OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

令和元年度

博士学位論文

腎線維症に対する ALK5 阻害剤の創薬研究

寺嶋　秀樹

目次

緒論 1

本論 5

第一章：線維症早期評価モデル動物の作製 5

　第一節：コラーゲンレポーターモデルラットの作製 5

　第二節：コラーゲンレポーターモデルマウスの作製 16

　第三節：小括 21

第二章：ALK5 阻害剤の創薬研究 22

　第一節：R-268712（ALK5 阻害剤）の構造、in vitro 活性、PK データ 22

　第二節：腎尿細管間質線維化モデルに対する ALK5 阻害剤の薬効評価 26

　第三節：慢性糸球体腎炎モデルに対する R-268712 の薬効評価 28

　第四節：小括 36

第三章：腎間質線維化における線維症原因細胞（コラーゲン産生細胞）の同定 37

　第一節：尿細管間質線維化モデルにおけるコラーゲン産生細胞の同定 38

　第二節：小括 42

総括 43

結論 47

謝辞 48

主論文 49

引用文献 50

緒論

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（1）（Fig.1)。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事から 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事から、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（1,2)。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（3）（Fig.2)。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（4)。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、Galunisertib（Eli Lilly、膵癌を適応に Phase II)、Vactosertib（Medpacto、固形癌を適応に Phase I)、PF-06952229（Pfizer、乳癌、前立腺癌を適応に Phase I）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（5,6)。ALK5 阻害剤は、臓器線維症を適応とした臨床試験は未実施である事、メカニズム的に薬効が期待出来る事から、ALK5 阻害剤の臓器線維症への適応に向けた創薬研究を開始した。ALK5 阻害剤の創薬研究に向けた本研究の構成概略を Fig.3 に示す。臓器線維症で蓄積される主な細胞外マトリクスは、 I 型コラーゲンであるが、 I 型コラーゲンの蓄積には時間を要する為、臓器線維症モデルにおける薬効評価には長期間を要する。創薬研究を遅滞無く進める為には、短期 in vivo 評価系が必要と考えられた事から、 I 型コラーゲンレポーターラット、および、マウスの作製に取り組んだ。次に、当時、ALK5 阻害剤開発で先頭を走っていた GSK 社の特許化合物の中から、in vivo での作用も期待できる SB-431542 をリード化合物として誘導体展開を実施した。それらの誘導体に対して、 I 型コラーゲンレポーターラットを用いた短期 in vivo screening を実施した結果、強力な in vivo 抗線維化作用を有する RHI-3255（研究コード番号：R-268712）を獲得した。Unmet medical needs の高い線維症関連疾患として、慢性糸球体腎炎モデルに対する R-268712 の薬効評価を実施した結果、腎機能改善作用（蛋白尿抑制、血中クレアチニン増加抑制)、および、病理学的パラメーターの改善作用（糸球体硬化抑制、ポドサイト障害改善）を有する事を確認した。最後に、腎尿細管間質線維化に関するメカニズム検討を実施した。原因細胞 myofibroblast（αSMA 陽性のコラーゲン産生細胞）の origin としては、尿細管上皮細胞、周皮細胞、血管内皮細胞、間質線維芽細胞等、諸説あるが、今回作製した I 型コラーゲンレポーターラットを用いた免疫組織化学染色の結果から、尿細管上皮細胞が主なコラーゲン産生細胞である事を明らかにした。

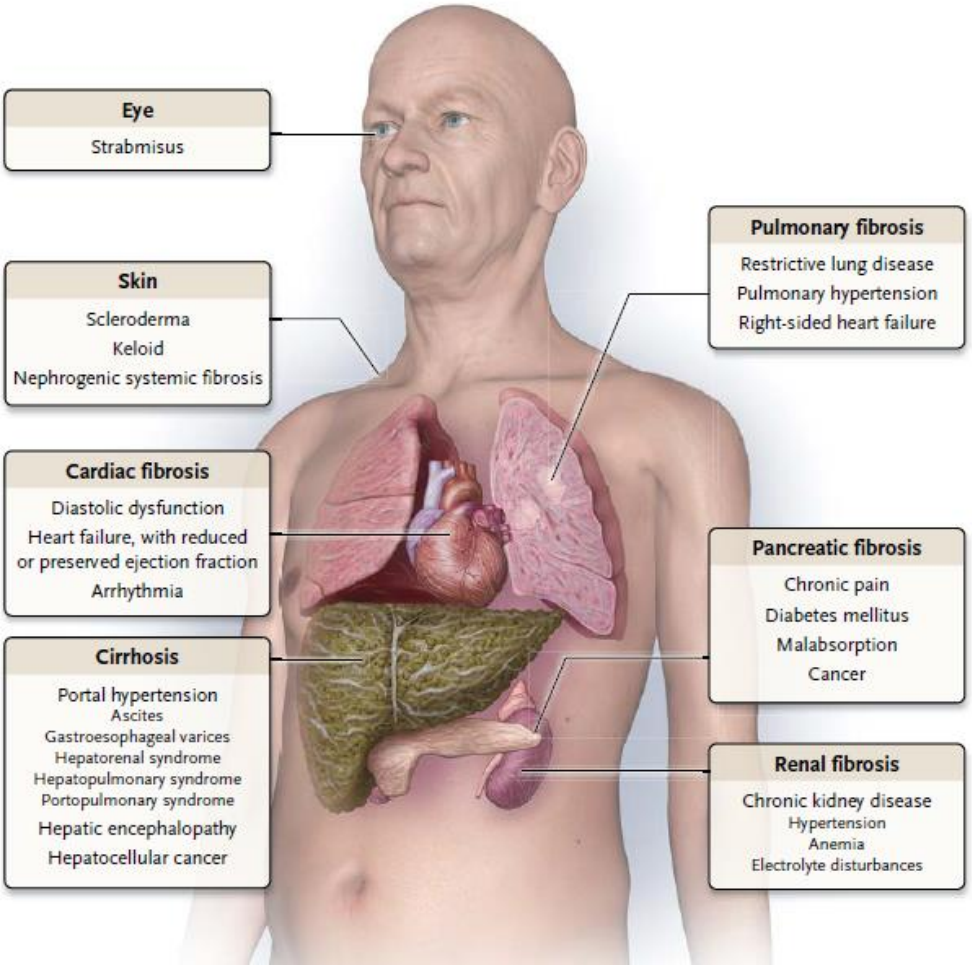

Fig.1. Fibrogenesis and Major Organ Systems. (Rockey DC et al., N Engl J Med 2015)
Fibrosis is a pathologic feature of disease in virtually all organs. It has protean and often lethal consequences and accounts for substantial morbidity and mortality. Selected organs and associated diseases are highlighted.

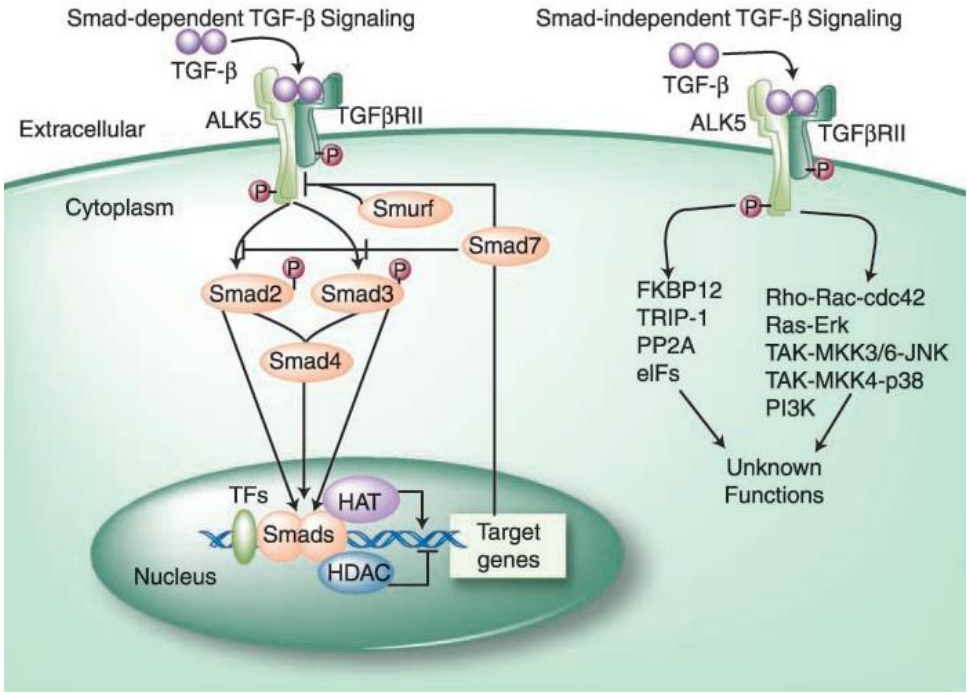

Fig.2. Summary of Smad-dependent and Smad-independent signaling following TGF-ß binding to its receptor. (Wrzesinski SH et al., Clin Cancer Res 2007)

Following TGF-ß binding to an example of a heterodimeric receptor for this cytokine [activin-like receptor kinase 5 (ALK5) and TGF-ßRII], several molecular signaling cascades occur. The Smad-dependent and Smad-independent pathways as well as negative regulatory feedback pathways through Smurf and Smad7 are shown. TF, transcription factor; HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone deacetylase; FKBP12, FK506 binding protein 12; TRIP-1, TGF-ßR interacting protein; PP2A, protein phosphatase 2A; eIFs, elongation initiation factors; JNK, c-JunNH2-terminal kinase; Erk, extracellular signal-regulated kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase.

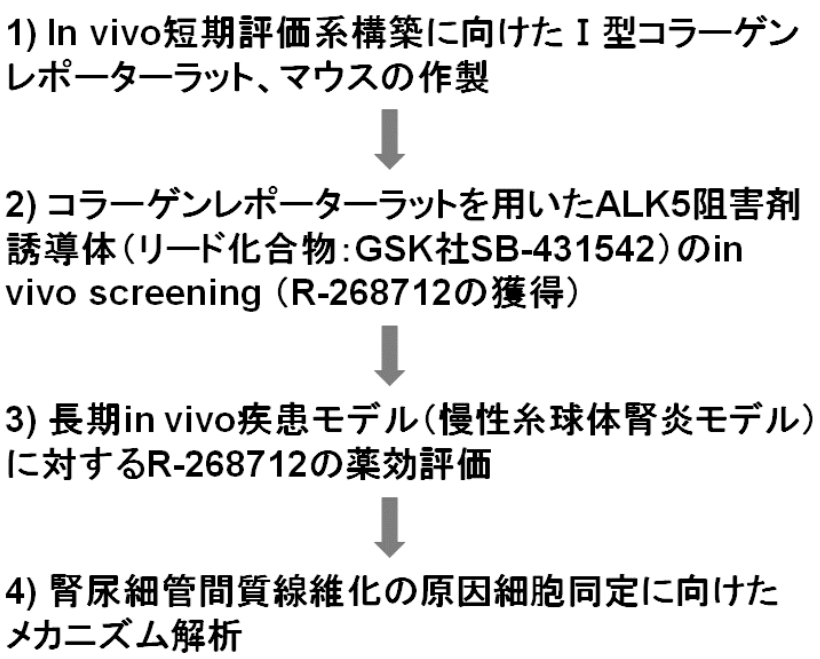

Fig.3. ALK5 阻害剤の創薬研究に向けた本研究の構成概略

本論

第一章：線維症早期評価モデル動物の作製

臓器線維症は、有効な治療法がほとんど無い事から、新規治療薬の開発が待たれている。しかしながら、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事から、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。線維化の際に蓄積される主要な細胞外マトリクスはⅠ型コラーゲンである。コラーゲンは代謝回転が遅い為、蓄積には時間を要する。従って、コラーゲン発現を、ルシフェラーゼで置き換えたコラーゲンレポーター動物を作製する事により、線維化の短期評価が可能と考えられた。この様な考えを元に、実験動物として汎用されるラット、および、マウスを用いたコラーゲンレポーターモデル動物の作製を実施した。

第一節：コラーゲンレポーターモデルラットの作製

Ⅰ型コラーゲン α2 鎖の 5'上流エンハンサー領域のレポーターコンストラクトを遺伝子導入したトランスジェニックマウスが報告されており（7)、同様の手法でトランスジェニックラットの作製も可能と考えられた。ラットの場合、エンハンサーやプロモーターが明らかになっていない。また、これらの転写制御因子は、細胞の種類や刺激によって変わる事が知られている。レポーターベクターに組み込む配列が長い程、その中に含まれる転写制御配列の数が多くなり、より生体反応に近いレポーターアッセイ系が構築できると考えられる事から、5'上流領域をなるべく長くクローニングし、その全長を用いたレポーターベクターを構築する事にした。Ⅰ型コラーゲンは、α1 鎖 2 本と α2 鎖 1 本で三重螺旋構造を形成する。従って、Ⅰ型コラーゲン α1 鎖、および、Ⅰ型コラーゲン α2 鎖の 5'上流領域にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ遺伝子コンストラクトを導入したトランスジェニックラットを各々、作製し、各臓器における発光強度を比較した。

実験材料と実験方法

動物

全ての動物実験は、第一三共（株）の実験動物ガイドラインに従った。トランスジェニックラットの作製は、受精卵に遺伝子コンストラクトをインジェクションする手法で実施した。導入遺伝子をヘテロ接合型の状態で、遺伝子改変動物を繁殖維持した。動物は明暗 12 時間サイクルの照明下、室温 23 ± 3℃、ペレット食の自由給餌、自由給水の状態で、飼育した。

Col1a1-Luc Tg ラットの作製

PCR primer は、ラットコラーゲン α1 鎖エクソン 1（GenBank no.J04464）の配列を参考にしてデザインした。Wistar rat のゲノム DNA を鋳型にして、forward primer（TGACTGTCCTGGAATTCACT）、reverse primer（TAGGAAACTCTGAAGCCCTG）で、PCR を実施した。次に、1st PCR 産物を鋳型にして、forward primer（CTATAGACCAGGCTAGCCTC）、reverse primer（GCTTCTTGTGGAATGTAGGG）で、nested PCR を実施した。2nd PCR 産物が 860 bp である事を電気泳動で確認後、シークエンスによって、ラットコラーゲン α1 鎖エクソン 1 が増幅できている事を確認した。2nd PCR 産物をラベリングキット（PCR DIG probe synthesis kit, Boehringer Mannheim）でジゴギシゲニン標識し、DNA probe として使用した。次に、ラットゲノムライブラリー（MoBiTec, Göttingen, Germany）から、上述のプローブを使用して、ラットコラーゲン α1 鎖の 5'-flanking region（from - 14,269 to + 371 bp）をクローニングした。pPS vector に automatic subcloning 後、クローニングした DNA の 5'側に、MluI site を含んだ forward primer（CCCACGCGTGCCTGGTCTACATAGTGAGT）と AatII site を含んだ reverse primer（GACGTCCACAGGTATTGGATATCTCC）で PCR をする事で制限酵素部位を導入した。同じ様に、クローニングした DNA の 3'側に、forward primer（ACAGCTCTGAAGACGGCTGT）と XhoI site を含んだ reverse primer（TTTCTCGAGCTAGACCCTAGACATGTAGA）で PCR を実施して、XhoI site を付加した。MluI、ECoRV、AatII、XhoI の制限酵素部位を利用して、ラットコラーゲン α1 鎖の 5'-flanking region（from - 14,247 to + 113 bp）をルシフェラーゼレポーターベクター（pGV-B2, Toyo B-Net, Tokyo, Japan）に recloning した（Fig.4A）。次に、NotI/SalI 処理して、bacterial replication origin や drug-resistant gene の様な不要な部分を除去して、直鎖化し、導入遺伝子コンストラクトとした。DNA コンストラクトを 233 個の受精卵にインジェクション後、8 匹の偽妊娠ラットに移植した。59 匹の産仔の尻尾サンプルに対して、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、2 個体（453–5 系統、455–2 系統）でルシフェラーゼ活性が認められた。この 2 系統を Founder（F0）として、Wistar ラットと交配して、サザンブロット解析を実施した。臓器別ハイドロシキプロリン-ルシフェラーゼ活性比較、および、in vivo 実験には、8 世代以上、交配維持した 453-5 系統を用いた。

Col1a2-Luc Tg ラットの作製

PCR primer は、ラットコラーゲン α2 鎖プロモーター領域（GenBank no. X66209）の配列を参考にしてデザインした。Wistar rat のゲノム DNA を鋳型にして、forward primer（AAGAAGCCCTGTAGCCACGT）、reverse primer（CAACAGAGTTCGCGTATCCA）で、PCR を実施した。PCR 産物が 350 bp である事を電気泳動で確認後、シークエンスによって、目的遺伝子が増幅できている事を確認した。PCR 産物をラベリングキットでジゴギシゲニン標識し、DNA probe として使用し

た。次に、ラットゲノムライブラリー（Stratagene, La Jolla, CA）から、上記のプローブを使用して、ラットコラーゲン α2 鎖の 5'-flanking region（from - 9,217 to + 4,520 bp）をクローニングした。NotI site で pGEM-T Easy vector に automatic subcloning 後、クローニングした DNA の 3'側に、forward primer（GTCACCCTCCACCTCTCAC）と HindIII site を含んだ reverse primer（CACCAGCGGAGGTATCACCTAAGCTT）で PCR を実施して、HindIII site を付加した。KpnI、XhoI、HindIII の制限酵素部位を利用して、ラットコラーゲン α2 鎖の 5'-flanking region（from - 7,585 to + 89 bp）をルシフェラーゼレポーターベクター（pGV-B2）に recloning した（Fig.4B）。次に、NotI/BamHI 処理して、bacterial replication origin や drug-resistant gene の様な不要な部分を除去して、直鎖化し、導入遺伝子コンストラクトとした。DNA コンストラクトを 323 個の受精卵にインジェクション後、11 匹の偽妊娠ラットに移植した。88 匹の産仔の尻尾サンプルに対して、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、8 個体でルシフェラーゼ活性が認められた。最も高いルシフェラーゼ活性を示した系統を Founder（F0）として、サザンブロット解析に使用した。Wistar ラットと交配して、得られた F1 動物を臓器別ルシフェラーゼ活性測定実験に供した。

