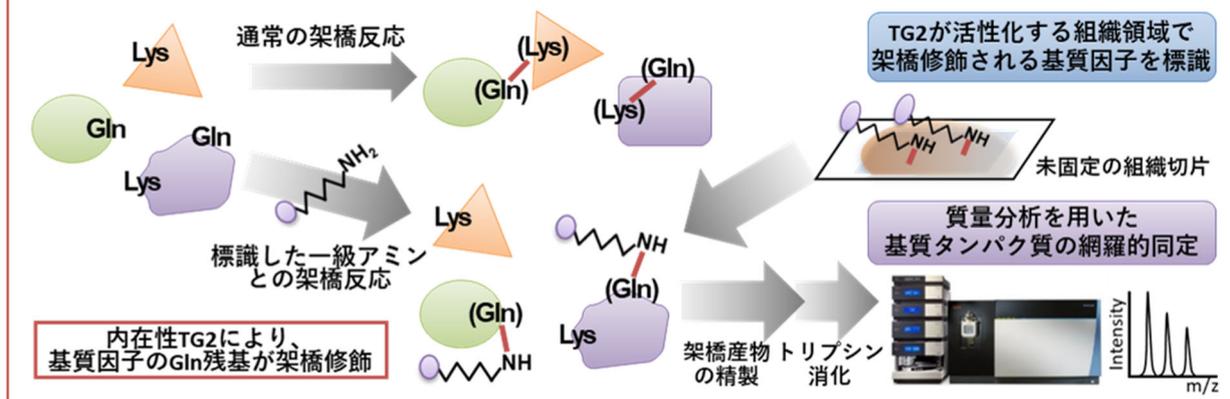


特発性肺線維症の鍵を握る架橋分子標的の探索法開発と同定に成功



肺線維症の分子標的の探索法開発および同定に成功 ～架橋修飾反応に関わる特発性肺線維症の発症機構の解明～

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院創薬科学研究科の辰川 英樹 助教、竹内 大修 大学院生、人見 清隆 教授らの研究グループは、同大学トランスフォーマティブ生命分子研究所（WPI-ITbM）の桑田 啓子 センターチーフらとの共同研究により、肺線維症の発症原因の一つとされる「タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ」により架橋修飾^{注1}される標的タンパク質群の同定解析手法を開発し、「特発性肺線維症（IPF）」の病態発症メカニズムの一端を明らかにしました。

IPFは、肺胞にできる傷の修復が繰り返される過程で、コラーゲンなどのタンパク質が過剰に増加して間質が厚くなり、呼吸機能が低下する疾患です。予後が悪い難治性疾患ですが、病態増悪に関わる詳細な分子メカニズムは解明されておらず、有効な治療法も確立されていません。

研究グループは、IPFの発症原因に関わるタンパク質間に共有結合を作る架橋酵素に着目し、架橋修飾される標的基質タンパク質を空間的・網羅的に同定する新手法を開発して、病態形成に伴い架橋される126種類の基質因子を見出しました。

研究成果は、病態増悪に関わるタンパク質の架橋修飾により誘導される病態分子ネットワークの分子基盤を提供し、IPFの新たな治療標的を対象とした創薬シーズの開発に繋がることが期待されます。

本研究成果は、2021年7月15日22時（日本時間）付米国の呼吸器雑誌「American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology」オンライン版に掲載されました。

【ポイント】

- ・ 架橋酵素の欠損マウスでは肺線維化が顕著に抑制されることから、病態形成の原因となる架橋修飾された標的基質因子を同定するための新手法を開発した。
- ・ 病態増悪に伴い架橋酵素が活性化する領域において、架橋修飾される 126 個の基質タンパク質群を同定し、シグナル伝達の経路解析やタンパク質相互解析により、架橋修飾反応の下流で誘導される、小胞体ストレス^{注2)}や脂質代謝関連のシグナル伝達などの新たな病態分子機構を見出した。
- ・ 架橋修飾により誘導されるシグナル伝達経路は、特発性肺線維症の患者での遺伝子の活性化経路と類似性があったことから、基質因子群の架橋修飾反応の制御は、未だ有効な治療法がない肺線維症の新たな薬剤シーズの開発に繋がることが期待される。

【研究背景と内容】

「特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)」は、肺に線維性タンパク質が過剰に蓄積して病態が進行する国指定の難治性疾患です。IPF の患者数は日本ではおよそ 1 万数千人と推測され、自覚症状が認められてからの生存期間は、一般的に 3~5 年と予後が大変悪い疾患です。現時点で、疾患を直接抑制する有効な治療法は確立されておらず、疾患増悪に関わる詳細な分子病態メカニズムの解明が求められています。

IPF の解析研究には、抗がん剤「ブレオマイシン」を投与した肺線維化マウスモデルが用いられます。本研究では、同マウスモデルにおいて、疾患発症の原因となる「タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 (TG2)」に着目し (図 1)、病態形成時に TG2 が活性化する領域で架橋修飾される標的基質タンパク質を同定する実験手法を開発しました。

