# TOKAI UNIVERSITY THE INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCES

### 「傷害肝の修復・再生を促進する新規治療法の開発」

#### 【研究概要】

コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスは、組織や臓器の形態保持や創傷治癒・組織修復において重要な役割を演じている。しかしながら、各種の細胞ストレスにより惹起された慢性炎症は組織に過剰のマトリックス成分を沈着させ、諸臓器の線維化を引き起こす。臓器線維症は多くの生活習慣病に合併し、癌の発生母地としても重要な病因的意義を有する。例えば肝臓病学の分野では近年、メタボリック症候群の肝臓表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患の患者が急増し、その一部は肝硬変・肝癌へ進展することから、ウイルス性肝炎に替わる新たな問題となっている。また、糖尿病性腎症や慢性糸球体腎炎による腎線維化は透析患者数の増加と医療費の高騰を招き、医学的な重要課題であるとともに医療経済的問題を招いた。さらに、肺線維症は原因不明の特発性肺線維症のみならず、抗癌剤・放射線治療の副作用や環境中有害物質、最近ではCOVID-19救命後の後遺症としても重要視されるなど、社会的関心も高い。

本研究プロジェクトは、各種の細胞ストレスが引き起こす臓器線維症の発症と進展機序の解明に系統的かつ臓器横断的に取り組み、新たな診断・治療法の開発に向けての分子基盤を構築することを目的とする。これまでの研究により、傷害肝細胞の修復と再生を促す新規のエクソソーム内包分子としてOpioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1)を同定し、その診断ならびに治療的意義を明らかにし、産学連携の元で国際特許を取得した。また、OGFRL1搭載エクソソームのin vitro高産生系を確立するとともに、エクソソームの表面に新たな修飾を施すことで利用効率の改善と肝細胞への指向性の向上を得た。

さらに、線維肝組織においてコラーゲンを産生する活性型星細胞をコラーゲン非産生性の静止期細胞様へと脱活性化させる転写因子として独自に同定したTcf21の肝線維症治療への応用に取り組んでいる。2022度には、独自のin silico創薬法を駆使して770万の低分子化合物データベースからTcf21作動性の候補化合物を選定し、in vitro次いでin vivoにおける薬理効果の評価と副作用の有無についての検討を行った。

#### 【研究成果】

1) Tcf21の機能性ペプチド配列の同定:

Tcf21の活性型星細胞に対する脱活性化作用を模倣する低分子化合物を探索するにあたっては、Tcf21の結晶構造が未解明であるという問題があった。そこで、Tcf21の共役因子(仮称:TfX)に着目し、Tcf21/TfXのヘテロダイマーが標的遺伝子のDNAと形成・維持する立体構造を、ホモロジー・モデリング法を用いて予測を行った。その結果、Tcf21タンパク質の中でTfXおよびDNAとの結合に重要なペプチド部分を推定し、in vitroのtransfection assayにおいて、とりわけTfXの共存下では当該ペプチドのみでも全長Tcf21と同等に活性型星細胞における I 型コラーゲン遺伝子転写を抑制することを実証した(図1)。

2) Tcf21作動性低分子化合物の選別:

上記のTcf21機能性ペプチドの構造を模倣する低分子化合物は、Tcf21作動性分子として機能する可能性がある。そこで770万の低分子化合物データベースから、ドッキングシミュレーションにより63種類のTcf21作動性の候補化合物を選定した。このうち、入手可能かつ最終濃度10μ Μで培養活性型星細胞に対して毒性を示さない28種類の低分子化合物について、ヒト初代培養肝星細胞おけるα平滑筋アクチン遺伝子(ACTA2)の発現に及ぼす効果を、リアルタイムPCR法を用いて定量解析した(図 2)。

3) 候補化合物の実験的肝線維症に対する抑制効果:

ACTA2遺伝子発現に対してin vitroで抑制効果を発揮した低分子化合物の中から、先行化合物No. 3について四塩化炭素 (CCI4) 誘導性の実験的肝線維症に対する抑制効果をin vivoで検証した。CCI4を3日毎に16回投与して肝線維症を作製した上で、その後もCCI4投与を継続しつつ、4週間にわたって当該化合物を連日腹腔内に投与した。その結果、No. 3の化合物は用量依存的に肝線維化の進展を抑制する(図3)とともに、肝組織中のActa2遺伝子発現を有意に抑制した。この際、化合物投与を行ったマウスにおいて血液生化学検査成績や主要臓器の組織所見に明らかな異常は認められなかった。

#### 【今後の展望】

以上の実験結果より、Tcf21機能性ペプチドの構造を模倣する低分子化合物の中から肝線維症の進展を有意に抑制するヒット化合物候補を見出した。28 種類の低分子化合物を用いた上記のtransfection assayの結果より、肝線維化抑制効果を発揮する化合物の構造的・化学的特徴が明らかになり(定量的構造活性相関)、これを元にヒット化合物の構造最適化や、さらに活性が高い低分子化合物の探索が可能となった。また、上記No. 3を含めて先行3化合物については非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスに対する薬理効果も検討中であり、これらの結果をもとに非臨床POCの取得と臨床応用を目指す。