UUO model（unilateral ureteral obstruction: 片側尿管結紮モデル）

Col1a1-Luc Tg ラットを麻酔下で開腹し、UUO オペを実施した。左尿管を 2 ヶ所、結紮した。UUO 処置、0, 3, 7, 14 日目にラットを sacrifice し、UUO 腎、非結さつ腎のルシフェラーゼ活性、ハイドロキシプロリン量、I 型コラーゲン α1 鎖、および、α2 鎖 mRNA を測定し、非結さつ腎に対する UUO 腎のルシフェラーゼの値を算出した。Day 0 は偽手術を実施した動物を用いた。

サザンブロット解析

pGV-B2 vector から、ルシフェラーゼをコードする領域を NcoI/HincII 制限酵素処理して切り出した後、ラベリングキット（Megaprime DNA Labeling System, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）を用いて ^{32}P 標識し、ルシフェラーゼ DNA に対するプローブとした。ゲノム DNA サンプルは、肝臓、または、尻尾のライセートを各制限酵素処理して、調製した。アガロースゲルに電気泳動後、0.25 N 塩酸で脱プリン化した。次に、アルカリ転写バッファーを用いて、陽性荷電したナイロン膜（Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech）に転写した。ハイブリダイゼーション後、膜を数回洗浄し、X 線フィルム（BioMax MS, Kodak, Rochester, NY）に 4℃、1 週間露光した。

ルシフェラーゼ活性測定

ルシフェラーゼ活性は、Picagene BrillianStar-LT Luminescence Kit (Toyo B-Net, Tokyo, Japan)を用いて測定した。方法はキットに添付のプロトコルに従った。組織をホモ

ジネート後、遠心分離した。5 µL の上清に対して、100 µL のルシフェラーゼ基質の入った試薬を添加し、マイクロプレート（B&W Isoplate, Perkin-Elmer Wallac, Gaithersburg, MD）で反応後、Wallac ARVO HTS-1420 multilabel counter（PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA）で、発光量を測定した。ルシフェラーゼ酵素スタンダード（Toyo B-Net）を用いた検量線から、ルシフェラーゼ蛋白量を求め、総蛋白量で補正した。総蛋白量は、BCA 測定キット（Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL）で測定した。

RNA 抽出と real-time RT-PCR

ラット腎臓から guanidinium thiocyanate 法と silica membrane 法を組み合わせた方法（Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel, Düren, Germany）にて、トータル RNA を単離した。RNA 濃度は、吸光度法にて、定量した。トータル RNA を Prime-Script RT reagent kit（Takara Bio, Otsu, Japan）を用いて、逆転写後、SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) と、SYBR green PCR 用プライマーセット（Takara Bio）を添加した。ABI PRISM 7900HT（Applied Biosystems, Tokyo, Japan）を用いて、定量 PCR を実施した。

ハイドロシキプロリン測定

ハイドロシキプロリンはコラーゲンに特異的なアミノ酸である為、コラーゲン定量に用いられる。ハイドロシキプロリン測定は、クロラミン T 法を若干修飾した Bergheim 等の方法（8）にて実施した。組織サンプル（50–100 mg）の秤量後、1 mL の 6 N HCl を添加して、100℃、24 時間インキュベートして、酸加水分解した。室温まで冷却後、等量の 6 N NaOH にて中和した。13,000 g で 12 分間遠心分離した。40 µL の上清を microtiter plate のウェルに入れ、25 µL のクロラミン T 溶液［1 part 7% chloramine T and 4 parts citrate/acetate buffer (pH 6.0, 695 mM sodium acetate, 128 mM trisodium citrate, and 29 mM citric acid, with 38.5% isopropanol)］を添加し、室温、10 分間、インキュベートした。次に、150 µL のエールリッヒ溶液（1.4 M dimethylaminobenzaldehyde with 20% perchloric acid and 67% isopropanol）を加えて、65℃、20 分間、インキュベートした。室温まで冷却後、560 nm の吸光度を測定した。ハイドロキシプロリン（Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan）の検量線によって値を算出後に、組織重量で補正した。

初代培養

肝細胞は、雄の 12 週齢の Col1al-Luc Tg ラットの肝臓から、コラゲナーゼ灌流法によって単離した。 I 型コラーゲンコートした 24 ウェルプレートに播種し、hepatozyme-SFM 培地（Invitrogen）で培養した。培養 24 時間後に、新鮮な培地に交換後、さらに 24 時間培養し、細胞を回収した。血管平滑筋細胞（Vascular smooth muscle cells ：

VSMC）は、雄の 11 週齢の Col1al-Luc Tg ラットの胸部大動脈から、explant 法にて単離した。血管を 2-3 mm 四方に切り取り、ゼラチンコートディッシュの上に静置した。DMEM/10%牛胎児血清含培地（100 µg/mL kanamycin、1 µg/mL amphotericin B）で培養を開始し、血管断片から outgrowth した初代細胞（P1）を継代後、60–80%コンフルエントに達した passage 2 の細胞を回収した。線維芽細胞は、雄の 11 週齢の Col1al-Luc Tg ラットの背部皮膚から、explant 法にて単離した。皮膚断片を DMEM/10%牛胎児血清含培地（100 µg/mL kanamycin、1 µg/mL amphotericin B）で培養し、outgrowth した初代細胞（P1）が 60–80%コンフルエントに達した時点で回収した。上述の細胞に対して、ルシフェラーゼ活性測定用には LyEX1 buffer（Toyo B-Net）でライセートを調製した。mRNA 解析用には Nucleospin RNA II kit に付属の lysis buffer でライセートを調製した。

統計解析

2 群間の検定には Student's t-test、多群間の検定には Dunnett test を用いた。統計解析ソフトは、SAS System Release 8.2（SAS Institute）を用いた。$P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

結果および考察

プラスミドコンストラクトの模式図を Fig.4 に示す。 I 型コラーゲン α1 鎖の転写開始点上流-14.3 kb から転写開始点直下の+0.4 kb をラットゲノムライブラリーからクローニングし、その後、-14.2 kb から+0.1 kb の領域を pGV-B2 vector（ルシフェラーゼ発現ベクター）にサブクローニングした。AatII 処理による 19.2 kb のフラグメント、および、AatII/EcoRV 処理による 11.0 kb と 8.2 kb のフラグメントが、アガロースゲル電気泳動のバンドとして検出された（Fig.4A）。この制限酵素処理パターンから、目的配列の pGV-B2 vector へのサブクローニングが、計画通りに実行できている事が確認できた。 I 型コラーゲン α2 鎖も同様にして、転写開始点上流-9.3 kb から転写開始点直下の+4.6 kb をラットゲノムライブラリーからクローニングし、その後、-7.6 kb から+0.1 kb の領域を pGV-B2 vector にサブクローニングした。次に、制限酵素処理パターンとして、KpnI による 12.4 kb のフラグメント、KpnI/XhoI 処理による 7.1 kb、および、5.3 kb のフラグメントが、アガロース電気泳動のバンドとして確認できた事から、pGV-B2 vector へのサブクローニングが、予定通り遂行された事を確認した（Fig.4B）。

導入遺伝子コンストラクトの模式図を Fig.5A に示す。Col1a1-Luc Tg ラットの DNA コンストラクトは、ラット I 型コラーゲン α1 鎖の転写開始点上流-14,247 bp から+113 bp の領域の遺伝子発現制御下にルシフェラーゼ遺伝子を連結したものであり、転写制御領域には、14 個の CAGACA 配列、すなわち、Smad binding elements が含まれている（転写開始点から、-13,821, -13,531,-10,702, -10,468, -9,487, -9,271, -8,796, -7,283, -6,624, -

5,157, -2,256, -2,226 bp の部位)。一方、Col1a2-Luc Tg ラットの DNA コンストラクトは、ラット I 型コラーゲン α2 鎖の転写開始点上流-7,585 bp から+89 bp の領域の遺伝子発現制御下にルシフェラーゼ遺伝子を連結したものであり、転写制御領域には、5 個の CAGACA 配列、すなわち、Smad binding elements が含まれている（転写開始点から、-4,985, -4,636, -4,371, -2,455, -2,451 の部位)。

当初、Col1a1-Luc Tg ラットのサザンブロット解析は、453-5 系統の F0, F5, F7 世代、および、455-2 系統の F3 世代の尻尾サンプルを用いて実施したが、スメアなパターンになってしまい、明確なバンドは確認出来なかった（Fig.5B, lanes 1-7)。凍結保存中にサンプルが分解した可能性が示唆された為、8 世代以上、交配を続けて、飼育中の 453-5 系統の肝臓、および、尻尾サンプルを用いて、サザンブロット解析を実施した。AseI/HpaI 処理により、15.2 kb の位置にバンドがみられ、XbaI 処理により、5.4 kb の位置にバンドがみられた（Fig.4C)。制限酵素処理の結果、予期した位置にバンドが見られた事から、導入遺伝子は世代を超えて維持されている事が確認できた。Col1a2-Luc Tg ラットのサザンブロット解析は、F0 世代の尻尾サンプルを用いて実施した。BglII/BamHI 処理による 8.1 kb のバンド、HpaI 処理による 5.6 kb のバンド、および、HincII 処理による 3.6 kb のバンドは、いずれも、導入遺伝子コンストラクトのデザインから予期された位置のバンドである事から、Col1a2-Luc Tg ラットが導入遺伝子を保持している事が確認できた（Fig.5B, lanes 8-11)。

組織別ハイドロキシプロリン量とルシフェラーゼ活性値を Table 1 に示す。Col1a1-Luc Tg ラット、Col1a2-Luc Tg ラット、いずれの系統も尻尾や肺などのコラーゲン含量の多い組織、すなわち、コラーゲンに特異的なアミノ酸であるハイドロキシプロリン量の多い組織で、高いルシフェラーゼ活性値を示した。Col1a1-Luc Tg ラットでは、ハイドロキシプロリン量とルシフェラーゼ活性値に高い相関が認められた（r = 0.99, Fig.6A)。一方、Col1a2-Luc Tg ラットにおいても、ハイドロキシプロリン量とルシフェラーゼ活性値に高い相関が認められたが（r = 0.94, Fig.6B)、全体的なルシフェラーゼ活性は、Col1a1-Luc Tg ラットと比較すると、低値であった。従って、これ以降の実験については、Col1a1-Luc Tg ラットを用いて実施した。臓器中には種々の細胞が存在しており、細胞ごとに発現量や代謝回転が異なる為、whole の臓器を用いた評価では、ルシフェラーゼ活性と mRNA の相関関係を正確に評価するのは困難と考えられた。従って、コラーゲン産生細胞として、血管平滑筋細胞、皮膚線維芽細胞、コラーゲン非産生細胞（もしくは弱発現細胞）として、肝細胞を選択し、それらの細胞を各々、単離して初代培養し、α1(I) collagen mRNA とルシフェラーゼ活性の相関を検討した。この様に均一な細胞集団で比較する事により、α1(I) collagen mRNA とルシフェラーゼ活性は高い相関を示す事が確認できた（r = 0.97, Table 2, Fig.6C)。

最後に、本章の目的である線維症モデルの評価期間を短縮できるかどうかを検証する為、腎線維化モデルとして、汎用されている UUO model を用いて、ハイドロキシプロリ

ン量（コラーゲン蛋白）、mRNA、レポーター活性（ルシフェラーゼ活性値）の経時変化を追跡した（Fig.7）。腎ハイドロシキプロリン量は、反対側の非結紮腎に対して、UUO3 日後ではわずか 1.3 倍の増加率だが、7, 14 日後には統計学的有意に増加した（各々、2.1 倍、3.4 倍, Fig.7A）。ハイドロシキプロリン量と比較して、ルシフェラーゼ活性は、わずか 3 日目で 5.4 倍に上昇し、7,14 日後と時間経過に伴って上昇した（各々、6.5 倍、9.5 倍, Fig.7B）。一方、α1(I) collagen mRNA は、3 日目で 5.7 倍に上昇し、ルシフェラーゼ活性と同程度の上昇率を示したが、7 日目でピークに達し（19 倍）、14 日目での増加率は 12 倍で、7 日目よりも低値を示した（Fig.7C）。 I 型コラーゲンは、α1 鎖 2 本と α2 鎖 1 本で三重螺旋構造を形成する為、α2 鎖の mRNA 発現も評価したが、α2(I) collagen mRNA は、α1(I) collagen mRNA と似た発現パターンを示した（Fig.7D）。評価期間を通して、ルシフェラーゼ活性値とハイドロキシプロリン量の上昇率には高い相関が認められた（r = 0.91, Fig. 7E）。しかしながら、α1(I) collagen mRNA は、ハイドロキシプロリン量と中程度の相関しか示さなかった（r = 0.62, Fig.7F）。

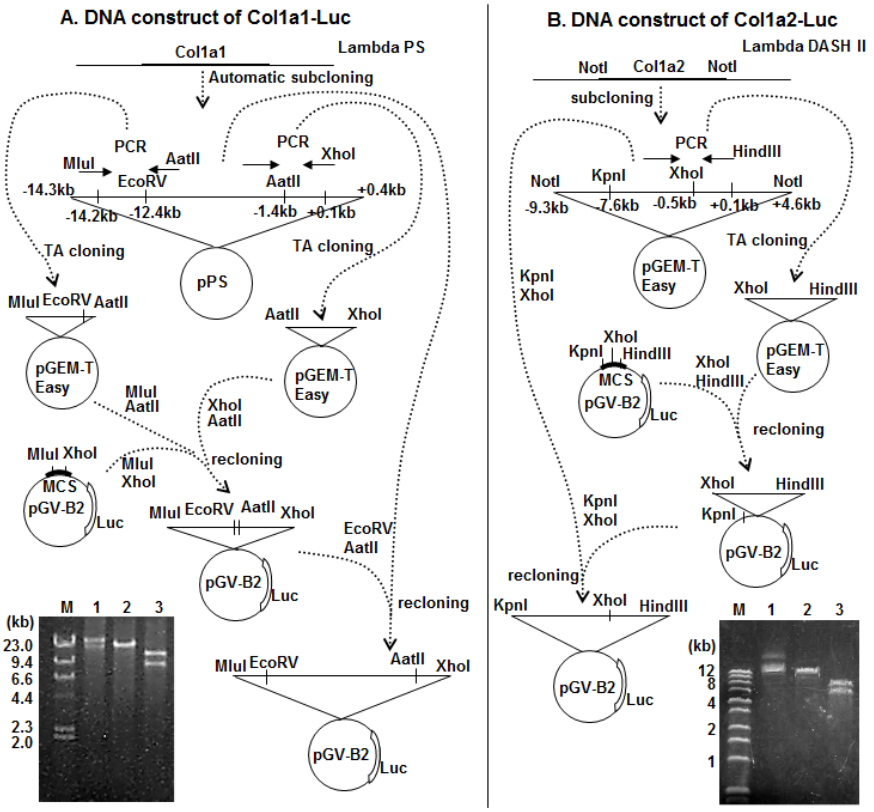

Fig. 4. Schematic diagram of the procedure to construct plasmids containing the 5'-flanking region of α1(I) collagen or α2(I) collagen with luciferase.

A: construction of 5'-flanking region of α1(I) collagen-luciferase (Col1a1-Luc) plasmid. Lane M, lambda HindIII DNA markers; lane 1, no digestion of the constructed Col1a1-Luc plasmid; lane 2, AatII digestion of the constructed Col1a1-Luc plasmid; lane 3,

AatII/EcoRV double digestion of the constructed Col1a1-Luc plasmid. B: construction of 5'-flanking region of α2(I) collagen-luciferase (Col1a2-Luc) plasmid. Lane M, perfect DNA markers, 0.1–12 kbp (Novagen, Madison, WI); lane 1, no digestion of the constructed Col1a2-Luc plasmid; lane 2, KpnI digestion of the constructed Col1a2-Luc plasmid; lane 3, KpnI/XhoI double digestion of the constructed Col1a2-Luc plasmid.

