に関連する機能を有することが分かった。

さらに、これら同定された基質候補タンパク質同士の相互作用について調べるため、STRING データベースによるタンパク質間相互作用のネットワーク解析を行った。さらに cytoHubba 解析により、相互作用ネットワークのハブとなるタンパク質を抽出した(Table 3)。上位 20 個のハブタ

ンパク質の GO 解析において PPAR γ シグナル経路に分類される THIKA/B および ACOX1/3 や、小胞体ストレス経路に含まれる S61A1 と SC61B/G などが TG2 の架橋修飾により機能変換され、これらがハブとして働くシグナル伝達経路に影響を与えることにより、肺線維化の進行に関わっている可能性が示唆された(Fig. 3E, Table 4)³⁷。

TG2 が好んで架橋する基質ペプチド配列の同定

所属研究室の過去の研究で行われてきた TGase 基質候補タンパク質の網羅的同定実験および本論文のここまでの実験結果では、基質タンパク質の同定は可能であっても、実際に架橋修飾されたペプチド断片を質量分析により同定することは不可能であった。この原因として、TGase により架橋された基質タンパク質を先にアフィニティ精製してから消化するために、測定サンプル中には BPA 修飾ペプチド以外に大量の非修飾ペプチドが含まれ、これらがノイズとなり同定できないのではないかと考えた。この問題を解決して TGase の架橋修飾ペプチドつまり TGase が架橋するアミノ酸残基を同定するために、サンプル調製法の改良を行った。

TGase により架橋修飾された基質ペプチドのみを濃縮するため、先にトリプシンによるタンパク質消化を行った後で、BPA 修飾ペプチドを含むペプチド混合物をアフィニティ精製に供し、目的物を濃縮した(Fig. 4A)。TG2 に架橋されることが分かっているタンパク質(β -casein)を用いた予備実験において、質量分析解析により BPA 修飾ペプチドが同定可能であることを確認した後、肺組織切片を用いて TG2 の基質ペプチド配列の同定を行った。切片上で BPA を架橋させた後に抽出し、トリプシン消化とアフィニティ精製を順に行い、濃縮した BPA 修飾ペプチドを質量分析に供した。4 群のサンプルを用い、WT の肺線維化群で有意に架橋される基質ペプチド配列を統計的な解析により抽出したところ、肺線維化モデルにおいて有意に TG2 により架橋されるペプチドとして 301 個の配列情報を同定した。この内 298 個は実際にグルタミン残基に BPA が修飾されたペプチド配列であり、これらは 184 個のタンパク質に帰属された(Fig. 4B, Table 5)。同定されたペプチドは Fibronectin など既知の TG2 基質に由来するものが多く同定された。

さらに同定したペプチド配列群について、TG2 の架橋部位であるグルタミン残基を中心としたアミノ酸の一次配列に規則性があるかどうか、pLogo を用いてモチーフ配列を作製した(Fig. 4C)。その結果、架橋されるグルタミン残基より一残基前にグリシン、一残基後ろにシステインが有意に現れることを見出し、立体構造を持つ天然のタンパク質に対する TG2 の高反応性基質配列を初めて明らかにした。

生細胞中で TGase に架橋される基質ペプチドの同定

ここまでの TGase 基質同定実験は全て凍結肺組織切片を用いて行ってきた。この実験系では架橋反応溶液中にカルシウムを添加しており、TGase が過剰に活性化した状態において基質とする分子を解析していた可能性がある。そこで肺線維化形成時など、生体内において TGase が架橋する基質分子を探索することにより、最終的に TGase の活性制御を介した病態抑制を達成するため、まず初めに培養細胞系を用いて、生理的条件下で TGase に架橋される基質分子の解析を行うこととした。

ヒト線維芽細胞株 NIH3T3 を用い、線維化誘導として TGF- β 、さらにそれぞれ細胞膜非透過性、細胞膜透過性の TG2 活性阻害剤である Boc-DON あるいは Z-DON を共処理した後に TGase 基質である BPA を培地中に添加し、内在性 TGase による架橋を試みた。TGF- β 刺激による BPA 架橋の増加と各阻害剤による架橋阻害は見られたものの、質量分析を行ったところ、TGase の架橋基質である修飾ペプチドがほとんど同定されなかった(Supple. Fig. S3)。そこでカルシウムイオンフォアであるイオノマイシンを、NIH3T3 よりも TG2 の発現量が多いヒト肺胞上皮細胞株 A549 に添加することにより、細胞内 TGase の活性化を誘導して架橋反応を促進した。イオノマイシンの添加により、アビジン精製の前後で共に BPA 修飾ペプチドが顕著に上昇することをイムノブロッティングにおいて確認した後に、イオノマイシン添加サンプルの基質同定解析を行った結果、7542 個の BPA 修飾ペプチドが同定され、これは全体の同定ペプチドの 98.6%であった(Fig. 5A)。この実験から、イオノマイシンを添加してはいるものの、生理的条件下で架橋される基質の同定に初めて成功した。

しかしながらこの手法においては、細胞外に局在するタンパク質由来のペプチドがほとんど同定されなかった。そこで細胞外における架橋反応を促進するために、NIH3T3 の培地中にリコンビナント TG2 を添加した。BPA 架橋産物の蓄積をイムノブロッティングで確認し、質量分析を行った結果、BPA 修飾ペプチドを 214 個同定した。この内 87.6%が細胞外タンパク質に由来するペプチドであり、リコンビナント TG2 の添加により細胞外に存在する基質を狙って同定することに成功した(Fig. 5B, Table 6)。この中には細胞外基質タンパク質であるフィブロネクチンに帰属されるペプチド配列が含まれていたが、過去の報告とは異なる位置のグルタミン残基が修飾されており、*in vitro* の実験系では生理的条件下における TGase の架橋反応を再現できていない可能性が示唆された²⁹。

マウス生体内で TGase に架橋される基質の解析

生理的条件下における架橋産物の同定に成功したため、次にマウス生体内における TGase 架橋基質の同定解析に取り組んだ。これまでと同様にブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスを用い、誘導後 21 日目のマウスに気道内投与により BPA を投与して架橋による基質のラベリングを誘導した。その後肺組織を摘出し、破碎して抽出液を作製し、SA-POD による TGase 架橋産物の検出を行った。その結果、BPA の投与に依存して架橋産物の蓄積が確認され、さらにブレオマイシンを投与した肺線維化群においてシグナルの顕著な増加が認められた(Fig. 6A)。

WT と TG2KO マウスそれぞれでコントロール群と肺線維化誘導群を作製し、同様の手順で BPA を架橋させ、摘出した肺組織を破碎してトリプシン消化、アフィニティ精製を行い、質量分析サンプルを作製した(Fig. 6B)。統計的な解析の結果、WT のコントロール群および TG2KO の線維化群と比較して、WT の肺線維化群で有意に架橋された BPA 修飾ペプチドを 34 個同定した(Fig. 6C, Table 7)。これらのペプチド配列は実際にマウスモデルにおける肺線維化の形成に伴って、動物個体レベルで TG2 により架橋されることを初めて直接的に示した。

考察

本研究は、肺線維症の病態形成に関わることが報告されている TG2 に着目し、その未知である基質分子を同定することにより、肺線維化進行時における TG2 のふるまいを明らかにしようと考えた。一般的に、TG2 はコラーゲンなどの細胞外基質タンパク質を架橋安定化することにより、組織線維化を亢進すると考えられているが、実際の生体内での詳細な架橋様式は明らかにされてこなかった。また、TG2 が転写因子を基質として架橋および機能変換して細胞死に関与するという報告もあるため、TG2 が組織中であるいは疾患において特異的に働き、細胞外基質以外にも細胞内の因子を標的として機能変換することにより、組織線維化に寄与している可能性が考えられた³⁸。所属研究室では各組織における TGase 架橋タンパク質の網羅的同定技術を有していたが、これまでに定量的な同定解析を行った例はなかった³⁹⁻⁴²。そこで本研究では様々な条件において TG2 の架橋基質分子を定量的に同定解析する手法を確立し、肺線維化と TG2 の関係についてその一端を明らかにすると共に、TGase が関わる広範な生体現象を解析可能である基盤技術の確立を行った。

初めに WT および TG2KO マウスを用いて肺線維化モデルマウスの作製を行い、組織染色による病態組織学的解析を行ったところ、WT マウスでは一様に線維化の進行が認められた一方で、TG2KO マウスでは局所的に線維構造が見られるものの、線維化を大幅に抑制した(Fig. 1)。TG2KO マウスでは架橋反応による線維性タンパク質の安定化が不完全であるため、線維化の過剰な進行による組織構造の破壊が起こりにくいと考えられる。しかし組織染色の結果から、TG2KO マウスは完全には線維化を抑制しないことが示されたため(Fig. 1)、肺線維化の形成には TG2 以外のタンパク質架橋化酵素である他の TGase アイソザイムあるいはリジロキシダーゼ(LOX)ファミリーなど、架橋修飾を担う別の因子が関与している可能性が示唆された。肺線維化の病態理解のためには、これら他の架橋因子との機能的なすみ分けについても更なる解析が必要である⁴³。

主に上皮組織に発現し、その架橋活性により表皮の角化などに関わる TG1 は、組織線維化を担う TG2 と共に線維化に関わることが示唆されている⁴⁰。そこで、肺線維化の進行に大きな役割を持つことを確認した TG2 と共に、TG1 についても、蛍光分子を用いた肺組織切片上での TGase 活性の検出を行った。その結果、TG1 および TG2 に特異的な基質ペプチドを用いた場合には、共に線維化肺において顕著な活性上昇が見られた。一方で、アイソザイム非特異的に架橋される一級アミンであるカダベリンを用いた実験では、TG2KO マウス由来の組織においてシグナルが増加しなかった(Fig. 2)。このことから、肺線維化においては TG2 が主に働いて、その架橋活性により病態進行に主に関与すると考え、TG2 が基質とする分子群の同定解析を行った。しかしながら、示したように肺線維化においては TG1 の活性も上昇することが明らかになった。肺胞における上皮細胞のうち、恒常性の維持を担う II 型肺胞上皮細胞の機能欠損は肺線維化の発症につながることを報告されている。上皮細胞において特異的に発現する TG1 が活性化することにより、上皮細胞の機能異常につながることも考えられるため、今後解析を進めていく必要がある^{44,45}。

架橋基質の同定に用いるプローブとして、リジン側のドナーとなるピオチン化ペンチルアミン(BPA)を選択した。これは 12 アミノ酸残基のオリゴマーである pepT26 と比べて、低分子である分子量 328.47 の BPA は MSMS により切断されず、BPA が架橋された基質分子の方が質量分析計で

検出することが比較的容易であると考えられることや、TGaseはその反応機構に起因してリジン側よりもグルタミン側の基質の特異性が高いと考えられていることが理由である⁴⁶。

肺線維化モデルにおける病変部位の不均一性を踏まえ、活性化したTG2の空間的分布を保持したまま架橋反応を行うことが可能である肺組織切片を用いて質量分析サンプルの作製を行った(Fig. 3C)。この方法を用いた際には、HRP-SAによるイムノブロットングにおいて、組織抽出液内で反応させる手法では再現できなかった、TG2架橋産物の蓄積増加を確認した(Figs. 3A, B)。次に質量分析によるプロテオーム解析を行い、統計処理を行った結果、線維化肺においてTG2依存的に架橋される基質タンパク質として126個のタンパク質を同定した。この中には過去に*in vitro*の実験系においてTG2に架橋されることが報告されているCollagen IやFibronectinなどを含む他、Surfactant protein DやCathepsin Dなど、肺線維化の病態進行に関わる因子も同定されており、TG2がこれらを架橋修飾して機能変換することにより線維化の進行に関与する可能性が示唆された^{47,48}。さらに、これら因子のKEGGパスウェイ解析を行ったところ、有意に増加したいくつかの経路のうちPhagosomeや*Staphylococcus aureus* infectionは、過去にヒト特発性肺線維症のトランスクリプトーム解析で得られた結果とも一致しており、動物種間の共通性および本実験の信頼性が示されたと考える⁴⁹。次に同定された基質候補タンパク質群のタンパク質間相互作用を解析するため、STRINGデータベースとNetworkAnalyzerを用いて、タンパク質相互作用においてハブとして機能するタンパク質を抽出した^{31,32}。上位に見出されたComplement C3 (C3)はTG2の基質分子として報告がある他、ヒトIPF患者ではC3の遺伝子発現が有意に高く、C3KOマウスでは肺線維化の進行が抑制されるなど、線維化との関連が報告されており、架橋されることにより、C3とその相互作用因子を含むシグナル経路へ影響を及ぼす可能性が考えられる^{50,51}。また、上位20個のハブタンパク質内におけるKEGGパスウェイ解析により同定されたPPAR signaling pathwayあるいはER processing pathwayは、定量PCR (quantitative polymerase chain reaction)を行い、実際に関連因子が肺線維化群で増加することを確認しており、これらの経路がTG2の架橋活性により変動し、肺線維化の病態進行に促進的に働く可能性が示唆された(Supple. Fig. S2)。PPAR γ は核内受容体型の転写因子で、脂質代謝関連遺伝子の発現調節に関わる。また、PPAR γ リガンドは筋線維芽細胞の活性化を阻害することにより、肺線維症の進行を抑制する⁵²。20個の中心的なハブタンパク質に含まれたTHIKA/BおよびACOX1/3はPPAR γ 経路の下流で転写され、脂質代謝に関わる因子である。ACOX1欠損マウスではPPAR γ の活性化が誘導されることが分かっており、TG2の架橋活性によるPPAR γ 経路内のハブタンパク質の修飾が線維症発症に関与することが示唆される⁵³。S61A1やSC61B/Gは、タンパク質輸送を担う小胞体上の膜タンパク質であるSec61のサブユニットである。Sec61はERストレス条件下で小胞体ストレス応答を誘導するIRE1 α の活性化を制御することが報告されている⁵⁴。異常な小胞体ストレスは肺線維症の発症につながることで知られており、Sec61へのTG2の架橋修飾が小胞体ストレス応答の誘導につながる可能性が考えられる⁵⁵。

これまでのTG2の基質タンパク質を同定する質量分析の実験系では、基質分子をアビジンレジンで精製した後にトリプシン消化を行い、未修飾ペプチドを解析することにより、データベース上で紐づけられたタンパク質をTG2の基質タンパク質として同定してきたが、BPAが修飾されたペプチド断片を直接同定することはできていなかった。BPAが修飾されていないペプチド断片が

質量分析に供するペプチドサンプルの大部分を占めており、これがノイズとなって標的である BPA 修飾ペプチドを同定できていないことが主な原因と考えたため、架橋反応後の抽出液をトリプシン消化した後に BPA 修飾ペプチドをアフィニティ精製する手法を確立した(Fig. 4A)。しかしながら、TG2 基質タンパク質である β -casein を用いた予備検討において、tamavidin を用いて精製した群では BPA 修飾ペプチドは検出されず、さらに未精製群においても 224 アミノ酸残基からなる β -casein のうち、わずか 3 つのペプチド断片のみしか検出されなかった(データ非掲載)。このことから、BPA 修飾ペプチドの同定効率は非常に悪いことが考えられたため、用いるタンパク質量を mg オーダーまで増やすことにより、以降の修飾ペプチドの同定解析を行った。

基質タンパク質同定実験と同様に、WT および TG2KO マウスの肺組織切片を試料として用いて、BPA を架橋させたペプチドサンプルを作製して質量分析を行ったところ、全部で 1347 個のペプチドを同定した。この中から、WT の肺線維化サンプルにおいてのみ有意に増加したペプチド配列について Perseus を用いて統計的な解析を行ったところ、301 個のペプチドを同定した。この内、配列中のグルタミン残基に BPA が修飾されていたペプチドは 298 個であったことから、アビジンレジンによる精製過程において、ほとんど非特異的な結合を認めずビオチン化ペプチドが濃縮されたことが示された。この中には既知の TG2 基質である Fibronectin など、細胞外基質タンパク質由来のペプチドが多く含まれ、実験結果の妥当性は高いと考えられる(Table 5)。

さらに 298 個の BPA 修飾ペプチドについて、オープンソースである pLogo を用いてペプチドシーケンスモチーフの可視化を行い、生体試料において TGase の基質となるペプチド配列の法則性を初めて明らかにした(Fig. 4C)³⁴。所属研究室で以前行われた、ファージディスプレイ法を用いた試験管内における TGase アイソザイムに特異的な基質配列の探索研究からは、TG2 が Q-x-P- ϕ -D-(P) という配列を好んで基質とする傾向があることが明らかにされている (x は保存されていないアミノ酸、 ϕ は疎水性アミノ酸を表す)¹⁷。ファージディスプレイによるランダムペプチドライブラリからペプチド配列を見出した過去の手法とは異なり、本研究では立体構造を保持した状態のタンパク質を BPA と架橋反応させ、その後に消化して BPA 修飾されたペプチド配列を同定した。そのため、両者の反応条件の違いから異なる結果が得られるのではないかと考えていたが、実際は 2 つの実験間において +2 位のプロリン(統計的な有意差は低い)や +3 位の疎水性アミノ酸が共通するなど、一部類似する結果が得られた。一方で、他の部分からは共通性は見いだせなかった。このことから、TG2 による基質分子の認識様式は、TG2 の架橋部位へのアクセスという観点では基質となるタンパク質の立体構造が重要であると考えられるが、架橋部位のアミノ酸の一次配列が基質特異性の決定に占める比重が少なくないことが示唆された。

これまでに行われた類似研究においては試験管内において単一のタンパク質の架橋基質配列を示した研究が多く、複雑系の中で TGase が架橋しやすい基質分子を俯瞰的に解析した例はなかった。本研究では、肺切片という生体由来試料を用いて基質ペプチドの網羅的な同定を行ったことにより、基質ロゴ配列を作成することができ、TGase が架橋する多数の基質の情報を比較解析あるいは統合解析することが可能になった。これら一連の実験から、今後 TGase の架橋反応様式あるいは基質分子探索の研究を進めるにあたり、重要な知見を得たと考える。

これまでの基質同定実験では、マウスから得た肺組織切片を用い、カルシウムイオンの添加により TGase を活性化させた条件において架橋される基質分子の同定を行っていた。しかしながら

この手法には2つの問題点が考えられた。一つは、一度凍結した肺組織の上で、さらに TGase を過剰に活性化させるという、生体とは乖離した条件で架橋反応を誘導していることである。この条件では、真に TGase が好んで架橋する基質のみならず、近傍に存在するタンパク質を非特異的に架橋している可能性が考えられる。もう一つは、肺線維化モデルではマウスへの線維化誘導後 21 日目時点の肺組織を用いており、長期にわたって病態が形成される線維化という現象において、生体内で架橋される基質分子を十分に捉えることができないという点である。これら問題点を解決し、生体内で TGase が真に架橋する分子群を同定するために、まずは培養細胞系を用いて実験コンセプトの検証を行った。

初めに線維芽細胞株 NIH3T3 の培養上清に BPA のみを添加したところ、架橋産物がわずかに増加することをイムブロットングにより確認できたが、質量分析を用いて基質分子を同定し、その規則性を解析するには至らなかった(Supple. Fig. S3)。培養細胞における TGase の活性が低いことから、質量分析による同定が可能な BPA 架橋産物量が回収できなかったことが原因であると考へ、架橋産物を増加させる誘導剤を用いて実験を進めることにした。カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンは細胞外に存在するカルシウムイオンに結合し、カルシウムイオンの細胞内への輸送を行う。培地中にイオノマイシンを添加し、同様に解析した結果、TGase 架橋産物の顕著な増加を確認した。イオノマイシンの処理時間は 30 分という短時間であり、細胞内に存在する TGase タンパク質の発現量に大きな影響はないと考えられるため、TGase の架橋産物の量はカルシウムイオン濃度つまりは TGase の活性化状態に大きく依存することが示唆された。架橋産物の増加を確認したため質量分析を行ったところ、イオノマイシン添加に依存して架橋される多くのペプチド配列を同定した(Fig. 5A)。生細胞において TGase に架橋される基質分子については過去に報告がなく、得られた結果は新規の知見であると考えられる。また、この実験からはアビジンレジンに結合させた BPA 修飾ペプチドの溶出に、これまで用いていた SDS sample buffer や TFA/アセトニトリルによる強制的な溶出ではなく、biotin 溶液を用いた競合的な溶出を行った。これによりアビジンレジンに非特異的に結合した分子の溶出を抑え、高い特異性で BPA 修飾ペプチドを溶出することが可能となった。

イオノマイシンを用いた細胞内 TGase 基質の同定手法の利点として、TGase の架橋基質を網羅的に解析できると同時に、同定した基質タンパク質の定量データとその局在情報から、生細胞における TGase の細胞内活性分布が解析できる点である。未知な点の多い TGase の細胞内における役割について、より詳細な解析を可能にするツールとなり得ると考へる。しかしながらイオノマイシンを添加することにより、結局は細胞内 TGase の活性を人為的に上昇させており、前述したようにカルシウムイオン濃度の上昇による TGase の過剰な活性化に依存する基質を同定しているため、内在性の TGase 活性による架橋基質の同定という本来の目的を達成できていない点が課題である。イオノマイシンを添加せず、単に BPA のみの処理によっても架橋産物は増加するため、ビオチン化ペプチドのアフィニティ精製による濃縮などの各工程における収率の改善や、より感度の高い質量分析計や定量手法を用いることなどにより、今後 TGase の活性化誘導なしでも基質分子の同定が可能になると考へる。

また、イオノマイシンを用いて細胞内の TGase の活性化を誘導する実験系においては細胞外基質タンパク質に由来するペプチドをほとんど同定できなかった。一般的に TG2 は主に細胞外基質

