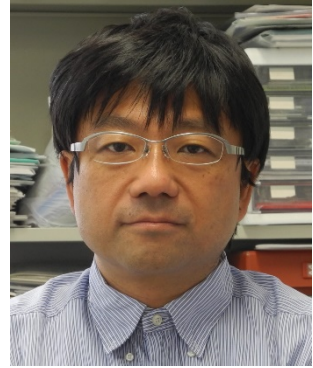




PANDEMIC
COVID-19
WE FIGHT TOGETHER

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!



吸入可能な抗炎症剤を用いた COVID19重症化予防・治療と応用

東北大学医学系研究科医科学専攻

講師 大河内真也

共同研究者

東北大学産業医学分野 教授 黒澤一

東北大学呼吸器外科 教授 岡田克典

山梨大学動物実験センター 准教授 兼平雅彦

COVID19コントロールは喫緊の課題

- 高い死亡率、重篤な後遺症
- 感染者1億8150万人、死亡393万人、ワクチン接種回数29億9400万回（ジョンズホプキンス大学ホームページ2021.6.29現在）
- 全世界の経済に打撃。社会の不安定化につながる危険性。一方で必要な社会変革の契機になりえる可能性。
- ワクチン接種である程度の予防は可能だが、根絶は困難。
- 効果的な治療方法、ワクチン以外の予防法の欠如。



COVID19従来治療とその問題点

- **COVID19は多彩な治療標的を持つ。**

①JAK/STAT・NF-kB活性化によるサイトカインストーム、②膜タンパクACE2・TMPRSS2を介したウイルス感染、③TGF β /SMAD活性化による線維化、④肺胞上皮・血管内皮障害等。