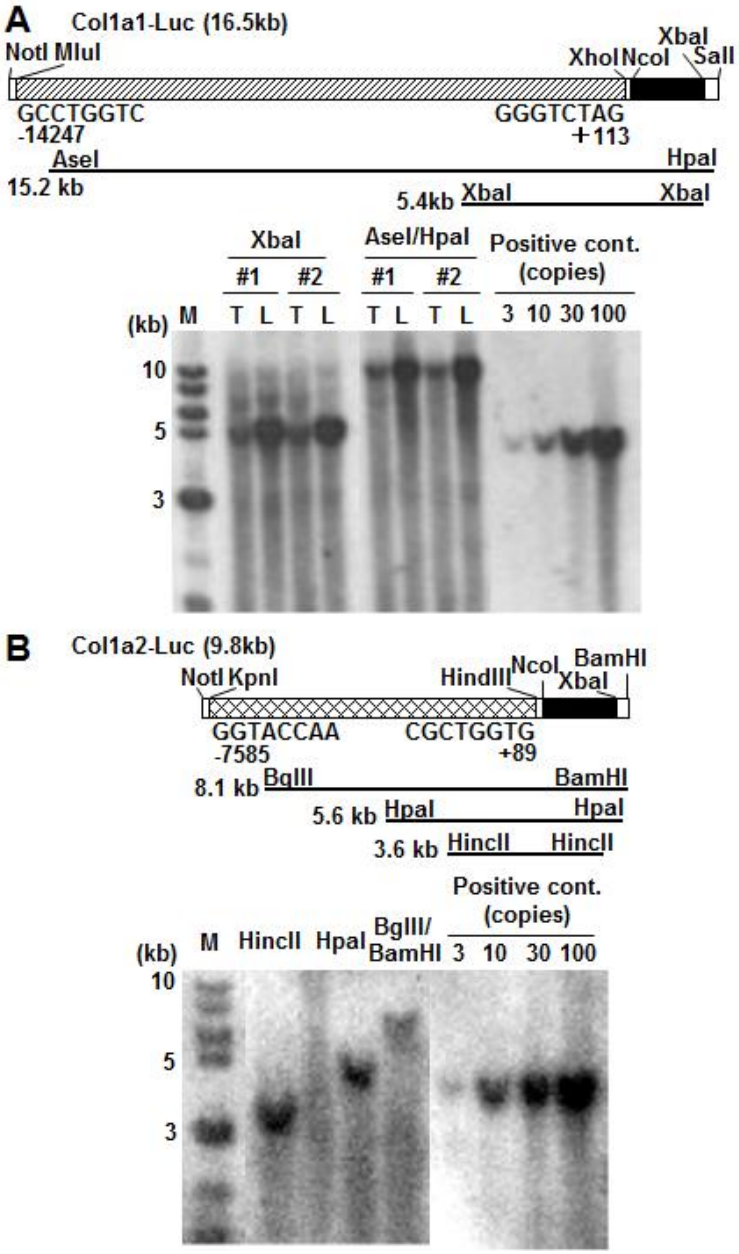

Fig. 5. Diagrams of transgenes and Southern blot analysis.

A: DNA constructs of Col1a1-Luc transgenic (Tg) rat and Col1a2-Luc Tg rat. The solid box, the open box, the hatched box, and the cross-hatched box represent the luciferase

gene, the vector sequence, the 5'-flanking region of rat α1(I) collagen, and the 5'-flanking region of rat α2(I) collagen, respectively. B: Southern blot analysis of Col1a1-Luc Tg rat and Col1a2-Luc Tg rat using the samples of early generation. 453–5 and 455–2, 2 lines of Col1a1-Luc Tg rat; F0, founder; F3, F5, and F7, 3rd, 5th, and 7th generation of F0, respectively; #1 and #2, sample number. C: Southern blot analysis of Col1a1-Luc Tg rat using the samples of late generation. T, tail sample; L, liver sample; M, NEB 1-kb ladder (New England BioLabs, Beverly, MA); positive control, NcoI/HincII digest of pGV-B2 vector; #1 and #2, sample number.

Table 1. Tissue hydroxyproline content and luciferase activity

Tissue	Hydroxyproline (μg/mg tissue)	Luciferase activity (pg/mg protein)	
		Col1a1-Luc	Col1a2-Luc
Heart	0.96	540	2.0
Liver	0.29	68	2.1
Kidney	0.64	580	1.5
Lung	2.7	4,200	39
Tail	9.9	59,000	990

Values of hydroxyproline are expressed as the mean of 4 female Wistar rats at 6 wk of age. Values of the luciferase activities in Col1a1-Luc Tg rats are expressed as the mean of 3 female rats at 7 wk of age. Values of the luciferase activities in Col1a2-Luc Tg rats are expressed as the mean of 1 male and 2 female rats at 5 wk of age.

Table 2. α1(I) Collagen mRNA and luciferase activity in primary cultured cells

Cell	Col1a1/ β -actin mRNA	Luciferase activity (pg/mg protein)
		Col1a1-Luc
Hepatocyte	1.0	990
VSMC	1,300	55,000
Fibroblast	820	25,000

Values of mRNA expression and luciferase activity are expressed as the mean of 3–5 replicates. Hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion method, and the experiment was performed at primary cultures (P1). Vascular smooth muscle cells (VSMC) and fibroblasts were isolated by the explant method from aorta and skin, respectively, and the experiment was performed at P1 (fibroblasts) or P2 (VSMC).

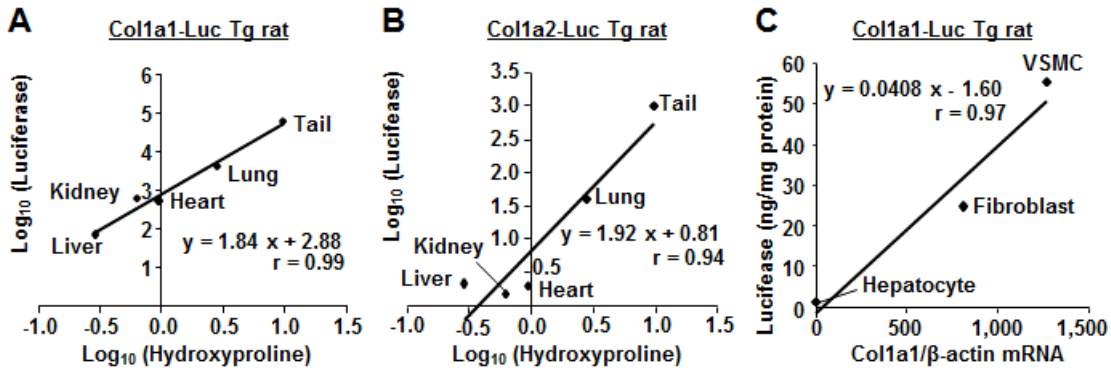

Fig. 6. Correlation between luciferase activity and hydroxyproline in tissues (A and B) or mRNA in primary cultured cells (C).

A: Col1a1-Luc Tg rat. B: Col1a2-Luc Tg rat. Detailed values and experimental animal data are described in Table 1. C: primary cultured cells of Col1a1-Luc Tg rat. Detailed values and experimental data are described in Table 2.

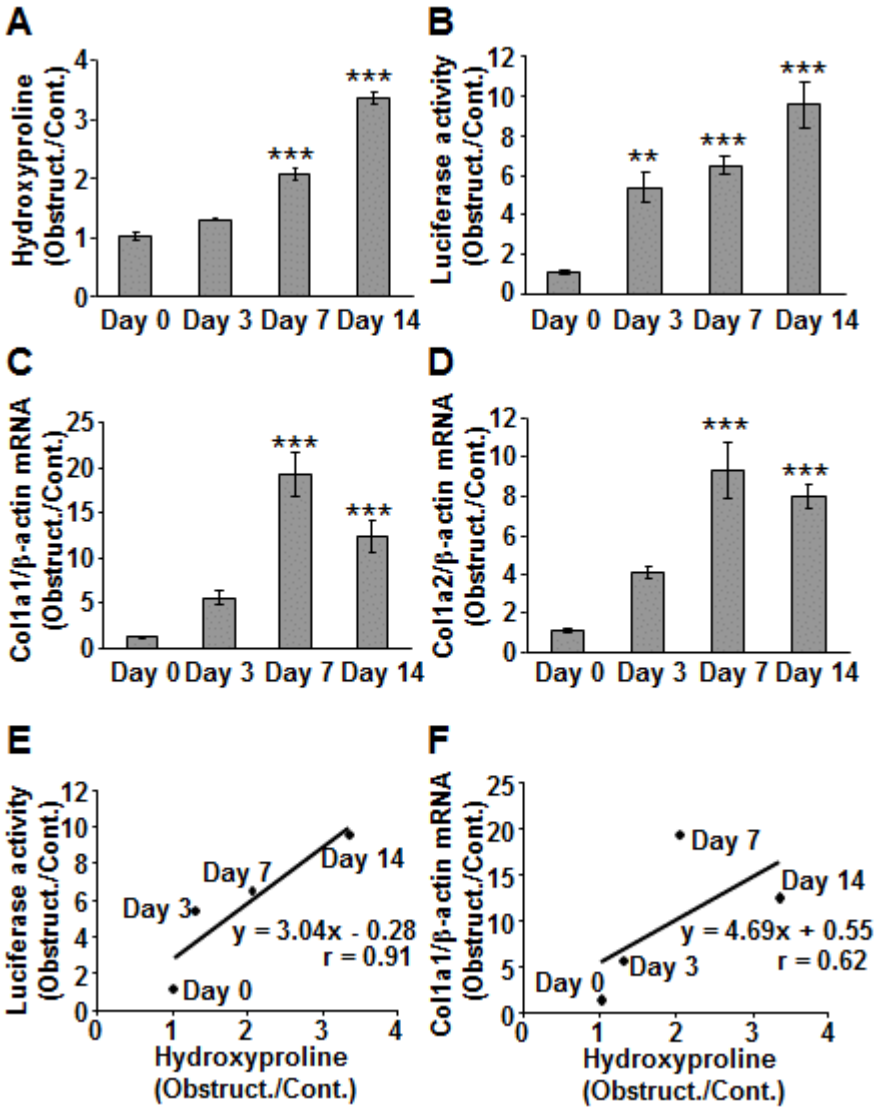

Fig. 7. Correlation between hydroxyproline and luciferase activity or α1(I) collagen mRNA level in the unilateral ureteral obstruction (UUO) model.

Male Col1a1-Luc Tg rats at 10 wk of age were subjected to UUO or sham operation and killed 0, 3, 7, or 14 days after UUO. A: hydroxyproline. B: luciferase activity. C: α1(I) collagen mRNA using β-actin as an internal standard. D: α2(I) collagen mRNA using β-actin as an internal standard. E: correlation between hydroxyproline and luciferase activity. F: correlation between hydroxyproline and α1(I) collagen mRNA. Values are means ± S.E. expressed as the ratio of the obstructed kidney to the contralateral normal kidney of 3–5 rats. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. day 0 (sham-operated control).

第二節：コラーゲンレポーターモデルマウスの作製

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 α2 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(7)。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事から、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。

実験材料と実験方法

動物

全ての動物実験は第一三共（株）実験動物ガイドラインに従って実施した。Col1a1-IRES-Luc KI マウスはヘテロ接合型で導入遺伝子を維持して繁殖した。C57BL/6N マウスに 8 回以上、戻し交配を実施し、コンジェニック化した。ブレオマイシン肺線維症の検討には、5-14 週齢の雄の KI マウスを用いた。各組織におけるルシフェラーゼ値とハイドロキシプロリン値の相関に関する検討には、14 週齢の雌の KI マウスを用いた。動物は明暗 12 時間サイクルの照明下、室温 23 ± 3℃、ペレット食に自由給餌、自由給水の状態で、飼育した。

KI-targeting construct

マウス Col1a1 の 3'-UTR、すなわち、ストップコドンの直下に、IRES2（Clontech, Mountain View, CA, USA）、および、ルシフェラーゼ（TOYO B-Net, Tokyo, Japan）を連結したコンストラクトを相同組換する様、IRES-Luc-targeting construct をデザインした（Fig.8A）。Embryonic stem（ES）細胞のゲノム DNA を鋳型にして、5′-GCT AGC TTT ACA CGA AGC AGG CAG GGC CAA TG-3′、および、5′-GTC GAC GGC TTT TTC AAG TCA AGA TCT AAC ACA CT-3′のプライマーセットで PCR を実施する事で、2.5-kb の PCR 産物を得た。この PCR 産物を pBluescript-MCA/DTA にサブクローニングして配列を確認後、KI-targeting construct の 5' arm として、construct の 5'側に ligation した。同様に、ES 細胞のゲノム DNA を鋳型にして、5′-GTC GAC ACT CCC TCC ACC CCA ATC TGG TTC CCT-3′、および、5′-TCT CCT AGG GTT TCA CAA CTT CCT TTA G-3′のプライマーセットで PCR を実施する事で、8.0-kb の PCR 産物を得た。この PCR

産物を pBluescript-MCA/DTA にサブクローニングして配列を確認後、KI-targeting construct の 3' arm として、construct の 3'側に ligation した。

Col1a1-IRES-Luc KI マウスの作製

129S6/SvEvTac マウス由来 ES 細胞（PhoenixBio, Higashi-Hiroshima, Japan）は、胎児線維芽細胞を feeder として、組換え leukemia inhibitory factor を含んだ一般的な ES 細胞培地で培養した。KI-targeting construct をエレクトロポレーションにてトランスフェクションし、G418 耐性のクローンを単離した。意図した通りに相同組換えが起こっているか確認する為、各クローンからゲノム DNA を単離し、KpnI で制限酵素処理後、サザンブロッティングを実施した（Fig.8B、左図）。ストップコドンから上流 3.5 kb に位置する領域をプライマーセット（5′-CTA GAT GAA GGC TAA GTA ATC ACT-3′、5′-ACC TTT AAT CCC AGC ACT AAG GAA-3′）で増幅し、得られた 848 bp の PCR 産物をサザンブロッティングのプローブとして用いた。正しい相同組換えが確認できたクローンに対して、phosphoglycerine kinase-neomycin marker cassette を除去する為、Cre 発現ベクターをトランスフェクション後、G418 不含培地で培養した。次に、C57BL/6N マウスの胚盤胞に ES 細胞をインジェクションし、偽妊娠させた CD-1 マウスに移植した。産仔のキメラマウスかどうかの判定は毛色で実施した。上述のクローン選択と同様の方法にて、産仔の尻尾サンプルのゲノム DNA を KpnI 処理して、相同組換えの確認を行った。また、neo cassette が除外されている事を確認する為、ゲノム DNA を PstI/HincII 処理した後、Luc probe でサザンブロッティングを行った（Fig.8B、右図）。コンジェニック化の為、F0 マウスは 8 世代以上、C57BL/6N マウスと戻し交配を実施した。

Time course of luciferase activity in the UUO model

20 週齢のノックインマウス雄を用いて実験を行った。各群 N = 5-6 で実施した。UUO オペは左尿管を 2 ヶ所、結さつした。UUO 処置、0, 3, 7, 14 日目にマウスを sacrifice し、UUO 腎、非結さつ腎のルシフェラーゼ活性を測定し、非結さつ腎に対する UUO 腎のルシフェラーゼの値を算出した。Day 0 は偽手術した動物を用いた。比較の為の Col1a1-Luc Tg rat の値は Fig. 7 を参考にした。

結果および考察

I 型コラーゲン α1 鎖の発現を感度良く評価可能なマウスを作製する為、IRES の Knock-in 技術を利用して、IRES の前に I 型コラーゲン α1 鎖、後ろにルシフェラーゼ遺伝子を配置したターゲットベクターをデザインした（Fig.8A）。IRES を用いると、その前後に配置された遺伝子をバイシストロニックに 1 つの mRNA から翻訳される為、同じ転写効率で、前後の遺伝子が転写される事になる。ネオマイシン耐性遺伝子の薬剤選択マーカーカセットを含んだ IRES-Luc DNA コンストラクトをマウス Col1a1 のストップコドン

の直下に相同組換えした。この様な薬剤選択マーカーは、近接する遺伝子発現に影響を及ぼすという報告（9）があるので、相同組換え後に除去出来る様、ネオマイシン耐性遺伝子の近傍に LoxP 部位を配置しており、薬剤選択された ES 細胞に Cre をトランスフェクションする事で、ネオマイシン耐性遺伝子を除去した。Cre をトランスフェクションしたクローンを胚盤胞にインジェクションし、ファウンダー（F0）として雄のキメラマウスを得た。遺伝子改変動物がメンデルの法則に従って生産される事から、生殖細胞系列へ遺伝子組換えされている事を確認した。F0 動物のゲノム DNA をサザンブロット解析した結果、IRES-Luc が相同組換えされている事、マウス Col1a1 locus が保存されている事、および、ネオマイシン耐性遺伝子カセットが除去されている事が確認された（Fig.8B）。

種々の組織（皮膚、肺、大動脈、心臓、腎臓、肝臓）について、ルシフェラーゼ活性値とハイドロキシプロリン量を評価した結果、皮膚や大動脈等、コラーゲン含量の高い組織では、高いルシフェラーゼ活性値を示した（Table 3）。また、ルシフェラーゼ活性値とハイドロキシプロリン量に高い相関がある事を確認した（Fig.9）。これらの結果から、本マウスにおけるルシフェラーゼ活性値は、コラーゲン蛋白の指標として有用と考えられた。

前節同様、本章の目的である線維症モデルの評価期間を短縮できるかどうかを検証する為、UUO model を用いて、ハイドロキシプロリン量、ルシフェラーゼ活性値の経時変化を追跡した（Fig.10）。比較の為、各グラフの右側に Col1a1-Luc Tg ラットを用いた時の値を示した（Fig.7 参照）。Col1a1-IRES-Luc KI マウスのハイドロキシプロリン量の上昇率（UUO 腎/コントロール腎）は、Day 3、Day 7、Day 14 で各々、1.2 倍、1.8 倍、2.5 倍であった（Fig.10B）。一方、ルシフェラーゼ活性の上昇率は、Day 3、Day 7、Day 14 で各々、13.1 倍、25.6 倍、51.4 倍であり、ハイドロキシプロリン量に比べて、顕著に高い上昇率を示した（Fig.10A）。今回の結果から、Col1a1-IRES-Luc KI マウスを用いる事により、線維化の短期評価が可能と考えられた。KI マウスと Tg ラットで、ハイドロキシプロリン量の上昇作用に、それほど、差はみられなかったが（Fig.10B）、ルシフェラーゼ活性の上昇率は、Tg ラットと比較して、KI マウスで顕著に高値を示した（Fig.10A）。KI マウスは、そのシステム上、レポーター遺伝子の発現制御に、I 型コラーゲン α1 鎖の全ての領域（5’上流、3’下流、エクソン、イントロン）の転写制御因子（プロモーター、エンハンサー、サイレンサー）を利用する為、生理学的作用はより生体に近いと考えられるが、Tg ラットは、遺伝子導入した 5’上流領域のみの転写活性を評価している。今回の結果から、I 型コラーゲン α1 鎖の発現制御には、5’上流領域以外にも、発現上昇に寄与する部位が存在する事が示唆された。