の架橋安定化を亢進することにより、肺線維化の進行に関わると理解されている。そこで、生理的条件下において TGase が細胞外で有する架橋機能の解析を目的とし、培地中にリコンビナント TG2 を加えることにより、細胞外における架橋反応を促進して架橋基質の同定を行った(Fig. 5B)。実験に用いるリコンビナント TG2 の濃度については、過去に行われた *in vitro* における BPA 架橋実験において添加した濃度を参考とし、培地中の終濃度 0.1-5 µg/ml をあらかじめ検討することにより決定した(データ非掲載)。この手法ではイオノマイシンを添加する実験系と比べて、より少ない数の BPA 修飾ペプチドが同定されたが、そのうちほとんどが細胞外タンパク質由来のペプチドであった(Table 6)。細胞の培養に用いた培地である DMEM の中には約 1.80 mM という高濃度のカルシウムイオンが含まれており、細胞外にカルシウムイオンが豊富に存在する条件であるにもかかわらず、イオノマイシンの添加時に比べて同定数が顕著に少なかった。この原因として、細胞外において TG2 が架橋を行う際の足場となるタンパク質などの物理的な周辺環境や基質である BPA の局所的な濃度や局在性、架橋反応後の細胞外基質タンパク質の溶出効率の問題など、多くの改善すべき課題が存在していることが考えられる。また、この実験で同定された fibronectin に由来するペプチドの一つである QAQQIVQPSPVAVSQSKPGCFDNGK(33-58)は質量分析の結果、先頭に位置する Q33 が唯一の BPA 架橋部位であった。しかしながら先行研究では Q33 は全く TG2 により架橋されず、主に Q35 が架橋されるとしている²⁹。このように試験管での架橋反応により同定された架橋部位は本研究と矛盾することもあることが分かり、生体内においてはこれまでの報告とは異なる基質タンパク質や基質部位を架橋する可能性が強く示唆された。今後より詳細な解析が必要となるが、プロテオームの変化を伴う特定の生体现象や疾患などにおいて、TGase が特異的に架橋する基質分子が存在し、その架橋反応により生じた機能変化がより大きな影響を及ぼす可能性があると考えられる。

さらに当初の研究目的である、肺線維化の進行時における TGase の機能解析を行うため、マウス生体内において架橋される基質の同定を行った。培養細胞を用いた基質同定実験では、イオノマイシンやリコンビナント TG2 を添加しており、内在性 TGase の活性のみに依存する架橋基質の同定は達成できていなかった。その一方で、肺線維化を誘導したマウスでは、肺組織における TG2 の活性が上昇するため、肺内への BPA の送達が可能であれば、内在性の TG2 活性に由来する基質を同定できると考えた。そこで、これまでブレオマイシンの投与に用いていた鼻腔内投与ではなく、気道内から投与を行うことにより、架橋基質である BPA をより効率的に肺組織内に届けようと考えた。実際に気道内よりエバンスブルーを投与し、肺組織内で十分に拡散することを確認しており、生細胞において拡散効率の良い BPA は、肺組織全体に効率よく暴露されることが期待される(データ非掲載)。BPA を気道内に投与し、30 分後に肺組織を回収、破碎してイムノブロットングを行った結果、肺線維化誘導マウスにおいて架橋産物が顕著に増加することを確認した(Fig. 6A)。次に同手法を用いて、マウス生体内で内在的な TGase 活性により架橋される基質分子の同定解析を行った。

本実験では、sp3 法と呼ばれる手法を用いて肺組織由来タンパク質の前処理を行った³⁵。肺組織を破碎して得たタンパク質を HILIC/ERLIC タイプの相互作用により磁気ビーズに結合させることにより、強い界面活性剤を使用した場合でもタンパク質の損失を抑えて buffer を置換し、同一チューブ内でタンパク質消化まで行うことができる手法である。今回 sp3 法を用いることにより、

肺組織の破碎のために、比較的高濃度である 1% の SDS を含む RIPA buffer を用いることができたため、高い溶出効率でタンパク質の回収ができたと考えられる。また、培養細胞を用いて細胞外の基質を同定する実験(Fig. 5B)においては、タンパク質を 1 mg 使用して質量分析サンプルを作製したものの、同定された BPA 修飾ペプチドが少なかった。今回も同様に 1 mg でサンプル作製を行ったが、BPA の修飾効率の違いから単純比較ができないとはいえ、全体で 12000 以上(PSMs)の BPA 修飾ペプチドを同定した。この同定数の多さ(タンパク質の損失の少なさ)は一つのチューブ内で消化まで行うことのできる sp3 法の利点であると考えられる。統計処理をする前に、WT のコントロール群に比べて肺線維化群においてシグナル強度の比が大きかった順にペプチド配列を並べると、LTBP(Latent-transforming growth factor beta-binding protein)4(1 位)、Fibulin-2(2 位)、Fibronectin(5 位)、LTBP1(10 位)など、細胞外に存在し、線維化に関わるタンパク質が上位に同定されており、実験の妥当性およびこの実験系で細胞外基質タンパク質由来のペプチドを検出できることが示された。この中には細胞外において TG2 に架橋されることにより、TGF- β の活性化に関わる LTBP1(1712 a.a.)に由来する BPA 修飾ペプチドが 2 つ含まれた。これらのペプチドは、IDSPGGQK(495-502)と EAQPGQSQVSYQGLPVQK(505-522)の二つであり、同定された架橋部位は Q501 と Q510 であった。いくつかの報告から、LTBP1 の N 末端側が TG2 により、細胞外基質タンパク質と架橋されることが分かっている^{23,56,57}。得られた結果はこれらを裏付ける結果であり、今回同定した TG2 の架橋部位が線維化進行に重要な役割を果たす細胞外における TGF- β の活性化機構において機能を持つかどうか、追って解析を進める必要がある。

さらに、Perseus を用いた統計的解析により 34 個のペプチド配列を同定したが、この中には FDR < 0.05 と S0 = 0.5 を共に満たした有意に架橋されるペプチド配列に加え、それぞれのネガティブコントロール群で値がない(質量分析で検出されなかった)ために有意差が出ないペプチドも含まれる。精製したサンプルの質量分析であるために、必ずしもネガティブコントロール群において検出されなくても良いと考えたためである。34 個の有意に TG2 に架橋されるペプチドのうち、PSMs の値が最も高かった 2 つのペプチドが帰属される SH3 and PX domain-containing protein 2B (SH3PXD2B)と Matrix Gla protein (MGP)は線維化との関係が示唆され、TG2 の基質タンパク質としては新規の因子である。SH3PXD2B は研究例の少ないアダプタータンパク質であり、SH3PXD2B 欠損ゼブラフィッシュにおいて、コラーゲンリモデリング異常(defective collagen-remodeling spectrum)と皮膚の線維化を示すことが報告されている⁵⁸。SH3PXD2B が哺乳類における線維化形成において機能を有するとすれば、TG2 による架橋修飾により異常をきたす可能性が考えられる。MGP に関しては、MGP の発現量と肝線維化病態の間に正の相関があること、さらに MGP ヘテロ欠損雌マウスにおいては肝線維化の抑制を示し、肝臓における間葉系細胞である肝星細胞において MGP をノックダウンすると線維化促進性のシグナルである TGF- β /SMAD 経路を抑制することが最近報告された⁵⁹。この報告においては、MGP の機能が性特異的であることや、非アルコール性脂肪性肝炎モデルの線維化で見られた現象であることから、肺線維症において一般的にみられる現象であるかは未知であるが、TGF- β /SMAD 経路という線維化の誘導において共通性の高いシグナル経路に関わることから、TG2 の標的としても興味深い因子であると考えられる。

最後に *in vivo* で同定した TG2 架橋基質が、以前に行った肺組織切片を用いた TG2 基質配列同定実験(Fig. 4)と共通性を示すかどうか検討を行った。今回 *in vivo* で見出した肺線維化において

TG2 に依存して架橋される 34 個の BPA 修飾ペプチドと、以前同定した、肺組織切片上で TG2 依存的に架橋される 298 個の BPA 修飾ペプチドの比較解析を行った結果、5 つの基質ペプチドが完全に一致していた (Table 8)。共通して見出されたこれら 5 つのペプチドは、確かに線維化肺において TG2 に架橋されるペプチド配列であると考えられる。Plasminogen は TG2 および TGase アイソザイムである FXIII により架橋されることが報告されている⁶⁰。また、5 つのうち 2 つは LTBP2 に由来するペプチドであり、GQQQIAAR は 128-135、LETPQRPAAR は 143-153 番目のアミノ酸残基を含むペプチド配列であった。2 つの LTBP2 由来ペプチドはタンパク質中で互いに近い位置に存在するが、これまでに報告のある LTBP2 内の機能的なドメイン構造内には存在しない。とはいえ、これまでに TG2 により架橋されて機能変換されることが報告されているタンパク質は多くなく、TG2 による架橋修飾の意義を明らかにするために重要な知見を得たと考えられる。さらに、今回同定した BPA 修飾ペプチドについても、架橋されることにより肺線維化にどのような影響を与えるか、今後より詳細な解析を行う必要がある。

肺線維症のみならず、肝臓や腎臓など他の組織における線維化や神経変性疾患にも関わる TG2 は全身に発現することから、分子標的薬を開発する場合には高い特異性が求められる。このため、現段階で TG2 あるいは他の TGase アイソザイムを標的とする治療薬は未だ開発されていない。しかし最近、TGase に関連する疾患の研究を進める Zedira 社によって創製された、低分子化合物の TG2 活性阻害剤 ZED1227 が、小腸の炎症を伴う自己免疫疾患であるセリアック病を対象とする治療薬として、第 II 相試験において有効性を示したことが報告された^{61,62}。セリアック病は小腸における TG2 活性により脱アミド化された、グリアジン由来のペプチドに対して自己免疫反応を生じることにより起こる、欧米諸国で頻度の高い疾患であり、治療薬は現時点で存在しない。セリアック病治療薬の市場規模の大きさも相まって、TG2 に対する創薬研究は主にセリアック病を対象として先行していたが、高い特異性と体内安定性を両立した ZED1227 に続いて、他の疾患においても TG2 を標的とした創薬研究が大きく進展することが期待される。実際に ZED1227 は線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) (あるいは metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)) に対しても第 II 相試験が進行中である。ZED1227 は分子量が 528.60 の経口投与可能な低分子化合物であるが、ドラッグデリバリーの観点で治療効果の組織特異性を担保できる技術が開発されれば、抗体医薬や核酸医薬など他のモダリティによる TG2 を標的とした新規治療戦略も有効となると考える。抗体医薬の場合は細胞外に存在する TG2 のみが標的となるが、肺線維化の治療という観点から、細胞外 TG2 の阻害のみで十分な治療効果が得られるかどうかは定かではない。実際に私たちは、TG2 が細胞内で架橋活性を示すことにより、線維化促進型のマクロファージサブタイプである M2 マクロファージへの極性を促進することを最近報告している⁶³。副作用を低減した緻密な創薬戦略を生み出すためには、本研究で行った TG2 の基質分子の解析以外にも、TG2 の 1 細胞レベルの局在や生体現象に伴う活性の変化など、酵素の機能を包括的に理解する必要がある。

本研究では、TG2 の基質分子の配列に起因する架橋反応の特異性について解析を進めた。一般的な創薬研究では、治療薬側の構造を最適化することにより、対象となる標的因子との親和性を高めるアプローチが用いられる。しかし TGase には各アイソザイムに特徴的な基質特異性が存在するため、本研究で得られた情報から、基質側に焦点を当てた創薬も実現可能であると考えられる。

実際に本研究から得られた TG2 の基質配列情報を用いて、架橋されやすい配列をデコイペプチドとして用いた TG2 架橋阻害あるいは基質タンパク質の架橋アミノ酸残基を点変異させることによる非 TG2 基質化により、線維化形成を阻害できるかどうかについて現在検討を進めているところである。

また一方で、これまで示してきたように肺線維化をはじめ様々な疾患の進行に関わる TG2 であるが、その機能は多岐にわたり、細胞死やエピジェネティクス制御など普遍的な生命現象への関与が報告されている^{38,64}。本研究ではこれまで解析が進んでいなかった TGase が架橋修飾する基質分子に着目し、様々な条件における基質分子の同定法を確立した。この実験系は本研究で主眼を置いた病態に関する研究にとどまらず、多種多様な生体现象の解析に応用できると考えられ、今後 TGase の未知である生理学的な役割について、より研究が進展することが期待される。

第二章 抗線維化薬ピルフェニドンの標的分子の解明

序論

難治性疾患である IPF の治療薬として、ピルフェニドン(製品名: ピレスパ)とニンテダニブ(製品名: オフェブ)の 2 種類の薬剤が現在認可され用いられている^{65,66}。このうちピルフェニドンは、日本で 2008 年に認可された世界初の IPF 治療薬である⁶⁷。ピルフェニドンは当初、抗炎症作用を持つ薬剤として開発が進められたが、*in vivo* 試験において副次的に現れた肺線維化を顕著に抑制したことをきっかけに、抗線維化薬として開発が進んだ。ピルフェニドンは肺以外の臓器の線維化においても薬理活性を示すことから、広範かつ普遍的な抗線維化作用を有することが示唆される⁶⁸⁻⁷⁰。これまでの報告からは、ピルフェニドンは線維化亢進性のサイトカインである TGF- β の発現を抑制することが根幹となって、抗線維化薬を発揮すると考えられる^{71,72}。この他にも多様な作用標的因子の報告があり、総じてピルフェニドンは炎症から線維化形成に至る広範なプロセスにおいて幅広く作用し、その結果として抗線維化作用が現れると考えられる。また、かつて IPF に対してはステロイド等の抗炎症薬が用いられてきたが、多数の報告から、抗炎症作用は却って肺線維化を悪化させることが分かっている⁷³。このことから、ピルフェニドンは本来有すると考えられてきた抗炎症作用とは異なる作用メカニズムにより、肺線維化の抑制に関与することが考えられる。

広範な薬理作用を有するピルフェニドンは、頻発する副作用が使用上の問題点である。複数の臨床試験の比較解析において 36.3%に吐き気、25%に発疹が現れるなど、ピルフェニドン投与群の大半に副作用が見られたことが報告された⁷⁴。この副作用が IPF 患者の大きな負担となっており、ピルフェニドンの服薬アドヒアランスは低い傾向にある⁷⁵。このような高頻度な副作用はピルフェニドンが複数の薬剤標的を持つことに起因すると考えられる。しかし前述したように、ピルフェニドンの作用メカニズムに関する報告は多数存在するものの、そのほとんどがピルフェニドン投与後に抑制された線維化関連シグナルにおいて下流に位置する因子の変動に焦点を当てた内容である^{76,77}。近年になっても網羅的な遺伝子変動解析などにより、ピルフェニドンの作用標的を同定する研究が進められているが、これまでにピルフェニドンが直接結合して相互作用する因子を示した報告はない^{78,79}。私はピルフェニドンが直接結合する標的因子および抗線維化メカニズムを解明することが、副作用を低減できる新規肺線維症治療薬の創出につながると考えた。本研究では、新規ピルフェニドン類縁体プローブを作製することにより、ピルフェニドンの結合標的因子を直接捉えて、標的分子の同定解析を行うことを着想した。

分子生物学の手法に有機化学的な技術を取り入れたケミカルバイオロジーは、生物学や薬学の分野において近年革新的な進歩を生み出している研究領域であり、中でもクリックケミストリーは、生理的条件下において高選択的に進行する反応を用いた基盤技術である^{80,81}。生化学や創薬科学など幅広い分野において応用研究が進んでおり、2022 年にはクリックケミストリーの発展に貢献した Sharpless ら 3 氏にノーベル化学賞が授与された⁸²。Huisgen 環化付加反応は最も頻用されるクリックケミストリーの一種であり、ヘテロ原子を含む双極子とアルキンまたはアルケンの

間で進行する[3+2]双極子付加環化反応を指す⁸³。反応が発見された当初は反応進行のために加熱が必要であったが、銅触媒の添加により常温で反応が進行することが確認された⁸⁴。さらに、銅触媒の添加により発現する細胞毒性が問題点であったが、アルキン側を歪んだ構造を持つシクロアルキンで代替することにより、毒性を示さず生理的条件下において進行する反応系が確立され、生体内分子の特異的な標識など、生命科学分野において広く用いられるようになった⁸⁵。本研究ではこの Huisgen 環化付加反応によるクリック反応を利用してピルフェニドンの標的因子を捕捉するプローブを作製した。ピルフェニドンは分子量 185.22 の単純な構造を持つ低分子化合物であり、多数の薬理作用点を有することあるいは実際の患者への投与量が 600 mg/日という非常に多い量であることから、特定の標的因子との親和性が弱いと考えられる。このような化合物と相互作用する分子を捉えるため、クリック反応に用いるアジド基を含む、反応性の異なる 2 種類のアジド基を修飾した光誘導性標識プローブを用いた⁸⁶。2 つのアジド基はそれぞれ芳香族性アジドと脂肪族性アジドであり、前者は UV 照射により近傍に存在する標的因子との光誘導性の架橋結合に、後者は機能性分子を付加した(シクロ)アルキンとのクリック反応に供することにより、プローブ分子を介してピルフェニドン標的分子を標識した。その後、特異的な精製と質量分析によりピルフェニドンの標的候補を同定し、標的候補因子の詳細な機能解析を行うことにより、線維化につながる新規分子メカニズムを解明しようと考えた。

本研究は技術的な制約によりこれまで成し遂げられてこなかった、ピルフェニドンが直接作用する分子群の同定を試みた。本研究成果により得られる新規線維化関連因子やシグナル伝達経路についてのさらなる解析は、治療選択肢が不足する IPF に対して新たな創薬シーズを提供することが期待される。

研究材料および実験手法

・ 試薬

試薬は主にナカライテスク株式会社および富士フイルム和光純薬株式会社の製品を使用した。アジドとアルキン間のクリック反応に用いた試薬やキットは vector LABORATORIES 社 (旧 Click Chemistry Tools 社)の製品を用いた。

・ 細胞培養

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549 は帝人ファーマ株式会社より、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T は名古屋大学 生命農学研究科 分子細胞制御学研究室から供与いただいた。ヒト胎児肺線維芽細胞株 WI-38 および MRC-5 は RIKEN Cell Bank から入手した。付着用細胞ディッシュに細胞を播種し、10% FBS (Sigma)、Penicilin-Streptomycin (meiji)を添加した low glucose DMEM (A549, WI-38, HEK293T)または α -MEM (MRC-5)(共にナカライテスク)を用いて CO₂ 濃度 5%、37°Cの環境下で培養した。

・ ピルフェニドンアナログが有する抗線維化活性の評価

ピルフェニドンアナログは名古屋大学大学院 創薬科学研究科 天然物化学研究室に合成いただいた。固体状の化合物を DMSO (Dimethyl sulfoxide)で溶解し、濃度を揃えて使用した。A549 を播種し、5 ng/ml TGF- β (Cell signaling TECHNOLOGY)で処理して線維化を誘導する 2 時間前にピルフェニドン(東京化成工業)あるいは合成したピルフェニドンアナログを培地中に添加した。FavorPrep Tissue Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen)を用いて、細胞から total RNA を取得した。ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA remover (TOYOBO)を用いて逆転写し、Real time PCR system (illumina)を用いて定量 PCR を行った。間葉系マーカーCollagen I (*Coll1*, forward: CCTGCGTGTACCCACTCA, reverse: ACCAGACATGCCTCTTGTCCTT)と上皮系マーカーE-cadherin (*Cdh1*, forward: GAACGCATTGCCACATACAC, reverse: ATTCGGGCTTGTTGTCATTC)を線維化および上皮間葉転換の指標として、GAPDH (*Gapdh*, forward: TGAACGGGAAGCTCACTGG, reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTA)をハウスキーピング遺伝子として標準化に用いることにより、ピルフェニドンアナログの抗線維化活性の評価を行った。

・ 培養細胞中におけるピルフェニドン標的のラベリング

WI-38 を播種した 24 時間後に TGF- β を処理し、線維化を誘導した。12 時間後に A-2 diazido を処理し、さらに 1 時間培養した。競合阻害化合物として用いた A-2 あるいはピルフェニドンは A-2 diazido 処理の 1 時間前に添加し、計 2 時間処理した。培地を除去し、PBS で洗った後、培養ディッシュごと UV crosslinker (analytikjena)に入れ、60,000 μ J/cm²の紫外線を照射し、A-2 diazido と標的因子を光誘導性クロスリンクにより結合させた。冷メタノール/アセトンで細胞を固定し、ビオチン修飾シクロアルキン(WS Biotin DBCO, vector LABORATORIES)を添加してクリック反応させ、ピルフェニドン標的にビオチンを修飾した。細胞を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150

mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, Phosphatase inhibitor cocktail, Protease inhibitor cocktail)で抽出した。

・ピルフェニドン標的分子の細胞内局在の可視化

カバーガラスを置いたディッシュ上で A549 を培養し、細胞に A-2 diazido を処理した後、UV 照射により近傍の標的とクロスリンクさせた。4% PFA を添加し細胞を固定した後、0.2% triton X-100/PBS を加えて、細胞膜の透過処理を行った。カバーガラスを移し、2.5% BSA/PBS でブロッキングした後、1 μ M の WCO Biotin/PBS を 1 時間反応させてピルフェニドンの結合標的因子をクリック反応によりビオチン化した。次に FITC-avidin(東京化成工業)を加えてビオチン化したピルフェニドン標的を FITC で標識し、顕微鏡で蛍光観察を行った。

・ピルフェニドン標的分子の固定化と質量分析サンプル作製

細胞に A-2 diazido を処理した後、UV 照射によりクロスリンクさせ、Urea-based lysis buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4% CHAPS, 1 M NaCl, 8 M Urea, Protease inhibitor cocktail)で抽出し、Bradford protein assay (Bio-rad)でタンパク質濃度を定量した。以下、Click-&-Go Dde Protein Enrichment Kit (vector LABORATORIES)を用い、推奨プロトコルに従ってクリック反応を行い、ピルフェニドン標的因子を磁気ビーズへ固定化した。終濃度 10 mM の DTT で還元し、終濃度 40 mM の IAA でアルキル化を行い、カラムを用いて磁気ビーズを洗浄した。磁気ビーズをシリコナイズドチューブに移し、100 μ L の digestion buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM CaCl₂, 10% acetonitrile)中に 1 μ g の TrypsinGold と 0.2 μ g の Lys-C を加え、37°Cで一晩サーモミキサーC を用いて混ぜながら on-beads digestion を行った。磁気ビーズを分離して消化物が含まれる上清を回収し、monospin C-18 (GL Sciences)を用いて脱塩を行った。