- **これらを標的とした従来型治療の効果は限定的かつ副作用多く高価である。**

①コルチコステロイド、②抗IL6製剤、③抗JAK阻害薬、④抗体製剤、⑤抗血栓薬、⑥ECMO等。特に抗体製剤は高価。普及に障害。

- **様々な治療標的を抑えなくてはならないため治療の複雑性が増し救命率は減少する。**

複数の治療標的を同時に狙える新規作用機序を持ち、有効性・安全性が高く、費用が安い薬を上梓できれば、人類の幸福に多大な貢献ができる。

- **経気道投与は副作用を軽減させるのに役立つが、現時点で経気道投与が可能な薬剤で有効性が示されているものは無い。**

新技術の特徴・従来技術との比較

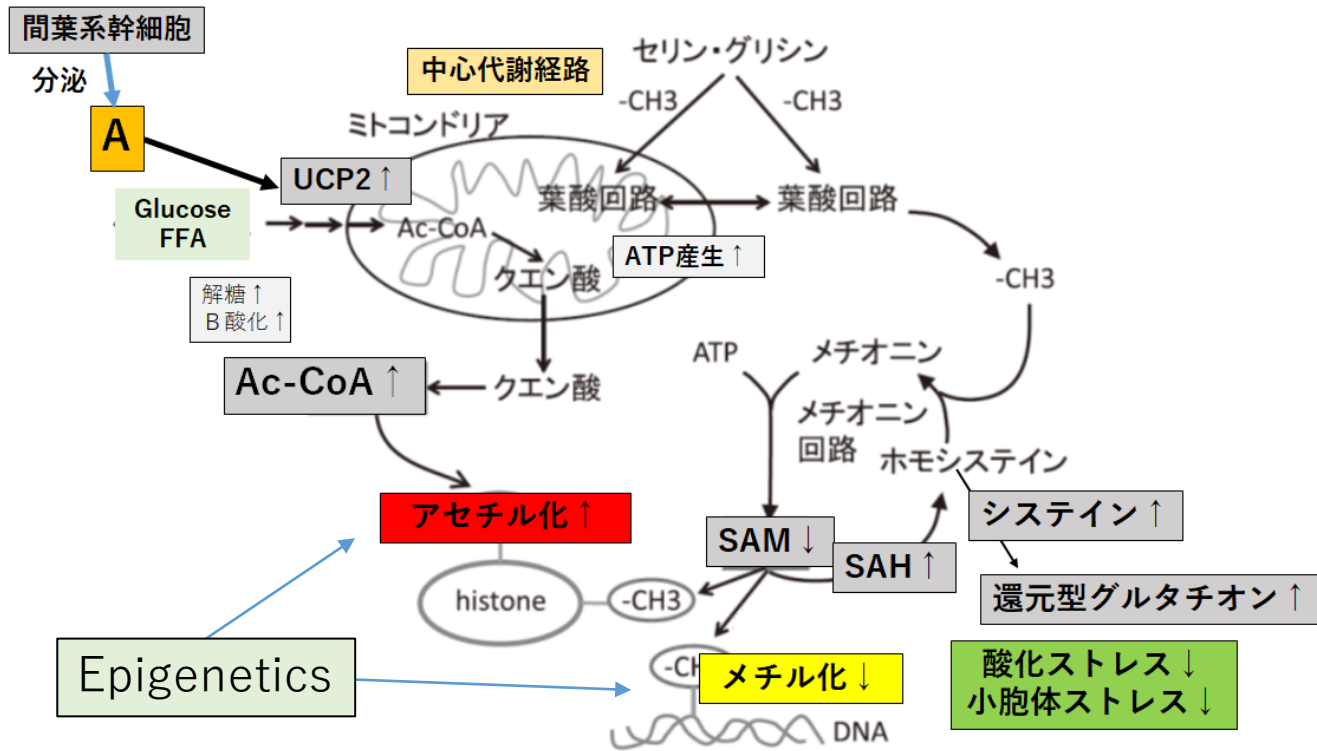
- Aは間葉系幹細胞等が微小環境の恒常性維持のために放出する液性因子（タンパク質）であり、リコンビナントタンパクとして容易に精製可能。
- Aは細胞の中心代謝とその周辺の代謝経路に影響を与えることにより、抗酸化ストレス低下、エピジェネティクス調整、免疫調整、組織保護等の作用を持つ。
- Aは経気道投与が可能であり、呼吸器系疾患の治療に有利。
- Aは今回報告する新技術の知見、過去の報告等により以下の病態に対する有効性が期待できる。

①JAK/STAT・NF- κ B活性化によるサイトカインストーム、②膜タンパクACE2・TMPRSS2を介したウイルス感染、③TGF β /SMAD活性化による線維化、④肺胞上皮・血管内皮障害等

- 以上より、AはCOVID19・自己免疫疾患の治療に対して有効性が期待できる。

背景 (1) タンパクAの働き

間葉系幹細胞由来分子AはUCP2を介して
ミトコンドリアとその周辺代謝経路に影響を与える



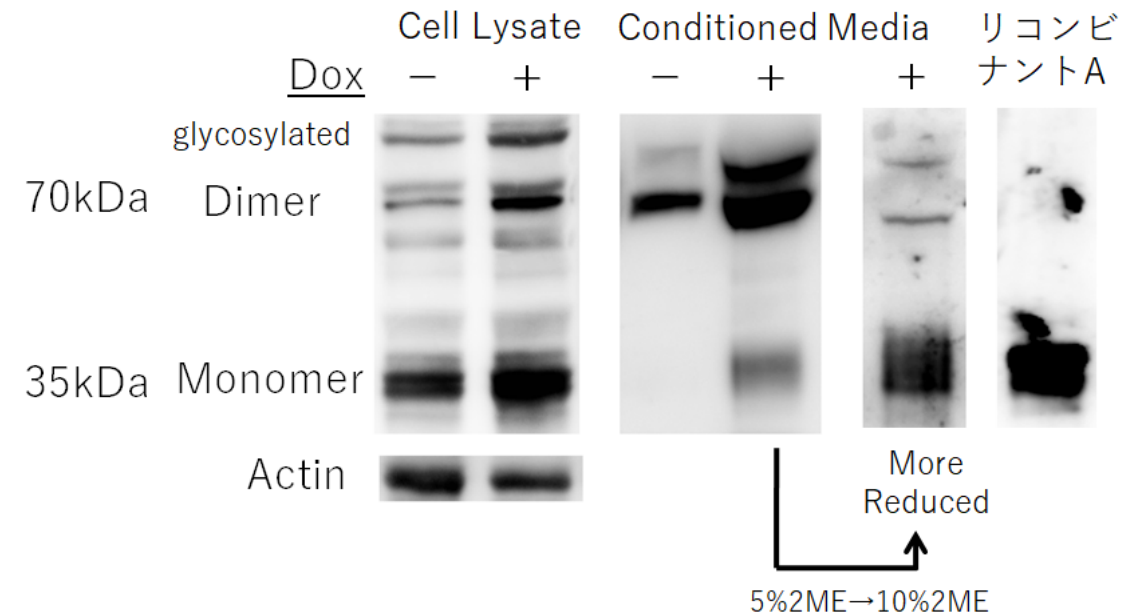
Aの働きについての発表者が明らかにした新規知見のまとめ (投稿準備中)

