



Title	尿細管上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する化合物AM251の同定と作用機構の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	吉永, 知世
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12742号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65268
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoyo_Yoshinaga_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 吉永 知世

学 位 論 文 題 名

尿細管上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する化合物 AM251 の同定と作用機構の解明

【序論】

慢性腎臓病 (CKD) は腎線維化を特徴とする深刻な慢性疾患の一つであり、日本国民の成人のうち 8 人に 1 人が発症しているとも言われる新たな国民病である。CKD の特徴である腎線維化が発症する要因は筋線維芽細胞がコラーゲンやフィブロネクチンなどを含む細胞外マトリックスを過剰産生することである。この筋線維芽細胞は間質の線維芽細胞や周皮細胞の形質転換、尿細管上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT)、腎内皮細胞の内皮間葉転換、線維細胞の遊走など様々な細胞に由来する。EMT の腎線維化に対する寄与／役割については議論が続いたが、近年、部分的 EMT (細胞はまだ基底膜にとどまっているものの EMT が誘導された状態) が CKD の病態進展に重要であることが示された。この過程で特に重要なのはトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β) 刺激によって誘導される 2 つの転写制御因子、snail family zinc finger 1 (SNAIL1) と twist family bHLH transcription factor 1 (TWIST1) である。これらの因子が誘導されると、TGF β などの分泌が促進され、筋線維芽細胞の増殖・活性化による腎線維化、尿細管上皮細胞の細胞周期停止による腎機能障害や慢性的な炎症が誘発され、最終的に CKD の病態進展に至る。このため、EMT を抑制することで CKD の病態進展を抑制できると考えられる。

EMT は TGF β などのサイトカインによる刺激や酸化ストレスによって誘導される。EMT が誘導されると上皮細胞マーカーである E-カドヘリンの発現が低下し、筋線維芽細胞のマーカーである細胞外マトリックスタンパク質 (コラーゲンやフィブロネクチンなど) や細胞骨格タンパク質 (α 平滑筋アクチン (α SMA) やビメンチンなど) の発現が上昇する。EMT の中心的なシグナル伝達経路は TGF β シグナルである。TGF β シグナルでは TGF β レセプター 1/2 に TGF β が結合後、SMAD2/3、p38 MAPK がリン酸化されることで活性化する。これらのリン酸化シグナルは SNAIL1、TWIST1 などの EMT 関連転写制御因子の活性化を介して、上記 EMT タンパク質の発現を誘導する。

本研究では CKD の治療薬の開発のため、約 200 種からなる脂質ライブラリを用いて EMT を抑制可能な化合物の探索を行った。その後、同定した化合物が EMT を抑制する作用機序を解析することで CKD 創薬につながる新たな知見を得ることを目的とした。

【結果】

EMT 抑制化合物探索スクリーニングによる AM251 の同定

まず、尿細管上皮細胞の株化細胞 (HK-2 細胞) を用いて市販脂質ライブラリのスクリーニングを実施した。EMT を誘導するために、TGF β 1 で刺激を行い、その 24 時間後に I 型コラーゲンの 1 種 *Collagen1A1* (*COL1A1*) の遺伝子発現量を指標に EMT を評価した。スクリーニングの結果、ヒットした化合物は 8 種であった。次に二次評価としてこれらの化合物がプライマリー細胞 (RPTEC 細胞) においても EMT を抑制可能か検証した。その結果、プライマリー細胞において細胞毒性を示さずに EMT を抑制したのは AM251 のみであった。EMT が誘導されると上皮マーカーである E-カドヘリンの発現が低下する。AM251 の E-カドヘリンに対する影響を検証したところ、AM251 は E-カドヘリンの発現低下を抑制した。これらの結果より、AM251 が尿細管上皮細胞の EMT を抑制可能であることが明らかとなった。