・質量分析および統計的解析によるピルフェニドン標的因子の同定

脱塩後のペプチドサンプルは、名古屋大学 WPI-ITbM 分子構造センターにおいて Q exactive 質量分析計 (Thermo Fischer Scientific)による測定を行った。得られた MS/MS スペクトルデータを Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific, version PD2.5)により処理し、MASCOT (Matrix Science) と SEQUEST HT (Thermo Fisher Scientific)を用いて、ヒトの Swiss-Prot データベースと一致するスペクトルを検索した。

・ピルフェニドン標的因子の発現ベクター

FavorPrep Tissue Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen)を用いて、WI-38 から total RNA を取得した。PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa)を用いて逆転写し、TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (TaKaRa)と、ベクターと 15 残基の相同配列を付加するように設計した各候補遺伝子増幅用のプライマーを混合し、PCR を行った。その後、エタノール沈殿により目的の PCR 産物を回収した。HindIIIと EcoRV (共に LABTAS+)により切断し、線状化した pcDNA3.1 myc-His に、In-Fusion Snap Assembly Master Mix (TaKaRa)を用いてクローニングを行った。

・ 標的候補因子の遺伝子導入による結合性の検証

構築したベクターの導入によるタンパク質発現を確認するため、HEK293T の播種後 24 時間に lipofectamine LTX (Invitrogen)を用いて、プラスミドのトランスフェクションを行った。その 48 時間後に A-2 diazido を処理し、UV 照射によるクロスリンクを行った。SDS based buffer (1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, Protease inhibitor cocktail)で抽出し、Bioruptor で細胞を破碎後、BCA protein assay を行い、タンパク質量を揃えた。残ったアジド基をビオチンで修飾するため、Click-&-Go Protein Reaction Buffer Kit と Biotin Alkyne (共に vector LABORATORIES)を製品プロトコル通りに用いてクリック反応を行った。メタノール/アセトン沈殿によりタンパク質を濃縮した後、BCA assay を行い、タンパク質量を揃えた。この一部を input サンプルとした一方で、一部は MagCapture Tamavidin 2-REV によるアフィニティ精製を行い、クリック反応依存的に付加させたビオチンを有するピルフェニドン標的タンパク質を濃縮し、purified サンプルとした。その後、両サンプルとも SDS サンプル化し、抗 myc 抗体 (nacalai tesque)を用いたイムノブロットティングを行い、精製後サンプルにおける myc タグが付加した標的候補因子の量を比較することにより、ピルフェニドンとの結合性を調べた。

・ 線維芽細胞における RAB11B 過剰発現

NEPA21 エレクトロポレーター (Nepagene)を用いて、MRC-5 への遺伝子導入を行った。播種しておいた MRC-5 をトリプシンで剥がした後、血清を含まない Opti-MEM で 2 回洗浄し、細胞数をカウントした。専用のキュベットに 1×10^6 個の細胞と 10 μ g のプラスミドを加え、以下の条件でエレクトロポレーションを行った。

-Poring Pulse 電圧: 125 V, パルス幅: 10 msec, パルス間隔: 50 msec, 回数: 2 回,
減衰率: 10%, 極性: +

-Transfer Pulse 電圧: 10 V, パルス幅: 2 msec, パルス間隔: 50 msec, 回数: 5 回,
減衰率: 10%, 極性: ±

その後、キュベットに付属するスポイトで丁寧に回収し、抗生物質を含まない α -MEM で 24 時間培養した。TGF- β およびピルフェニドンあるいは A-2 diazido を含む培地に交換し、48 時間後に 1% SDS-RIPA buffer を加えて溶解した。Bioruptor で細胞を破碎し、DC protein assay によりタンパク質量を揃えて SDS サンプル化し、イムノブロットティングを行った。

・ siRNA による RAB11B 発現抑制

播種しておいた MRC-5 をトリプシンで剥がし、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen)を用いて、ヒト RAB11B に対する siRNA (MERCK, Sense: GGCCCGCGCCUUCGCAGAA, Antisense: UUCUGCGAAGGCGCGGGCC)をリバーストランスフェクションした。24 時間後に TGF- β およびピルフェニドンあるいは A-2 diazido を含む培地に交換し、48 時間培養した後に 1% SDS-RIPA buffer を加えて溶解した。Bioruptor で細胞を破碎し、DC protein assay によりタンパク質量を揃えて SDS サンプル化し、イムノブロットティングを行った。

実験結果

ピルフェニドン類縁体プローブの合成と活性評価

二段階の反応により標的分子を捕捉する分子プローブを作製するために、初めにリンカー構造とその修飾部位について評価を行い、その後にアジド基の導入を行った(Fig. 7A)。構造活性相関に基づき、ピルフェニドン骨格を保持した 14 種類のピルフェニドン類縁体化合物(ピルフェニドンアナログ)を合成した(Fig. 7B)。これらは、7 種類のリンカー構造を 2 種類の修飾部位にそれぞれ導入したものである。TGF- β を処理した、肺線維芽細胞株 WI-38 あるいは肺胞上皮細胞株 A549 にこれら候補化合物を処理し、定量 PCR を用いた線維化関連遺伝子(*Coll1a1* (Collagen), *Cdh1* (E-cadherin))の変動を指標に抗線維化活性の評価を行い、各アナログにおける IC50 および EC50 を算出した(Table 9, 10)。なお、DMSO への溶解度が低い化合物、あるいは細胞への添加により顕著な毒性を示した化合物は活性評価を行うことができなかった。WI-38 については TGF- β 処理により誘導された *Coll1a1* の発現上昇に対する各種化合物の抑制作用率のみを指標としたが、A549 についてはピルフェニドンが有する上皮細胞の間葉転換の阻害作用を考え、TGF- β 処理により発現上昇した *Coll1a1* に加えて上皮細胞マーカー *Cdh1* の発現減少に対する各種化合物の抑制作用率を指標として評価した。A549 に対して TGF- β とピルフェニドンを用いたサンプルを標準として比較することにより、各ピルフェニドンアナログの抗線維化活性を解析した。その結果、A-2 が元のピルフェニドンと類似した抗線維化活性を示したため、A-2 の構造を基にプローブ分子の合成に進んだ(Fig. 7C, Table 11)。

選んだ A-2 のリンカー構造の先端のフェニル基に 2 つのアジド基を導入した A-2 diazido をピルフェニドン標的の同定実験に用いるプローブとして取得した(Fig. 5D)。A-2 diazido について A549 を用いて抗線維化活性を調べたところ、ジアジドユニット修飾前の A-2 と同様に Collagen の発現増加と E-cadherin の発現減少の抑制およびコラーゲンタンパク質の蓄積抑制効果を示した(Figs. 7E, F)。以上の結果から、A-2 diazido を標的の同定に用いるピルフェニドン類縁体プローブとして決定し、以降の実験に用いた。

細胞へのプローブ処理による標的因子のラベリング

WI-38 の培養上清に A-2 diazido を処理し、細胞内において A-2 diazido が近接している分子を、UV 照射による芳香族性アジド基との光誘導性クロスリンクにより結合した。その後残った脂肪族性アジド基を、クリック反応によりビオチン修飾シクロアルキンと結合させた(Fig. 8A)。タンパク質の抽出を行った後に、結果的にビオチン標識されたピルフェニドン標的タンパク質を HRP-SA を用いた免疫ブロッティングにより検出した。その結果、A-2 diazido の添加に依存してビオチン化されたピルフェニドン標的を示すシグナルが増加することが確認された(Fig. 8B)。しかしながら、A-2 diazido の処理前に A-2 を処理したサンプルにおいて、特定のバンドの顕著な減少を示すような競合阻害効果は見られなかった。このことから、ピルフェニドンは低い特異性で広範な標的タンパク質に結合すると考えられたため、特定のタンパク質を狙うのではなく網羅的な同定解析と統計的処理により標的の同定を行うこととした。

ピルフェニドン標的タンパク質群の同定解析

プローブが結合する、ピルフェニドン近傍に存在する標的タンパク質を濃縮して質量分析に供するため、光誘導性クロスリンクを行った後、残った芳香族性アジド基をクリック反応によりビオチン化するのではなく、表面にアルキンが修飾された磁気ビーズをクリック反応を行って固定化し、標的分子をプルダウンした(Fig. 9A)。ビーズ上にトリプシンを添加し消化した後、質量分析によりピルフェニドン標的タンパク質の網羅的同定解析を行った。培養上清へのプローブ添加の有無に加え、競合阻害化合物としてアジド基を持たない A-2 と元構造のピルフェニドンをプローブと共処理した 4 群計 12 サンプルから同定解析を行った結果、総計で 6923 個のタンパク質が同定された。しかしながら、全体の同定数からは 2 種類の競合阻害用化合物の添加によるタンパク質同定数の有意な減少は見られなかった(Fig. 9B)。そこで各同定タンパク質の定量値データに基づいて、統計的な解析を行ったところ、A-2 diazido の添加により増加し、2 種類の競合阻害化合物により共に有意に減少した 29 個のタンパク質を同定した(Table. 12)。これら 29 個の標的候補因子には、細胞内酵素や膜タンパク質などの幅広い因子が含まれ、機能や局在などに明確な共通点はなかった。競合阻害を受けた因子群について、GO 解析(cellular component)を行ったところ、membrane や endoplasmic reticulum membrane に局在する傾向が示された(Table. 13)。中でも、同じテトラスパニンファミリーの細胞表面抗原タンパク質である CD81 や CD151 は、肺線維化との関連が報告されている因子であった。

候補因子のピルフェニドン結合性の再検証

競合阻害を示した 29 個の因子に加えて、2 種類の化合物では競合阻害されなかったが A-2 diazido への結合が顕著であった因子について一部を抽出し、結合性の検証を行った。計 40 個の因子について、WI-38 細胞から抽出した total RNA をテンプレートとし、目的遺伝子のクローニングを行った(Table 14)。クローニングした標的候補因子の遺伝子を pcDNA3.1 myc-His ベクターに組み込み、動物細胞におけるタンパク質発現ベクターを作製した。この内、HEK293T 細胞へのトランスフェクションによりタンパク質の発現が確認できた因子について、A-2 diazido を介したビオチンラベリングとアフィニティ精製を用いた結合性の検証実験を行った(Fig. 10A)。標識反応後のアビジン精製前後のサンプルにおける myc タグの発現量を指標として解析を進めた結果、RAB11B は精製後サンプルにおいても myc タグのシグナルが強く表れた。つまり A-2 diazido との結合性が高かったことを示したため、RAB11B が有望なピルフェニドンの標的候補因子であることが示唆された(Fig. 10B)。

RAB11B が持つ肺線維化関連機能の解析

ピルフェニドンとの高い結合性が示唆された RAB11B の発現ベクターを、肺線維芽細胞株 MRC-5 に電ポレーション法により導入し、TGF- β による線維化誘導に対する応答を解析し、線維化関連機能の評価を行った。遺伝子導入後の細胞に TGF- β と A-2 diazido、および競合阻害化合物を同時処理し、線維芽細胞の活性化マーカーである α -SMA の発現を免疫ブロッティングにより確認したところ、RAB11B の過剰発現により α -SMA のシグナルの増大つまり線維芽細胞

が活性化することが示された(Fig. 11A)。また、A-2 diazido の添加により、線維芽細胞の活性化は完全に抑制されたが、ピルフェニドン添加では抑制が見られなかった。

次に、RAB11B の発現を抑制した場合にどのような応答を示すかを解析するために、siRNA による遺伝子ノックダウン実験を行った。同様に siRNA を細胞内にトランスフェクションし、 α -SMA の発現を指標に解析を行ったところ、RAB11B の発現を抑制した場合においても、線維芽細胞の活性化が誘導されることが示された(Fig. 11B)。

考察

本研究では、線維化抑制作用を有するものの、その作用機構が明らかではないピルフェニドンの未知の標的分子を同定することにより、肺線維症の病態理解と新規治療戦略の創出を目指した。

未だ成し遂げられていない、ピルフェニドンの標的同定という難解なテーマに対するアプローチとして、クリックケミストリーを利用して類縁体プローブに標的分子を直接固定化するという研究戦略を取った(Fig. 7A)。この理由は、ピルフェニドンが単純な分子構造を持つために、特定の標的分子との親和性が低いのではないかと推測したことによる。実際に臨床試験や過去の報告から、ピルフェニドンが広範な薬理作用点を有することにより、総合的に抗線維化作用を持つことが示唆され、またその裏返しとして多岐にわたる副作用が生じることが示されている。

催奇形性を有することから大規模な薬害事件に発展した薬剤サリドマイドは、約半世紀に渡ってその表現型の発現メカニズムが解明されていなかったが、2010年にItoらはサリドマイドがセレブロンというタンパク質に結合し、E3ユビキチンリガーゼの特異性を変化させることが催奇形性の原因であると報告した⁸⁷。このときサリドマイドの標的同定のためにとった手法がナノ磁性ビーズへのサリドマイド誘導体の固定化であり、大量の細胞抽出液とサリドマイド固定化磁性ビーズを反応させることでセレブロンを見出した。その後も同様の手法により様々な薬剤ターゲットの単離・同定が行われてきたが、過去の研究報告から、担体にピルフェニドン分子を固定化してピルフェニドンの相互作用分子の探索を試みた実験は失敗に終わっている。サリドマイドの場合はそれほど大きな分子ではないものの、明確に結合して作用する分子があったため、標的の同定に至ったと考えられる。ピルフェニドンはその想定される作用機構から、複数の作用標的因子と弱く相互作用するという仮説の基で、本研究ではピルフェニドンの標的分子をプローブ分子に直接固定化する手法を選択した。

ピルフェニドン分子に、クリック反応によりタグ分子を修飾するためのアジド基と、標的分子を直接捕捉するためのアジド基をそれぞれ導入した分子プローブを用いた。ピルフェニドン分子に直接タグ分子を修飾しなかった理由は、プローブ分子を細胞内で作用させることを想定し、細胞膜を透過できるよう、分子量が過度に大きくならない分子設計を考えたことによる。初めにリンカー構造のみを修飾し、活性評価を行った後にアジド基を追加で付加する戦略で分子プローブの合成を進めた(Fig. 7D)。

最初に、ピルフェニドン骨格を保持する14種類のピルフェニドンアナログを構造活性相関により作製した(Fig. 7B, Table 7)。これら合成した化合物をDMSOに溶解して培養細胞に添加し、活性の評価を行ったが、14種類のうちの半数である、パラ位にリンカーを付加した化合物のうち4種類(B-1, B-5, B-6, B-7)は溶解度が低く、細胞に添加してアッセイを行うことが不可能であった。さらに問題がなく溶解ができた化合物の中にも顕著な細胞毒性を示す化合物があり、最終的に抗線維化作用の評価を行うことができたのは、リンカーをメタ位に修飾したA-2, A-3, A-5, A-6, A-7とパラ位に修飾したB-3の計6化合物であった(Table 8)。これらについて、TGF- β の誘導による肺線維芽細胞株WI-38の活性化抑制作用と肺胞上皮細胞株A549の上皮間葉転換の抑制作用を指標として抗線維化活性を評価した結果、A-2が元の構造に類似した活性を示した(Table 9)。A-2のみで

はなく、他の化合物も元のピルフェニドンと同濃度であるにもかかわらず、より強い抗線維化活性を示すものが多かった。これはリンカー構造の修飾により物性が変化し、元来標的としていた分子により強く結合するようになった、あるいは新しく相互作用する分子ができた結果、抗線維化活性を発揮したことが考えられる。後者であった場合、A-2 由来の分子プローブを用いた標的の同定実験では、本来の目的であるピルフェニドンの標的因子が同定できない可能性が考えられたが、結果的に肺線維化の進行に関わる新規因子を見いだすことに研究の意義があると考えて研究を進めた。ここまでの研究においては、14 種類の化合物を合成し、そのうち 6 種類の抗線維化活性をアッセイすることにより候補化合物を選抜した。これは一般的な構造活性相関による薬効化合物の同定プロセスと比較してかなり少ない候補数である。今後、より多数の候補化合物を検討することにより、ピルフェニドンと同等の活性を持ち、それにより真のピルフェニドン標的分子を捉えることのできる化合物を見出せる可能性が考えられる。今回用いた研究手法により、今後より確度の高いピルフェニドン標的因子を探索していくためには、リンカー構造の異なる複数のプローブ分子を並列して利用することにより標的因子の同定を行い、比較解析を行っていくことが必要になると考える。

上記のように見出した A-2 に、アジド基を 2 つ導入した A-2 diazido を合成した(Fig. 7D)。A-2 diazido は、ピルフェニドンよりも強い抗線維化作用を有することが示された(Figs. 7E, F)。これはアジド基を挿入することにより化合物の極性が変化し、標的因子とのアフィニティに影響を及ぼしたためであると考えられる。しかしながら抗線維化活性は維持しており、溶解度等にも問題がなかったことから、A-2 diazido を用いて、標的タンパク質を標識する実験系の検討を進めた。

当初は先行研究で実施されてきたように、細胞抽出液中に A-2 diazido を添加し、光誘導性反応を進める実験系に取り組んだ。この実験系において、反応体積や化合物濃度を調節することにより、芳香族性アジド基の光誘導性反応に由来する非特異的な結合の少ない条件を探索したが、非特異的な結合と考えられるシグナルが強く、銀染色などにおいて特定のタンパク質が標的になるような結果は得られなかった(データ非掲載)。溶液中のタンパク質濃度が高く、標的となり得るタンパク質とプローブが近接しすぎてしまうことが、本来は標的でない因子との非特異的結合につながる可能性があると考えた。そこで、培養細胞の上清中にプローブを添加し、生細胞内においてプローブ近傍に存在するピルフェニドン標的因子と光クロスリンクさせる実験系の検討を行った(Fig. 8A)。

まず、A-2 diazido が細胞膜を透過し、細胞内に入るかどうかを確かめるため、FITC-avidin を用いて A-2 diazido が付加した標的因子を染色する実験を行った。この実験においては、A-2 diazido の添加に依存して蛍光シグナルが顕著に上昇するような染色像は得られなかったが、A-2 diazido の添加により、細胞内小胞と思われる部分のシグナルが明らかに強調され、細胞内において A-2 diazido の局在が変化していることが示唆された(Supple. Fig. S4)。以上の結果および後の質量分析の結果から、A-2 diazido は細胞膜を透過し、細胞内にて標識反応を行っていると考えられた。

また、真に A-2 diazido が結合する因子を明らかにするため、アジド基を持たない A-2 あるいは元構造のピルフェニドンを、A-2 diazido の処理前にあらかじめ添加することによる競合阻害実験を行った。しかしながら、免疫ブロッティングでは競合阻害化合物の添加による特定のタンパク質に由来するバンドの減弱は見られなかった(Fig. 8B)。これは、アジド基を 2 つ追加したことに

より化合物の極性が変化し、標的とのアフィニティが元の構造よりも強くなったことが原因の一つであると考えられる。しかしながら、細胞抽出液を用いた以前の実験系では競合阻害が見られていたため、培地中に化合物を処理するという実験系の特性上、過剰量の競合阻害化合物を添加することができなかつたことも大きな原因であると考えられる。引き続き A-2 diazido の添加により特異的に検出されるタンパク質も確認できなかつたものの、質量分析サンプルの作製手法として、より生体条件に近い培養上清中への化合物処理を用い、質量分析による網羅的な同定とその後の統計的処理からピルフェニドン標的因子を同定しようと考えた。

A-2 diazido が光誘導性クロスリンクにより捉えたタンパク質のビオチン標識を行うために用いたビオチン-シクロアルキンのクリック反応は特異性が高いと考えられるものの、濃度の高いタンパク質混合物中においてはシクロアルキンがタンパク質中のシステイン残基と反応してしまい、反応の特異性が低下すると考えられる⁸⁸。また、クリック反応後のビオチン-アビジン相互作用による精製においても、非特異的な夾雑物の混入が起こり得ると考えられた。そこでビオチン標識に供していた脂肪族性アジド基を、アルキン修飾された磁気ビーズに対して、直接クリック反応により結合させることにより、標的因子を精製しようと考えた(Fig. 9A)。網羅的な同定解析と、その統計的な解析により候補分子を絞り込むために、A-2 あるいはピルフェニドンの前処理による競合阻害群を含めた 4 群の同定解析を行った。単純な同定数の比較では、競合阻害のサンプルにおいて有意な変化が見られなかつたが、競合阻害が見られないことはイムノブロットングの結果と一致するため想定内であった(Figs. 8B, 9B)。Perseus を用いて統計的に処理を行ったところ、29 個の因子が 2 種類の化合物処理により競合阻害を受けることが示された(Table 10)。しかしながらこれらの因子は機能的あるいは構造的に特徴的な共通点がなく、ピルフェニドン結合の規則性を見出すことは不可能であると考えられた。一方で、共に 29 個の因子に含まれていたテトラスパニンファミリーである CD81 と CD151 は肺線維化への関連が報告されている。CD81 は CD9 と共に細胞膜上で機能を持ち、その二重欠損マウスではマクロファージの異常に起因する肺での強い炎症が見られる⁸⁹。また、CD151 の欠損マウスは肺胞上皮細胞に異常をきたす肺線維化自然発症モデルであることが示されている⁹⁰。これまでの報告によると、これらの因子は発現の低下が肺線維化病態を増悪する方向に進むことが示唆されるが、ピルフェニドンが結合してタンパク質間相互作用を調節することにより、肺線維化に対して抑制的な作用を示す可能性も考えられる。