ストレスに晒された間葉系幹細胞 (MSCs) はAを大量に分泌する。AはUCP2 (Uncoupling Protein 2)の発現を誘導し、ミトコンドリアおよびその周辺の代謝経路に影響を及ぼす。その結果、タンパクアセチル化、DNAメチル化 (エピジェネティクス)、酸化ストレス軽減などにも関わる。

心身医学 57, 343の図表を用いて作図

Aは遺伝子導入
により簡便に精製可能

タンパクA遺伝子導入細胞でのAの発現



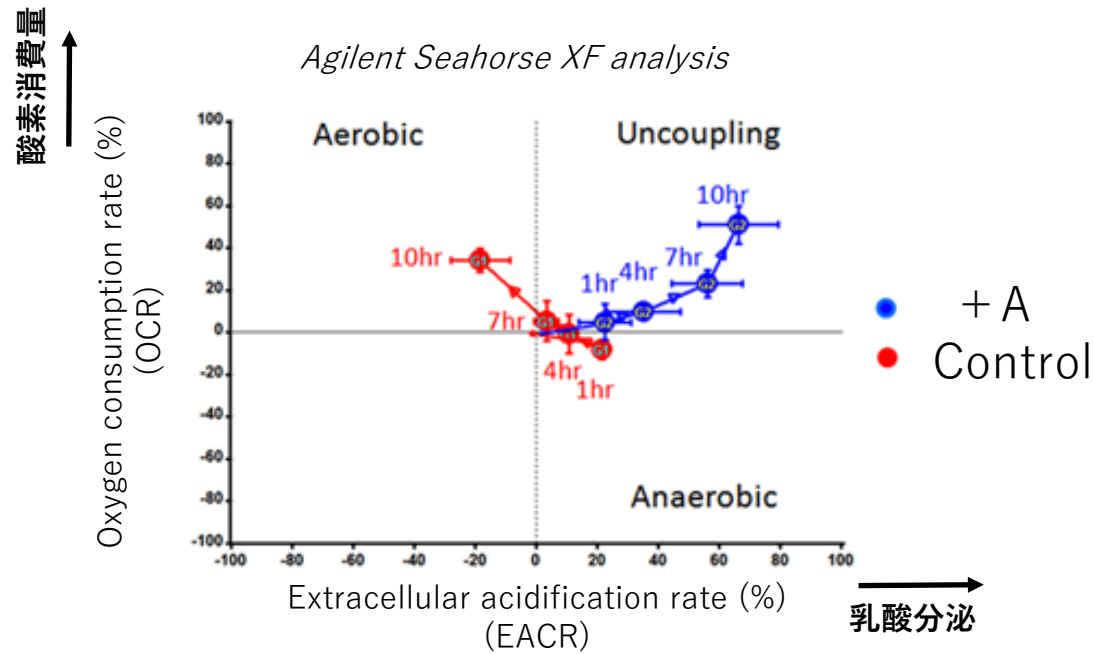
発表者データ (未発表)