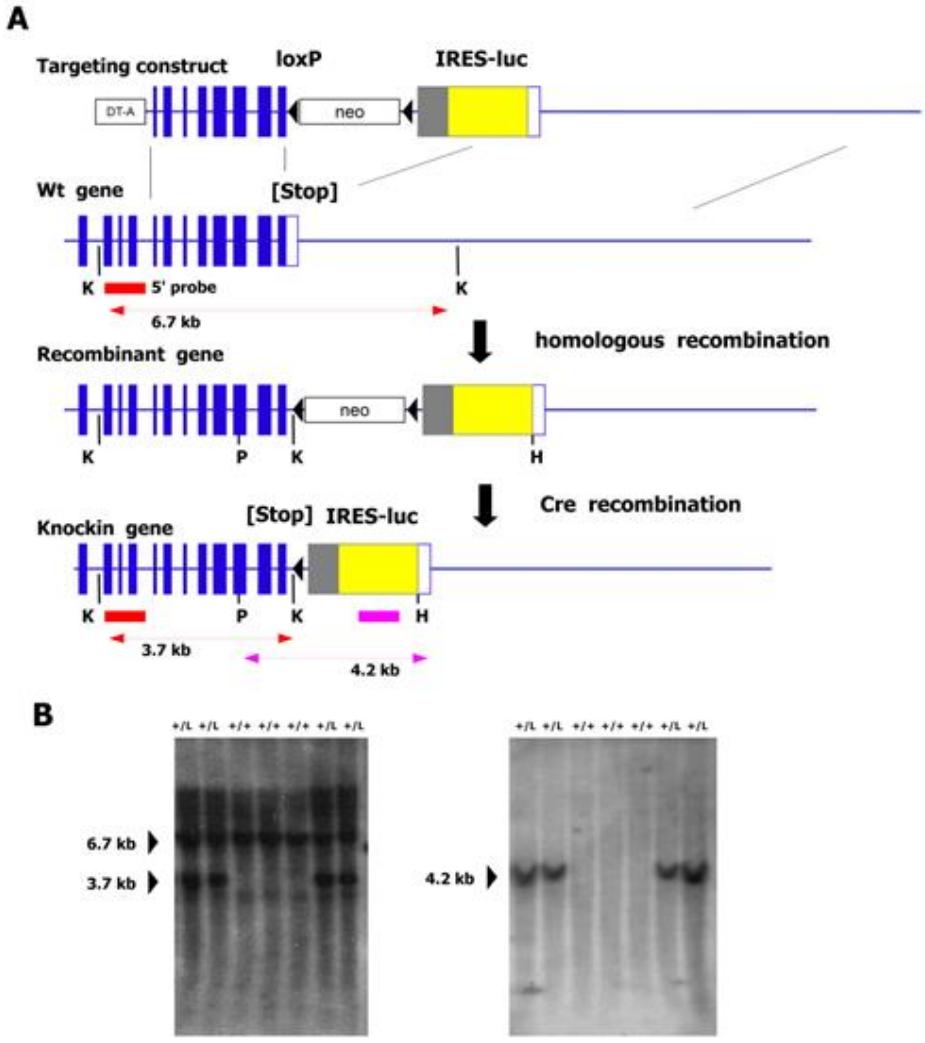

Fig. 8. Homologous recombination scheme of the IRES-Luc construct into the 3′-UTR of the Col1a1 locus.

(A) A linearized Col1a1-targeting construct was transfected into mouse embryonic stem cells. The circular Cre (encodes Cre recombinase) expression plasmid was transiently transfected into homozygously recombined clones to remove the phosphoglycerate kinase-neomycin marker cassette. Through Cre activity, the floxed neo (encodes neomycin) selection cassette was deleted, resulting in the knock-in Col1a1 allele. (B) Homologous and Cre recombinations in F0 (first filial generation) mice were confirmed by Southern blot analyses with 5′ flanking and luc probes. The 5′ flanking probe (left panel) detects the 6.7-kb wild-type and 3.7-kb targeted fragments. The luc probe (right panel) detects a 4.2-kb targeted fragment.+ indicates wild-type (Wt); L indicates the luc knock-in allele. K, P, or H represents the enzyme restriction site for KpnI, PstI, or HincII, respectively.

Table 3. Luciferase activity and hydroxyproline content in various tissues of Col1a1-IRES-Luc KI mice.

	Relative luciferase act. (Lung=1)	Hydroxyproline (μg/mg tissue)
Liver	0.018 ± 0.0019	0.39 ± 0.016
Heart	0.10 ± 0.0087	1.4 ± 0.064
Kidney	0.078 ± 0.0045	1.8 ± 0.098
Lung	1.0 ± 0.099	7.0 ± 0.32
Aorta	1.4 ± 0.10	18.5 ± 3.8
Skin	3.4 ± 0.31	19.3 ± 1.5

Data are calculated as the luciferase activity relative to the lung (Lung = 1) and then expressed as means ± S.E. for five female Col1a1-IRES-Luc KI mice aged 14 weeks.

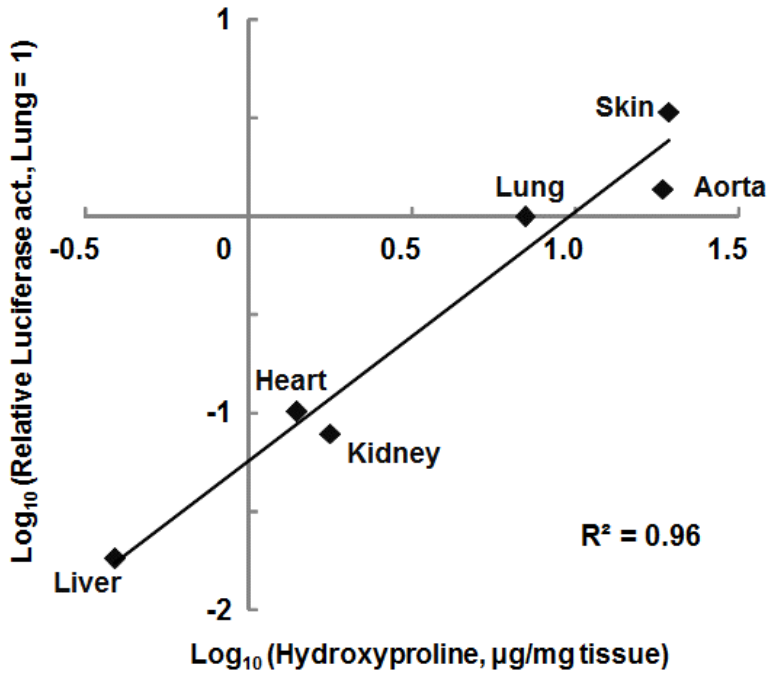

Fig. 9. Correlation between luciferase activity and hydroxyproline content in several tissues of Col1a1-IRES-Luc KI mice.

Five female Col1a1-IRES-Luc KI mice aged 14 weeks were used. R^2 is the square of Pearson's correlation coefficient R.

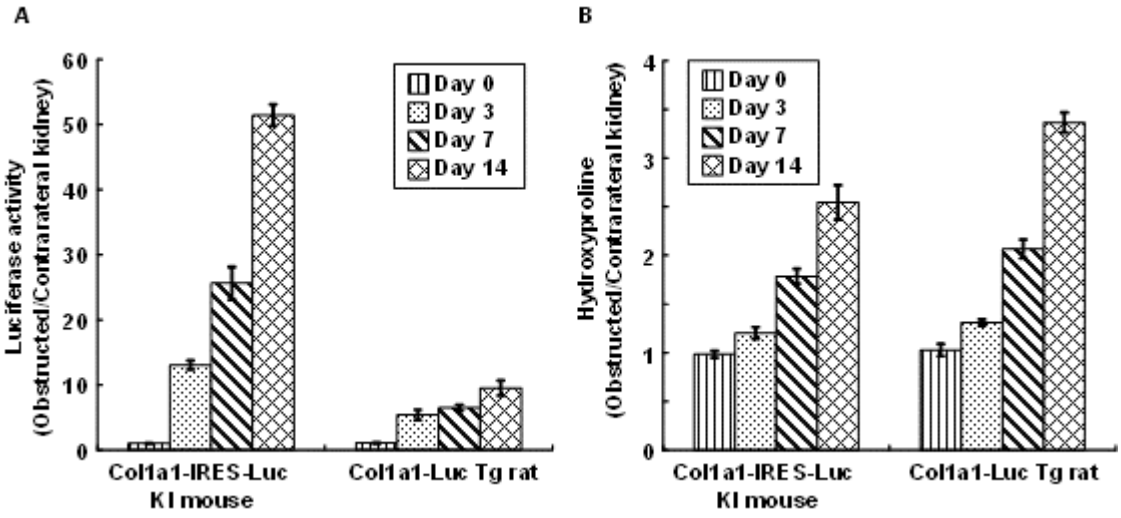

Fig. 10. Time course of luciferase activity (A) and hydroxyproline (B) in the UUO model.

UUO operation was performed at Day 0. Luciferase activity is shown in the left panel (A) and hydroxyproline content is shown in the right panel (B) at Day 0, 3, 7 and 14 after UUO. Values are shown as the relative expressions of UUO kidneys to contralateral kidneys. Values are expressed as the means ± S.E. of five to six male Col1a1-IRES-Luc knock-in mice at the age of 20 week-old.

第三節：小括

- 線維化を短期評価可能な動物モデルとして、コラーゲンレポーターを導入した Col1a1-Luc Tg ラット、および、Col1a2-Luc Tg ラットを作製した。各組織におけるルシフェラーゼ活性は Col1a1-Luc Tg ラットの方が高く、感度面から Col1a1-Luc Tg ラットを評価モデルとして採用した。
- 線維化を短期評価可能な動物モデルとして、コラーゲンレポーターを導入した Col1a1-IRES-Luc KI（knock-in）マウスを作製した。
- 腎線維化モデル（UUO モデル）を用いて、上記のモデル動物が、コンベンショナルなハイドロキシプロリン法よりも、短期間に感度良く、線維化を検出可能な事を確認した。

第二章：ALK5 阻害剤の創薬研究

糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎は、透析導入原疾患の第一位と第二位であり、患者数が多い疾患である。糖尿病性腎症は糖尿病に伴って起こる腎疾患である為、糖尿病を治療するという根本的な治療法があるが、慢性糸球体腎炎は原因が多岐に渡り、有効な治療薬も少ない事から、治療薬の開発が望まれている疾患領域である。慢性糸球体腎炎には、IgA 腎症、膜性腎症、膜性増殖性腎炎、急速進行型糸球体腎炎など様々な腎炎がある。各々、原因は異なるが、糸球体の線維化病変である糸球体硬化を生じ、糸球体機能が破綻して、持続的な蛋白尿発症、尿細管間質障害を起こして、最終的に尿細管間質線維化という共通の病態進行過程を辿る。線維化阻害剤は、共通パスウェイ中の糸球体硬化と尿細管間質線維化の両方に薬効を示す可能性がある為、有効性が期待される。これまで、ALK5 阻害剤の腎に対する抗線維化作用に関して、UUO モデルでの報告はあるが（10)、片腎 Thy1 腎炎モデル（慢性糸球体腎炎モデル）での報告はなされていない。また、既存の抗線維化剤としては、Pirfenidone や Nintedanib が肺線維症を適応として承認されているが、薬効面、副作用面からの課題も多い。TGF-β は線維化の key mediator である為、TGF-β を阻害する事で、強い抗線維化作用が期待できる。以上の観点から、TGF-β のシグナルを遮断する ALK5（TGF-β type I receptor）阻害剤の創薬研究を実施した。

第一節：R-268712（ALK5 阻害剤）の構造、in vitro 活性、PK データ

実験材料と実験方法

動物

動物の飼育等は、前述の記載に従った。WKY/Hos ラットは星野試験動物飼育所（Saitama, Japan）から購入した。Col1a1-Luc Tg ラットは、前章で作製したものを用いた。

ALK5 キナーゼ活性測定

ヒト ALK5 細胞内キナーゼドメイン（ALK5-KD; amino acids 200-504）を pGST-PSP vector（generated from commercially available vector with CMV promoter）にクローニングした。ALK5-KD/pGST-PSP vector を Lipofectamine 2000（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いて、293-T 細胞にトランスフェクションした。Whole cell lysate から、GST 精製キット（GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)、および、PreScission protease digestion（GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA）を用いて、ALK5-KD 蛋白を精製した。基質として、ヒト Smad3 を pGEX-6P-1 vector（GE Healthcare,

Piscataway, NJ, USA）の GST 近傍にクローニングし、TOP10 コンピテントセル（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）にトランスフェクションした。大腸菌を 0.2 mM isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside（IPTG）を含んだ LB 培地で、28℃、8 時間培養する事で、GST-Smad3 融合蛋白を発現させた。GST-Smad3 融合蛋白を GST-Flash plate（PerkinElmer）に 4℃、一晩インキュベートして結合させた後、Tris-buffered saline（TBS）で洗浄操作を実施した。ALK5-KD と化合物を反応液（50 mM HEPES containing 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 2 µM ATP, and 0.005 µCi/µl [γ-^{33}P]-ATP）に入れて、30℃、150 分間インキュベート後に、γ-^{33}P をシンチレーションカウンターで測定する事で、ALK5 キナーゼ阻害活性を評価した。使用核種としては、^{32}P と比較して、ß 線エネルギーは 7 分の 1 以下だが、半減期が 10 日間長い ^{33}P を用いた。

TGF-beta reporter assay

p3TP vector をトランスフェクトした Mv1Lu 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、DMEM/10% FCS 培地で confluent になるまで CO2 インキュベーターで培養した。無血清 DMEM 培地に培地交換し、化合物を添加 15 分後に、TGF-beta を終濃度 1 ng/mL となる様、添加した。6 時間培養後に、DMEM/10% FCS 培地に培地交換し、steady Glo を添加後、発光量を測定した。

p38ß2 MAP キナーゼ活性測定

p38ß2 MAP キナーゼ阻害活性は、市販のキット（MolecularDevices）を用いて測定した。

R-268712 のラット PK（薬物動態）

R-268712 は 0.5% sodium carboxymethyl cellulose（CMC）に懸濁後、0.3, 1, 3, 10 mg/kg の用量で、ゾンデを用いて WKY/Hos ラットに経口投与した。投与 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 時間後に、イソフルラン麻酔下で、頸静脈から採血を実施した。血漿中薬物濃度は、API4000 liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)で測定した。PK パラメーターは、解析ソフト Biobook（ID Business Solutions Ltd.）を用いて実施した。

結果および考察

病態モデルの評価期間が長いと、1) 必要な化合物量が多くなる、2) 情報のフィードバックに時間がかかり、誘導体展開が遅延する等の問題が発生する為、短期評価モデルを評価フローに組み込む事は、創薬研究を円滑に進行する上で有効と考えられる。この様な観点から、今回、コラーゲンレポーターを用いた短期評価モデルを構築し、ALK5 阻害剤の

創薬研究の評価フローに組み込んだ（Fig.11）。疾患モデルは腎メサンギウム細胞に発現する Thy1 抗原に対する抗 Thy1 抗体を投与して、糸球体腎炎を発症させるモデルであるが、マウスメサンギウム細胞には Thy1 抗原が発現していない為、マウスに抗 Thy1 抗体を投与しても、糸球体腎炎は発症しない。また、ラットとマウスは体の大きさが全く異なり、薬物の代謝・排泄速度が異なる為、疾患モデルと短期 in vivo モデルの動物種は、同じにする事が望ましいと考えられた。従って、第一章でラットとマウスのレポーターアッセイ動物を作製したが、短期 in vivo モデルとして、ラットレポーターアッセイ動物を採用した。ALK5 阻害剤は、元々、p38MAP kinase 阻害剤から派生した低分子化合物であり、TGF-beta type I receptor （ALK5）の細胞内 Ser/Thr domain のリン酸化を阻害する作用を有する。GSK 社が先行して創薬研究を進めていた為、GSK 社特許化合物の中から、体内曝露が良好で、in vivo での薬効が期待出来そうな SB-431542 をリード化合物として、誘導体展開を実施した。R-268712: 2-[4-[2-fluoro-5-[3-(6-methylpyridine-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl] phenyl] pyrazol-1-yl] ethanol は、SB-431542 から誘導体展開して得られた pyrazole 誘導体である（Fig.12）。R-268712 の ALK5 阻害作用（IC_{50}）は、非常に高く（IC_{50} = 2.5 nM）、誘導体展開のリード化合物として用いた SB-431542 （IC_{50} = 96 nM）より約 40 倍、強力な作用を有する事を確認した（Table 4）。ALK5 阻害剤は、p38 MAP キナーゼ阻害剤から分離した起源を持つ為、R-268712、および、SB-431542 の両化合物とも弱い p38 MAP キナーゼ阻害作用を有するが（IC_{50} は各々、12.1 μM、15.3 μM）、R-268712 は ALK5 阻害活性が強くなった分、キナーゼ選択性は向上した（Table 4）。R-268712 の薬物動態を評価する為、長期薬効評価モデル（片腎 Thy1 腎炎モデル）の使用系統である WKY/Hos ラットに、0.3, 1, 3, 10 mg/kg の 4 用量を単回経口投与し、血中濃度を経時的に測定した（Fig.13）。ALK5 阻害活性、および、PK データから、R-268712 は 1 mg/kg の経口投与で十分な薬効を示すと考えられた。その根拠として、R-268712 の無細胞系での in vitro 活性は、前述の IC_{50} = 2.5 nM であるが、Mv1Lu（ミンク肺）細胞を用いた p3TP レポーターアッセイ（TGF-beta reporter assay）での IC_{50} = 17 nM であった（Table 4）。0.3 mg/kg をラットに曝露した際に、17 nM を維持出来る時間は、約 6 時間である為、一日の 1/4 しか薬効を示さないと考えられた。一方、1 mg/kg の曝露量では、約 20 時間近く、17 nM を維持出来る為、十分な薬効を示すと考えられた。

Fig. 11. Assay flow for development of ALK5 inhibitor.