競合阻害が見られた 29 個の因子に加え、競合阻害は受けなかつたものの、A-2 diazido 単独処理時に有意にスコアが高かつた因子をさらなる解析のために抽出した。これまでに検証は進んでいないものの、この中には LIMS1 や FHL3 など、LIM ドメインという三次構造を有するタンパク質が複数含まれており、ピルフェニドンがこのドメイン構造に結合しやすい可能性も示唆された⁹¹。さらにそれほどスコアは高くなかつたものの、同じ LIM ドメインを含む FHL2 は肺線維化さらにはピルフェニドンとの関与が示唆されており、追って解析を進めたい因子である^{78,92,93}。これら候補因子の発現ベクターを作製するために cDNA クローニングを行い、DNA シーケンスにより目的遺伝子配列の挿入を確認した(データ非掲載)。しかしながら、完成したベクタープラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションしタンパク質発現を確認したところ、半数程度の候補タンパク質において発現が見られなかつた(Table 14)。当初用いた pcDNA3.1 ベクター以外の他の発現ベクターを用いてもタンパク質が発現しない因子が存在したため、本研究においては結合スコア

が良好であった上位候補の全てについて結合性の検証を行うことができなかった。そのため、後の実験で着目した RAB11B 以外にも、ピルフェニドンにより強く結合して肺線維化の進行に関わる因子が存在する可能性は否定できず、今後さらなる検証が必要である。

質量分析により得られた結果について、異なる実験系を用いて再度検証するために、HEK293T 細胞内で候補因子を過剰発現させ、プローブを処理することにより結合性が評価できる実験系を構築した(Fig. 10A)。この実験系において検証を行った約 10 個の候補因子の中で、RAB11B が最も高いピルフェニドンとの結合性を示したため、以降は RAB11B に着目して実験を進めた(Fig. 10B)。また、質量分析の結果において RAB11B よりも高い結合スコアを示した TGFB11I や GSTO1 などの因子は、検証実験においては高い結合性を示さなかったため、この実験系における結果は質量分析の結果と完全には一致しないことが考えられた(データ非掲載)。

RAB11B は RAB ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質であり、GTP と結合した活性型の RAB11B は膜輸送を促進する働きを持つ⁹⁴。RAB ファミリーを構成する 60 種類以上の RAB タンパク質はそれぞれが特異的に膜輸送を制御すると考えられており、RAB タンパク質の機能異常はがんの転移や神経疾患などの疾患に関わることが報告されている^{95,96}。RAB11B はそのアイソフォームである RAB11A に比べて解析が進んでいないが、線維化誘導性サイトカイン TGF- β の受容体の一つである T β RI (TGF- β receptor I)の細胞内リサイクリングを行うことが最近報告されている^{97,98}。ピルフェニドンが RAB11B に結合し、T β RIの機能を阻害して TGF- β シグナルを減弱するとすれば、線維化を抑制し得ると考えた。この仮説を検証するため、肺線維芽細胞株における RAB11B の機能解析を行った。

初めに RAB11B の過剰発現実験を行ったところ、TGF- β の誘導の有無に関わらず α -SMA の発現が上昇した(Fig. 11A)。TGF- β 非添加群においても線維芽細胞の活性化を誘導したために、細胞の状態に関係なく、RAB11B は線維化促進的な機能を持つと考えられた。また、TGF- β の添加の有無に関係なく活性化が見られたことから、RAB11B は仮説として考えられた T β RIのリサイクリング経路ではなく、少なくとも古典的な TGF- β 経路とは独立して線維芽細胞の活性化を誘導する可能性が示唆された。また、線維芽細胞の活性化を抑制した A-2 diazido は、RAB11B の発現量に影響を及ぼさなかった(データ非掲載)。このことから、A-2 diazido は、RAB11B が関与する線維芽細胞活性化経路とは別の作用点において線維化抑制に関わる薬効を持つことが示唆される。

得られた結果から、逆に RAB11B の発現量を低下させれば線維芽細胞の活性化が抑制されるのではないかと考え、siRNA による RAB11B 発現の抑制実験を行った。しかしながら、予想に反して RAB11B の発現が確かに抑制される一方で、 α -SMA の発現は増加していた(Fig. 11B)。RAB11B 内の異なる標的配列を狙った他の siRNA においても同様に RAB11B の発現抑制と α -SMA の発現上昇が確認されており(データ非掲載)、RAB11B のタンパク質の減少もまた、線維芽細胞の活性化につながることを示唆された。これまでに示された RAB11B の線維化促進作用に関わる一連の結果は矛盾しているように考えられる。現時点ではこの矛盾を説明できる追加実験を行うことができていないため、今後より詳細な解析を行うことにより、新規線維化関連因子である RAB11B について理解を深めていく必要がある。また、RAB11B の細胞内の発現量の変動が、線維芽細胞の活性化に影響する分子機構が存在する可能性もある。

今回の実験ではプラスミドを線維芽細胞株にトランスフェクションするためにエレクトロポレーション法を用いた。一般的に線維芽細胞へのプラスミドの導入は困難であると考えられ、実際に通常用いているリポフェクション試薬ではほとんど導入されなかった(データ非掲載)。用いたエレクトロポレーション法においても導入効率自体は良かったものの、細胞内の生存率が極端に悪く、理想的な遺伝子導入ができていないと言いがたい。そのため siRNA のトランスフェクションも含めて、線維芽細胞へのトランスフェクションを最適化して再検証を行う必要がある。理想的な遺伝子導入から得られる実験結果から RAB11B の線維化関連機能について議論を進めたい。また、RAB11B のノックアウト細胞や安定発現細胞あるいは RAB11B トランスジェニックマウスを用いた解析は、今後行いたい研究課題の一つである。

RAB11B とピルフェニドンの結合について、別の角度から検証するため、創薬科学研究科 構造生理学分野 田中康太郎助教に AutoDock Vina を用いたドッキングシミュレーションを行っていただいた。その結果、GDP が外れたアポ状態である RAB11B のグアニンヌクレオシド結合部位に対して、非常に強いアフィニティではないものの、ピルフェニドンが選択性を持って結合する可能性が示唆された(データ非掲載)。このことから、ピルフェニドンがタンパク質相互作用の阻害ではなく、RAB11B の GTPase 活性を阻害して線維化抑制作用を示す可能性が考えられる。今後、ドッキングシミュレーションで得られた知見の正誤を確かめるために、RAB11B の GTPase を検出できる実験系や GTPase 活性を欠損した変異体を用いて、RAB11B の GTPase 活性と線維化関連機能を解析したいと考えている。

本研究では、未だ明らかでない肺線維症治療薬ピルフェニドンの標的因子を探索する実験系を確立し、暫定的ではあるものの、ピルフェニドンの標的となる新規肺線維化関連因子として RAB11B を同定した。この RAB11B についてさらなる解析を行うことにより、RAB11B を標的とした新たな創薬研究に発展する可能性が考えられ、治療選択肢が不足する IPF の新たな治療標的となり得る。先に述べたように、他のピルフェニドン結合候補因子の中にも IPF の治療標的になり得る因子が存在する可能性があり、今後解析を進めていく必要がある。また、今回合成した A-2 diazido などのピルフェニドン類縁体化合物は、元のピルフェニドン分子よりも高い抗線維化作用を示した。これら化合物を人に投与する上では溶解度や毒性の問題は抱えるものの、構造活性相関解析等により元々最適化されて開発されたという経緯ではないピルフェニドンよりも効果の高い新規低分子治療薬が創出できる可能性が示唆された。

本研究では、その相互作用分子の同定を目的とする低分子化合物に 2 つのアジド基を修飾し、2 段階の反応を利用して標的分子を捉える戦略により、標的因子の同定解析を行った。分子内に 2 つのアジド基を持つ化合物を用いた標的の同定については、東京医科歯科大学 細谷研究室からいくつか報告がある^{99,100}。しかしながら、光誘導性反応により芳香族性アジド基を標的分子に結合させた後に、アジド基が修飾された磁気ビーズに結合させる手法による低分子化合物の標的の同定はこれまで報告がない。本研究では予備的な結果であるものの標的の同定に成功しており、相互作用の弱い分子の作用標的の同定のための新しい手法を確立することができたと思う。今後、前述してきたような、確度の高い標的分子を同定するための工夫について検討を進め、ロバストな実験系を確立できれば、ピルフェニドンだけでなく様々な低分子化合物に応用可能である、化合物の標的の同定手法のプラットフォームとなることが期待される。

参考文献

1. Phan, S. H. The Myofibroblast in Pulmonary Fibrosis. *Chest* **122**, 286S-289S (2002).
2. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
3. Yao, C. *et al.* Senescence of Alveolar Type 2 Cells Drives Progressive Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **203**, 707–717 (2021).
4. King, T. E., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* **378**, 1949–1961 (2011).
5. Natsuzaka, M. *et al.* Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 773–779 (2014).
6. Gross, T. J. & Hunninghake, G. W. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **345**, 517–525 (2001).
7. Nakahara, Y. *et al.* Fibroblasts positive for meflin have anti-fibrotic properties in pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* **58**, (2021).
8. Sitaraman, S. *et al.* Proteasome dysfunction in alveolar type 2 epithelial cells is associated with acute respiratory distress syndrome. *Sci Rep* **9**, 1–15 (2019).
9. Wang, J. Y. & Young, L. R. Insights into the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis from Genetic Diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* **67**, 20–35 (2022).
10. Satoh, T. *et al.* Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* **541**, 96–101 (2017).
11. Otaki, N. *et al.* Activation of ILC2s through constitutive IFN γ signaling reduction leads to spontaneous pulmonary fibrosis. *Nature Communications* **2023 14:1** **14**, 1–20 (2023).
12. Glass, D. S. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment. *Clin Respir J* **16**, 84–96 (2022).
13. Koudstaal, T. & Wijsenbeek, M. S. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Presse Med* **52**, (2023).
14. Lorand, L. & Conrad, S. M. Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* **58**, 9–35 (1984).

15. Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:4 **6**, 328–340 (2005).
16. Lorand, L. Crosslinks in blood: transglutaminase and beyond. *FASEB J* **21**, 1627–1632 (2007).
17. Sugimura, Y. *et al.* Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. *J Biol Chem* **281**, 17699–17706 (2006).
18. Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. & Hitomi, K. Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. *Arch Biochem Biophys* **477**, 379–383 (2008).
19. Sugimura, Y. *et al.* Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1-- development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. *FEBS J* **275**, 5667–5677 (2008).
20. Yamane, A. *et al.* Identification of a preferred substrate peptide for transglutaminase 3 and detection of in situ activity in skin and hair follicles. *FEBS Journal* **277**, 3564–3574 (2010).
21. Tatsukawa, H. & Hitomi, K. Role of Transglutaminase 2 in Cell Death, Survival, and Fibrosis. *Cells* **10**, (2021).
22. Zhou, X. *et al.* Impaired proteolysis of collagen I inhibits proliferation of hepatic stellate cells: Implications for regulation of liver fibrosis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 39757–39765 (2006).
23. Kojima, S., Nara, K. & Rifkin, D. B. Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Biol* **121**, 439–448 (1993).
24. Verderio, E. *et al.* Regulation of cell surface tissue transglutaminase: Effects on matrix storage of latent transforming growth factor- β binding protein-1. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**, 1417–1432 (1999).
25. Olsen, K. C. *et al.* Transglutaminase 2 and its role in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 699–707 (2011).
26. Olsen, K. C. *et al.* Inhibition of transglutaminase 2, a novel target for pulmonary fibrosis, by two small electrophilic molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**, 737–747 (2014).
27. Philp, C. J. *et al.* Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **58**, 594–603 (2018).

28. Lorand, L., Parameswaran, K. N. & Velasco, P. T. Sorting-out of acceptor-donor relationships in the transglutaminase-catalyzed cross-linking of crystallins by the enzyme-directed labeling of potential sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 82–83 (1991).
29. Hoffmann, B. R., Annis, D. S. & Mosher, D. F. Reactivity of the N-terminal region of fibronectin protein to transglutaminase 2 and factor XIIIa. *J Biol Chem* **286**, 32220–32230 (2011).
30. Christensen, B. *et al.* Identification of Transglutaminase Reactive Residues in Human Osteopontin and Their Role in Polymerization. *PLoS One* **9**, e113650 (2014).
31. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* **45**, D362–D368 (2017).
32. Doncheva, N. T., Assenov, Y., Domingues, F. S. & Albrecht, M. Topological analysis and interactive visualization of biological networks and protein structures. *Nat Protoc* **7**, 670–685 (2012).
33. Chin, C. H. *et al.* cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol* **8**, 1–7 (2014).
34. O’Shea, J. P. *et al.* PLogo: A probabilistic approach to visualizing sequence motifs. *Nat Methods* **10**, 1211–1212 (2013).
35. Hughes, C. S. *et al.* Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol Syst Biol* **10**, (2014).
36. Wang, Z., Cantrell, L. S. & Schey, K. L. Spatially Resolved Proteomic Analysis of the Lens Extracellular Diffusion Barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **62**, 25–25 (2021).
37. Takeuchi, T. *et al.* Spatially Resolved Identification of Transglutaminase Substrates by Proteomics in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **65**, 319–330 (2021).
38. Tatsukawa, H. *et al.* Role of transglutaminase 2 in liver injury via cross-linking and silencing of transcription factor Sp1. *Gastroenterology* **136**, (2009).
39. Tatsukawa, H., Tani, Y., Otsu, R., Nakagawa, H. & Hitomi, K. Global identification and analysis of isozyme-specific possible substrates crosslinked by transglutaminases using substrate peptides in mouse liver fibrosis. *Sci Rep* **7**, (2017).
40. Tatsukawa, H., Otsu, R., Tani, Y., Wakita, R. & Hitomi, K. Isozyme-specific comprehensive characterization of transglutaminase-crosslinked substrates in kidney fibrosis. *Sci Rep* **8**, (2018).

41. Ito, Y. *et al.* Detection and identification of potential transglutaminase 2 substrates in the mouse renal glomeruli. *Arch Biochem Biophys* **660**, 11–19 (2018).
42. Tatsukawa, H., Takeuchi, T., Shinoda, Y. & Hitomi, K. Identification and characterization of substrates crosslinked by transglutaminases in liver and kidney fibrosis. *Anal Biochem* **604**, (2020).
43. Chen, L., Li, S. & Li, W. LOX/LOXL in pulmonary fibrosis: potential therapeutic targets. *J Drug Target* **27**, 790–796 (2019).
44. Parimon, T., Yao, C., Stripp, B. R., Noble, P. W. & Chen, P. Alveolar Epithelial Type II Cells as Drivers of Lung Fibrosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
45. Wu, H. *et al.* Progressive Pulmonary Fibrosis Is Caused by Elevated Mechanical Tension on Alveolar Stem Cells. *Cell* **180**, 107-121.e17 (2020).
46. Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2003* **4:2** **4**, 140–156 (2003).
47. Ogawa, H. *et al.* Surfactant protein D attenuates sub-epithelial fibrosis in allergic airways disease through TGF- β . *Respir Res* **15**, (2014).
48. Kasper, M., Lackie, P., Haase, M., Schuh, D. & Müller, M. Immunolocalization of cathepsin D in pneumocytes of normal human lung and in pulmonary fibrosis. *Virchows Arch* **428**, 207–215 (1996).
49. Gong, W., Guo, P., Liu, L., Guan, Q. & Yuan, Z. Integrative Analysis of Transcriptome-Wide Association Study and mRNA Expression Profiles Identifies Candidate Genes Associated With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Genet* **11**, (2020).
50. Nikolajsen, C. L., Scavenius, C. & Enghild, J. J. Human complement C3 is a substrate for transglutaminases. A functional link between non-protease-based members of the coagulation and complement cascades. *Biochemistry* **51**, 4735–4742 (2012).
51. Okamoto, T. *et al.* The relationship between complement C3 expression and the MUC5B genotype in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **315**, L1–L10 (2018).
52. Sime, P. J. The antifibrogenic potential of PPARgamma ligands in pulmonary fibrosis. *J Investig Med* **56**, 534–538 (2008).
53. Vluggens, A. *et al.* Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform [corrected]. *Lab Invest* **90**, 696–708 (2010).

54. Sundaram, A., Plumb, R., Appathurai, S. & Mariappan, M. The Sec61 translocon limits IRE1 α signaling during the unfolded protein response. *Elife* **6**, (2017).
55. Burman, A., Tanjore, H. & Blackwell, T. S. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. *Matrix Biol* **68–69**, 355–365 (2018).
56. Troilo, H., Steer, R., Collins, R. F., Kielty, C. M. & Baldock, C. Independent multimerization of Latent TGF β Binding Protein-1 stabilized by cross-linking and enhanced by heparan sulfate. *Scientific Reports* *2016 6:1* **6**, 1–11 (2016).
57. Lockhart-Cairns, M. P. *et al.* Latent TGF β complexes are transglutaminase cross-linked to fibrillin to facilitate TGF β activation. *Matrix Biology* **107**, 24–39 (2022).
58. de Vos, I. J. H. M. *et al.* The novel zebrafish model pretzel demonstrates a central role for SH3PXD2B in defective collagen remodelling and fibrosis in frank-ter haar syndrome. *Biol Open* **9**, (2020).
59. Hui, S. T. *et al.* Role of Matrix Gla Protein in Transforming Growth Factor- β Signaling and Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **16**, 943–960 (2023).
60. Bendixen, E., Borth, W. & Harpel, P. C. Transglutaminases catalyze cross-linking of plasminogen to fibronectin and human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 21962–21967 (1993).
61. Schuppan, D. *et al.* A Randomized Trial of a Transglutaminase 2 Inhibitor for Celiac Disease. *N Engl J Med* **385**, 35–45 (2021).
62. Isola, J. *et al.* The Oral Transglutaminase 2 Inhibitor ZED1227 Accumulates in the Villous Enterocytes in Celiac Disease Patients during Gluten Challenge and Drug Treatment. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
63. Shinoda, Y. *et al.* Tissue transglutaminase exacerbates renal fibrosis via alternative activation of monocyte-derived macrophages. *Cell Death Dis* **14**, (2023).
64. Farrelly, L. A. *et al.* Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature* *2019 567:7749* **567**, 535–539 (2019).
65. Spagnolo, P. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development. *Pharmacol Ther* **222**, 107798 (2021).
66. Wollin, L. *et al.* Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* **45**, 1434–1445 (2015).

67. Taniguchi, H. *et al.* Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **35**, 821–829 (2010).
68. Schelegle, E. S., Mansoor, J. K. & Giri, S. Pirfenidone attenuates bleomycin-induced changes in pulmonary functions in hamsters. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **216**, 392–397 (1997).
69. Tada, S. *et al.* Pirfenidone inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 522–527 (2001).
70. Shimizu, T. *et al.* Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int* **54**, 99–109 (1998).
71. Iyer, S. N., Gurujeyalakshmi, G. & Giri, S. N. Effects of Pirfenidone on Transforming Growth Factor-Gene Expression at the Transcriptional Level in Bleomycin Hamster Model of Lung Fibrosis 1. (1999).
72. Conte, E. *et al.* Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**, 13–19 (2014).
73. G, R., KJ, A., TE, K., JA, L. & FJ, M. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **366**, 1968–1977 (2012).
74. Lancaster, L. *et al.* Safety of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: Integrated analysis of cumulative data from 5 clinical trials. *BMJ Open Respir Res* **3**, 105 (2016).
75. Lancaster, L. H. *et al.* Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* **26**, (2017).
76. Iyer, S. N., Gurujeyalakshmi, G. & Giri, S. N. Effects of Pirfenidone on Procollagen Gene Expression at the Transcriptional Level in Bleomycin Hamster Model of Lung Fibrosis 1. (1999).
77. Kakugawa, T. *et al.* Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **24**, 57–65 (2004).
78. Bauer, Y. *et al.* A novel genomic signature with translational significance for human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **52**, 217–231 (2015).

79. Ma, H. Y. *et al.* Inhibition of MRTF activation as a clinically achievable anti-fibrotic mechanism for pirfenidone. *Eur Respir J* **61**, (2023).
80. Bertozzi, C. R. & Kiessling, L. L. Chemical glycobiology. *Science (1979)* **291**, 2357–2364 (2001).
81. Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* **8**, 1128–1137 (2003).
82. Zaia, J. The 2022 Nobel Prize in Chemistry for the development of click chemistry and bioorthogonal chemistry. *Anal Bioanal Chem* **415**, 527–532 (2023).
83. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English* **2**, 565–598 (1963).
84. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective ‘ligation’ of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie - International Edition* **41**, 2596–2599 (2002).
85. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc* **126**, 15046–15047 (2004).
86. Hosoya, T. *et al.* Novel bifunctional probe for radioisotope-free photoaffinity labeling: Compact structure comprised of photospecific ligand ligation and detectable tag anchoring units. *Org Biomol Chem* **2**, 637–641 (2004).
87. Ito, T. *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **327**, 1345–1350 (2010).
88. Van Geel, R., Pruijn, G. J. M., Van Delft, F. L. & Boelens, W. C. Preventing thiol-yne addition improves the specificity of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *Bioconjug Chem* **23**, 392–398 (2012).
89. Takeda, Y. *et al.* Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J Biol Chem* **283**, 26089–26097 (2008).
90. Tsujino, K. *et al.* Tetraspanin CD151 protects against pulmonary fibrosis by maintaining epithelial integrity. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 170–180 (2012).