ドキシサイクリン作動性A遺伝子組み込みレンチウイルスを細胞に導入しウエスタンブロットを行った。Aは細胞内では主に単量体として産生されるが、糖化された二量体として分泌される。遺伝子導入技術でAの大量生産は可能である。

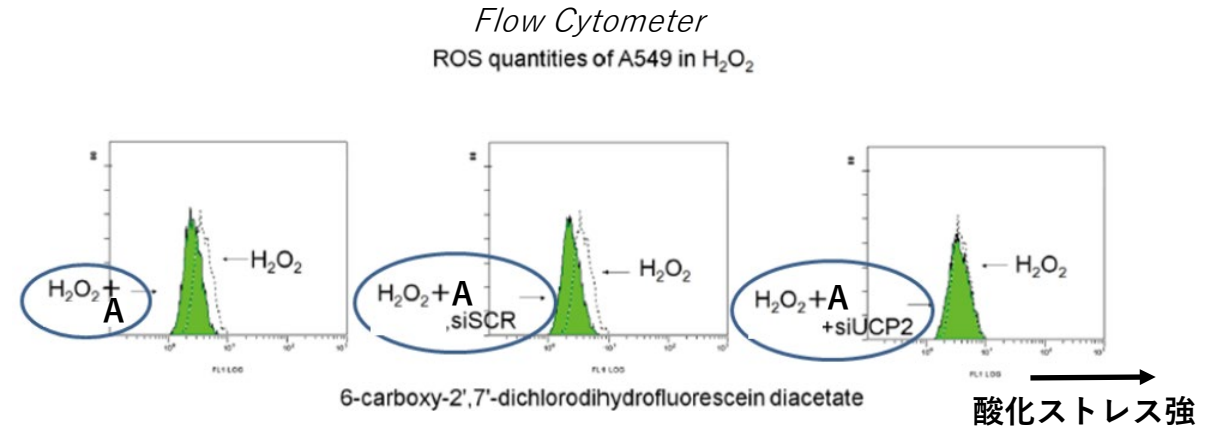
背景 (2) タンパクAの働き (代謝)

AはUCP2を介して細胞の脱共役呼吸 (Uncoupling Respiration) を誘導する

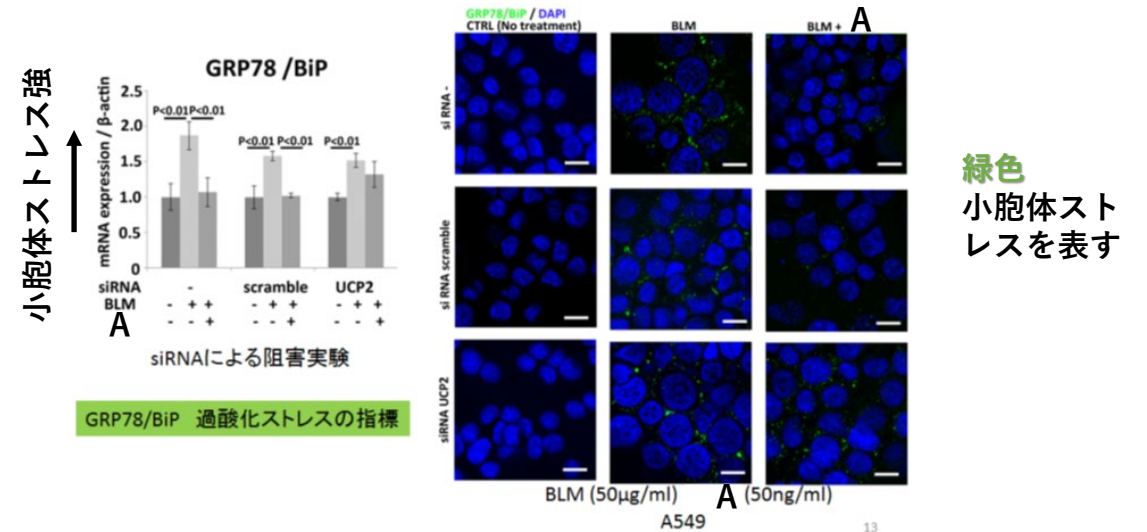
AはUCP2依存性に細胞の過酸化・小胞体ストレスを軽減する



Aは脱共役呼吸 (OCR ↑、ECAR ↑) を誘導することにより、細胞内過酸化・小胞体ストレスを低減する (上図)。脱共役呼吸の結果、細胞は抗ストレス作用を持つ。



