

1. TGF- β 1 標的 PI ポリアミドを用いた肥厚性癬痕治療薬の開発

1) 背景

TGF- β は線維芽細胞が足場非依存性増殖を獲得する際に必要な因子として発見されたサイトカインであるが、細胞増殖、分化、運動性の制御を行うなど多彩な機能を持つ。また細胞外基質の増生、線維芽細胞の遊走に関与し創傷治癒の際に機能していることも知られている。一方、疾病においては、腎炎、血管狭窄、肝硬変症、肺線維症、皮膚肥厚性癬痕などの線維性疾患の責任分子の1つであることが判っている。これらの疾患においては、TGF- β 1 の発現・機能の抑制を行うことが治療効果につながることを期待されるが、未だに TGF- β 1 を効果的に抑制する実地薬剤は実用化されていない。これまでに動物モデルを用いて進行性腎障害¹⁾や肝硬変、肺線維症、皮膚癬痕²⁾、腹膜硬化症³⁾などの線維性疾患に対する TGF- β 1 抑制 PI ポリアミドの遺伝子治療効果を確認してきた。ラットの背部皮膚に皮筋層に至る深さの切創を作り肥厚性癬痕を形成させる場合、皮膚切開直後に切創周辺に TGF β 1 抑制 PI ポリアミドを皮下投与すると、TGF β 1 や間葉系細胞のマーカーである Vimentin の発現が非投与群と比べて強く抑制されていた。また癬痕の形成も明らかに抑制されていたことから、TGF β 1 抑制 PI ポリアミドは TGF β 1 の発現を抑制し、線維性疾患の治療に役立つ可能性が強く示唆された。しかしながら、これらの解析はラット、マウスを用いたものであるため、ヒトを対象とした薬剤を開発する上では、よりヒトに近いゲノム構造を持ったモデル動物を用いた全臨床試験が必要となる。そこで、我々は霊長類であるコモン・マーモセット (*Callithrix jacchus*) に着目した。

コモン・マーモセットは新世界猿に属する霊長類であり、体重 300g、体長 20cm 前後と小さく、ゲノム構造もヒトとの類似性が高いことから、実験動物として非常に適している。また、繁殖力も旺盛であり、旧世界猿であるアカゲザルやカニクイザルが性成熟に 3 年ほど要し、一生の産仔数が 10 頭前後であるのに対し、マーモセットは妊娠期間 144 日、性成熟に達するまでの期間が 12~18 ヶ月と短く、一生の間に 40~80 頭の子供を産出する。この点も実験動物として非常に理想的である。このような利点があることから、公益財団法人・実験動物中央研究所 (実中研) では近年、コモン・マーモセットを飼養し、動物実験を行う体制を確立している。我々も薬剤開発を行う上で、マーモセットを用いた全臨床試験の必要性を痛感していたが、日本大学医学部においてはマーモセットをはじめとした霊長類の飼養・実験設備がなく、実験は不可能であった。そこで、実中研の実験施設において、実中研が飼養しているコモン・マーモセットの皮膚肥厚性癬痕に対する TGF β 1 抑制 PI ポリアミドの効果の検討を行った。

2) ヒト TGF- β 1 に対する PI ポリアミドの設計と機能解析

まず最初に、ヒト TGF- β 1 プロモーター (転写開始点を起点として、558 塩基上流から 516 塩基下流の部分) に対し、複数の PI ポリアミド GB1101~GB1107 を設計した。GB1101 は転写因子 FSE2 結合サイト、GB1105 と GB1106 は転写因子 AP1 結合サイトに近く、GB1107 は転写因子 NF-1 の結合サイトに近い。これらの PI ポリアミドを 10nM から 10 μ M の範囲で培養ヒト血管平滑筋細胞に投与し、TGF- β 1 の発現量を real time PCR により定量したところ、GB1101、GB1105、GB1106 の 3 つが非投与群と比較して有意な TGF- β 1 発現抑制効果を示した。

BLAST 解析の結果、この TGF- β 1 プロモーター領域のヒトとマウスの相同性は 39.5%程度であるのに対し、ヒトとマーモセットの間では 86%と高い相同性が見られることが確認された。詳

細に配列を比較したところ、上記の3つのPIポリアミドのうち、GB1101とGB1106の結合領域のDNA配列がヒトとマーモセットで共通であった。そこで、マーモセット皮膚より樹立した繊維芽細胞株に対するこれらのPIポリアミドの効果を調べたところ、GB1101が有意なTGF- β 1発現抑制効果をしめしたことから、以降の*in vivo*における解析はGB1101について行った。