91. Kadrmas, J. L. & Beckerle, M. C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004 5:11 **5**, 920–931 (2004).
92. Jin, J. *et al.* Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- β 1. *Respir Res* **20**, (2019).
93. Shi, M., Cui, H., Shi, J. & Mei, Y. Silencing FHL2 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis through the TGF- β 1/Smad signaling pathway. *Exp Cell Res* **423**, 113470 (2023).
94. Zulkefli, K. L., Houghton, F. J., Gosavi, P. & Gleeson, P. A. A role for Rab11 in the homeostasis of the endosome-lysosomal pathway. *Exp Cell Res* **380**, 55–68 (2019).
95. Dozynkiewicz, M. A. *et al.* Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev Cell* **22**, 131–145 (2012).
96. Jeong, G. R. *et al.* Dysregulated phosphorylation of Rab GTPases by LRRK2 induces neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **13**, 1–17 (2018).
97. Mitchell, H., Choudhury, A., Pagano, R. E. & Leof, E. B. Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11. *Mol Biol Cell* **15**, 4166–4178 (2004).
98. Huang, S. *et al.* Asporin Promotes TGF- β -induced Lung Myofibroblast Differentiation by Facilitating Rab11-Dependent Recycling of T β RI. *Am J Respir Cell Mol Biol* **66**, 158–170 (2022).
99. Kii, I. *et al.* Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. *Org Biomol Chem* **8**, 4051–4055 (2010).
100. Kohta, R. *et al.* 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline binds with tubulin β , a substrate of parkin, and reduces its polyubiquitination. *J Neurochem* **114**, 1291–1301 (2010).

Publication list

- I. **“Spatially Resolved Identification of Transglutaminase Substrates by Proteomics in Pulmonary Fibrosis”**, Taishu Takeuchi, Hideki Tatsukawa, Yoshiki Shinoda, Keiko Kuwata, Miyuki Nishiga, Hiroshi Takahashi, Naoki Hase, Kiyotaka Hitomi, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 65(3) 319-330 (2021)
- II. **“Identification and characterization of substrates crosslinked by transglutaminases in liver and kidney fibrosis”**, Hideki Tatsukawa, Taishu Takeuchi, Yoshiki Shinoda, Kiyotaka Hitomi, *Analytical Biochemistry*, 604 113629-113629 (2020)
- III. **“Tissue transglutaminase exacerbates renal fibrosis via alternative activation of monocyte-derived macrophages”**, Yoshiki Shinoda, Hideki Tatsukawa, Atsushi Yonaga, Ryosuke Wakita, Taishu Takeuchi, Tokuji Tsuji, Miyako Tanaka, Takayoshi Suganami, Kiyotaka Hitomi, *Cell Death & Disease* 14(2) (2023)

謝辞

本研究を進めるにあたり、素晴らしい研究環境を与えていただくと共に、研究内容の議論にとどまらず、日頃から多くのご指導を賜りました人見清隆教授、辰川英樹助教に深く御礼申し上げます。また、研究方針や実験手法等について大変有意義なご助言をいただきました辻徳治助教や手島裕文さん、篠田祥希さんをはじめとする先輩方にも大変感謝しております。

帝人ファーマ株式会社 高橋広さん、西賀美幸さんには、肺線維化モデルマウス作製のためのブレオマイシンの投与方法や組織染色標本の作製方法など、私の研究の礎となる手技について懇切丁寧に教えていただきました。

名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所 分子構造センター 三城恵美特任講師、加納圭子技術員、佐藤伸弥技術員、桑田啓子前特任講師には、質量分析による解析を行っていただくと共に、実験条件等について懇切丁寧なご指導・助言をいただき、多くの勉強をさせていただきました。

創薬科学研究科 天然物化学分野 横島聡教授、西山義剛前助教にはピルフェニドン類縁体化合物の合成をしていただくと共に、反応系での問題点について多大なるご助言を頂きました。

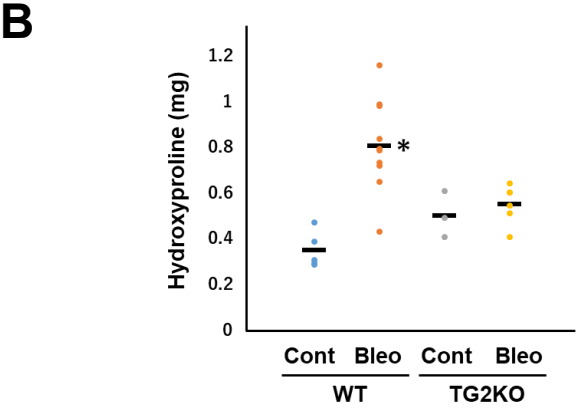
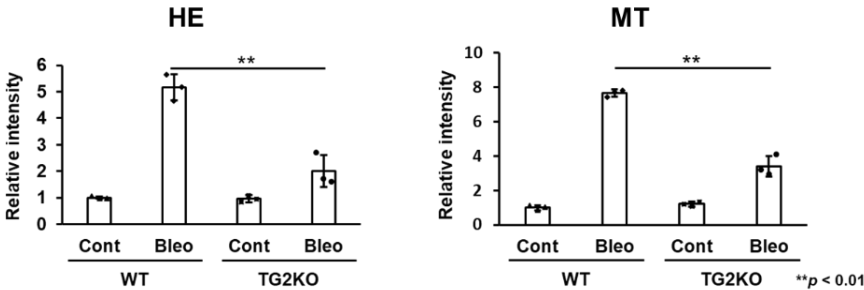
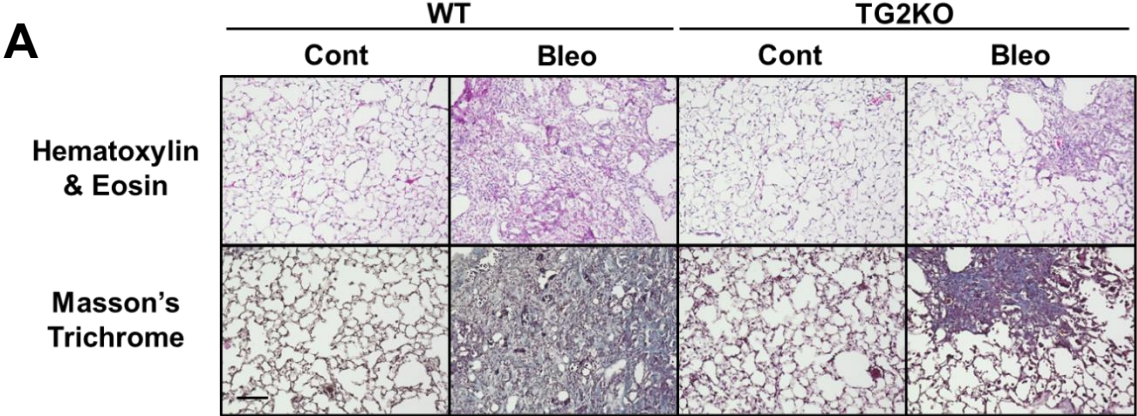
本研究に多大なる貢献をいただいた先生方に深く感謝申し上げます。

また、卓越大学院プログラム GTR の活動においてダブルメンターとしてお世話になりました横島聡教授、研究プロポーザルの際に審査員としてご助言を頂きました創薬科学研究科 細胞薬効解析学分野 小坂田文隆教授、生命農学研究科 栄養生化学研究室 小田裕昭教授、そしてプログラムの運営に携わっていただいた GTR 学生支援室の皆様我心から感謝申し上げます。

最後に、細胞生化学研究室の皆さんのおかげで大変有意義な大学院生活を送ることができました。6年間お世話になった Meng Qi さんをはじめとする同期のみなさん、いつも研究室を支えてくださる渡邊優子博士、そして先生方、先輩・後輩のみなさんには日頃より多くのことを学ばせていただくと共に普段から仲良くしていただき、自分にとって研究生活の大きな支えとなりました。

お世話になりました全ての方々に心より感謝を述べさせていただきます、ありがとうございました。

Figures & Tables



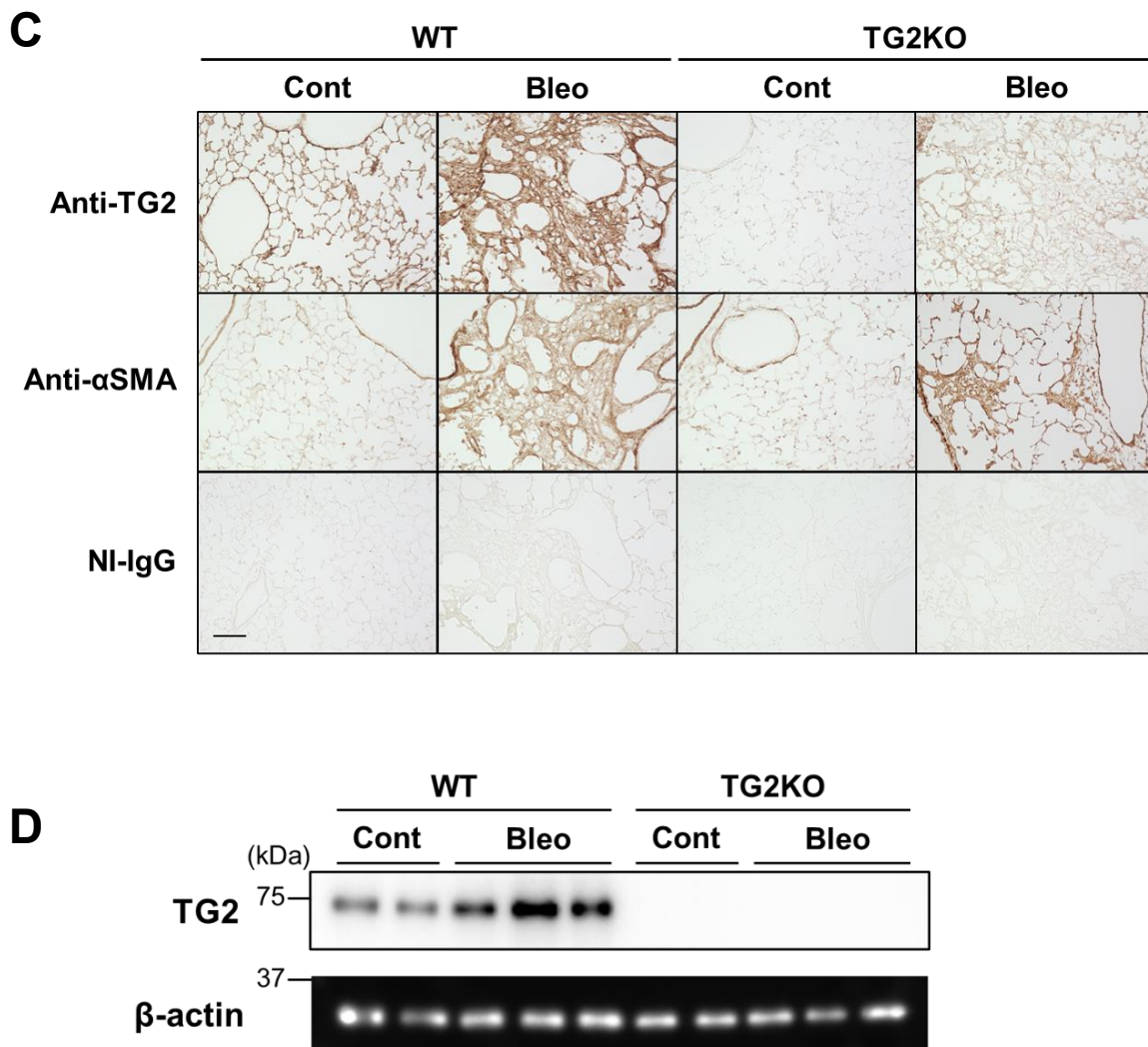


Fig. 1 肺線維化モデルマウスの病態評価

- A. パラフィン包埋した肺組織から薄切した組織切片を用いて、核を青紫色に染めるヘマトキシリンと細胞質を赤色に染めるエオジンをを用いた HE 染色およびコラーゲンなどの線維性タンパク質を青色に染色する MT 染色により、組織構造を可視化し線維化の評価を行った。グラフは染色領域を ImageJ により定量化したものを示す。Scale bar = 100 μ m.
- B. 組織中に含まれる総コラーゲン量をハイドロキシプロリン定量により測定した。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-tailed Student's t-test.
- C. 固定した肺組織切片を用いて、TG2 と線維化亢進に関わる筋線維芽細胞のマーカである α -SMA の抗体で免疫染色を行った。Scale bar = 100 μ m.
- D. 肺組織抽出液を用いてイムノブロッティングを行った。

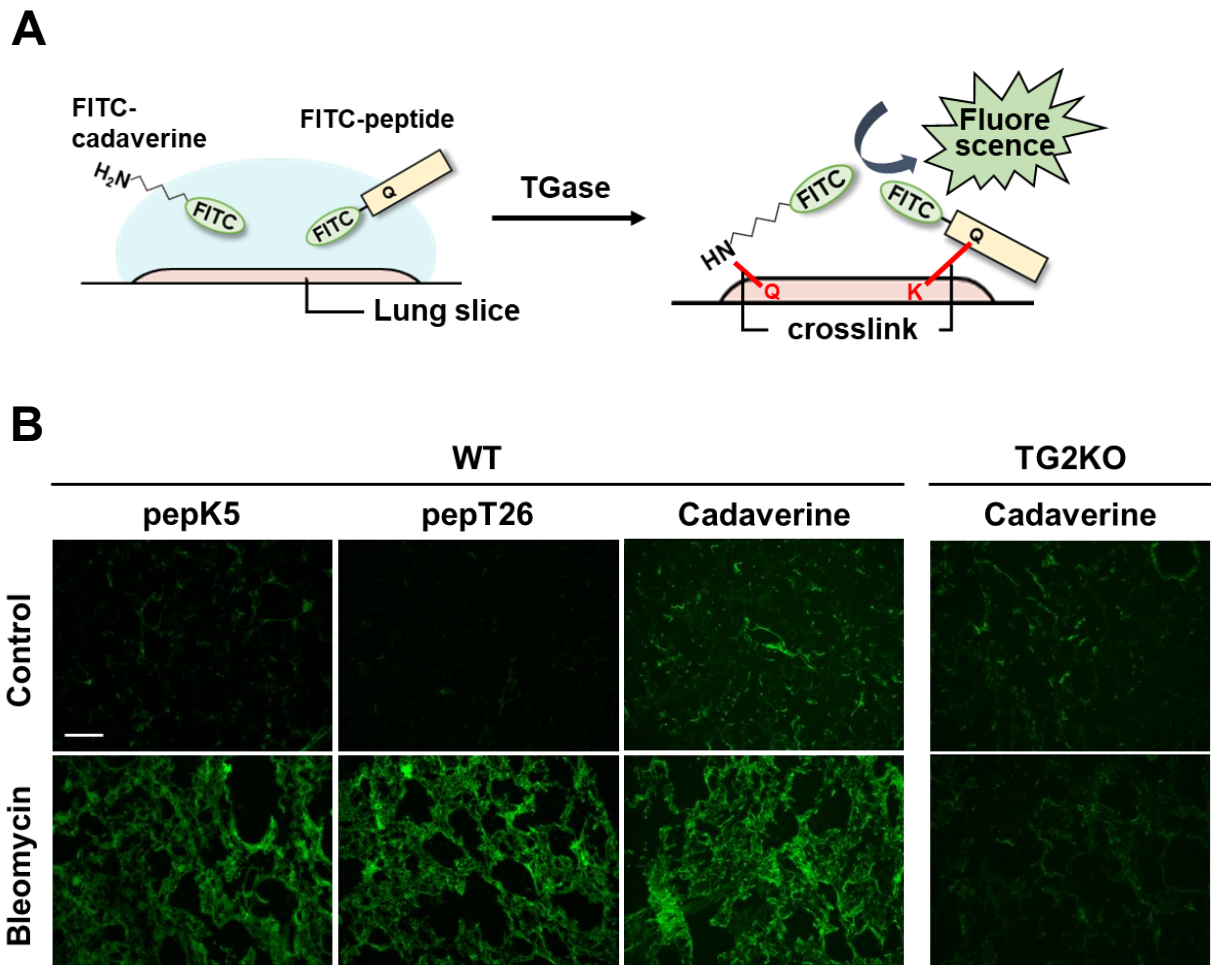
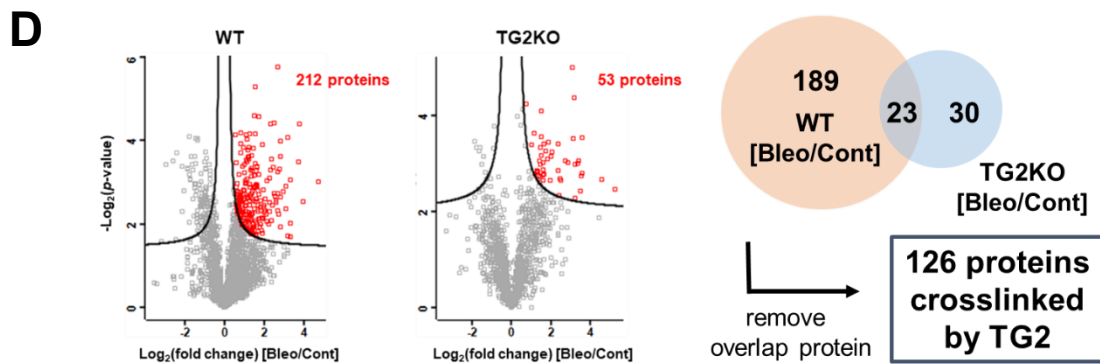
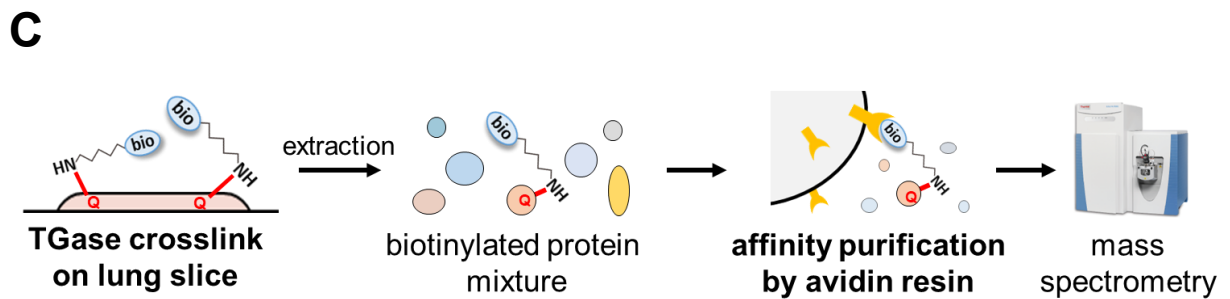
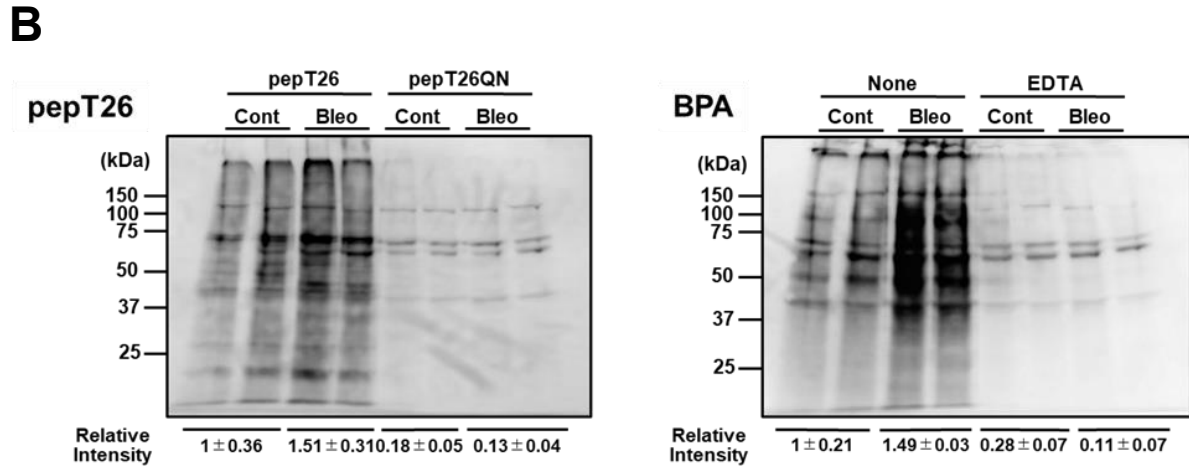
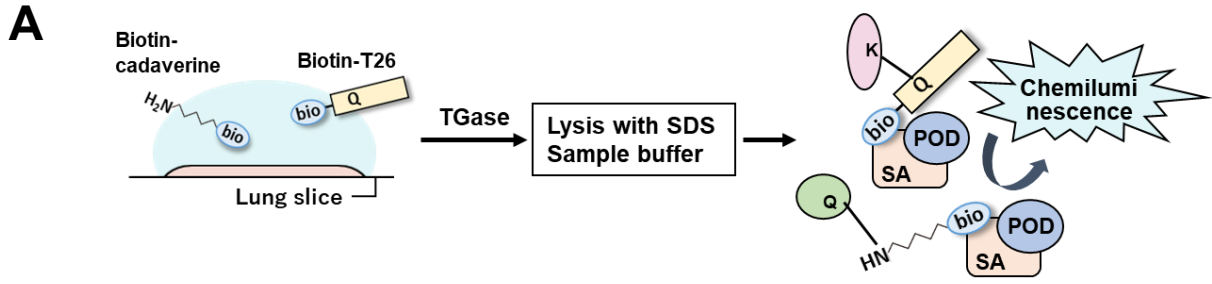


Fig. 2 TGase 活性の可視化

A. 未固定の肺組織切片上に蛍光標識したプローブを含む反応液を添加して架橋させ、蛍光強度を指標に TGase 活性の可視化を行った。pepK5 は TG1 に、pepT26 は TG2 に特異的な高反応性基質配列であり、cadaverine は TGase アイソザイム非特異的な基質分子である。