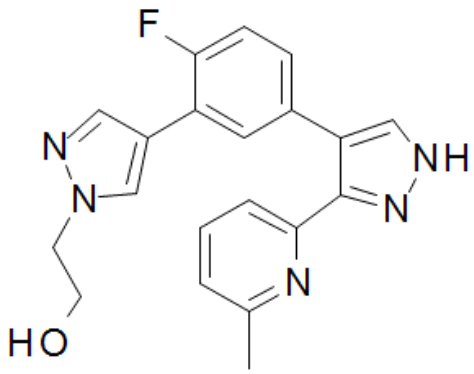

Fig. 12. The chemical structure of R-268712.

R-268712 is a pyrazole derivative and a specific inhibitor of ALK5.

Table 4. **In vitro inhibitory activities of ALK5 inhibitors.**

	R-268712	SB-431542
ALK5 kinase	2.5	96
TGF-beta reporter (Mv1Lu-p3TP)	17	200
p38MAP kinase	12100	15300

Data shown are IC_{50} values (nM)

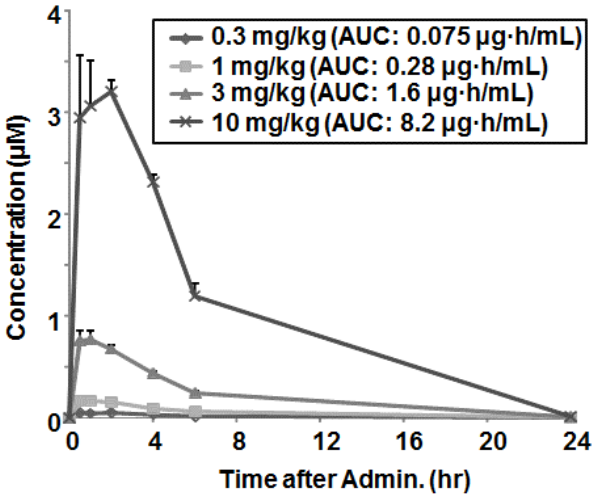

Fig. 13. Pharmacokinetic profile of R-268712 after a single oral dose in rats.
R-268712 was suspended in 0.5% CMC and dosed at 0.3, 1, 3, and 10 mg/kg in male WKY/Hos rats. The plasma concentration of R-268712 is expressed as the mean ± S.E. for data from 4 rats.

第二節：腎尿細管間質線維化モデルに対する ALK5 阻害剤の薬効評価

実験材料と実験方法

ルシフェラーゼ活性測定、ハイドロキシプロリン定量

前章に記載の方法にて実施した。

ラット UUO（Unilateral ureteral obstruction）モデル

Figure 14 では、13-14 週齢の雌の Col1a1-Luc Tg ラットを 10 群に分け、1 群あたり 5 匹のラットを用いた。Figure 15 では、10-14 週齢の雄の Col1a1-Luc Tg ラットを 4 群に分け、1 群あたり 5-6 匹のラットを用いた。UUO 処置は前章の方法に従った。化合物は 0.5% CMC で懸濁後、1, 3, 10 mg/kg の用量で一日一回経口投与した。投与期間は UUO オペ前日から、解剖前日の 4 日間投与した。UUO 処置 3 日後に解剖し、結紮腎のルシフェラーゼ活性を評価した。Vehicle 群は 0.5% CMC を投与した。Control には、Vehicle 群の非結紮腎を用いた。

統計解析

前章に記載の方法にて実施した。

結果および考察

In vitro 活性、および、PK データから選抜された一連の誘導体に対して、短期評価モデルによる in vivo screening を実施した。Col1a1-Luc Tg ラットに UUO 処置し、3 日後に解剖して、腎ルシフェラーゼ活性を測定し、抗線維化作用を評価した。リード化合物の GSK 社 SB-431542 と比較して、複数の化合物でリード化合物を上回る薬効を示した（Fig.14）。RHI-3255（後の R-268712）は、一連の in vivo screening で最も強い抗線維化作用を示した為、用量を振って、さらに低用量で作用を示すか検討した。R-268712 は、1, 3, 10 mg/kg で各々、45%、57%、62%の抑制作用を示し、用量依存的に抗線維化作用を示した（Fig.15）。

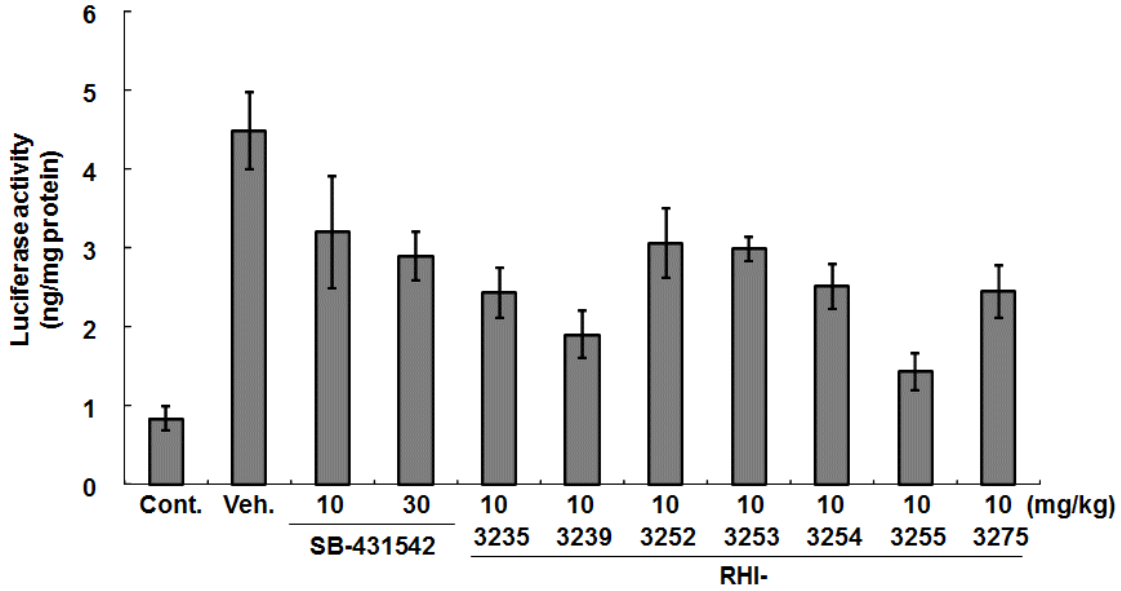

Fig. 14. In vivo screening of ALK5 inhibitor in a short-term assay of Col1a1-Luc Tg rat UUO model.

A series of ALK5 derivatives are evaluated in the short-term assay in the UUO model using Col1a1-Luc Tg rats. UUO operation was performed on Col1a1-Luc Tg rats. After 3 days, luciferase activity of UUO kidney was measured and corrected to the total protein concentration. Compounds were administered orally once daily for 3 days from a day before UUO operation. Vehicle group was administered with sodium carboxymethylcellulose. SB-431542 is an ALK5 inhibitor developed by GSK. RHI compound is a series of derivatives derived from SB-431542. RHI-3255 is identical to R-268712. Values are expressed as the means ± S.E. of five female Tg rats in each group aged 13 to 14 weeks.

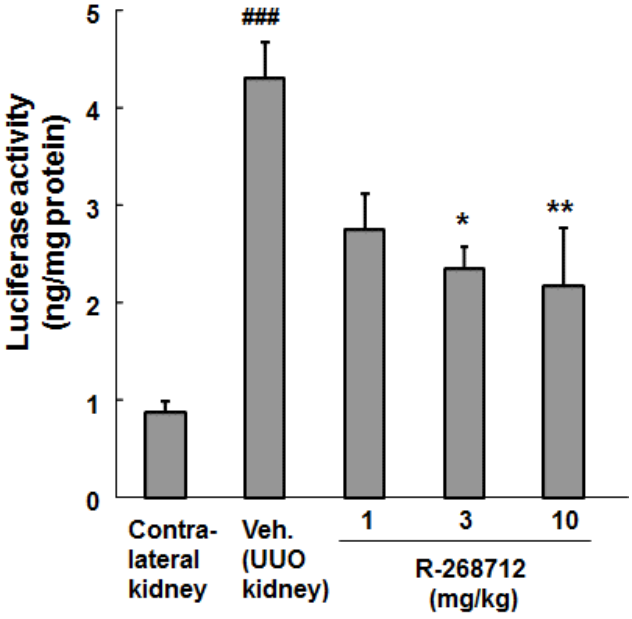

Fig. 15. The renal antifibrotic effect of R-268712 in the UUO renal fibrosis model.
10–14-week-old male Col1a1-LucTg rats were subjected to UUO and sacrificed 3 days later. R-268712 was orally administered 1 day before UUO preparation and every day thereafter. Vehicle group: obstructed kidney of vehicle-treated rats and other groups: obstructed kidney of compound-treated rats. The contralateral kidney of the vehicle group was used as the comparator value for calculations. Values shown are means ± S.E. for 5–6 rats. The symbol ### indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the contralateral kidney. The symbol of a single asterisk, or two asterisks indicates the statistical significance of $P < 0.05$ or $P < 0.01$ compared to the vehicle group, respectively.

第三節：慢性糸球体腎炎モデルに対する R-268712 の薬効評価

<u>実験材料と実験方法</u>

実験は 1 群 7 匹の 4 群で実施した。4 週齢の雄性 WKY/Hos ラットに対して、イソフルラン麻酔下で片腎を摘出した。片腎摘出 1 週間後に、イソフルラン麻酔下で、抗 Thy-1 抗体（clone OX-7, Millipore, CBL1500-K）を 1 mg/kg の投与量で頚静脈から投与した。Control 群は同容量の saline を投与した。R-268712 は、0.5% CMC に懸濁後、0.3、1 mg/kg の用量で経口投与した。Control 群、および、Vehicle 群には同容量の 0.5% CMC を経口投与した。化合物は、抗体投与当日から解剖前日まで、連日投与を実施した。尿アッセイのサンプリングの為、抗 Thy-1 投与日を Day 0 として、Day -3（プレ値）、Day

5、Day 11、Day 21、Day 28 に、ラットを代謝ケージに入れ、24 時間蓄尿を実施した。ラットは、抗 Thy-1 抗体投与 33 日目に解剖した。イソフルラン麻酔下で、ラット腎臓を PBS で灌流した。ラット腎臓を 10%ホルマリン液固定（病理切片用）、または、液体窒素で凍結し、使用時まで-80℃保存した（免疫染色用）。

糸球体硬化指数（Glomerular sclerosis index: GSI）の評価

ホルマリン固定した腎臓をパラフィン包埋し、薄切切片を作製した。常法に従って、PAM（periodic acid silver methenamine）染色し、病理評価を実施した。GSI スコア化は、Raiji 等の方法（11）に従い、50 個の糸球体の平均値で算出した。1 個の糸球体において、硬化病変の占める面積として、硬化病変が認められないものをスコア 0、硬化病変の面積が 0-25%のものをスコア 1、硬化病変の面積が 25-50%のものをスコア 2、硬化病変の面積が 50-75%のものをスコア 3、硬化病変の面積が 75%以上のものをスコア 4 とした。

尿中蛋白排泄量の測定

尿中蛋白排泄量の評価は、ピロカテコールバイオレット法（SysmexCorp.）にて実施した。尿サンプルを試薬と反応させ、吸光度をビオリス 24i プレミアム（Tokyo Boeki Machinery）で測定し、スタンダードカーブを用いて数値化した。ビオリスの評価値（濃度）に、尿量を乗じて、24 時間の総排泄量として示した。

血清クレアチニン値

血液サンプルは、解剖時にイソフルラン麻酔下で頚静脈から採血し、遠心分離によって血清を得た。血清サンプルを N-Assay L CRE-K（Nittobo Medical）の試薬と反応させ、ビオリス 24i プレミアム（Tokyo Boeki Machinery）で測定した。

ハイドロキシプロリン値

前章に記載の方法に従って、実施した。

免疫組織化学染色

凍結した腎臓を 6-7 μm の厚さに薄切し、風乾後に 4%パラホルムアルデヒドで固定した。内因性のペルオキシダーゼ活性は、メタノール中で 3%過酸化水素水と反応させる事で失活させた。2.5%の normal horse serum（Vector Laboratories, Burlingame, CA）でブロッキング後、抗 desmin 抗体（clone D33, Abcam,Tokyo, Japan）、または、抗 αSMA 抗体（clone 1A4, Abcam,Tokyo, Japan）を添加し、室温、1 時間インキュベートした。洗浄操作後、horseradish peroxidase 標識 2 次抗体（Histofine Simple Stain MAXPO, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan）を添加してインキュベートし、洗浄操作を行った。

次に、DAB（3,3'-diaminobenzidine, Nichirei Biosciences）で染色反応を行った。Haematoxylin で核を対比染色後、エタノールによる脱水操作、キシレンによる洗浄操作を行い、封入した。20 個の糸球体について、GSI と同様の方法にてスコア化を実施した。

単離糸球体アッセイ

5 匹の雄性 Col1a1-Luc Tg ラットから Misra の方法（12）によって、糸球体を単離した。ラットを麻酔下で放血によって安楽死させた後、腎臓を摘出した。被膜を除去後、PBS にて洗浄した。次に、一連のサイズの金属製 sieving mesh に通した。口径 250 μm、180 μm、150 μm のメッシュを通した後、53 μm のメッシュ上に残った組織を糸球体とした。顕微鏡下で、尿細管の切れ端がほとんど無く、糸球体が単離されている事を確認した。糸球体を DMEM/0.2% FCS 培地に懸濁し、1 ウェルあたり、150 から 200 糸球体となる様、96 ウェルプレートに播種した。化合物を DMSO で溶解し、各ウェルに添加した。化合物添加 30 分後に、human TGF-β1（10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN）を添加した。5% CO_2、37℃の CO2 インキュベーターで 48 時間培養後、PBS で洗浄し、50 μl の GLO lysis buffer（Promega, Madison, WI）で糸球体を溶解した。ライセートに対して、ルシフェラーゼ活性測定を行った。

統計解析

前章に記載の方法にて実施した。

結果および考察

コンベンショナルな Thy1 腎炎モデルは、蛋白尿が一過性であり、Thy1 抗体投与 1 週間後には自然治癒する急性糸球体腎炎モデルである。プレリミナリーな検討結果から、ラットの系統を、一般的に用いられている Wistar ラットから、WKY/Hos ラットに変更し、更に片腎を摘出する事によって、1 ヶ月以上、持続的な蛋白尿を呈する慢性糸球体腎炎モデルの作製に成功した（data not shown）。

ALK5 阻害活性、PK データ、および、UUO モデルの結果から、R-268712 の投与量を、0.3、1 mg/kg の 2 用量に設定し、片腎 Thy1 腎炎モデルに対する薬効評価を実施した。これらの用量では、有意な体重増加抑制を示さず（Fig.16）、活動性の低下等、薬効に影響を及ぼす事が懸念される全身性の副作用は認められなかった。Vehicle 群では、Thy1 抗体投与 11 日目に蛋白尿がピークに達し、28 日目まで持続的な蛋白尿が観察された。R-268712 投与群（1 mg/kg）では、Thy1 抗体投与 21 日目から 28 日目にかけて、顕著な蛋白尿の抑制作用が認められた（Fig.17）。腎機能の指標の 1 つである血清クレアチニン値は、Thy1 抗体投与 28 日目の Vehicle 群で、有意な上昇を示したが、R-268712 投与群（1 mg/kg）は、ほぼ正常動物レベルまで抑制した（Fig.18）。