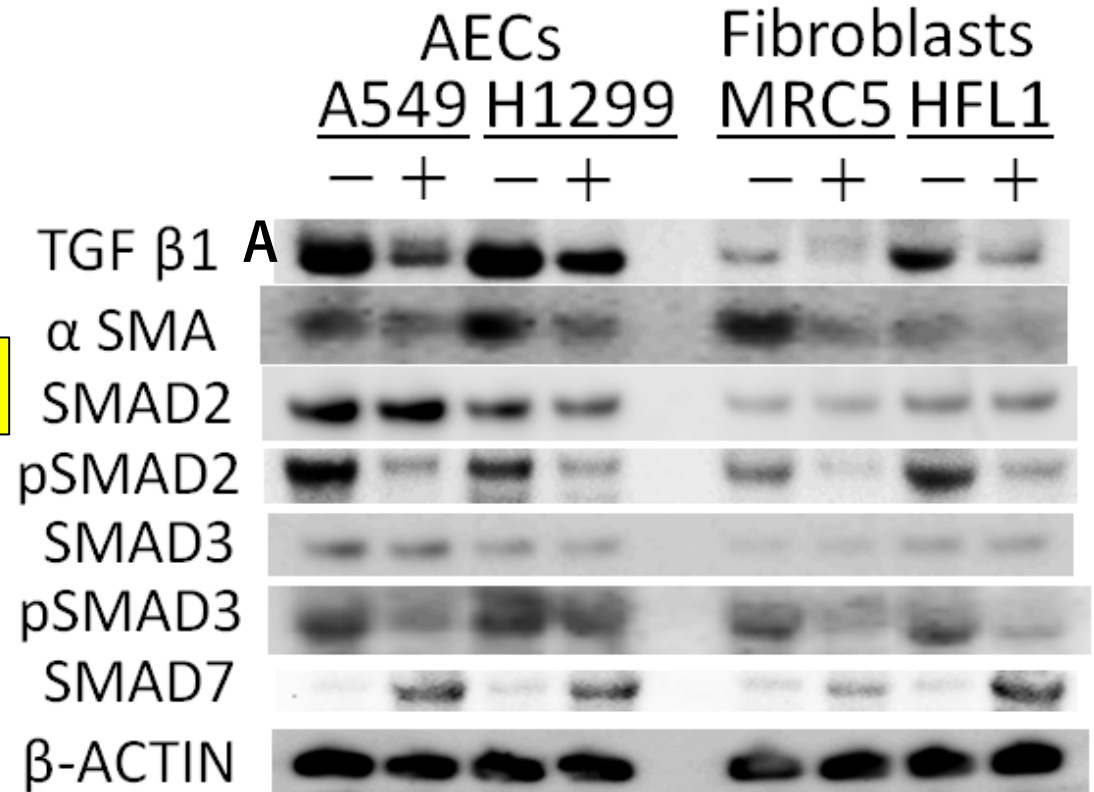
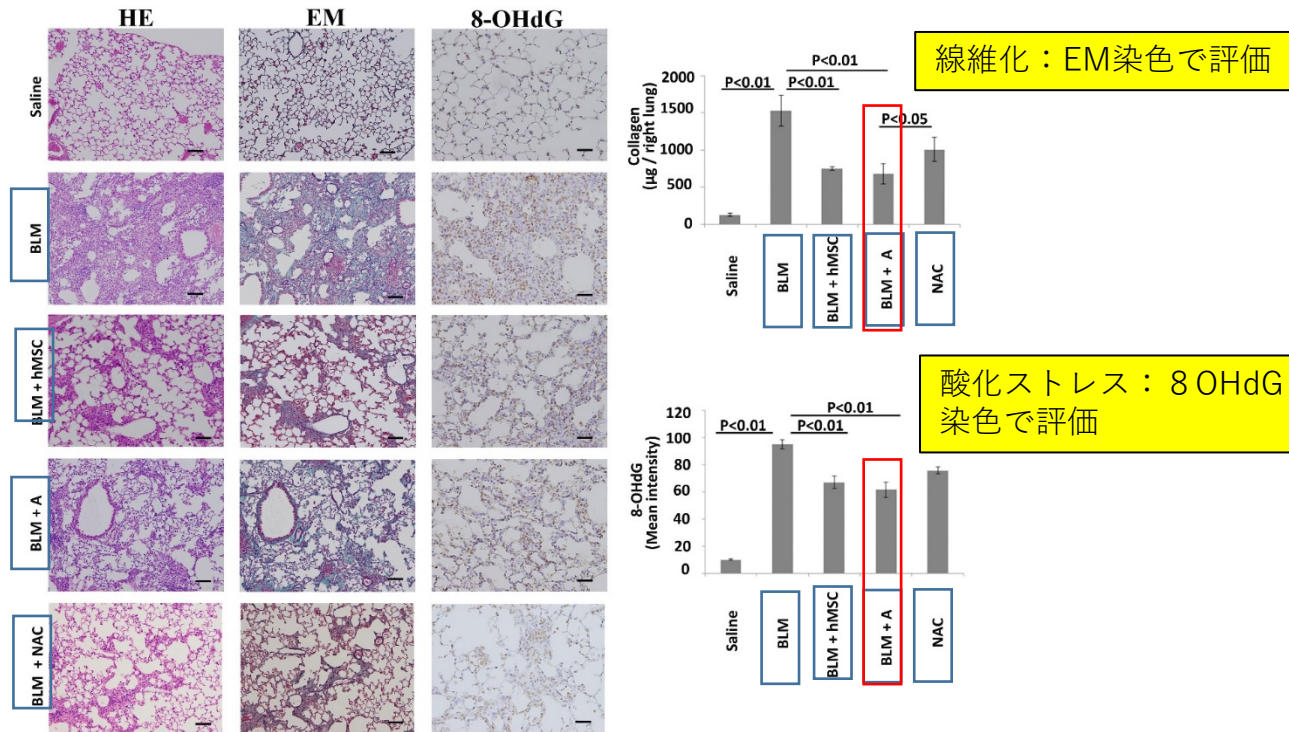
qPCR and immunofluorescent staining