B. TGase 活性により蛍光プローブが架橋されると、緑色蛍光を呈する。Scale bar = 100 μ m.



E

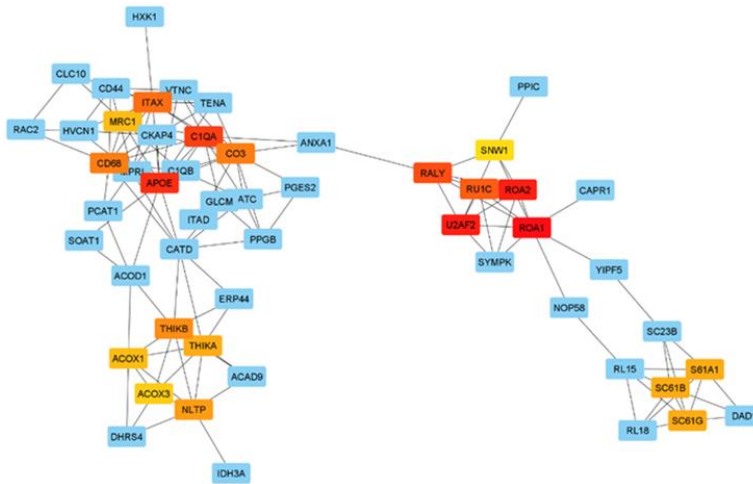


Fig. 3 TG2 基質タンパク質の同定解析

- A. ビオチン標識した基質ペプチド(pepT26)あるいは一級アミン(BPA)を肺組織切片上で架橋させ、溶出した後に HRP-SA により架橋産物を検出した。ネガティブコントロールとして、pepT26 に対しては配列中のグルタミン残基をアスパラギンに置換した pepT26QN、BPA を架橋させる反応系では、カルシウムイオンキレーターである EDTA を反応前に加えた。
- B. 溶出したサンプルを用いてイムノブロットィングを行い、HRP-SA によりビオチン化した活架橋産物を検出した。下部にはシグナル強度を ImageJ により定量化したものを示す。
- C. 切片上で BPA を架橋させた後、アフィニティ精製により TGase 基質タンパク質を濃縮し、質量分析により網羅的な同定解析を行った。
- D. WT と TG2KO それぞれにおいて線維化誘導群で増加した因子を統計的に抽出し、重複した因子を除いて TG2 依存的に架橋される基質タンパク質を同定した。
- E. 基質タンパク質群において、Cytoscape 内の cytoHubba プラグインを用いてタンパク質間相互作用を可視化した。上位 20 個のハブタンパク質において MCC(maximum correlation criterion)のレベルを高(赤色)~低(黄色)で示した。

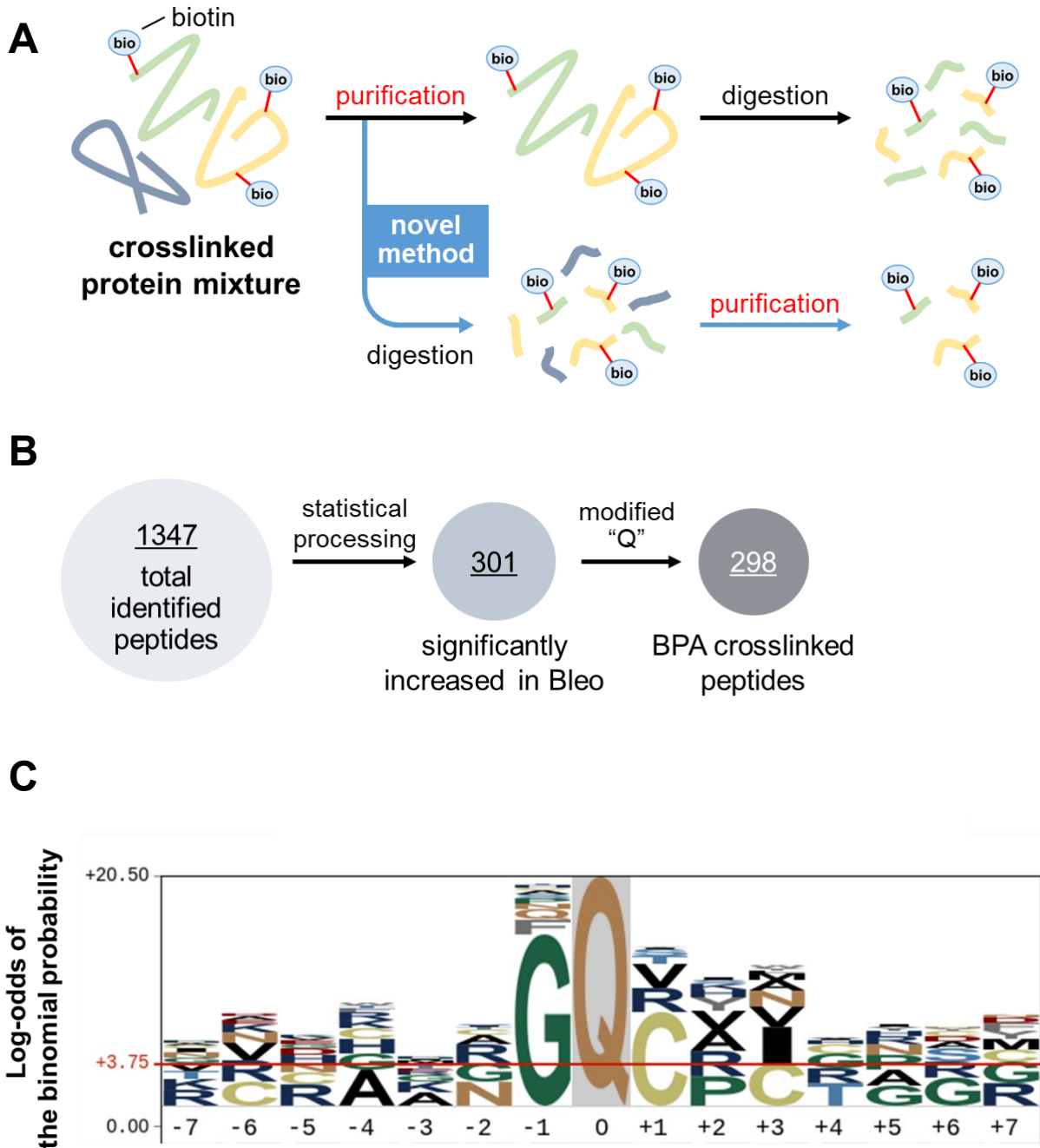


Fig. 4 TG2 が架橋するアミノ酸残基の網羅的同一

- A. 切片上でBPAを架橋させ、抽出したタンパク質を先にトリプシン消化してから精製する新手法を示す。
- B. 全同定ペプチド配列の中から、TG2依存的に線維化誘導群で増加したペプチドを統計的に抽出し、さらにその中からグルタミン残基が修飾されたペプチドのみを選び出した。
- C. 298個のBPA修飾ペプチドについて、架橋されるグルタミン残基周辺の配列モチーフについてpLogoを用いて視覚化した。

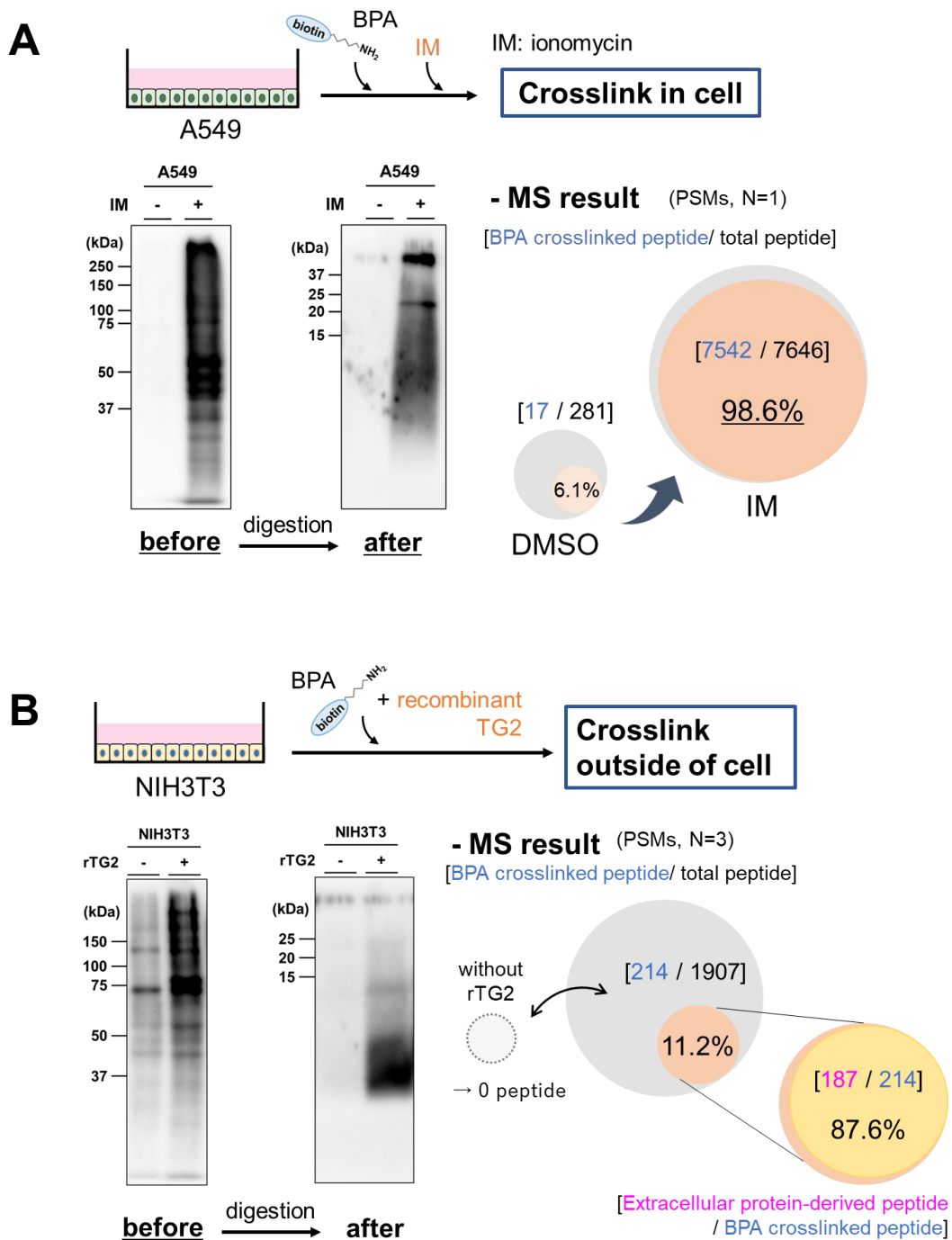


Fig. 5 生細胞において TGase が架橋する基質ペプチドの網羅的同定解析

A. イオノマイシンを添加して、A549 細胞内における架橋反応を促進した。HRP-SA を用いたイムノブロッティングと質量分析の結果を示す。

B. リコンビナント TG2(rTG2)を添加して、NIH3T3 細胞外における架橋反応を促進した。HRP-SA を用いたイムノブロッティングと質量分析の結果を示す。

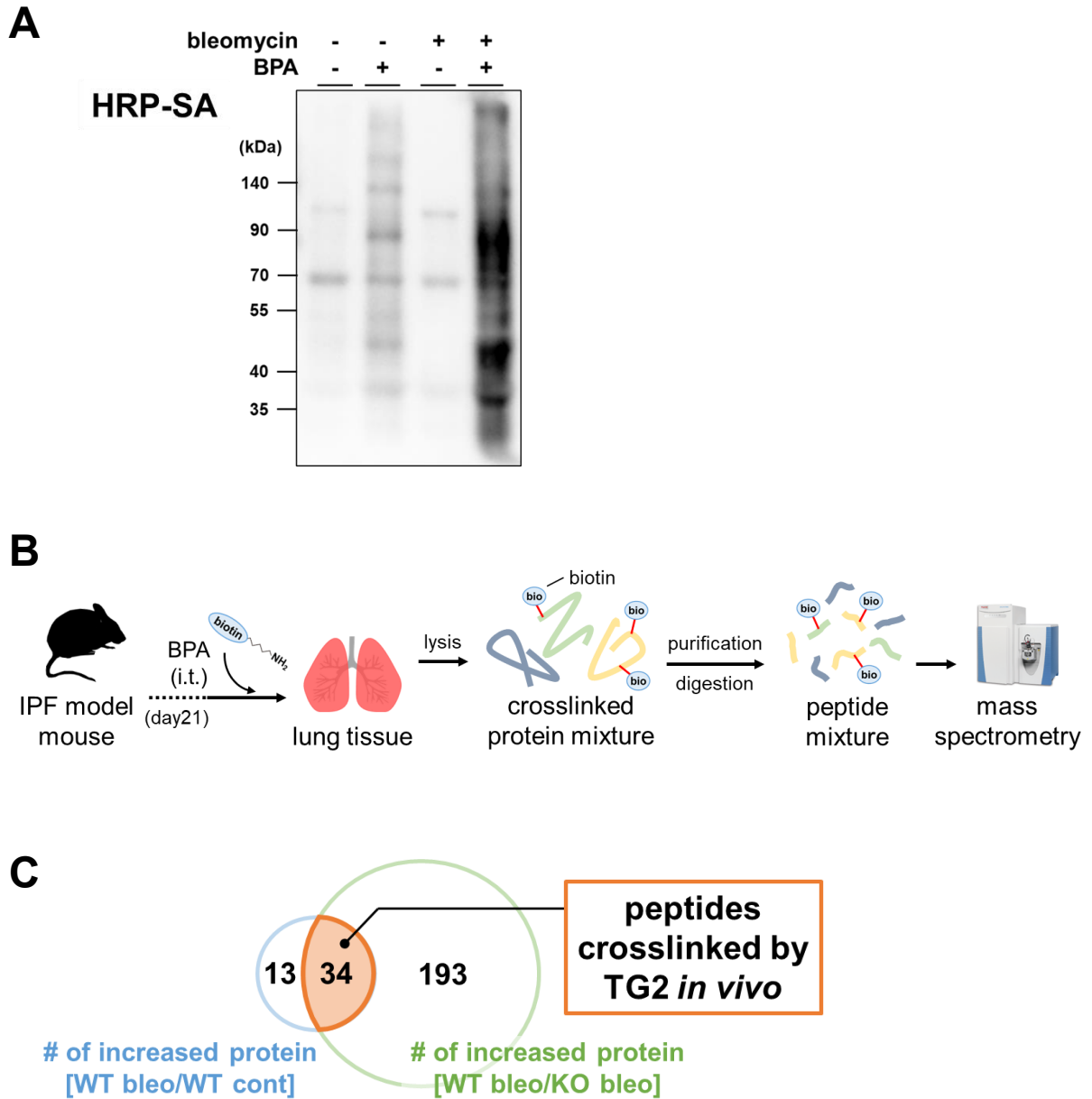
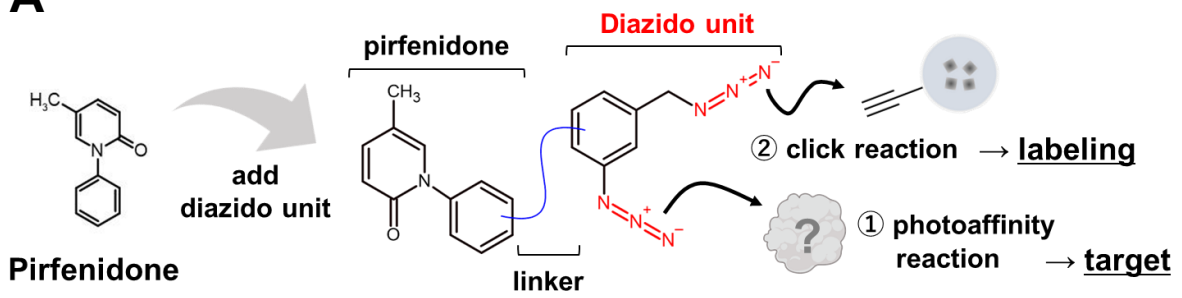
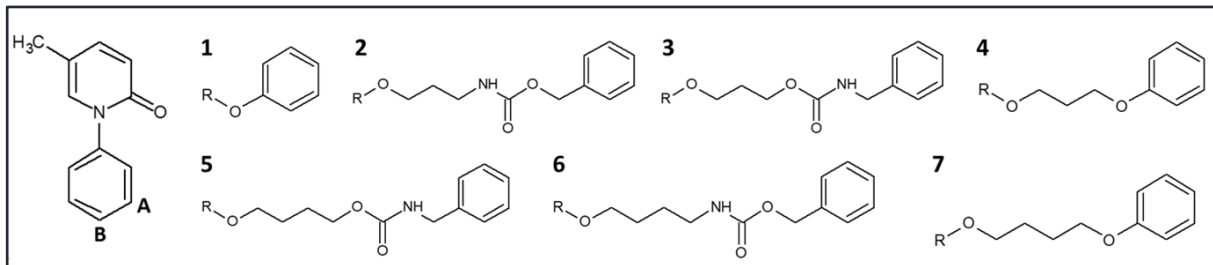
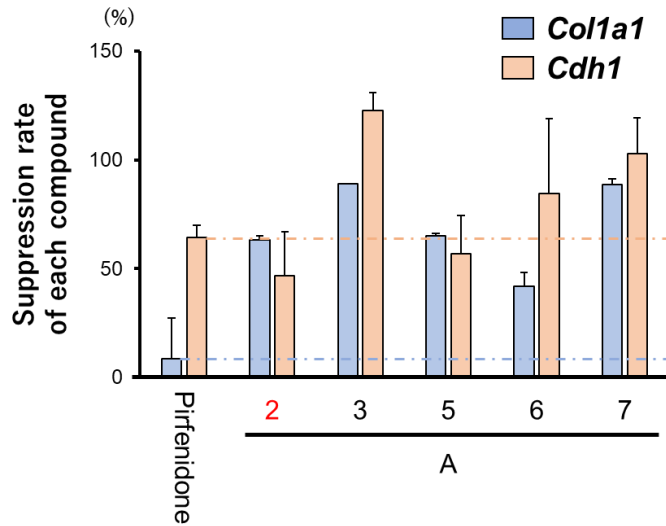
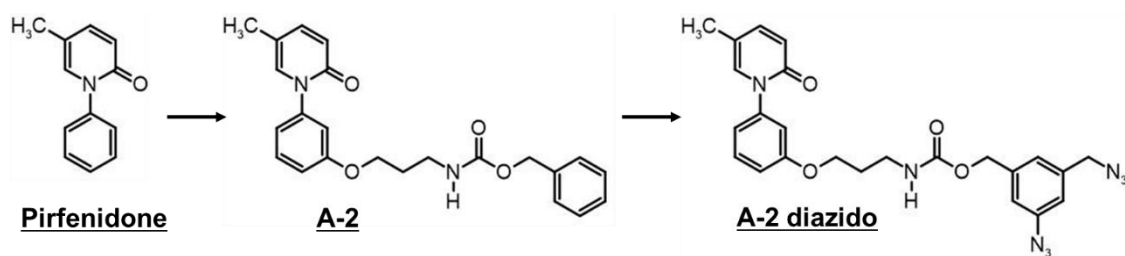


Fig. 6 肺線維化マウス生体内で架橋された基質分子の解析

- A. 肺線維化マウスの気道内に BPA を投与し架橋反応させ、HRP-SA を用いたイムノブロッティングにより、架橋産物の量を評価した。
- B. マウス肺組織内で BPA を架橋修飾し、架橋されたペプチドを同定解析するフローを示す。
- C. WT の肺線維化群対 WT のコントロール群および WT の肺線維化群対 KO の肺線維化群でそれぞれ増加を示したペプチドの共通部分を、マウス生体内で肺線維化に伴って TG2 により架橋されるペプチド配列とした。

A**B****C****D**

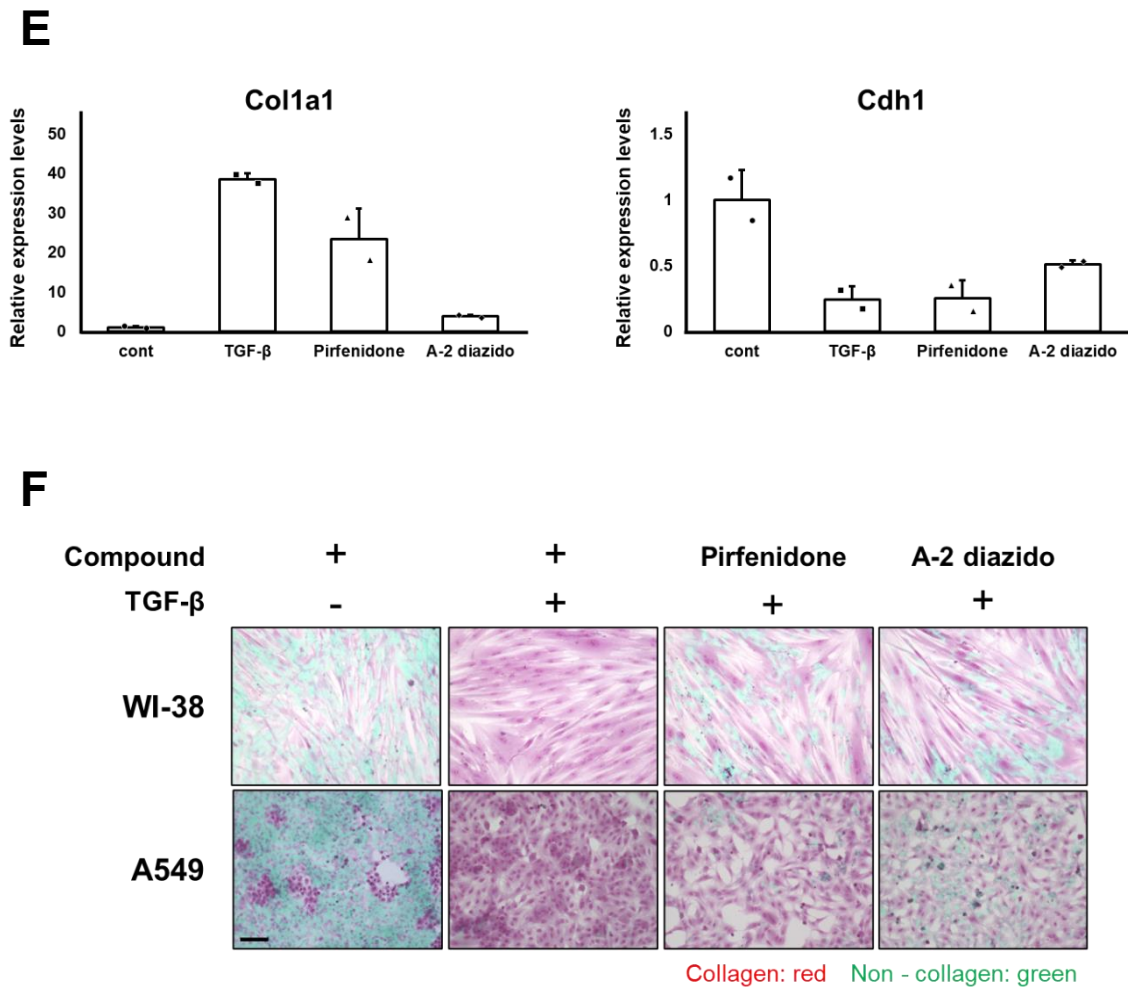


Fig. 7 ピルフェニドン類縁体プローブの合成と活性評価

- A. ピルフェニドン類縁体プローブを用いた標的因子同定の概略を示す。
- B. 合成した 14 種類の化合物の構造を示す。A(メタ位)と B(パラ位)にそれぞれ 1 から 7 の異なる構造を持つリンカーを修飾した。
- C. 溶解した A-2, A-3, A-5, A-6, A-7 を A549 細胞に処理し、定量 PCR により遺伝子変動を解析し、抗線維化活性の評価を行った。TGF- β を単独処置したときを基準(0%)とし、各化合物の薬効により発現減少した Collagen および発現上昇した E-cadherin の値を棒グラフに示した。
- D. ジアジドユニットを修飾したピルフェニドン類縁体プローブの合成フローを示す。抗線維化活性により選んだ A-2(中央図)に 2 つのアジド基を修飾し、A-2 diazido(右図)を合成した。
- E. 定量 PCR によりジアジドユニットを付加した A-2 diazido の抗線維化活性を評価した。
- F. WI-38 と A549 の 2 種類の細胞に対してピルフェニドンと A-2 diazido が示す抗線維化活性についてシリウスレッド染色で評価した。赤色はコラーゲン線維、緑色は細胞などの非コラーゲン領域を示す。Scale bar = 50 μ m.

