



Title	腎線維症に対するALK5阻害剤の創薬研究
Author(s)	寺嶋, 秀樹
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76504
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (寺 嶋 秀 樹)

論文題名

腎線維症に対するALK5阻害剤の創薬研究

論文内容の要旨

臓器線維症は、腎、肝、肺、膵などの臓器に細胞外マトリクスが蓄積し、機能不全を引き起こした病態である。臓器線維症は種々の臓器に見られる病態であり、患者数が多いにも関わらず、有効な治療薬はほとんど存在しないことからunmet medical needsの高い疾患領域である。各臓器線維症において、共通のサイトカイン、増殖因子の関与が報告されていることから、臓器線維症の発症・進展にはcommon pathwayの存在が示唆されている。TGF- β は、非常に強力な細胞外マトリクス産生誘導作用を有し、線維症発症・進展のkey playerと考えられている。TGF- β は、II型受容体に結合後、I型受容体(ALK5)と会合して、シグナル伝達する。ALK5阻害剤はALK5(TGF- β I型受容体)の細胞内キナーゼドメインに結合して、TGF- β のシグナルを遮断する低分子阻害剤である。TGF- β は、癌の病態進行にも関わっている事が知られており、現在、LY-3200882(Eli Lilly)、PF-06952229(Pfizer)、Vactosertib(Medpacto)等、複数のALK5阻害剤が癌を適応として、臨床試験が進行中である。私は、ALK5阻害剤の腎線維症への適応に関して検討を実施した。

生体内における細胞外マトリクスの蓄積には時間がかかることから、線維症モデル動物を用いた薬効評価は長期間を要し、創薬研究を阻む要因となっている。この課題を克服する為、線維化時に蓄積する主な細胞外マトリクスであるI型コラーゲンの5'上流プロモーター制御下にルシフェラーゼ遺伝子を配置したDNAコンストラクトを導入したTgラット(Col-Luc Tgラット)を作製した。Col-Luc Tgラットを使用する事により、腎尿細管間質線維化モデルの薬効評価期間が短縮できる事を確認した。ラットと比較して、マウスは遺伝子改変動物の種類が多く、それらのマウスと交配する事により、線維症のメカニズム解析に応用可能である等の利点がある。実際、I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の5'上流エンハンサーをトランスジェニックしたレポーターマウスが既に報告されている。しかしながら、遺伝子の転写調節因子であるエンハンサーやサイレンサーは、5'上流領域以外に、イントロン等にも存在する事が知られていることから、より生体内の転写活性を反映したレポーターアッセイ系を構築するには、染色体上のこれらの因子をそのまま利用する事が望ましいと考えられた。そこで、染色体上のI型コラーゲンの3'-UTR(untranslated region)にIRES(internal ribosome entry site)とルシフェラーゼを繋いだDNAコンストラクトを相同組換えしたknock-inマウス(Col-Luc KIマウス)を作製した。Col-Luc KIマウスを用いる事により、ブレオマイシン肺線維症モデルの薬効評価期間を短縮できる事を確認した。

慢性糸球体腎炎は、透析に至る原疾患の第二位を占めており、新たな治療薬開発が望まれている。我々は、慢性糸球体腎炎に対する治療法として、ALK5阻害剤の創薬研究に取り組んだ。ALK5阻害剤の創薬フローとしては、「in vitro ALK5阻害活性 → Col-Luc Tgラットを用いたin vivo短期薬効評価 → 病態モデルを用いた長期薬効評価」の流れで化合物評価を実施した。Col-Luc Tgラットを用いたin vivo短期薬効評価は、薬効評価に要する期間がわずか3日間の為、短期間で多くの化合物をスクリーニングする事が可能である。Col-Luc Tgラットを用いたin vivo短期スクリーニングの結果から、ALK5阻害剤R-268712(Daiichi Sankyo)は、誘導体展開された化合物の中で、最も強力なin vivo抗線維化作用を有する事が示された。R-268712は、慢性糸球体腎炎モデルである片腎摘出Thy1腎炎モデルに対して、顕著な蛋白尿抑制作用と糸球体硬化抑制作用を有し、慢性糸球体腎炎に対する有効性が示された。