Aは細胞の小胞体ストレス (上図)、過酸化ストレス (下図) を軽減する。

背景 (3) タンパクAの働き (抗線維化)

Aはマウスのブレオマイシン経気道投与モデルにおいて肺の線維化と酸化ストレスを軽減させる



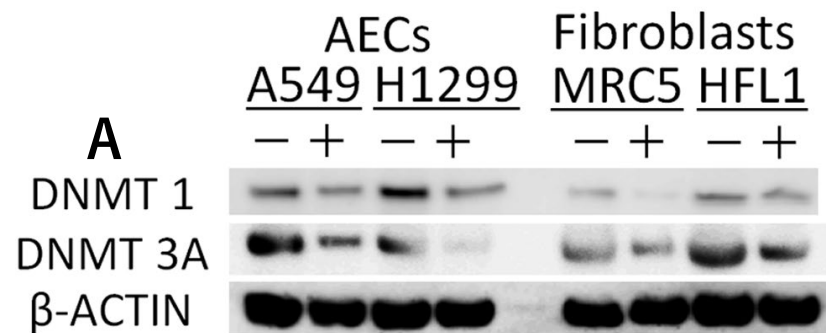
ブレオマイシン経気道モデル (BLM群) に、翌日A (2 μg) 経気道投与した群 (BLM+A) は、翌日ヒトMSC (1 million/匹) 静脈投与群 (BLM+MSC) 及び翌日Nアセチルシステイン (250 μg) 経気道追加投与群 (BLM+NAC) と同等の線維化・酸化ストレス抑制効果を示す。(詳細は下記文献を参照のこと)