3) マーモセット皮膚癒痕に対するTGF- β 1抑制PIポリアミドの作用の確認

成体の雄マーモセットの腹部皮膚の片側に、200 μ g/mlの濃度のGB1101、もう片側に水を500 μ l皮下注射し、その後、各領域に長さ2cm、皮筋層に達する切創を1本ずつ作成した。切創を縫合して観察を続けたところ、水投与部位では明確な皮膚の肥厚が見られたが、GB1101投与部位においては肥厚化はほぼ完全に抑制されていた。35日目に皮膚を生検し組織像を観察したところ、GB1101投与部位では水投与部位と比較して、表皮層の肥厚化が有意に抑制されていた(図1)。

組織の免疫染色の結果、GB1101投与部位においては、水投与部位と比較してTGF- β 1の発現低下が見られ、更に間葉系マーカーであるVimentin陽性部位の面積も低下していた(図1)。

以上の結果から、GB1101はマーモセットの皮膚切創において、TGF- β 1の発現上昇とそれに伴う線維化を阻害し、肥厚性癒痕の形成を抑制できることが証明された。

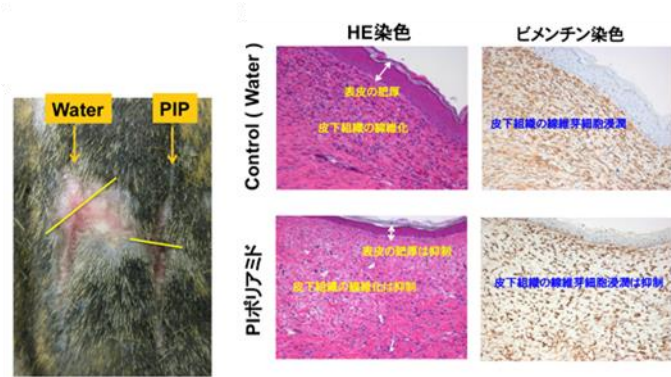


図1 マーモセット皮膚切創

4) 軟膏を用いたGB1101の投与法の検討

GB1101を実際に人の肥厚性癒痕の治療に用いる場合は、軟膏に溶解した状態で投与することから、最も適した軟膏基剤を選定する実験を行った。5種類の軟膏基剤(Vaseline, Plastibase, Hydrophilic ointment, Solbase, HPMC)に対し蛍光物質FITCをラベルしたGB1101を溶解した。ラットの皮膚切創にGB1101入り軟膏を塗布し(GB1101の投与量は10 μ g)、24時間後と48時間後に皮膚切片を蛍光顕微鏡下で観察し、FITC-GB1101の細胞内への取り込みを確認したところ、Solbaseを用いた群において、GB1101の核への取り込みが顕著であった。この結果に基づき、マーモセット皮膚切創に対して、Solbaseに溶解したGB1101を30 μ g投与したところ、肥厚性癒痕の形成が抑制され、また真皮層のVimentin陽性部位の現象が観察された。以上の結果からSolbaseに溶解したGB1101は肥厚性癒痕の治療薬として有望であることが示された。

5) 考察

以上の結果より、TGF- β 1抑制PIポリアミドであるGB1101が皮膚肥厚性癒痕の形成する作用を持つ事が、マーモセットを用いた前臨床試験で確認できた⁴⁾。GB1101はマーモセットとヒト両方のTGF- β 1プロモーター領域を認識することから、そのままヒトのTGF- β 1発現抑制剤

として使用することが可能であり、今回の成果はPI ポリアミドの実用化に大きく一歩近づいた成果であると言える。現在ところ、肥厚性瘢痕の治療薬としてはTGF- β 1の機能を阻害する機能のあるトラニラストと副腎皮質ホルモンの二つが臨床の現場で使われているが、トラニラストの作用はTGF- β 1 特異的なものでなく効果も弱いことから、これらの治療薬は肥厚性瘢痕を完治させるには至らない。そのためGB1101は新規の肥厚性瘢痕治療薬候補として非常に期待できると考えている。

6) 今後の展望

今回の報告では、観察が容易な皮膚病変について検討したが、TGF- β 1が原因となっている他の線維性疾患に対してもGB1101を適用するために、ラット・マウスを用いた解析同様、マーモセットモデルを用いた検討が必要となる。モデル動物として歴史が浅く、確立された疾病モデルの種類が少ないこと、飼育費用が高い点など、実現には困難を伴うが、現在、免疫抑制剤シクロスポリンAを用いたマーモセットの腎症モデルの確立を急いでいる。現在までにマーモセットの腎症モデルを作成した例はなく、GB1101のヒト腎症に対する治療効果を予測する上で、非常に信頼できる動物モデルであると言える。

引用文献

- 1) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- β 1 promoter. *Kidney Int.* 2011;79(1):46-56.
- 2) Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- β 1 promoter. *J Invest Dermatol.* 2011;131(10):1987-95.
- 3) Serie K, Fukuda N, Nakai S, Matsuda H, Maruyama T, Murayama Y, Omata S. Pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor β 1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int.* 2012;32(4):462-72.
- 4) Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF- β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One.* 10(5):e0125295. 2015.