## 肝臓·腎臓病学研究部門



中尾祥絵 Nakao Sachie 医学科 研究補助員



小川はる美 Ogawa Harumi 医学科 研究技術員



任 元 分明 Sumiyoshi Hideaki 生体機能学 准教授



平山令明 Hirayama Noriaki 医学部 客員教授



プロジェクトリーダー:稲垣 豊 Inagaki Yutaka 医学部医学科 特任教授 マトリックス医学生物学センター センター長



池田麻里子
Ikeda Mariko

生体機能学研究補助員



渡邊まゆみ Vatanabe Mayumi 医学科研究技術員



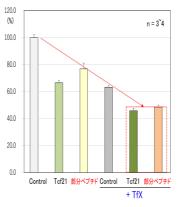


図1. Tcf21の部分ペプチドが I 型コラーゲン遺伝子の転写に及ぼす抑制効果の検証全長Tcf21あるいはTcf21部分ペプチドを過剰発現させた際のコラーゲン遺伝子転写に対する抑制効果を、共役因子TfXの存在下・非存在下で比較検討を行った。各組み合わせにおけるルシフェラーゼ活性を、TfX非存在下で対照プラスミドをtransfectionした際の活性に対する相対値として示す。

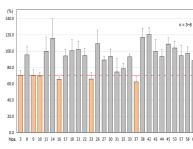


図2. ヒト初代培養星細胞のACTA2 遺伝子発現を指標とした候補化合物のスクリーニング最終濃度10 μMで細胞傷害性を示さない28種類の低分子化合物について、ACTA2遺伝子の発現に対する抑制効果をin vitroで検討したところ、オレンジ色で示す6化合物の投与により70%以下に抑制された。

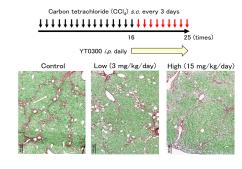


図3. 候補化合物の四塩化炭素誘導性肝線維症に対する抑制効果の検証 ヒット候補化合物 No. 3 の99% 高純度品(YT0300)を合成して肝線維症モデルマウスに投与したところ、四塩化炭素の線維化刺激が継続するにもかかわらず、用量依存的に肝線維化の進展を抑制した(Sirius red染色)。

### Selected Papers,

1. Yasuhiro Nakano, Sachie Nakao, Minako Sueoka, Daigo Kasahara, Yuri Tanno, Hideaki Sumiyoshi, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima, Katsuto Hozumi, Yutaka Inagaki. Two distinct Notch signals, Delta-like 4/Notch1 and Jagged-1/Notch2, antagonistically regulate chemical hepatocarcinogenesis in mice. Commun Biol 5: 85, 2022. DOI:10.1038/s42003-022-03013-8

2.Toshiaki Tanaka, Koji Moriya, Makoto Tsunenaga, Takayo Yanagawa, Hiromi Morita, Takashi Minowa, Yoh-ichi Tagawa, Nobutaka Hanagata, Yutaka Inagaki, Toshiyuki Ikoma. Visualized procollagen I a 1 demonstrates the intracellular processing of propeptides. Life Sci Alliance 5: e202101060, 2022. DOI:10.26508/Isa.202101060

3.Hidehiko Yagasaki, Susumu Takekoshi, Kanae Kitatani, Chikara Kato, Hiroyuki Yamazaki, Kie Shoyama, Takaaki Tsuboi, Tomohiko Matsuzaki, Yutaka Inagaki, Ryota Masuda, Masayuki Iwazaki. Protective effect of ebselen on bleomycin-induced lung fibrosis: Analysis of the molecular mechanism of lung fibrosis mediated by oxidized diacylglycerol. Free Radical Research 56: 473-482, 2022. DOI:10.1080/10715762.2022.2092477

4.Hirotaka lura, Kazu Kobayakawa, Hirokazu Saiwai, Daijiro Konno, Masatake Tanaka, Kazuhiro Hata, Tetsuya Tamaru, Yohei Haruta, Gentaro Ono, Kazuki Kitade, Ken Kijima, Kensuke Kubota, Yutaka Inagaki, Masato Ohtsuka, Ken Okazaki, Koji Murakami, Shusaku Matsuda, Masami Tokunaga, Takaaki Yoshimoto, Takeshi Maeda, Yasuharu Nakashima, Seiji Okada. Bone marrow-derived fibroblast migration via Periostin causes irreversible arthrogenic contracture after joint immobilization. FASEB Journal 37: e22842, 2023. DOI:10.1096/fj.202201598R