Thy1 抗体投与 33 日目に解剖して、糸球体の組織学的解析を実施した。病態群では、多

くの糸球体で細胞外マトリクス形成を伴うメサンギウム細胞の増殖像が認められ、いくつかの糸球体では、さらに病態が進行した半月体形成が認められた。また、尿細管間質では、細胞浸潤を伴う尿細管壊死像も認められた。R-268712 投与群（1 mg/kg）では、これらの病理像を形態学的に改善している事が確認できた（Fig.19A）。糸球体硬化指数（GSI: glomerular sclerosis index）を用いて、スコア化して半定量的に薬効評価を実施した結果、R-268712 投与群（1 mg/kg）は、病態群で悪化した糸球体硬化指数を約 30%抑制した（Fig.19B）。更に Whole の腎ライセート解析でも、R-268712 投与群（1 mg/kg）は、線維化の指標であるハイドロキシプロリン量を有意に抑制する事を確認した（Fig.20）。次に糸球体内の個々の細胞について、解析する為、免疫染色を実施した。Desmin はポドサイト障害マーカーとして知られており、病態群では、糸球体係蹄に沿って染色域の増加を示したが、R-268712 投与群（1 mg/kg）では、染色域の減少が認められた（Fig.21A）。GSI と同様の方式でスコア化した結果、病態群によるスコアの増加と、R-268712 投与群（1 mg/kg）による抑制作用が確認できた（Fig.21B）。αSMA は、一般的には Myofibroblast の指標であり、糸球体内では、活性化メサンギウム細胞の指標として用いられる。病態群では、メサンギウム領域に αSMA 染色域の増加を示したが、R-268712 投与群（1 mg/kg）では、染色域の減少が認められた（Fig.21A）。スコア化の結果でも、R-268712 投与群（1 mg/kg）による糸球体内 αSMA スコアの抑制作用が示された（Fig.21B）。免疫染色の結果から、ALK5 阻害剤は、慢性糸球体腎炎に対して、糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞の活性化抑制作用、および、ポドサイト障害の軽減作用を有する事が示された。糸球体に対する ALK5 阻害剤の作用を確認する為、Col1a1-Luc Tg ラット由来単離糸球体を用いた検討を実施した。ALK5 阻害剤（SB-431542）は、TGF-β によって誘導される I 型コラーゲン転写活性を濃度依存的に抑制した（Fig.22）。この事から、ALK5 阻害剤は、in vivo においても、TGF-β 阻害というメカニズムで、糸球体の線維化である糸球体硬化や、糸球体構成細胞の活性化を抑制する事が示唆された。

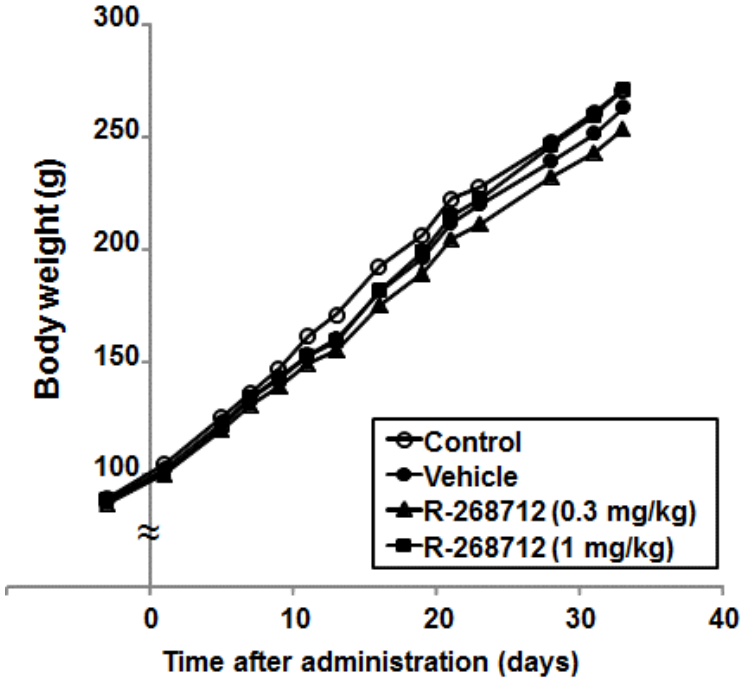

Fig. 16. Body weight changes over time for various treatment groups in the heminephrectomized anti-Thy1 nephritis model.

Male WKY/Hos rats at 4 weeks of age were subjected to heminephrectomy and injected intravenously with an anti-Thy1 antibody 1 week later. R-268712 was orally administered on the same day as anti-Thy1 antibody injection and each day thereafter. Control group: saline injected heminephrectomized rats that received an oral dose of 0.5% CMC; vehicle group: anti-Thy1 antibody injected heminephrectomized rats that received an oral dose of 0.5% CMC; and other groups: anti-Thy1 antibody injected heminephrectomized rats that received oral doses of R-268712. Values shown are means ± S.E. for 7 rats

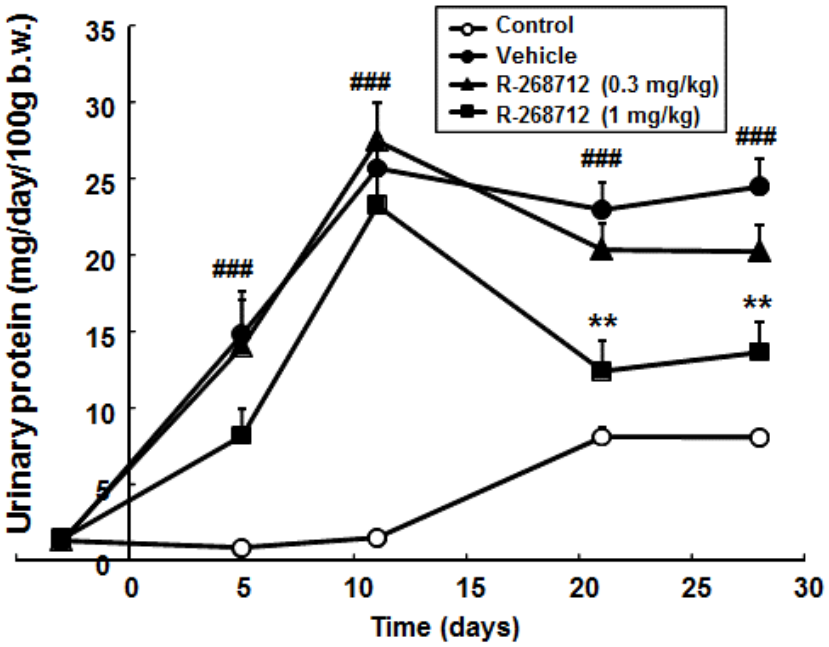

Fig. 17. The antiproteinuric effect of R-268712 in the anti-Thy1 nephritis model.
Values shown are means ± S.E. for 7 rats. The symbol ### indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the control group. The symbol of two asterisks indicates the statistical significance of $P < 0.01$ compared to the vehicle group.

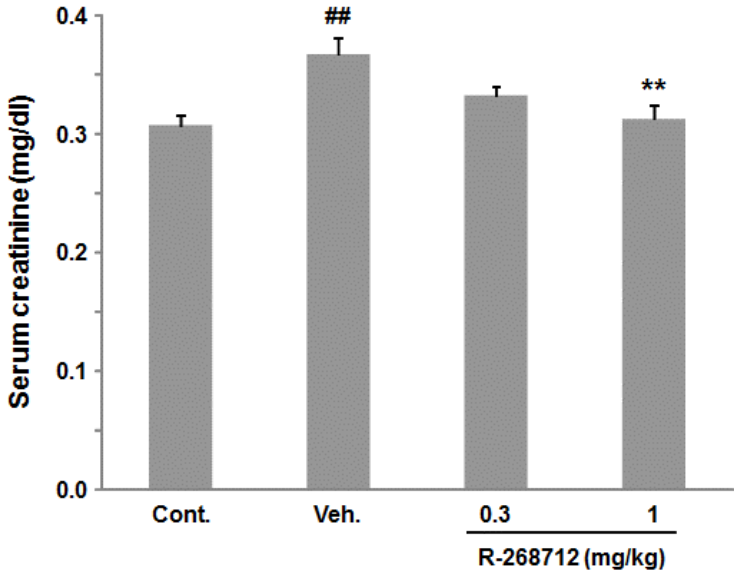

Fig. 18. The protective effect of R-268712 on serum creatinine levels in the anti-Thy1 nephritis model.
Serum creatinine was measured as the aggravation of glomerular filtration function in

the heminephrectomized anti-Thy1 chronic nephritis model. After nephrectomy, anti-Thy1 antibody was injected at day 0. Blood samples were collected after administration at day 28. Values shown are means ± S.E. for 7 rats. The symbol ## indicates the statistical significance of $P < 0.01$ compared to the control group. The symbol of two asterisks indicates the statistical significance of $P < 0.01$ compared to the vehicle group.

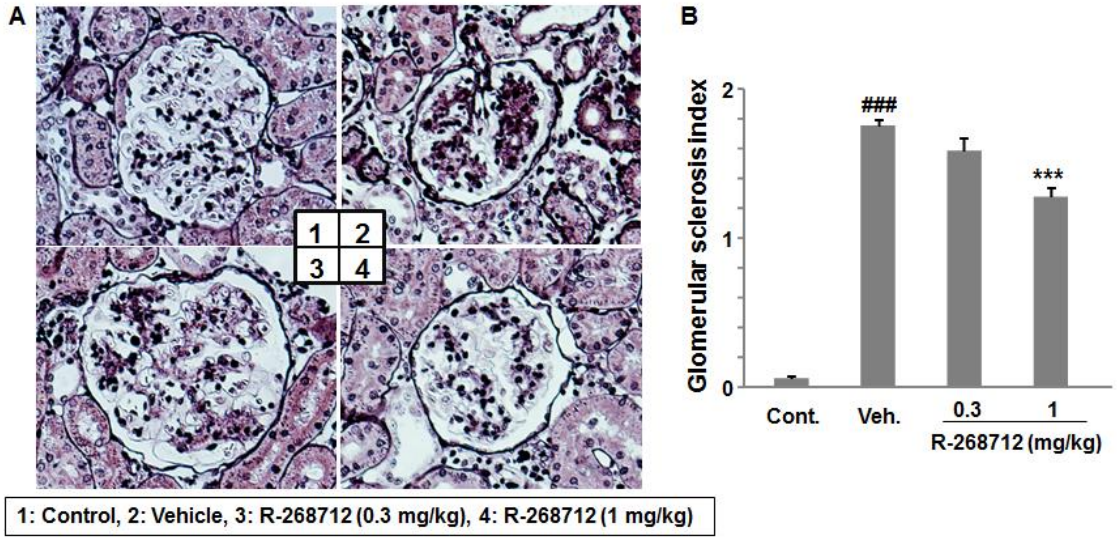

Fig. 19. Pathological analysis of glomeruli in the Thy-1 nephritis model.

(A): Periodic acid methenamine silver (PAM) stain. Rats were sacrificed 33 days after administration of R-268712. The kidneys were removed, fixed in 10% formaldehyde, stained with PAM, and examined histologically: (1) control kidney, (2) vehicle treated kidney, (3) low dose of R-268712 treated kidney and (4) high dose of R-268712 treated kidney. (B): The inhibitory effect of R-268712 on the glomerular sclerosis index (GSI) in the anti-Thy1 nephritis model. GSI was assessed in 50 glomeruli per rat. The extent of glomerular sclerosis (GS) was graded from 0 to 4 by a semi quantitative score: 0: normal; 1: mesangial expansion / sclerosis involving < 25% of the tuft; 2: moderate GS (25–50%); 3: severe GS (50–75%); and 4: diffuse GS involving > 75% of the glomerular tuft. GSI for each rat was calculated as the mean value of all glomerular scores obtained. The symbol ### indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the control group. The symbol of three asterisks indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the vehicle group.

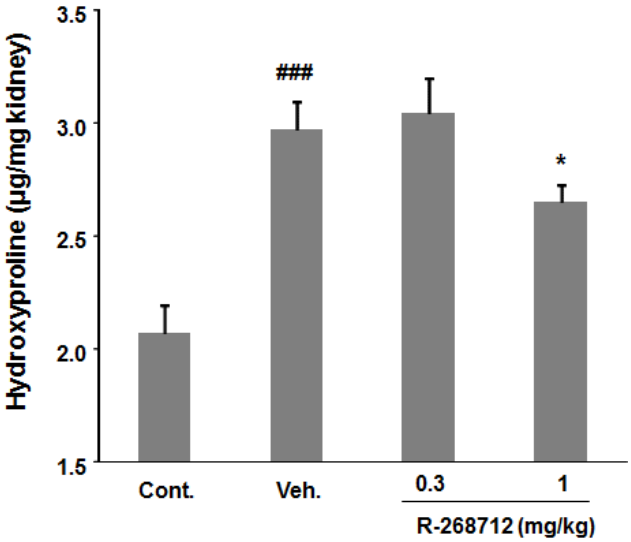

Fig. 20. Hydroxyproline content of kidneys from treatment groups in the anti-Thy1 nephritis model.

Rats were sacrificed 33 days after administration of R-268712. The kidneys were removed and dried, and the hydroxyproline content of the kidney was measured. Values shown are means ± S.E. The symbol ### indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the control group. The symbol of a asterisk indicates the statistical significance of $P < 0.05$ compared to the vehicle group.

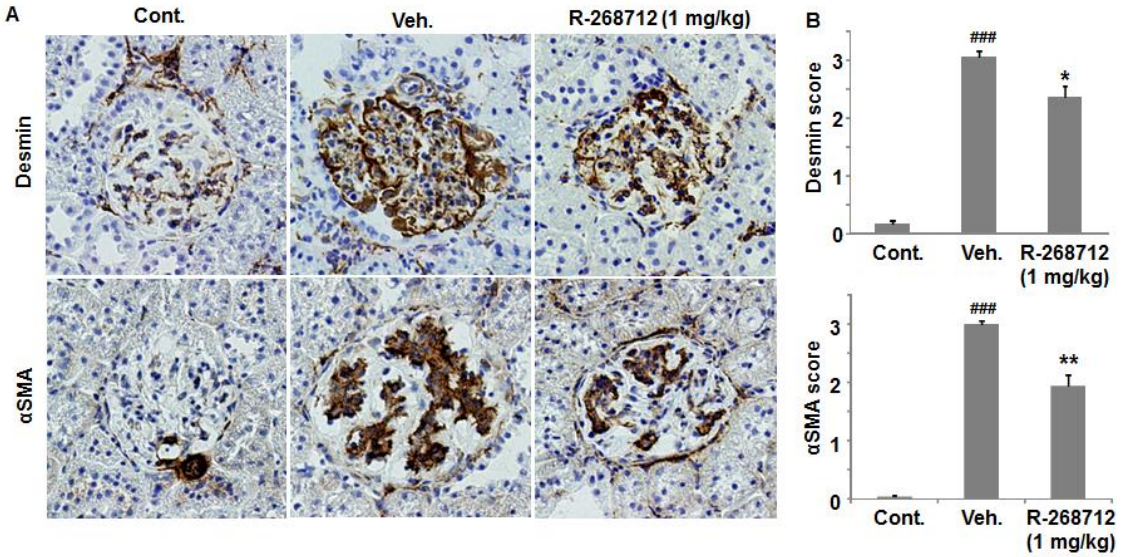

Fig. 21. Immunohistological staining of kidney sections from treatment groups in the anti-Thy1 nephritis model.

(A): Immunohistological staining against desmin and α-SMA. Rats were sacrificed 33 days after administration of R-268712. (B): Staining are as of 20 glomeruli in each

section were assigned severity score as follows: 0, very weak or absent staining; 1, < 25% staining of the glomeruli; 2, 25–50% staining of glomeruli; 3, 50–75% staining of glomeruli; and 4, > 75% diffuse staining of glomeruli. A staining score for each rat was calculated as the mean value of all glomerular scores obtained. The symbol ### indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the control group. The symbol of a single asterisk, or two asterisks indicates the statistical significance of $P < 0.05$ or $P < 0.01$ compared to the vehicle group, respectively.

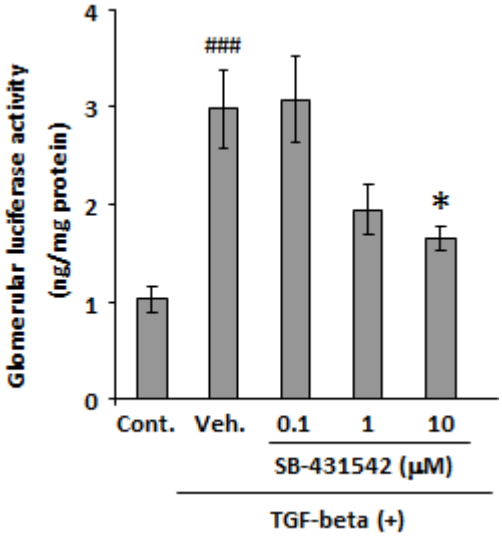

Fig. 22. In vitro assay using isolated glomeruli of Col1a1-Luc Tg rat.
Luciferase activities were measured 48 h after the addition of transforming growth factor-β1 (TGF-β1). Compounds were added 30 min before TGF-β1 stimuli. Values are means ± SE of six biological replicates. The symbol ### indicates the statistical significance of $P < 0.001$ compared to the control group. The symbol of a single asterisk indicates the statistical significance of $P < 0.05$ compared to the vehicle group.