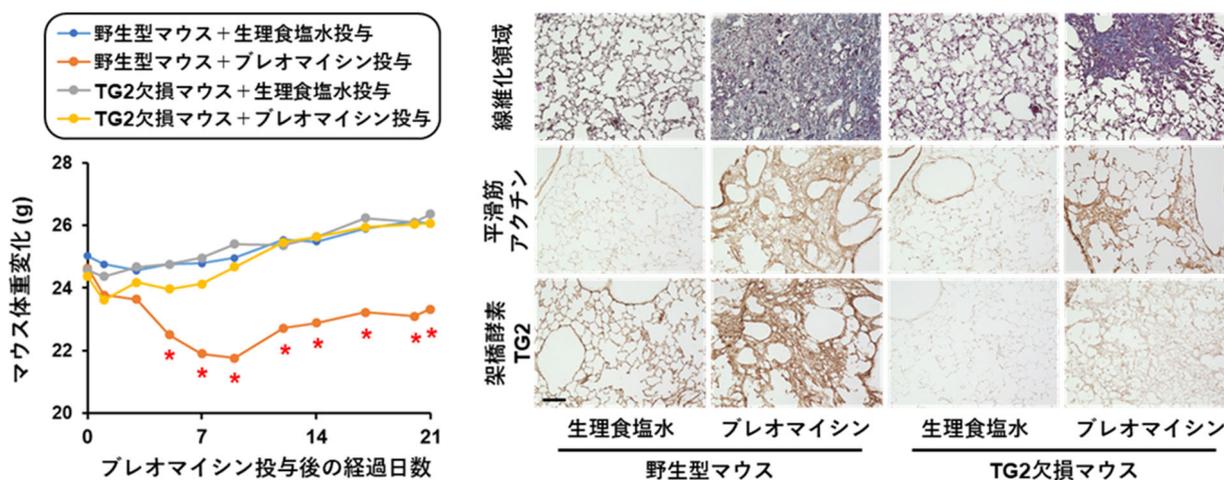


図 1 肺線維化の原因となる架橋酵素 TG2 の欠損マウスの表現型解析

ブレオマイシンを投与した肺線維化誘導マウスでは、投与数日後に急激な体重減少 (*で図示) が起こると共に線維化した領域が増加し、架橋酵素 TG2 も増加した。TG2 欠損マウスでは体重減少が起こらず、線維化領域も減少した。

TG2 はタンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間に不可逆的な架橋結合を形成する酵素であり、肺が線維化した領域ではTG2の活性増加（蛍光標識一級アミンの架橋修飾の増加）が顕著に観察されました（図2）。内在性TG2により肺組織切片中のグルタミン残基を持つタンパク質に一級アミンが架橋修飾され、これを指標としてTG2活性を調べることができます。

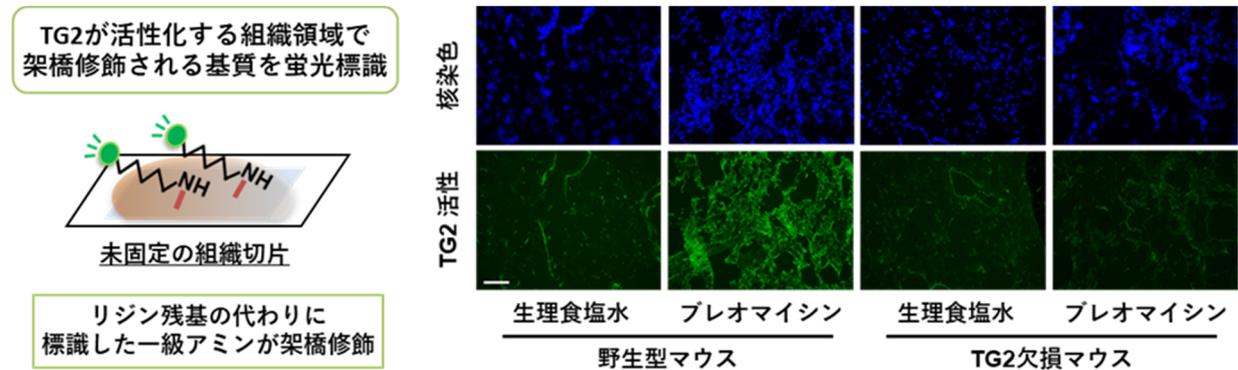


図2 肺線維化した領域でのTG2の活性化（標識一級アミンの架橋反応）

ブレオマイシンにより線維化した肺の未固定の凍結組織切片を作製し、蛍光標識した一級アミンと反応させた。線維化肺で活性化したTG2が組織切片中のグルタミン残基を持つタンパク質と蛍光標識一級アミン（リジン残基側のタンパク質を模倣）を架橋修飾するため、蛍光観察によりTG2の活性化の程度を調べることができる。

次に、このような一級アミンと架橋した組織中のグルタミン残基を持つタンパク質を調べることにより、線維化領域でTG2によって架橋される基質タンパク質を同定できるのではないかと考え、実験系の構築を行いました（図3）。