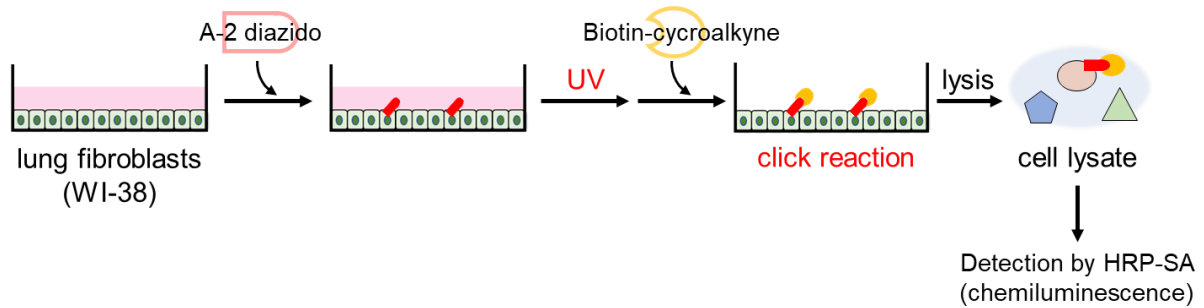
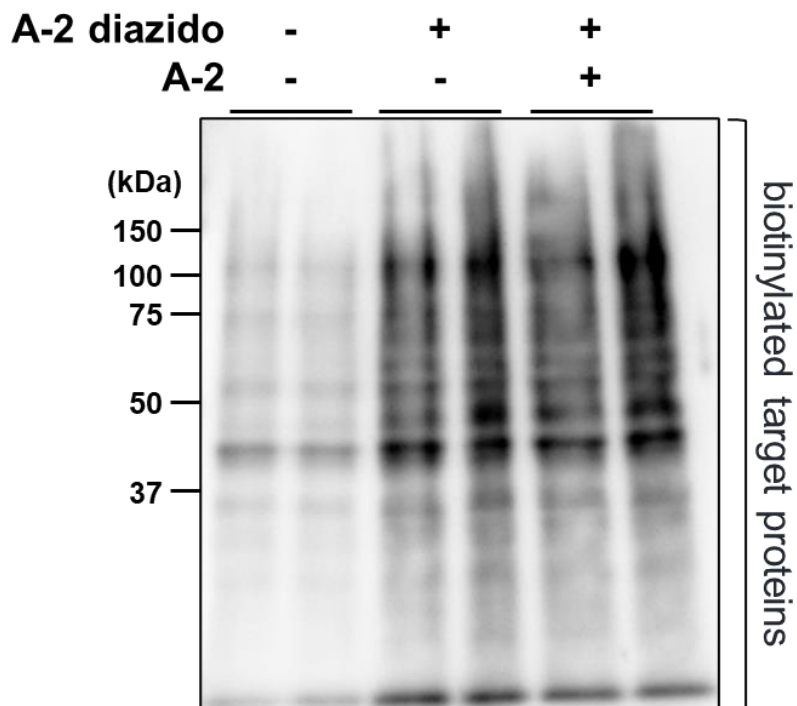
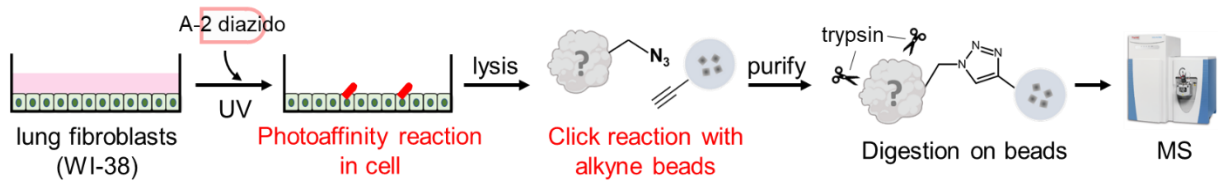
A**B**

Fig. 8 細胞中におけるピルフェニドン標的分子のラベリング

- A. 標的分子のラベリング手法の概略を示す。培養上清に A-2 diazido を処理し、UV 照射による光誘導性クロスリンクを行い、次にビオチン化シクロアルキンとのクリック反応を行った。
- B. A によりビオチン化したピルフェニドン標的タンパク質を HRP-SA を用いたイムノブロットイングにより評価した。アジド基を持たない A-2 を事前に処理することにより、競合阻害について検討した。

A**B**

Identified proteins (N=3)

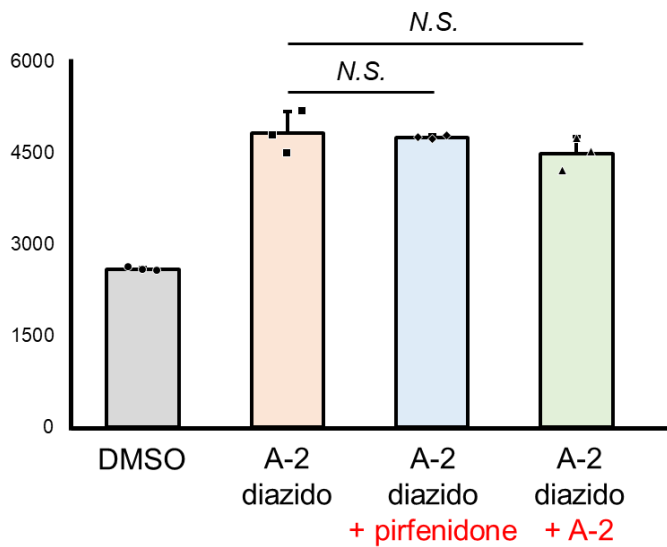
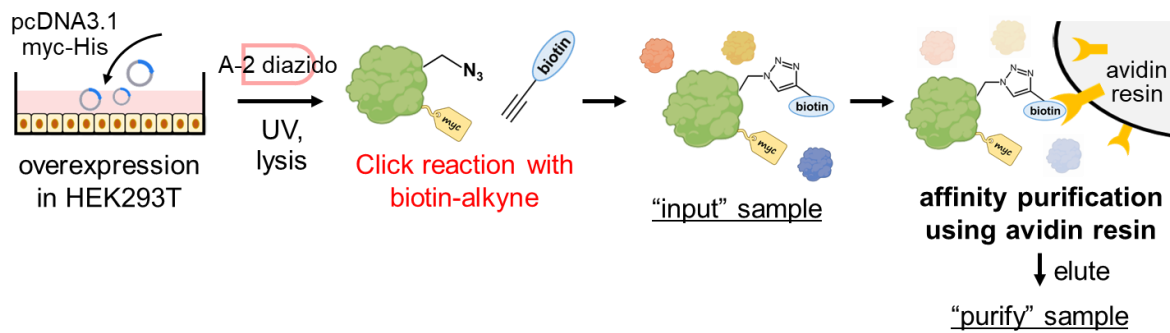
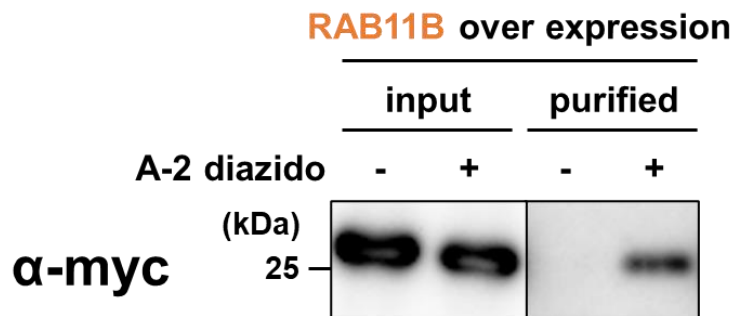


Fig. 9 細胞中におけるピルフェニドン標的分子のラベリング

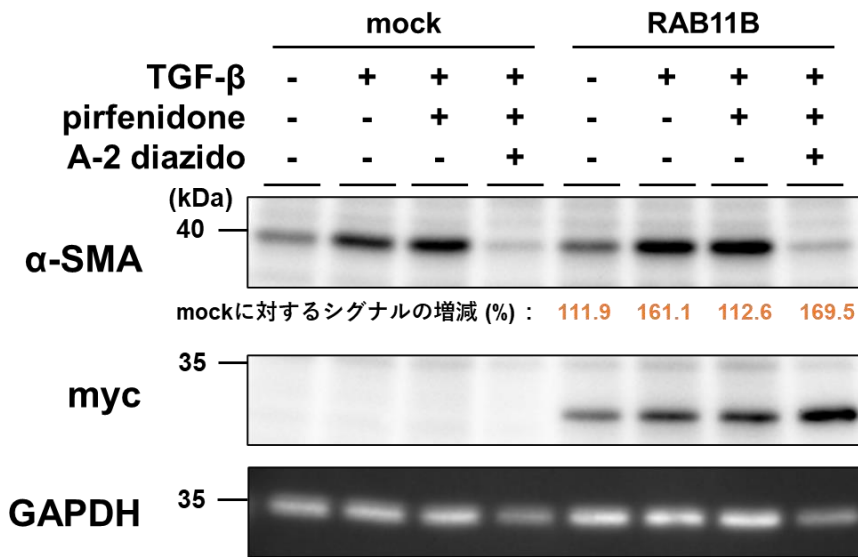
A. Fig. 8a と同様に WI-38 中で A-2 diazido を反応させ、光誘導性クロスリンクを行った後で抽出し、アルキン修飾ビーズとクリック反応を行った。磁気分離によりプルダウンし、質量分析による同定解析を行った。

B. 同定されたタンパク質数を棒グラフに示した。

A**B****Fig. 10 細胞中におけるピルフェニドン標的分子のラベリング**

- A. 標的候補因子の発現ベクターを用いたピルフェニドン結合性の検証実験のフローを示す。各候補因子はC末端に myc タグが付加されている。標識反応後のアビジン精製の前後で、ピルフェニドン標的であるビオチン化タンパク質の中に、myc タグが付加した候補因子がどれだけ含まれるかを解析した。
- B. 候補の一つである RAB11B を過剰発現させた場合のイムノブロットティングの結果を示す。

A



B

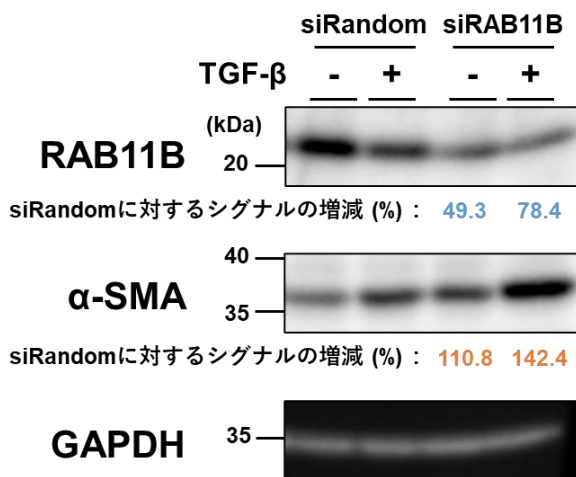


Fig. 11 RAB11B の高発現あるいは発現抑制による線維化への影響

- A. エレクトロポレーション法により MRC-5 に RAB11B 発現ベクターを導入し、TGF- β による線維化誘導と化合物の添加による抗線維化活性について免疫ブロッティングにより評価した。 α -SMA のバンド強度を ImageJ で定量した結果を図の下部に示す。値は GAPDH のバンド強度により標準化した。
- B. siRNA を MRC-5 に導入し、TGF- β による線維化誘導と化合物の添加による抗線維化活性について免疫ブロッティングにより評価した。RAB11B および α -SMA のバンド強度を ImageJ で定量した結果を図の下部に示す。値は GAPDH のバンド強度により標準化した。

Table. 1 TG2 依存的に架橋される上位 30 個の基質タンパク質

UniProt Name	Description	Fold change [Bleo/Cont] (Log2)	p-value (-Log10)
CATD	Cathepsin D	4.73	3.01
THIKB	3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal	3.96	2.52
CD68	Macrosialin	3.79	4.4
SFTPD	Pulmonary surfactant-associated protein D	3.76	3.49
THIKA	3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	3.31	1.69
HB23	H-2 class II histocompatibility antigen, E-S beta chain	3.1	2.9
GT251	Procollagen galactosyltransferase 1	2.97	2.77
HB21	H-2 class II histocompatibility antigen, E-B beta chain	2.85	3.62
TENA	Tenascin	2.83	2.64
MYO5A	Unconventional myosin-Va	2.82	1.94
BAK	bcl-2 homologous antagonist/killer	2.71	2.72
DHRS4	dehydrogenase/reductase sdr family member 4	2.69	2.31
ITAX	Integrin alpha-X	2.68	5.76
LACTB	Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial	2.59	2.56
GLCM	glucosylceramidase	2.54	2.66
PLOD1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	2.52	4.42
ACOX3	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	2.51	2.74
LSP1	Lymphocyte-specific protein 1	2.48	3.36
CLC10	C-type lectin domain family 10 member A	2.37	2.07
INT1	integrator complex subunit 1	2.34	3.29
VMP1	Vacuole membrane protein 1	2.33	4.4
HKDC1	Putative hexokinase HKDC1	2.28	2.29
RAB32	Ras-related protein Rab-32	2.14	3.04
VPS18	Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog	2.07	2.33
PPGB	lysosomal protective protein	2.05	2.6
SNW1	SNW domain-containing protein 1	2.01	2.31
C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B	2.01	2.45
NET1	Netrin-1	1.98	2.83
TPRGL	Tumor protein p63-regulated gene 1-like protein	1.95	2.4
EST1C	Carboxylesterase 1C	1.93	2.13

Table. 2 GO 解析により各カテゴリの上位に示された因子

Category	Term	Count in gene set	p-Value
Biological process	metabolic process	14	7.10E-06
	immune system process	12	3.05E-05
	lipid metabolic process	13	3.29E-05
	protein transport	14	9.13E-05
	fatty acid metabolic process	7	4.64E-04
Molecular function	fatty-acyl-CoA binding	5	6.74E-05
	acetyl-CoA C-acyltransferase activity	3	5.81E-04
	transferase activity, transferring acyl groups	7	6.63E-04
	oxidoreductase activity	12	0.0015
	carbohydrate binding	7	0.0033
Cellular component	endoplasmic reticulum	36	1.56E-13
	membrane	85	2.94E-13
	extracellular exosome	41	7.42E-08
	lysosome	12	8.12E-06
	endoplasmic reticulum membrane	17	1.02E-05
KEGG pathway	Phagosome	12	1.16E-06
	Staphylococcus aureus infection	6	1.49E-04
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5	1.51E-04
	Lysosome	8	2.40E-04
	Tuberculosis	9	4.19E-04

Table. 3 cytoHubba 解析による上位 20 個のハブタンパク質

UniProt Name	Description	Fold change [Bleo/Cont] (Log2)	P-value (-Log10)
THIKB	3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal	3.96	2.52
CD68	Macrosialin	3.79	4.4
THIKA	3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	3.31	1.69
ITAX	Integrin alpha-X	2.68	5.76
ACOX3	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	2.51	2.74
SNW1	SNW domain-containing protein 1	2.01	2.31
RU1C	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	1.8	2.12
C1QA	Complement C1q subcomponent subunit A	1.72	3.18
NLTP	Non-specific lipid-transfer protein	1.71	2.78
ACOX1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	1.65	2.92
MRC1	macrophage mannose receptor 1	1.6	3.27
S61A1	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	1.44	2.26
CO3	Complement C3	1.44	1.77
ROA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1.35	2.69
APOE	Apolipoprotein E	1.32	1.76
SC61G	Protein transport protein Sec61 subunit gamma	1.31	1.9
ROA2	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1.21	3.77
U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	1.18	3.59
RALY	RNA-binding protein Raly	1.06	2.43
SC61B	protein transport protein Sec61 subunit beta	1.04	3.22

Table. 4 上位 20 個のハブタンパク質における KEGG エンリッチメント解析

Category	Description	Count	p-value
KEGG	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5	1.23E-05
KEGG	PPAR signaling pathway	6	6.76E-05
KEGG	Peroxisome	6	8.06E-05
KEGG	Fatty acid metabolism	5	1.59E-04
KEGG	alpha-Linolenic acid metabolism	4	3.20E-04
KEGG	Lysosome	6	4.92E-04
KEGG	Protein processing in endoplasmic reticulum	6	0.0021
KEGG	Fatty acid degradation	4	0.0023
KEGG	Protein export	3	0.0108
KEGG	Phagosome	5	0.0137
KEGG	Staphylococcus aureus infection	3	0.0302
KEGG	Spliceosome	4	0.0356
KEGG	Pertussis	3	0.0614
KEGG	Complement and coagulation cascades	3	0.0644
KEGG	Tuberculosis	4	0.0706
KEGG	Metabolic pathways	12	0.0740
KEGG	ECM-receptor interaction	3	0.0830

Table. 5 TG2 依存的に架橋された上位 30 個の BPA 修飾ペプチドと由来タンパク質

Sequence	Descriptions	Fold change [Bleo/Cont] (Log2)	p-value (-Log2)
NGESQPLVQTAVTNIDRPK	fibronectin	7.7	2.71
WSRPQAPITGYR	fibronectin	6.74	4.05
TAIYQPQTHPQPAPYGHCVTD SGVVYSVGMQWLK	fibronectin	6.27	4.79
GSCSRPQVCICR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	5.81	2.74
TYHVGEQWQK	fibronectin	5.73	1.49
NLPATDAIQR	Extracellular matrix protein 1	5.71	4.22
HALQSASAGSGSFTDVR	fibronectin	5.61	1.39
RPGAAEPSDGTGHTYNTYQY QR	fibronectin	5.53	1.38
NNRQPYAVSELAGHQ TSAESW GTGR	60S ribosomal protein L4	5.52	3.31
HYQINQQWER	fibronectin	5.39	1.77
GLLQQIK	alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-	5.17	3.23
CDNCRRPGAAEPSDGTGHT YNQYQYQR	fibronectin	5.15	3.44
CHEGGQSYK	fibronectin	5.14	1.6
TAIYQPQTHPQPAPYGHCVTD SGVVYSVGMQWLK	fibronectin	5.13	1.34
TYHVGEQWQKEYLGAICSCTC FGGQR	fibronectin	5.1	3.95
SQSSHSYDDSTLPLIDR	Catenin delta-1	5.06	4.49
EYLGAICSCTCFGGQR	fibronectin	5.05	1.62
GYSLYTGGTGALSPGGPQAQN SPRPASR	EMILIN-1	5.04	1.78
TETITGFQVDAIPANGQTPVQR	fibronectin	4.95	2.29
NANTFMSPPQR	matrix Gla protein	4.85	3.23
YGDGSSSFQSTTGHCVHMR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	4.84	3.26
NFGIGQDIQPK	60S ribosomal protein L7a	4.77	4.2
FLEQQNK	Keratin, type II cytoskeletal 79;Keratin, type II cytoskeletal 8;Keratin, type II cytoskeletal 7;Vimentin	4.71	3.46
LETPQRPAAR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	4.7	2.1
LTCQCLGFGSGHFR	fibronectin	4.64	1.56
IAWESPQGQVSR	fibronectin	4.6	3.3
ELTAVVQK	40S ribosomal protein S3	4.57	2.97
VVGGCVANPHSWPWQISLR	Plasminogen	4.53	5.6
SSGPYGGGGQYFAKPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	4.49	1.6
AQCPIVER	40S ribosomal protein S5	4.47	1.45

BPA が取り込まれたグルタミン残基を Q で示す。

Table. 6 細胞外で架橋された上位 10 個のペプチド配列

Sequence	Descriptions	Abundances
QAQQIVQPQSPVAVSQSKPGCFDNGK	Fibronectin	4.31E+06
NAQDFKEAVKK	Collagen alpha-1(VI) chain	3.10E+06
GAPQLDTAR	Fibulin-2	1.29E+06
HALQSASAGSGSFTDVR	Fibronectin	1.20E+06
IAWESPQGQVSR	Fibronectin	8.91E+05
AQPTPR	Bromodomain and WD repeat-containing protein 1	6.51E+05
GVVGPPQGAR	Collagen alpha-2(I) chain	5.29E+05
WSRPQAPITGYR	Fibronectin	3.61E+05
GQAGVMGFPGPK	Collagen alpha-1(I) chain	3.55E+05
RPGAAEPSDGTGHTYNQYTQR	Fibronectin	3.50E+05