第四節：小括

- 第一章で作製した Col1a1-Luc Tg ラットを用いた in vivo screening によって、SB-431542 をリードとした一連の誘導体の中から、最も強い in vivo 腎線維化抑制作用を有する化合物 R-268712 を見出した。
- R-268712 を用いて、慢性糸球体腎炎モデルに対する ALK5 阻害剤の薬効を世界で初めて示した。
- 組織学的解析結果から、R-268712 の糸球体硬化抑制のメカニズムとして、メサンギウム細胞の活性化（αSMA 陽性）抑制作用、および、ポドサイト障害の軽減作用を有する事を明らかにした。

第三章：腎間質線維化における線維症原因細胞（コラーゲン産生細胞）の同定

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（13-15)、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事から（16)、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（17)、周皮細胞（18)、resident fibroblast（19)、fibrocyte（20）等、諸説あり、統一見解が得られていない（21,22)。現状を Fig.23（22）に模式的に示す。細胞外マトリクスは分泌蛋白である為、細胞外マトリクスの免疫染色では、産生細胞を同定する事は出来ない。しかしながら、我々が新たに作製した I 型コラーゲンに対するルシフェラーゼレポーターラット（Col1a1-Luc Tg ラット）では、コラーゲン発現誘導に伴って産生されるルシフェラーゼは細胞内蛋白である為、ルシフェラーゼを免疫染色する事で、コラーゲン産生細胞、すなわち、線維化を引き起こす原因細胞を同定する事が可能である。今回、Col-Luc Tg ラットを用いて、尿細管間質傷害を惹起したラットの腎切片を免疫染色する事により、尿細管上皮細胞が尿細管間質の線維化を引き起こす原因細胞である事を明らかにした。プライマリーヒト尿細管上皮細胞（RPTEC）を TGF-β で刺激すると、I 型コラーゲンが発現誘導されるという論文報告（23）から、ヒト臨床においても、尿細管上皮細胞がコラーゲン産生に関与している事が示唆された。我々の検討でも、プライマリーヒト尿細管上皮細胞（RPTEC）を TGF-β 刺激した結果、I 型コラーゲン mRNA 発現誘導が起こり、その作用は、ALK5 阻害剤 SB-431542 によって、濃度依存的に抑制された。この結果から、ALK5 阻害剤は、ヒト臨床においても尿細管上皮細胞に作用し、尿細管間質線維化を抑制する可能性が示唆された。

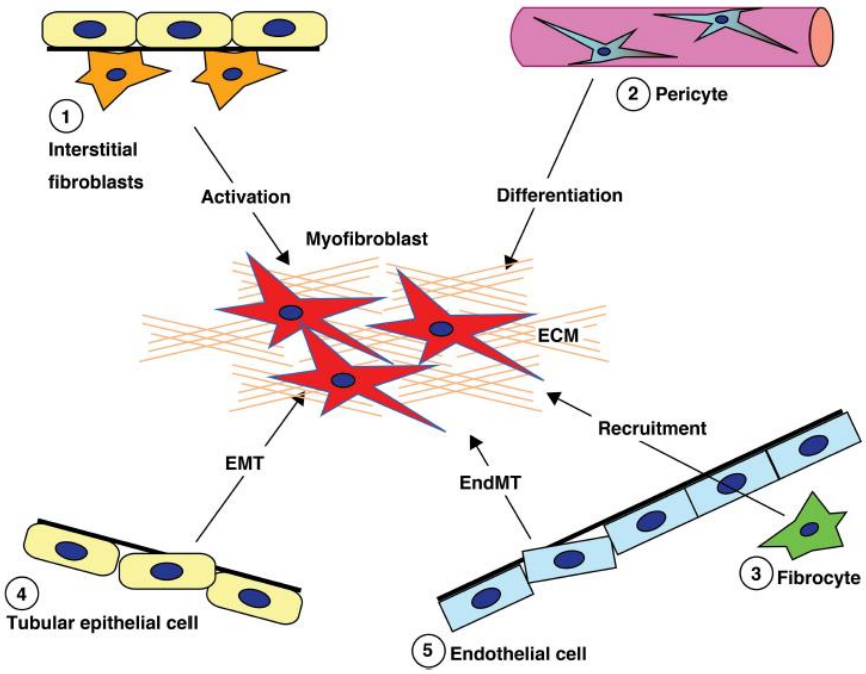

Fig. 23. Diverse origins of fibroblasts. (Kanasaki K et al., Front Endocrinol 2013)
Kidney fibrosis is a well-coordinated event originating from various sources (1, interstitial cells; 2, pericytes; 3, fibrocytes; 4, tubular epithelial cells; 5, endothelial cells) and processes (recruitment, activation, differentiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and endothelial-to-mesenchymal transition) that contribute to myofibroblast activation/formation.

第一節：尿細管間質線維化モデルにおけるコラーゲン産生細胞の同定

実験材料と実験方法

シリウスレッド染色

シリウスレッド染色は、López-De León 等の方法（24）に従って実施した。ラット腎臓を液体窒素で急速凍結し、OTC コンパウンド（Sakura Finetek, Torrance, CA）で包埋した。クリオスタットで 5 μm の厚さに薄切し、MAS コートガラススライド（Matsunami Glass, Osaka, Japan）に貼り付けた。切片を風乾後、4%パラホルムアルデヒド/0.2%グルタルアルデヒド溶液中で、室温、15 分間インキュベートして、組織固定を行った。次に、ピクリン酸飽和水溶液で調製した 0.1% シリウスレッド溶液（Direct red 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）に、組織を浸して、1 時間インキュベートした後、0.1% fast green FCF（Wako Pure Chemicals）で対比染色を行った。0.01 N HCl で 2 分間リンス

して、余分な色素を除去後、アルコールによる脱水操作、キシレンによる洗浄操作を行い、Mount-Quick（Daido Sangyo, Tokyo, Japan）で封入した。

免疫組織化学染色

凍結切片（5 μm 薄切切片）の固定化に関して、αSMA 免疫染色と I 型コラーゲン免疫染色には 4%パラホルムアルデヒド、ルシフェラーゼ免疫染色には冷アセトン固定を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を 3%過酸化水素処理で不活化後、2.5% normal horse serum（Vector Laboratories, Burlingame, CA）でブロッキングした。1 次抗体として、goat anti-type I collagen antibody（Southern Biotechnology Associates, Birmingham, UK）、rabbit anti-luciferase antibody（Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan）、または、mouse monoclonal anti-αSMA antibody（clone 1A4, DakoCytomation, Glostrup, Denmark）を用い、室温で 1 時間反応させた。洗浄操作後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識 2 次抗体（Histofine Simple Stain MAX PO, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan）を反応させた。PBS で洗浄後、DAB（3,3'-diaminobenzidine, Nichirei Biosciences）で染色操作を行った。ルシフェラーゼ免疫染色については、anti-horseradish peroxidase antibody（clone 2H11, Abcam, Tokyo, Japan）を 2 次抗体に混合して、シグナルを増感した。

免疫蛍光染色

凍結切片（5 μm 薄切切片）を冷アセトンで固定化後、Image-iT FX signal enhancer（Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA）でブロッキングした。上述の rabbit anti-luciferase antibody、または、mouse monoclonal anti-αSMA antibody（clone 1A4）で反応させ、洗浄操作後、Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG antibody、または、Alexa Fluor 555-labeled goat anti-mouse IgG antibody（Molecular Probes/Invitrogen）とインキュベートした。洗浄操作後、Fluoromount/Plus（Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA）で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果および考察

第一章で作製した Col1a1-Luc Tg ラットを UUO 処置し、結紮腎、および、非結紮腎の組織学的染色を実施した（Fig.24）。左側のパネル（A, C, E, G）が非結紮腎（Control 腎）、右側のパネル（B, D, F, H）が UUO 処置 1 週間後の結紮腎（UUO 腎）の組織染色像である。シリウスレッド染色は、コラーゲンの染色に用いられる染色法であり、染色域は赤色を呈する。コントロールの正常腎では、小葉間動脈以上の大きさの動脈周囲に強いシリウスレッド染色像が認められ、それ以外に、尿細管周囲にも弱い染色像が認められた（Fig.24A）。正常腎における I 型コラーゲン免疫染色像は、シリウスレッド染色像とほぼ同様の染色パターンを示した（Fig.24C）。正常腎におけるルシフェラーゼ免疫染色像は、

小葉間動脈以上の大きさの動脈平滑筋細胞に強い染色、尿細管上皮細胞に弱い染色が認められ、Ⅰ型コラーゲン染色域の近傍にある細胞が染色されていた（Fig.24E）。一方、正常腎における αSMA 免疫染色像は、動脈だけでなく、静脈の平滑筋細胞にも染色像が認められた（Fig.24G）。UUO 腎では、尿細管間質領域に強いシリウスレッド染色像（Fig.24B）、および、強いⅠ型コラーゲン染色像（Fig.24D）が認められた。ルシフェラーゼ染色像は、UUO 腎の尿細管上皮細胞、および、尿細管間質細胞に強い染色像が認められた（Fig.24F）。αSMA 染色では UUO 腎の一部の尿細管細胞、および、尿細管間質の広範な領域で、強い染色像が認められた（Fig.24H）。

次にルシフェラーゼと αSMA の二重染色によって、コラーゲン産生細胞（ルシフェラーゼ染色陽性細胞）と筋線維芽細胞（αSMA 陽性細胞）が一致するか検討した。Fig.25 の上段のパネル（A, B, C）がコントロールの正常腎、下段のパネル（D, E, F）が UUO 腎を示す。正常腎では、Fig.24E 免疫染色の結果同様、免疫蛍光染色でも尿細管上皮細胞に弱い緑色の蛍光像が認められた（Fig.25A）。血管平滑筋細胞は αSMA 陽性の赤い蛍光像を示した（Fig.25B）。正常腎では、ルシフェラーゼと αSMA の共染色は観察されなかった（Fig.25C）。UUO 腎では、一部の尿細管細胞、および、尿細管間質細胞で、ルシフェラーゼ陽性を示す強い緑色の蛍光像が認められた（Fig.25D）。αSMA 陽性を示す赤の染色像は、尿細管細胞、尿細管間質細胞、および、血管の細胞において認められた（Fig.25E）。一部の尿細管細胞、および、尿細管間質細胞では、ルシフェラーゼと αSMA の共染色を示す黄色の染色像が認められた（Fig.25F）。これらの結果は、一部の αSMA 陽性の尿細管細胞、および、尿細管間質細胞がⅠ型コラーゲンを産生し、UUO モデルにおける線維化の原因細胞である事を示していると考えられた。

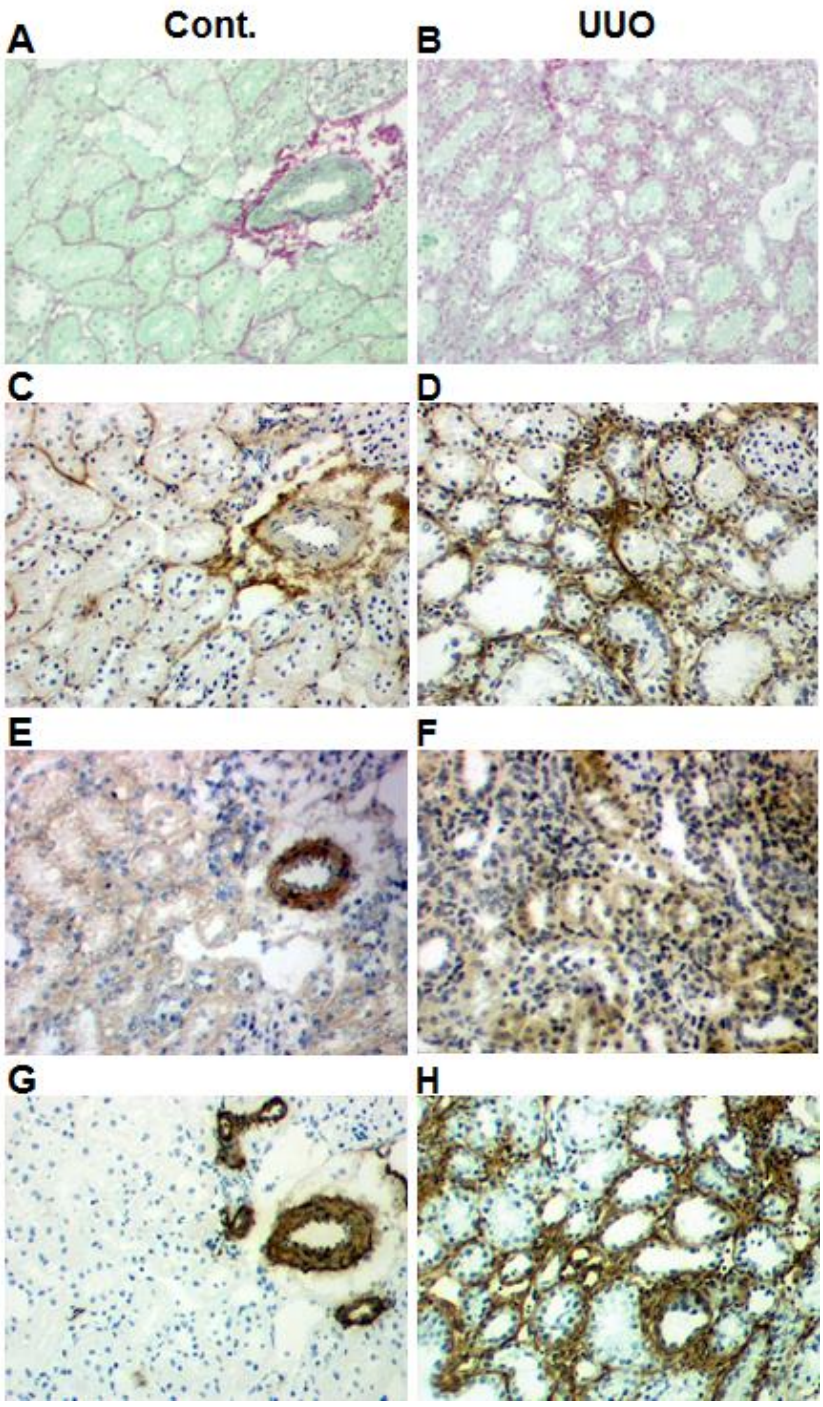

Fig. 24. Renal histopathological and immunohistological staining in the UUO model. Female Col1a1-Luc Tg rats at 14 wk of age were subjected to UUO and killed 7 days after UUO. A, C, E, and G: contralateral normal kidney specimens. B, D, F, and H: obstructed kidney specimens. A and B: Sirius red staining. C and D: immunostaining for type I collagen. E and F: immunostaining for luciferase. G and H: immunostaining for α-smooth muscle actin (α-SMA). Original magnification, x100.

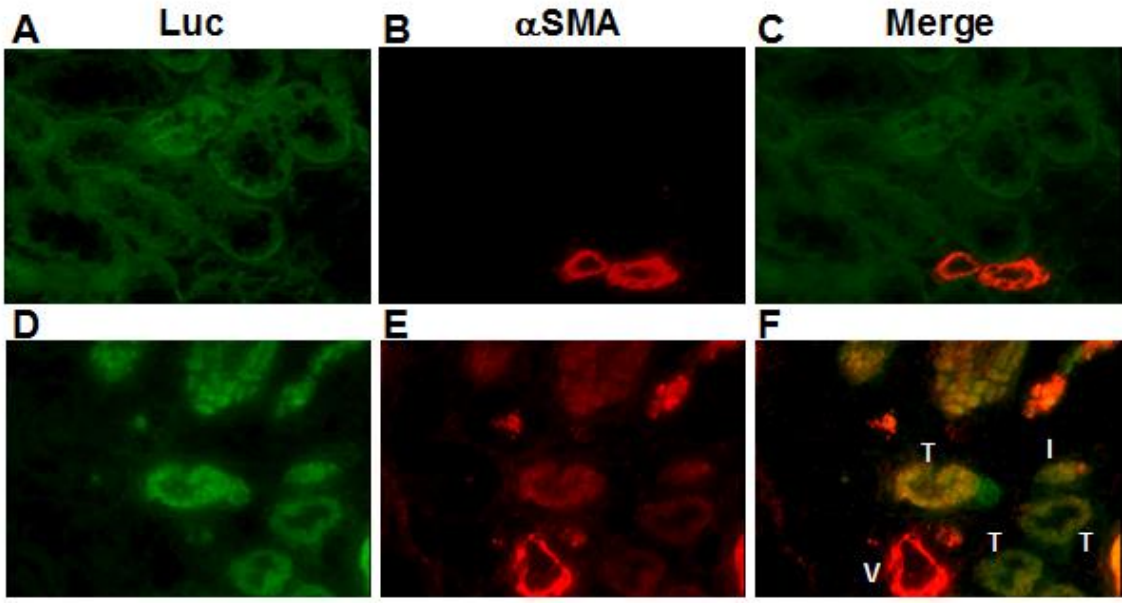

Fig. 25. Renal immunofluorescence for luciferase and α-SMA in the UUO model.
Female Col1a1-Luc Tg rats at 14 wk of age were subjected to UUO and killed 7 days after UUO. A–C: contralateral kidney specimens. D–F: obstructed kidney specimens. A and D: immunofluorescence for luciferase (green). B and E: immunofluorescence for α-SMA (red). C and F: merged image (yellow). V, vascular cells; T, tubular cells; I, interstitial cells. Original magnification, x200.