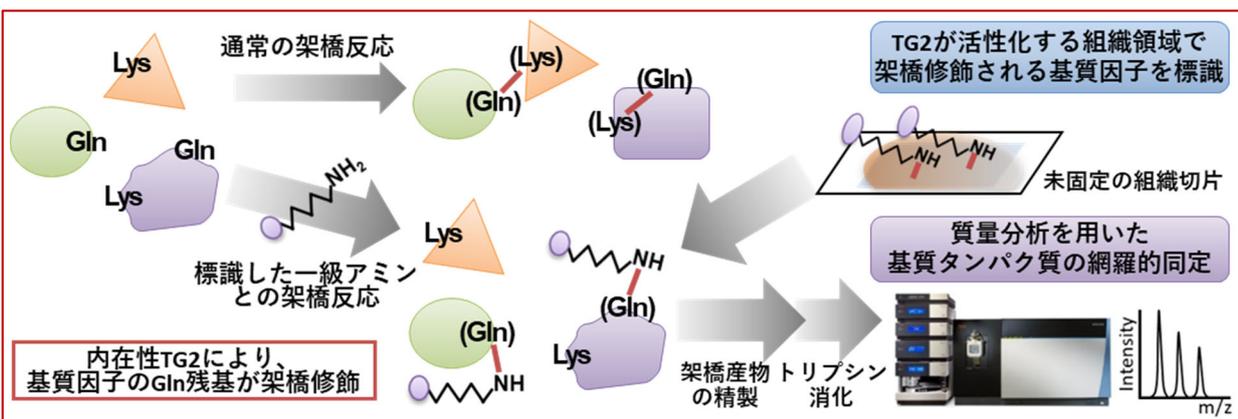


図3 架橋修飾される基質タンパク質を空間的・網羅的に同定する新手法の開発

未固定の組織切片を用いた反応により、TG2の分布に伴って標識一級アミンと架橋修飾したグルタミン残基側の基質タンパク質（架橋産物）について、特異的かつ効率的に精製し、質量分析を用いたプロテオーム解析^{注3)}により網羅的に同定・定量解析する一連の実験手法を確立した。（グルタミン残基をGln、リジン残基をLysと表記）

このような架橋タンパク質の同定手法を用いて、線維化肺で顕著に架橋修飾されるタンパク質群を調べたところ、病態増悪に伴い架橋される 126 種類の基質タンパク質を見出しました。同定されたタンパク質群はファゴソーム^{注4)}、脂質代謝、免疫応答、小胞体のタンパク質のプロセッシング^{注5)}などを含む 21 種類のシグナル伝達経路に関わることが分かりました。さらに、タンパク質相互作用解析により、小胞体ストレスやペルオキシソーム増殖因子活性化受容体^{注6)}シグナルに関連する 6 つのクラスターとシグナル伝達経路において、中心性が高い上位 20 個のハブタンパク質を抽出しました。これらの同定因子やパスウェイの一部は IPF 患者の遺伝子発現解析の結果と類似しており、架橋修飾反応を起点として誘導するシグナル伝達経路が、IPF の病態発症メカニズムに関わることが分かりました。

特定の基質タンパク質の架橋修飾と病態形成の関係性が今後解明されることにより、IPF の病態機構解明と新たな治療標的を対象とする創薬シーズの開発に繋がることが期待されます。

【成果の意義】

難治疾患である特発性肺線維症の病態増悪に関わる架橋酵素の標的基質タンパク質群を網羅的に同定した本研究成果は、線維化の病態分子機構の解明および新たな病態治療法の開発のための創薬シーズの創出に繋がります。

【用語説明】

注 1) 架橋修飾 :

タンパク質のグルタミン残基とリジン残基にイソペプチド結合 (共有結合) が形成される翻訳後修飾反応。

注 2) 小胞体ストレス :

タンパク質が正常な高次構造に折りたたまれなかったタンパク質 (変性タンパク質) が小胞体に蓄積し、細胞に悪影響が生じる状態。

注 3) プロテオーム解析 :

ある組織や細胞において存在している全タンパク質を調べ、生命現象を統合的に解析する手法。

注 4) ファゴソーム :

マクロファージなどにより死んだ細胞が除去される食作用の過程で形成される小胞。細胞の周囲に細胞膜が融合することにより形成される。

注5) プロセッシング :

生合成されたタンパク質が種々の修飾を受けて活性を持つタンパク質へと変化(成熟)する過程。

注6) ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 :

ほとんどの脊椎動物において発現している核内受容体。ステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、糖や脂質代謝に関与する種々の標的遺伝子を調節する転写因子。

【論文情報】

雑誌名 : American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology

論文タイトル : Spatially resolved identification of transglutaminase substrates by proteomics in pulmonary fibrosis

(肺線維化における架橋酵素トランスグルタミナーゼの局在依存的な標的基質のプロテオミクスによる同定解析)

著者 : 名古屋大学大学院創薬科学研究科

竹内 大修、辰川 英樹、篠田 祥希、人見 清隆

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所

桑田 啓子

帝人ファーマ株式会社

長谷 直樹、高橋 広、西賀 美幸

DOI : 10.1165/rcmb.2021-00120C