BPA が取り込まれたグルタミン残基を Q で示す。

Table. 7 線維化に伴って生体マウス肺で TG2 に架橋されるペプチド配列

Sequence	Master Protein Descriptions	# PSMs	Abundance (WT bleo)
GFGG <u>Q</u> YGIQK	Hematopoietic lineage cell-specific protein	47	6.16E+05
QLQDQDKDKEDDGGHSLEQP G <u>Q</u> QTLISLK	Lymphocyte-specific protein 1	2	6.32E+04
QNG <u>Q</u> LLR	PDZ and LIM domain protein 7	3	7.39E+04
QKPTLSG <u>Q</u> R	eIF5-mimic protein 2	32	2.23E+05
<u>Q</u> QMVAAHQYSFASDGEAR	Tensin-3	9	6.89E+04
SEGDTAYG <u>Q</u> VQPNTWK	Lipoma-preferred partner homolog	53	1.46E+06
SG <u>Q</u> CAAGAPVLQFTNCR	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	7	8.60E+04
SNG <u>Q</u> TIIEEK	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	6	5.93E+04
<u>Q</u> GQETAVAPSLVAPALSKPK	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	4	8.01E+04
SPSSESSP <u>Q</u> HPTPPTPR	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7	55	4.05E+05
S <u>Q</u> EPISNDQK	Protein LYRIC	2	5.53E+04
SQP <u>Q</u> NQNIPR	Interferon-activable protein 205-B	4	6.57E+04
SVM <u>Q</u> EGAAPLPR	Fibulin-2	11	1.25E+05
TLAAG <u>Q</u> FHI	Importin-8	10	1.61E+05
TRQEWESAG <u>Q</u> QAPHPR	Drebrin-like protein	14	1.96E+05
VG <u>Q</u> MVISGVDR	Perilipin-3	83	1.39E+06
VMTIPYQMPASSPVICAG <u>Q</u> DR	Poly(rC)-binding protein 1	12	1.74E+05
QEWESAG <u>Q</u> QAPHPR	Drebrin-like protein	66	1.04E+06
G <u>Q</u> EPLGPDALK	Transcription factor 25	66	6.36E+05
G <u>Q</u> QQAAR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	37	1.51E+06
HNP <u>Q</u> SPLQESSATLK	Histone deacetylase 6	5	1.25E+05
HSEYNP <u>Q</u> HSLLAQFR	Mothers against decapentaplegic homolog 1	10	2.60E+05
KE <u>Q</u> MPLTPPR	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	2	8.63E+04
IDFSSIAVPGTSNP <u>Q</u> QR	Protein DDI1 homolog 2	76	2.03E+06
LETP <u>Q</u> RPAAR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	37	4.90E+05
APAGTFPGSQ <u>Q</u> APASPSLPA RPPAPPPPR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	29	2.82E+05
<u>Q</u> DHPSSMGVY <u>Q</u> ESGGFSGP GENR	RNA-binding protein EWS	3	6.53E+04
NVPVPVQEATL <u>Q</u> QRPVPPR	SH3 and PX domain-containing protein 2B	233	4.14E+06
NANTFMSP <u>Q</u> QR	Matrix Gla protein	160	4.54E+06
EA <u>Q</u> LPVIENK	Plasminogen	28	2.63E+05
L <u>Q</u> QQAALSPTTAPAVSSVSK	Transcriptional repressor p66-beta	5	3.32E+04
INPDGS <u>Q</u> SVVEVPYAR	Protein canopy homolog 2	15	3.62E+05
LNL <u>Q</u> SGQK	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3	23	2.55E+06
ILSTA <u>Q</u> RPLE	Xylulose kinase	7	7.01E+04

BPA が取り込まれたグルタミン残基を Q で示す。同一ペプチド中に複数の Q が含まれる場合、実際に修飾された Q は一つであるが特定はできず、それらの Q が修飾されている確率が等しいことを示す。

Table. 8 実験間で共通して架橋された BPA 架橋ペプチド配列

Sequence	Master Protein Descriptions
SEGDTAYG <u>Q</u> QVQPNTWK	Lipoma-preferred partner homolog
G <u>Q</u> QQAAR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2
LETP <u>Q</u> RPAAAR	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2
NANTFMSP <u>Q</u> QR	Matrix Gla protein
EA <u>Q</u> LPVIENK	Plasminogen

BPA が取り込まれたグルタミン残基を Q で示す。

Table. 9 ピルフェニドンアナログの構造と溶解度

linker position	structure	solubility	linker position	structure	solubility
A-1		△	B-1		×
A-2		○	B-2		○
A-3		○	B-3		○
A-4		○	B-4		△
A-5		○	B-5		×
A-6		○	B-6		×
A-7		○	B-7		×

Table. 10 ピルフェニドンアナログの IC50/EC50

pirfenidone analog	A549		WI-38
	<i>Col1a1</i>	<i>Cdh1</i>	<i>Col1a1</i>
	IC ₅₀ (μg/ml)	EC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)
pirfenidone	1085.4	>1000	300.2
A-2	181.5	89.5	335.9
A-3	212.1	162.9	467.4
A-5	446.5	>1000	480.5
A-6	525.7	>1000	N.A.
A-7	179.0	>1000	417.9
B-3	-	-	N.A.

Table. 11

500 $\mu\text{g/ml}$ の処理濃度におけるピルフェニドンおよび各ピルフェニドンアナログの *Col1A1* 発現上昇および *Cdh1*(E-cadherin)発現低下に対する抑制作用率

linker position	WI-38	A549	
	<i>Col1A1</i> suppression rate	<i>Col1A1</i> suppression rate	<i>Cdh1</i> increase rate
pirfenidone	31.7 \pm 9.6 %	8.7 \pm 18.6 %	64.2 \pm 5.8 %
A-1	-	-	-
A-2	81.6 \pm 1.8%	63.1 \pm 2.0%	46.7 \pm 20.1%
A-3	83.5 \pm 7.8%	89.0 \pm 0.1%	122.8 \pm 8.2%
A-4	-	-	-
A-5	68.4 \pm 1.3%	64.9 \pm 1.4%	56.8 \pm 17.8%
A-6	0.9 \pm 1.3%	41.8 \pm 6.3%	84.6 \pm 34.4%
A-7	72.3 \pm 2.6%	88.5 \pm 2.9%	102.8 \pm 16.4%
B-1	-	-	-
B-2	-	-	-
B-3	6.8 \pm 9.6%	-	-
B-4	-	-	-
B-5	34.7% \pm 10.4%	-	-
B-6	-2.0% \pm 41.0%	-	-
B-7	-4.6% \pm 27.4%	-	-

Table. 12 A-2 およびピルフェニドンにより競合阻害を受けた全 29 個のピルフェニドン標的因子

Description	A-2 diazido /DMSO	(A-2 diazido +A-2) /A-2 diazido	(A-2 diazido +pirfenidone) /A-2 diazido
Prenylcysteine oxidase 1	70	0.6	0.7
CD81 antigen	33.3	0.6	0.6
Metaxin-1	22.1	0.7	0.5
TRAF family member-associated NF-kappa-B activator	14.9	0.5	0.5
ER lumen protein-retaining receptor 2	14.4	0.2	0.6
Transmembrane 9 superfamily member 4	13.4	0.8	0.6
CD151 antigen	11.8	0.6	0.6
Solute carrier family 22 member 18	11	0.9	0.6
Armadillo repeat-containing X-linked protein 3	11	0.7	0.5
HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	10	0.4	0.4
Pirin	9.7	0.4	0.6
Calcium uptake protein 2, mitochondrial	9.6	0.7	0.6
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	9.6	0.9	0.8
Golgi reassembly-stacking protein 2	8	0.7	0.6
Phospholipase A2 group XV	7.2	0.7	0.7
Lysyl oxidase homolog 1	7.1	0.7	0.5
ERO1-like protein alpha	6	0.7	0.6
Sorting nexin-18	5	0.8	0.5
Perilipin-2	4.9	0.8	0.7
CXXC motif containing zinc binding protein	4.4	0.5	0.6
Torsin-1A-interacting protein 1	4.4	0.6	0.5
Caveolae-associated protein 1	4.3	0.7	0.6
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	3.8	0.6	0.7
Thrombospondin-1	3.6	0.7	0.7
Echinoderm microtubule-associated protein-like 1	2.9	0.6	0.6
Golgin subfamily A member 3	2.9	0.6	0.6
LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	2.7	0.8	0.5
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22	2.2	0.7	0.6
Neutral cholesterol ester hydrolase 1	2.1	0.8	0.6

Table. 13 少なくとも一方に競合阻害された 160 個の標的候補因子における GO 解析

・ Top 10 factors (Cellular component)

Category	Term	Count	%	p-Value
Cellular component	membrane	67	41.1	3.68E-12
Cellular component	endoplasmic reticulum membrane	29	17.8	4.74E-08
Cellular component	endoplasmic reticulum	28	17.2	3.52E-07
Cellular component	extracellular exosome	40	24.5	8.68E-07
Cellular component	endoplasmic reticulum lumen	11	6.7	1.61E-04
Cellular component	cytoplasm	66	40.5	3.98E-04
Cellular component	cytosol	64	39.3	5.56E-04
Cellular component	focal adhesion	12	7.4	5.84E-04
Cellular component	calcium channel complex	4	2.5	0.00116
Cellular component	platelet alpha granule lumen	5	3.1	0.00192

Table. 14

ピルフェニドン結合候補因子のクローニング可否、タンパク質発現、ピルフェニドン結合能

gene	competitive inhibition		cloning	protein expression	binding to pirfenidone
	89 and Pirfenidone	89 or Pirfenidone			
FHL2			○	x	
ITGB1			○	x	
RAB11B			○	○	○
PCYOX1	○		○	△	
CAVIN1	○		○	○	x
THBS1	○		○	○	
LIMS1	○		○	x	
NCEH1	○		○	x	
KRT75			x		
FHL3			○	○	
IKBIP			○	△	
TGFB111			○	○	△
GSTO1			○	○	△
HADHA			x		
TMEM217			x		
ABDH10		○	○	x	
ACLY1			○	○	
CD81	○		○	○	△
CERS2		○	○	x	
EMD			x		
FHL1		○	○	x	
MGLL			○	○	△
MVP			○	○	
NQO1			○	○	△
NUCB1			○	x	
NUCB2		○	x		
PLA2G15	○		○	x	
PLIN2	○		○	x	
RDH11			○	x	
RTN4			○	○	△
CD151			○	○	
NUP153			x		
HMOX2			○	○	
LOXL1			○	○	
ENG			○	x	
MT1E			x		
PIR			○	○	
TRIP6			x		
SERPINE1			x		
RDX			x		

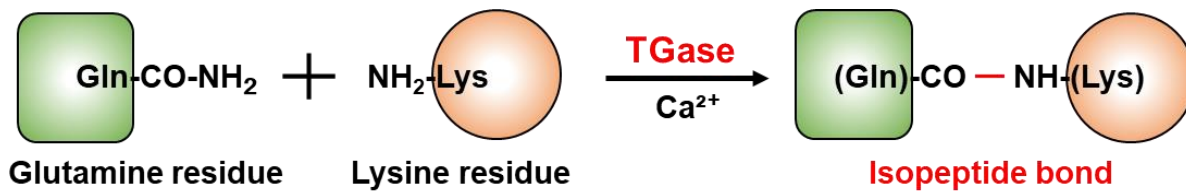
Competitive inhibition: A-2 とピルフェニドン(P)に共にあるいはどちらか一方に有意に阻害された因子を○で示す

Cloning: pcDNA3.1 ベクターへの目的配列の挿入を確認した因子を○で示す

Protein expression: 発現ベクターを HEK293T 細胞に導入したときにタンパク質発現が確認できた因子を○で示す

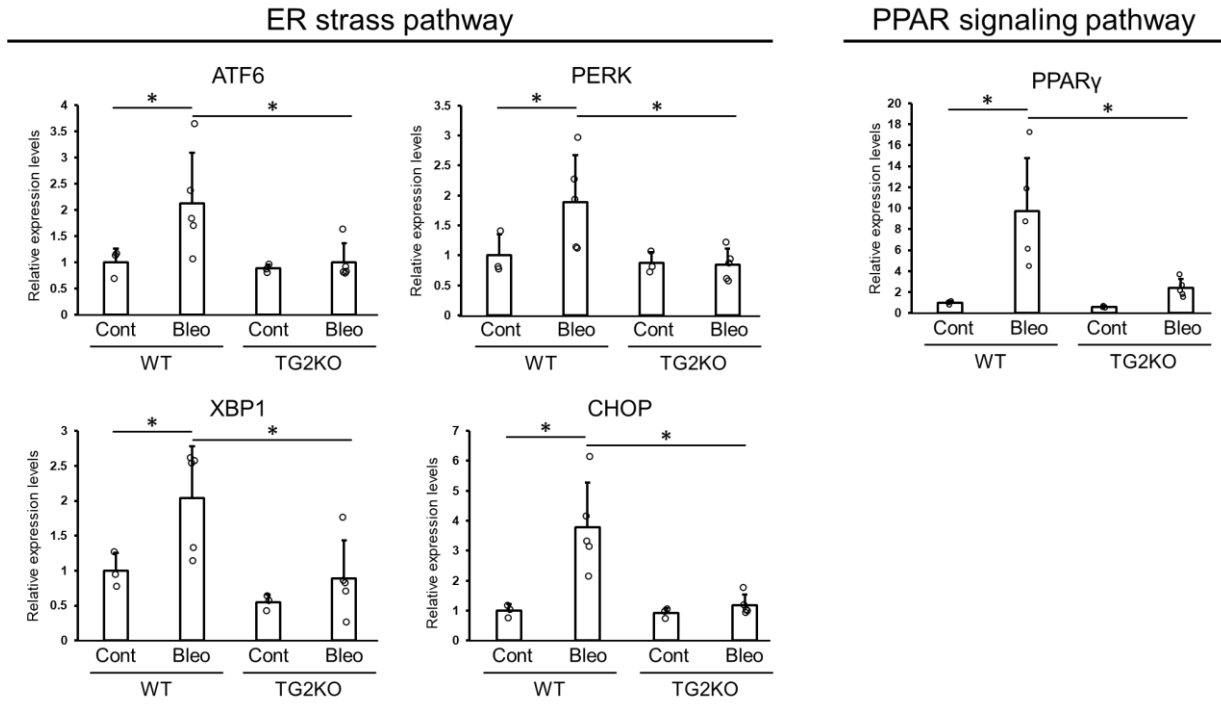
Binding to pirfenidone: ピルフェニドンとの結合の程度を○, △, ×で示す

Supplementary Figures



Supple. Fig. S1 TGase の反応機構

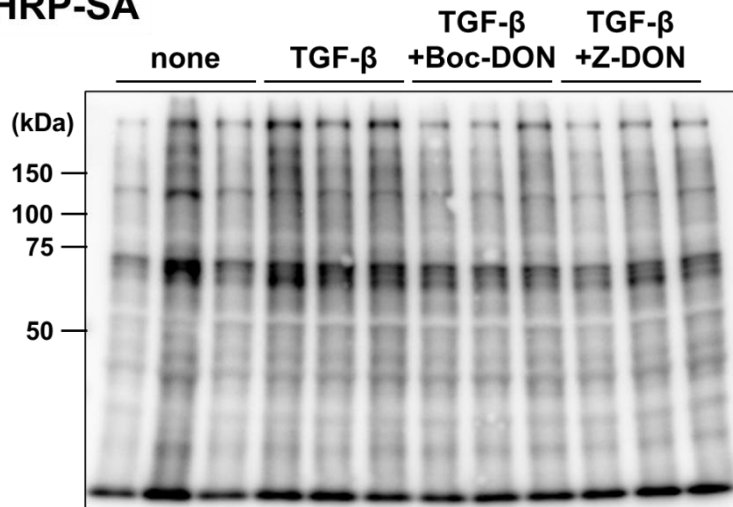
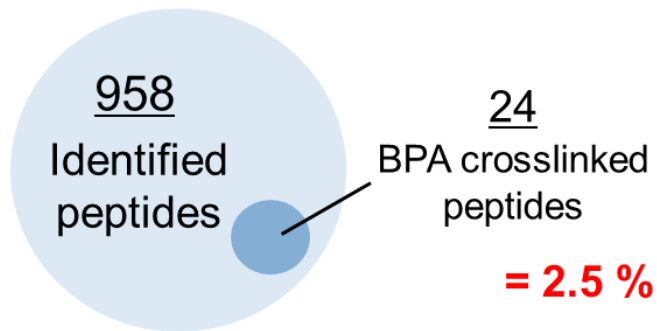
TGase はカルシウムイオン依存的にタンパク質中の特定のグルタミン残基とリジン残基(あるいは一級アミンや水分子)との間にイソペプチド結合を形成する。



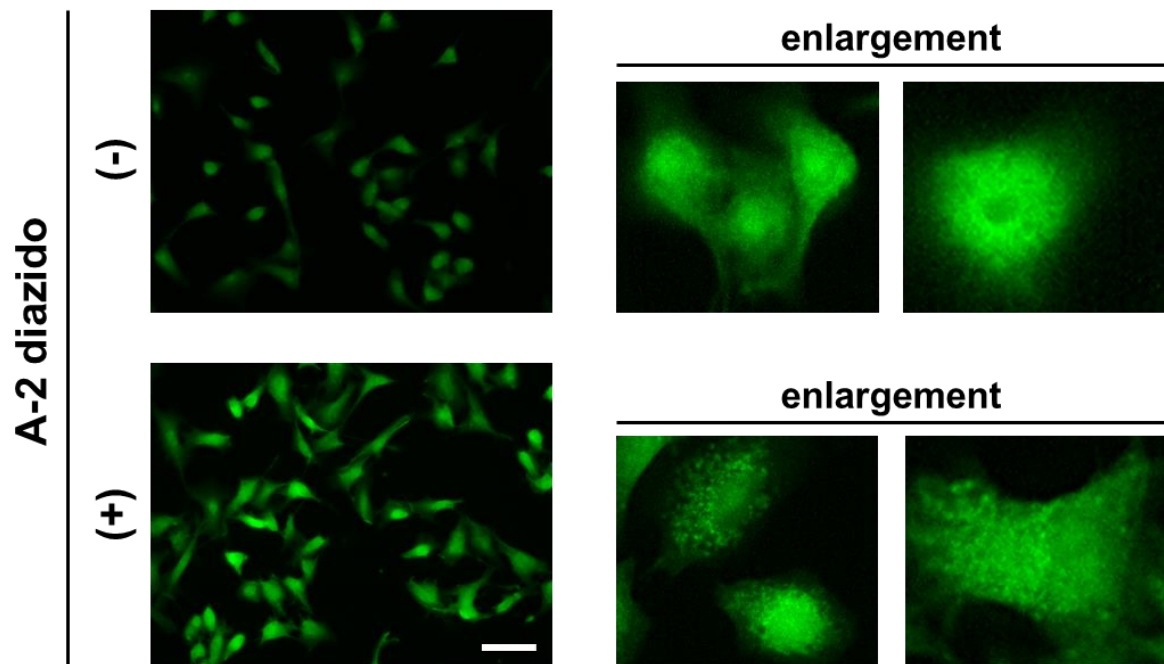
Supple. Fig. S2 Enrichmentされた経路に関連するタンパク質の発現変動解析

同定した基質候補タンパク質群あるいはPPIのハブタンパク質のエンリッチメント解析において有意性を示した、小胞体ストレス経路とPPAR γ シグナル経路の関連遺伝子について、肺組織からtotal RNAを抽出・逆転写してcDNAを作製し、定量PCRによる解析を行った。

* $p < 0.05$, two-tailed Student's t-test.

A**HRP-SA****B****Supple. Fig. S3 培養細胞内で架橋される基質ペプチドの同定**

- A. NIH3T3 細胞に TGF- β を添加して線維化誘導を誘導後、培地中に BPA を添加し架橋させた。
また、BPA 添加と同時に 2 種類の TG2 活性阻害剤を加えた。細胞を抽出後、HRP-SA を用いてイムノブロッティングを行った。
- B. 質量分析の結果、同定されたペプチド数を示す。



Supple. Fig. S4 A549 細胞を用いた A-2 diazido の細胞内局在の可視化

A-2 diazido とビオチン化アルキンの処理によりピルフェニドン標的分子をビオチン標識した後、FITC-avidin を反応させて蛍光標識し、顕微鏡で観察した。右図は左図の拡大像を示したものである。Scale bar = 50 μm .

Supplementary Tables

Supple. Table. S1 イムノブロットティングに用いた抗体

Antibodies	Source	Identifier	Dilution
<i>First antibodies</i>			
Rabbit anti-mouse TG2	in house	-	1/4000
Rabbit anti- α -SMA	Abcam	ab5694	1/2000
Mouse anti- β -actin (clone: 8H10D10)	Cell Signaling technology	#3700	1/10000
Mouse anti-GAPDH (clone: 6C5)	MILLIPORE	MAB374	1/10000
Rabbit anti-RAB11B	Proteintech	28498-1-AP	1/2000
Mouse anti-c-Myc (clone: MC045)	Nacalai tesque	04362-34	1/4000
Streptavidin HRP (HRP-SA)	Thermo Fischer	21126	1/4000
<i>Second antibodies</i>			
Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated	Jackson Laboratory	111-035-003	1/2000
Goat anti-mouse IgG peroxidase conjugated	Jackson Laboratory	115-035-003	1/2000
Goat anti-mouse IgG StarBright Blue 700	Bio-rad	12004158	1/5000