AM251 は既知作用点 (CB1, GPR55) を介さずに EMT を抑制する

AM251 の作用として、カンナビノイドレセプタータイプ 1 (CB1; *CNR1*) に対するアンタゴニスト作用と G タンパク質共役型受容体 55 (GPR55) に対するアゴニスト作用が知られる。そこで、AM251 の持つこれらの作用が EMT 抑制に寄与している可能性を検証した。まず、CB1 アゴニストであるアナナダミドを RPTEC 細胞に作用させた場合の EMT 誘導効果を評価したが、EMT は全く誘導されず、TGFβ1 刺激との相乗効果も認められなかった。さらに、*CNR1* の siRNA を用いて EMT 抑制効果を評価したが、AM251 による EMT 抑制効果には影響がなかった。次に、AM251 の GPR55 アゴニスト効果による影響を検証するために、GPR55 アンタゴニストを用いて検証を行った結果、GPR55 アンタゴニストを作用させても AM251 による EMT 抑制効果に影響は認められなかった。以上の結果より、AM251 は既知作用である CB1 アンタゴニスト効果及び GPR55 アゴニスト効果以外の作用によって EMT を抑制していることが示唆された。

AM251 は TGFβ1 刺激時の *SNAIL1*, *FOSB*, *JUNB* の遺伝子発現誘導を抑制する

AM251 による EMT 抑制メカニズムを解析するために、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。まず、AM251 (-) および AM251 (+) 条件下で TGFβ1 による刺激を行った場合に 2 倍以上の遺伝子発現変動が認められたアレイプローブ群について比較を行った。その結果、AM251 は TGFβ1 刺激により 2 倍以上発現変動した 2439 プローブのうち、68.8% の発現変動を抑制していることが判明した。次に、AM251 がどのようなパスウェイに大きく寄与しているのかを解析した結果、影響の大きい上位 10 位のパスウェイのうち 5 個が EMT や TGFβ シグナルに関連するパスウェイであった。このことから、AM251 は数多くの経路に対して幅広く影響しているのではなく、EMT 及び EMT に関与するシグナル経路に対して比較的特異的に作用していることが示唆された。

次に、EMT 抑制メカニズムの詳細を解明するため、EMT に重要とされる主要な転写制御因子への AM251 の影響を評価した。その結果、これらの転写制御因子のうち、TGFβ1 刺激によって最も大きく遺伝子発現上昇したのは *SNAIL1* であり、AM251 を作用させることでこの遺伝子発現上昇は抑制された。また、*SNAIL1* に影響する上位因子である AP-1 ファミリーを評価した結果、TGFβ1 刺激時には *JUNB* と *FOSB* の遺伝子発現が大きく上昇していたが、AM251 を作用させると抑制されていた。以上の結果より、AM251 は TGFβ1 刺激時により誘導される *SNAIL1*, *JUNB*, *FOSB* の遺伝子発現上昇を抑えることによって、EMT を抑制していることが示唆された。また、同様の結果はリアルタイム RT-PCR 法によっても得られた。

AM251 は TGFβ1 刺激時の SMAD2/3, p38 MAPK のリン酸化を抑制する

TGFβ1 刺激によって TGFβ シグナルが活性化すると SMAD2/3 及び p38 MAPK ファミリーのリン酸化が亢進する。これらのリン酸化の状態をウェスタンブロッティング法により評価した。その結果、AM251 は TGFβ1 刺激時の SMAD2/3 及び p38 MAPK のリン酸化を抑制することが示唆された。

【結論】

本研究では、EMT を抑制できる脂溶性化合物を探索する目的で、脂質ライブラリを用いたスクリーニングを実施した結果、AM251 が EMT 抑制作用を持つことを明らかにした。さらに、AM251 による EMT 抑制作用のメカニズム解析を行った結果、AM251 は既知作用点である CB1 や GPR55 を介することなく EMT を抑制可能であること、TGFβ シグナルの中でも SMAD2/3 及び p38 MAPK のリン酸化を抑制すること、*FOSB*, *JUNB*, *SNAIL1* の発現誘導を抑制することを明らかとした。