臓器線維症において、細胞外マトリクスを産生し、線維化を引き起こす原因細胞を同定する事は、副作用回避といった創薬の戦略上、非常に重要である。尿細管間質線維化(UUO)モデルは、ヒト臨床において、線維化疾患の治療薬として承認されているピルフェニドンやニンテダニブが薬効を示す疾患モデルである事、および、線維化の発症・進展に、TGF- β が主に関与しており、メカニズム的にもヒト疾患に類似していると考えられることから、今回、疾患モデルとして使用した。尿細管間質線維化(UUO)モデルにおいて、コラーゲン産生に携わる線維症原因細胞は、尿細管上皮細胞、周皮細胞、resident fibroblast、fibrocyte等、諸説あり、統一見解が得られていない。今回、Col-Luc Tgラットに尿細管間質傷害を惹起したマウスの腎切片に対して、抗ルシフェラーゼ抗体を用いた免疫染色によって、尿細管上皮細胞が尿細管間質の線維化を引き起こす主な原因細胞である事を明らかにした。

結論を下記に列記する。

1. 臓器線維症の短期in vivo薬効評価に使用可能な、新たなコラーゲンレポーターモデルラット (Col-Luc Tgラット)、および、マウス (Col-Luc KIマウス) を作製した。
2. Col-Luc KIマウスを用いたin vivo短期スクリーニングの結果、強力なin vivo抗線維化作用を有する化合物として、R-268712を見出した。R-268712は、長期疾患モデルである片腎摘出Thy1腎炎モデルにおいて、顕著な蛋白尿抑制作用と糸球体硬化抑制作用を有し、慢性糸球体腎炎に対する有効性が示された。
3. Col-Luc Tgラットを用いたIHC (免疫組織化学) の結果から、尿細管上皮細胞が腎尿細管間質線維化を引き起こす事を明らかにした。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (寺 嶋 秀 樹)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	辻川和丈
	副 査	特任教授	八木清仁
	副 査	教授	橋本 均

論文審査の結果の要旨

腎臓、肝臓、肺などの臓器に細胞外マトリクスが蓄積することにより機能不全が誘発される病態である臓器線維症は、現在有効な治療薬がほとんど存在しないunmet medical needsの高い疾患領域となっている。TGF- β は強力な細胞外マトリクス産生誘導作用を有することが知られており、臓器線維症の発症・進展のkey playerと考えられている。TGF- β が結合したII型受容体はキナーゼ活性を有するI型受容体(ALK5)と会合することにより細胞内にシグナルが伝達される。TGF- β は癌の病態進行にも関わっていることから、ALK5の細胞内キナーゼドメインに結合することによりTGF- β のシグナルを遮断するALK5阻害低分子化合物に対して癌を適応とした臨床試験が進められている。本論文では、ALK5阻害剤を腎線維症への適応に関して検討を進めた。その結果、開発したALK5阻害剤R-268712が強力な抗線維化作用により慢性糸球体腎炎モデルに対する有効性を示すことを突き止めた。

本論文の新規性は、

1. 臓器線維症の短期in vivo薬効評価に使用可能な、新規コラーゲンレポーターモデルラット(Col-Luc Tgラット)および、モデルマウス(Col-Luc KIマウス)を作製した。
2. Col-Luc KIマウスを用いたin vivoスクリーニングにより、強力なin vivo抗線維化作用を有する化合物としてR-268712を見出した。R-268712は、長期疾患モデルである片腎摘出Thy1腎炎モデルを用いた検討において、顕著な慢性糸球体腎炎に対する有効性が示された。
3. Col-Luc Tgラットを用いた解析により、腎尿細管間質線維化は尿細管上皮細胞が産生するコラーゲンに関わることを突き止めた。

以上、本論文により腎尿細管間質線維化を誘発する細胞が新たに同定され、さらに腎線維症に対する有望な治療薬開発への道筋をつけたことから、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。