*NACは吸入治療薬として臨床で使用されている

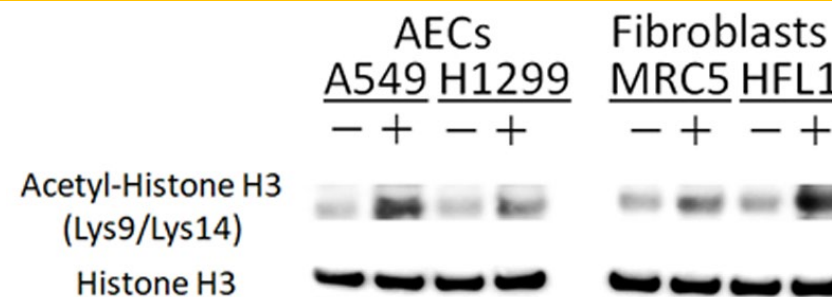
Aはヒト肺胞上皮細胞 (A549,H1299)、ヒト線維芽細胞 (MRC5,HFL1) の、線維化誘導因子であるTGFβ・αSMAの発現、SMAD2/3のリン酸化を抑制し、線維化抑制性因子であるSMAD7の発現を誘導する。

背景 (4) タンパクAの働き (遺伝子脱メチル化、蛋白アセチル化)