第二節：小括

- 正常腎（非結紮腎）では、I 型コラーゲン免疫染色像は、葉間動脈以上の大きさの動脈周囲に強い染色像が認められ、尿細管周囲にも弱い染色像が認められた。ルシフェラーゼ免疫染色像は、その近傍に存在する細胞、すなわち、小葉間動脈以上の大きさの動脈平滑筋細胞に強い染色、尿細管上皮細胞に弱い染色が認められた。この事から、ルシフェラーゼ陽性の I 型コラーゲン産生細胞から分泌された I 型コラーゲンが、その細胞の周囲に蓄積していると考えられた。
- UUO7 日目の腎臓では、ルシフェラーゼ免疫染色像は、尿細管上皮細胞、および、尿細管間質細胞に強い染色が認められた。この事から、尿細管上皮細胞、および、尿細管間質細胞が、線維化の原因細胞と考えられた。尿細管間質細胞の Origin については、今回の検討からは不明であった。
- 線維化の原因細胞 Myofibroblast は αSMA で染色される特徴を有する。従って、αSMA とルシフェラーゼで二重染色した結果、UUO 腎では、尿細管上皮細胞、および、尿細管間質細胞が二重染色され、これらの細胞が Myofibroblast 様細胞となっている事が確認できた。

総括

線維化治療薬の創薬研究のボトルネックの 1 つが、疾患モデルの薬効評価期間が長い事である為、まず最初にこの課題を克服する為、in vivo 短期評価モデルの構築に取り組んだ。線維化は、細胞外マトリクスが蓄積した病理像を示す。主要な細胞外マトリクスは I 型コラーゲンである。 I 型コラーゲンは α1 鎖 2 本と α2 鎖 1 本で三重螺旋構造を形成している。 I 型コラーゲンを検出感度の高いルシフェラーゼで置き換える事によって、線維化を早期に検出できるのではないかと考え、コラーゲンレポーター動物の作製に取り組んだ。

ラット I 型コラーゲン α1 鎖、および、α2 鎖の 5'上流プロモーター領域をゲノムライブラリーからクローニングし、転写開始点から、各々、14.2 kb、7.6 kb 上流から転写開始点までを含む領域をルシフェラーゼ遺伝子に繋いだ遺伝子コンストラクトを構築し、Tg ラットを作製した。各組織サンプルのルシフェラーゼ活性値を比較した結果、Col1a2-Luc Tg ラットの方が、全体的に低値を示した。ルシフェラーゼ活性値は検出感度に影響するファクターである為、in vivo 短期評価モデルの使用動物として、Col1a1-Luc Tg ラットを選択した。適応疾患として、腎線維症を目指している為、腎線維化モデルとして汎用されている UUO モデルを用いて、経時的に Col1a1-Luc Tg ラットのハイドロキシプロリン量（コラーゲン蛋白の指標)、mRNA、および、ルシフェラーゼ活性を評価した。ハイドロキシプロリン量は、蓄積に時間を要した。mRNA は早期に上昇が確認できたが、発現が一過性であり、実験期間を通して判断すると、蛋白との相関は低かった。ルシフェラーゼは、mRNA 同様に早期に発現上昇するが、その発現は時間経過に伴って上昇しており、実験期間を通して、蛋白との相関は高かった。早期検出、蛋白との相関という観点から、ルシフェラーゼによる評価は、非常に有用と考えられた。ルシフェラーゼは、mRNA と蛋白の中間的な性質を持つと考えられた。すなわち、mRNA の様に早期に発現上昇がみられるが、その発現は、mRNA の様な一過性ではなく、蛋白の様に時間経過に伴って上昇する発現パターンを示す。これは、代謝回転の影響によるのではないかと考えられた。つまり、ルシフェラーゼは蛋白であるので、mRNA よりは代謝回転が遅いが、可溶性蛋白である為、不溶性蛋白であるコラーゲンよりは代謝回転が早いと考えられた。UUO モデルにおける I 型コラーゲン α1 鎖と α2 鎖 mRNA の発現比は、2:1 であった（Fig.6C, 6D)。これは I 型コラーゲンが α1 鎖 2 本と α2 鎖 1 本で三重螺旋構造を形成する事に起因すると考えられた。今回、Col1a1-Luc Tg ラットのルシフェラーゼ活性値は、全体的に Col1a2-Luc Tg ラットより高値を示したが、その原因として、導入した転写制御領域の長さ以外に、この発現比が影響している可能性が示唆された。この 2:1 の発現比を考慮すると、理論的にも、短期評価モデル動物としては、α1 の方が適していると考えられた。

マウスは ES 細胞を用いた相同組換えが可能である為、knock-in technology を利用した IRES-Luc 導入マウスを作製した。UUO モデルにおいて、Col1a1-IRES-Luc KI マウスと

Col1a1-Luc Tg ラットを比較した結果、ハイドロキシプロリン量は同程度であったが、ルシフェラーゼ活性の上昇率は、Col1a1-IRES-Luc KI マウスの方が数倍、高値を示した事から、Col1a1-IRES-Luc KI マウスは、短期評価モデル動物として、非常に有用である事が確認できた。また、ラット I 型コラーゲン α1 鎖には、5'上流の 14 kb 以外にも、転写を活性化する領域がある事が示唆された。しかしながら、種差という観点、および、ラットにしか存在しない疾患モデルも存在する為、ラット、マウス、両方の短期評価モデル動物を揃えておく事は重要と考えられた。また、マウスモデルを作製する事によって、ラットモデルの妥当性を検証する事が可能となった。その他、臓器線維症は TGF-beta pathway という共通のメカニズムを有する為、適応拡大が可能と考えられる。肺線維症モデルとして、マウスブレオマイシン肺線維症モデルが汎用されるが、今回作製したマウスレポーター動物を用いる事により、評価期間が短縮可能な事、および、R-268712 が、腎線維症モデルだけでなく、肺線維症モデルでも優れた薬効を示す事を明らかにした（主論文 3)。

線維化に関する疾患モデルの薬効評価は、通常、1 ヶ月程度を要するが、今回、新たに構築したコラーゲンレポーター動物を用いて、わずか 3 日間で評価可能な in vivo 短期評価モデルを構築する事が出来た。この評価系構築によって、多くの化合物を in vivo screening する事が可能となった。実際、約 90 化合物の in vivo screening を実施し、最も強い抗線維化作用を示す化合物として、R-268712 を見出した。In vitro ALK5 阻害活性が高く、PK 曝露が良好な化合物程、in vivo における薬効は強くなる傾向は認められたが、必ずしも予想された通りの順番で薬効が強くなっていなかった為、in vivo screening による化合物の選別は重要と考えられた。その理由としては、組織移行性、細胞内移行性、反復投与による代謝酵素誘導等が考えられた。

糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎は、透析導入原疾患の第 1 位と第 2 位を占めており、患者数も多い事から、治療薬の開発が望まれている。糖尿病性腎症は糖尿病を治療するという根本的な治療法が存在するが、慢性糸球体腎炎は原因不明な事が多く、根本治療も存在しない事から、より unmet medical needs が高いと考えられた。慢性糸球体腎炎モデルとして用いられる GBM 腎炎モデルは、重症度が高く、線維化が進行する前に死亡してしまうモデルである為、よりマイルドなモデルとして、Thy1 腎炎モデルを採用した。Thy1 腎炎モデルは一過性の蛋白尿の後、自然治癒してしまう為、慢性糸球体腎炎モデルとして用いる為には、持続的な蛋白尿を呈する様に、試験系を修飾する必要がある。ラット系統について検討した結果、WKY/Hos ラットに片腎摘出処置をする事によって、持続的な蛋白尿を発症するモデルの作製に成功した。このモデルに対して、R-268712 は、抗線維化作用（腎ハイドロキシプロリン量抑制)、および、腎機能改善作用（蛋白尿抑制、血中クレアチニン値抑制）を示した。糸球体硬化のメカニズムを検討する為、組織学的解析を実施した結果、R-268712 は、メサンギウム細胞の活性化抑制、および、ポドサイト障害軽減作用を有する事が確認された。

尿細管間質線維化の原因細胞は、Myofibroblast と考えられているが、その起源につい

ては、諸説あり、明らかになっていない。線維化の原因物質であるⅠ型コラーゲンは分泌蛋白である為、Ⅰ型コラーゲンを免疫染色しても、その産生細胞は同定できない。今回、作製したコラーゲンレポーター動物は、Ⅰ型コラーゲン発現刺激でルシフェラーゼを発現するが、ルシフェラーゼは細胞内で発現する為、ルシフェラーゼを免疫染色する事により、コラーゲン発現細胞を同定する事が可能と考えられた。尿細管間質線維化モデルとして汎用される UUO モデルを用いて検討した。正常腎では、ルシフェラーゼ陽性細胞の周囲にⅠ型コラーゲン発現が認められた事から、ルシフェラーゼ免疫染色の評価系は正常に機能していると考えられた。αSMA は血管平滑筋細胞のマーカーであるが、線維化の原因細胞である Myofibroblast のマーカーとしても知られている。UUO 腎について、ルシフェラーゼと αSMA で共染色した結果、一部の尿細管上皮細胞、および、尿細管間質細胞が二重染色される事を確認した。今回の結果から、尿細管間質線維化の原因細胞に、尿細管上皮細胞が関与している事が明らかになった。ただし、二重染色された尿細管間質細胞の起源については、今回の検討から同定出来なかった。

尿細管上皮細胞が Myofibroblast に変化する EMT（Epithelial to mesenchymal transition）は、in vitro では良く見られる現象であるが、in vivo での報告例はほとんどない。その理由の 1 つとして、既に Myofibroblast になっている細胞の origin を調べる事が難しいという技術的な面があるが、もう 1 つは、EMT を起こした細胞が、間質領域に migration するには、TBM（tubular basement membrane）という物理的な障壁を越える必要があるからと考えられる。今回の検討結果から、尿細管上皮細胞は、尿細管の形状（個々の細胞の形状ではなく、集合体としての尿細管の形状）をある程度、維持した状態で Myofibroblast に形質転換していることが認められた。この事から、TBM によって、migration が阻害されていたとしても、尿細管に位置した状態で、産生されたコラーゲンが、TBM を越えて、間質の線維化に関与する可能性が示唆された（Fig.26）。または、産生されたコラーゲンが、尿細管管腔を塞ぐ事で、尿細管構造を破壊し、同じく破壊された TBM から migration を引き起こすという可能性も示唆された。

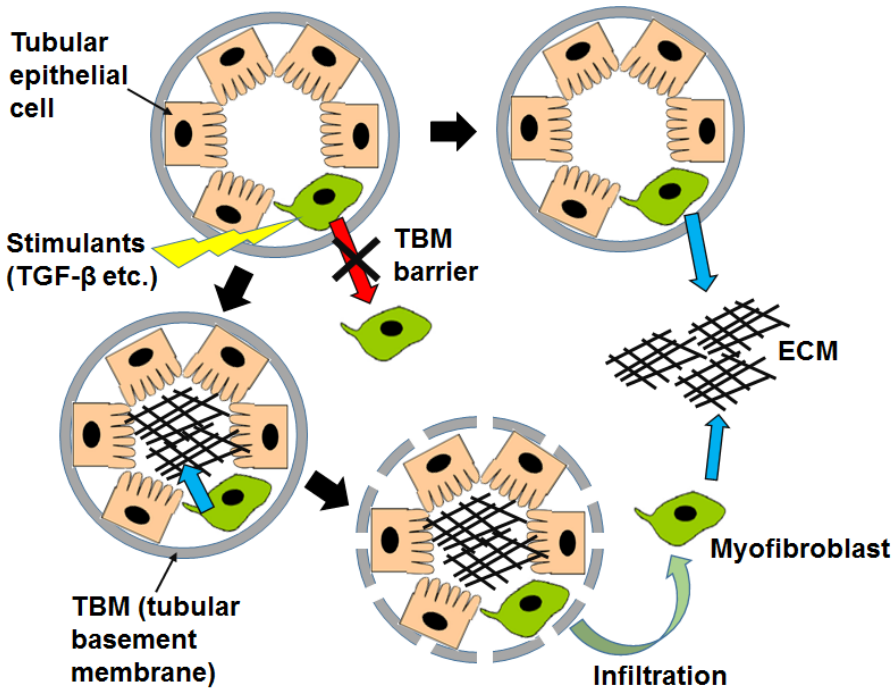

Fig. 26. New insight of tubular epithelial cells on the interstitial fibrosis.

Red arrow: conventional theory of EMT. Blue arrow: new insight according to our results.

結論

今回の腎線維症に対する ALK5 阻害剤の創薬研究を通して、下記の知見、および、成果物を得た。

- 線維症の早期薬効評価や、線維症原因細胞同定に有用なコラーゲンレポーターラット、および、マウスを作製した。これらの動物を用いる事により、線維症治療に対する創薬研究が加速する事が期待された。
- 上記のコラーゲンレポーターラットを in vivo 短期薬効評価系として、ALK5 阻害剤の創薬研究評価フローに組み込み、in vivo screening を実施した結果、R-268712 という強力な in vivo 抗線維化作用を有する化合物を見出した。
- R-268712 を用いて、ALK5 阻害剤の慢性糸球体腎炎モデルに対する薬効を世界で初めて示した。
- 腎尿細管間質の線維化時に、コラーゲンを主に産生する線維化原因細胞に関して、諸説あるが、コラーゲンレポーターラットを用いた免疫染色の結果から、尿細管上皮細胞がその原因細胞の 1 つである事を示した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、始終御指導、御鞭撻を賜りました第一三共株式会社スペシャルティ第二研究所 第三グループ長　加藤幹雄氏に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究を進めていくにあたり御指導、御助言をいただきました第一三共株式会社、佐田登志夫氏に厚く御礼申し上げます。

また、実験を行うにあたり熱心にご協力をいただきました第一三共株式会社、安雲浩明氏、土田洋氏、水野誠氏、海老澤正幸氏、小林英毅氏、鈴木佳奈恵氏、根津義和氏、青沼見里氏、宮間ちづる氏、庄司和子氏、中馬紘子氏、杉本光太郎氏、横山美香氏、中田朋子氏に心より感謝いたします。

なお、本研究を論文博士として発表させていただく際に、温かく御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 細胞生理学分野、辻川和丈教授に心より御礼申し上げます。

さらに、大阪大学 薬品製造工学講座在学中のみならず、卒業後も論文博士を目指すことに際し、始終温かく御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科、八木清仁特任教授に心より御礼申し上げます。

主論文

１． Hideki Terashima, Mikio Kato, Hiroaki Yasumo, Hiroshi Tsuchida, Makoto Mizuno, Toshio Sada. A sensitive short-term evaluation of antifibrotic effects using newly established type I collagen reporter transgenic rats. Am J Physiol Renal Physiol. 299, F792-801 (2010).

２． Hideki Terashima, Mikio Kato, Masayuki Ebisawa, Hideki Kobayashi, Kanae Suzuki, Yoshikazu Nezu, Toshio Sada. R-268712, an orally active transforming growth factor-β type I receptor inhibitor, prevents glomerular sclerosis in a Thy1 nephritis model. Eur J Pharmacol. 734, 60-66 (2014).

３． Hideki Terashima, Misato Aonuma, Hiroshi Tsuchida, Kotaro Sugimoto, Mika Yokoyama, Mikio Kato. Attenuation of pulmonary fibrosis in type I collagen-targeted reporter mice with ALK-5 inhibitors. Pulm Pharmacol Ther. 54, 31-38 (2019).

引用文献

1) Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. N Engl J Med. 372, 1138-1149 (2015)
2) Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. World J Gastroenterol. 13, 3056–3062 (2007)
3) Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. Clin Cancer Res. 13, 5262-5270 (2007)
4) Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA. Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. Mol Pharmacol. 62, 58-64 (2002)
5) Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, Pezet D, Deplanque G, Fuchs M, Trojan J, Oettle H, Kozloff M, Cleverly A, Smith C, Estrem ST, Gueorguieva I, Lahn MMF, Blunt A, Benhadji KA, Tabernero J. Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. Br J Cancer. 119, 1208-1214 (2018)
6) Jung SY, Hwang S, Clarke JM, Bauer TM, Keedy VL, Lee H, Park N, Kim SJ, Lee JI. Pharmacokinetic characteristics of vactosertib, a new activin receptor-like kinase 5 inhibitor, in patients with advanced solid tumors in a first-in-human phase 1 study. Invest New Drugs. 2019 Jul 13. [Epub ahead of print]
7) Bou-Gharios G, Garrett LA, Rossert J, Niederreither K, Eberspaecher H, Smith C, Black C, Crombrugghe B. A potent far-upstream enhancer in the mouse pro alpha 2(I) collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. J Cell Biol. 134, 1333-1344 (1996)
8) Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. J Pharmacol Exp Ther. 316, 592-600 (2006)
9) Hug BA, Wesselschmidt RL, Fiering S, Bender MA, Epner E, Groudine M, Ley TJ. Analysis of mice containing a targeted deletion of beta-globin locus control region 5' hypersensitive site 3. Mol Cell Biol. 16, 2906-12 (1996)
10) Moon JA, Kim HT, Cho IS, Sheen YY, Kim DK. IN-1130, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase (ALK5) inhibitor, suppresses renal fibrosis in obstructive nephropathy. Kidney Int. 70, 1234-1243 (2006)
11) Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive

glomerular damage in Dahl rats. Kidney Int. 26, 137-143 (1984)
12) Misra RP. Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving. Am J Clin Pathol. 58, 135-139 (1972)
13) Shimizu T, Kuroda T, Hata S, Fukagawa M, Margolin SB, Kurokawa K. J. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. Kidney Int. 54, 99-109 (1998)
14) Schaefer CJ, Ruhrmund DW, Pan L, Seiwert SD, Kossen K. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. Eur Respir Rev. 20, 85-97 (2011)
15) Liu F, Wang L, Qi H, Wang J, Wang Y, Jiang W, Xu L, Liu N, Zhuang S. Nintedanib, a triple tyrosine kinase inhibitor, attenuates renal fibrosis in chronic kidney disease. Clin Sci (Lond). 131, 2125-2143 (2017)
16) Sureshbabu A, Muhsin SA, Choi ME. TGF-ß signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. Am J Physiol Renal Physiol. 310, F596–F606 (2016)
17) Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest. 112, 1776-84 (2003)
18) Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. Am J Pathol. 176, 85–97 (2010)
19) Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. J Clin Invest. 121, 3981-3990 (2011)
20) LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. Nat Med. 19, 1047-1053 (2013)
21) Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. Kidney Int. 87, 297-307 (2015)
22) Kanasaki K, Taduri G, Koya D. Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. Front Endocrinol (Lausanne) 4:7 (2013)
23) Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. J Am Soc Nephrol.18, 58-65 (2007)
24) López-De León A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. Histochem Cytochem

33, 737–743 (1985)