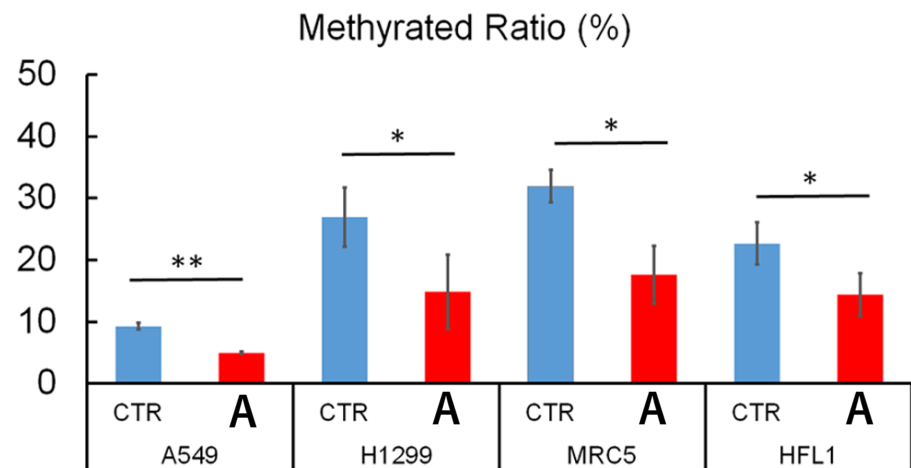
AはDNAメチル化酵素DNMT1,3Aの発現を抑制する



AはヒストンH3のアセチル化を促進する

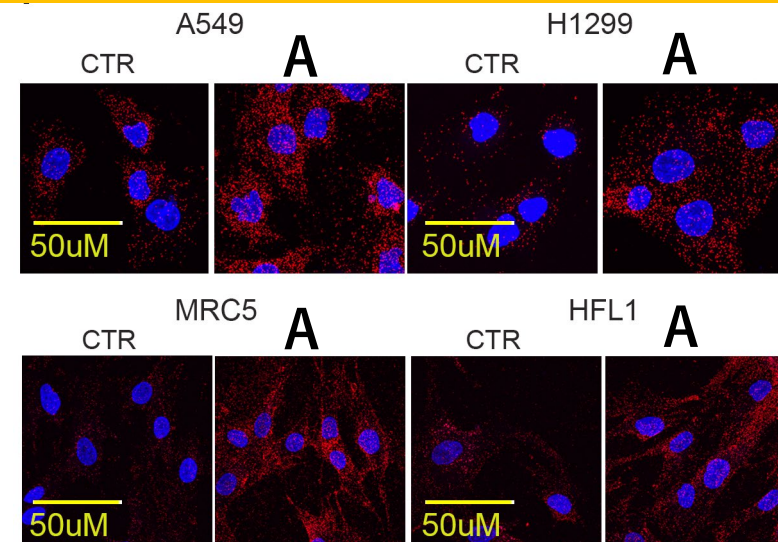


AはSMAD7の遺伝子プロモーター領域のメチル化を抑制する



細胞由来genomicDNAを、バイサルファイト処理 (WAKO291-78501)した。Methyl Primer Expressソフトウェア (Applied Biosystem) にてメチル化、非メチル化特異的プライマーを設計後、定量的メチル化PCR用キット (Takara R100A)を用いてSMAD7遺伝子プロモーター領域のメチル化を測定した。

AはSMAD7のアセチル化を促進する



In situ proximal ligation assay (Sigma Aldrich Duo Link) を用いてSMAD7アセチル化を検証した。SMAD7がアセチル化している場合、赤い点として確認できる。SMAD7アセチル化はSMAD7の作用を増強する。
(参考文献: Yoshikawa, Nat Genet 2001., Wei, BBRC 2018., Yan, JBC 2016)

発表者
データ
(未発表)

背景 (5) COVID19における治療標的 (ACE2, TMPRSS2, JAKs/STAT)

SARS-CoV2の宿主細胞内侵入
に必要な膜タンパクACE2, TMPRSS2

InvivoGen HP: 引用改変

新型コロナウイルス
(SARS-COV2)

Sタンパク

Binding the RBD motif of
SARS-CoV-2 Spike

ACE2
ウイルスの接着

Protease function:
cleavage of SARS-CoV-2
Spike to allow viral entry

TMPRSS2
宿主細胞膜
の開裂

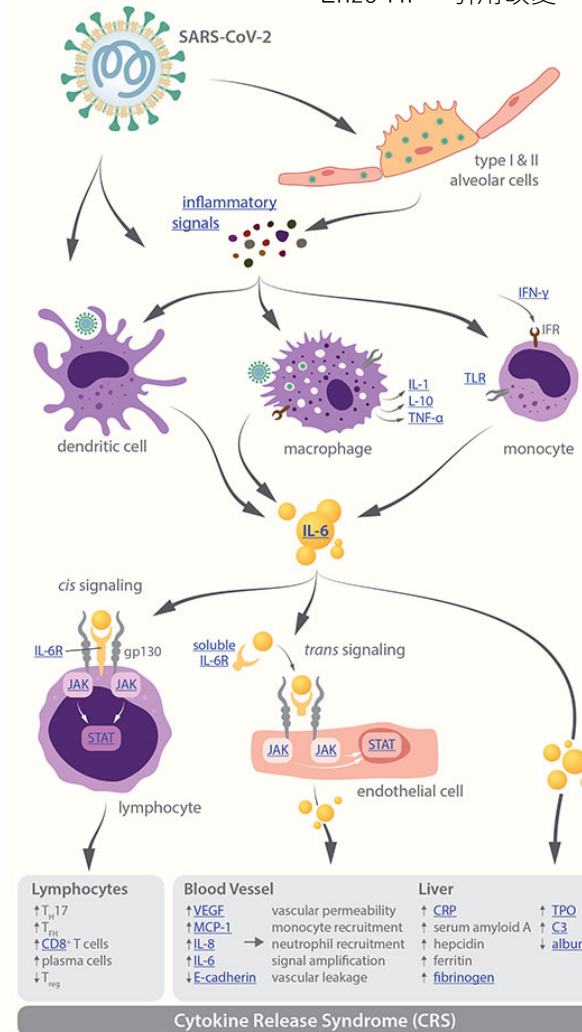
Host target cell

宿主細胞 (主に上気道~下気道)

ACE2, TMPRSS2はインフル
エンザウイルス感染にも関与

COVID19重症化に重要なJAKs/STAT経路
活性化を介したSTAT3リン酸化

Enzo HP: 引用改変



ウイルスが細胞内に侵入

マクロファージなどが
ウイルスを認識

マクロファージが炎症性サ
イトカイン (IL6等) を放出。
JAK /STAT経路を活性化。

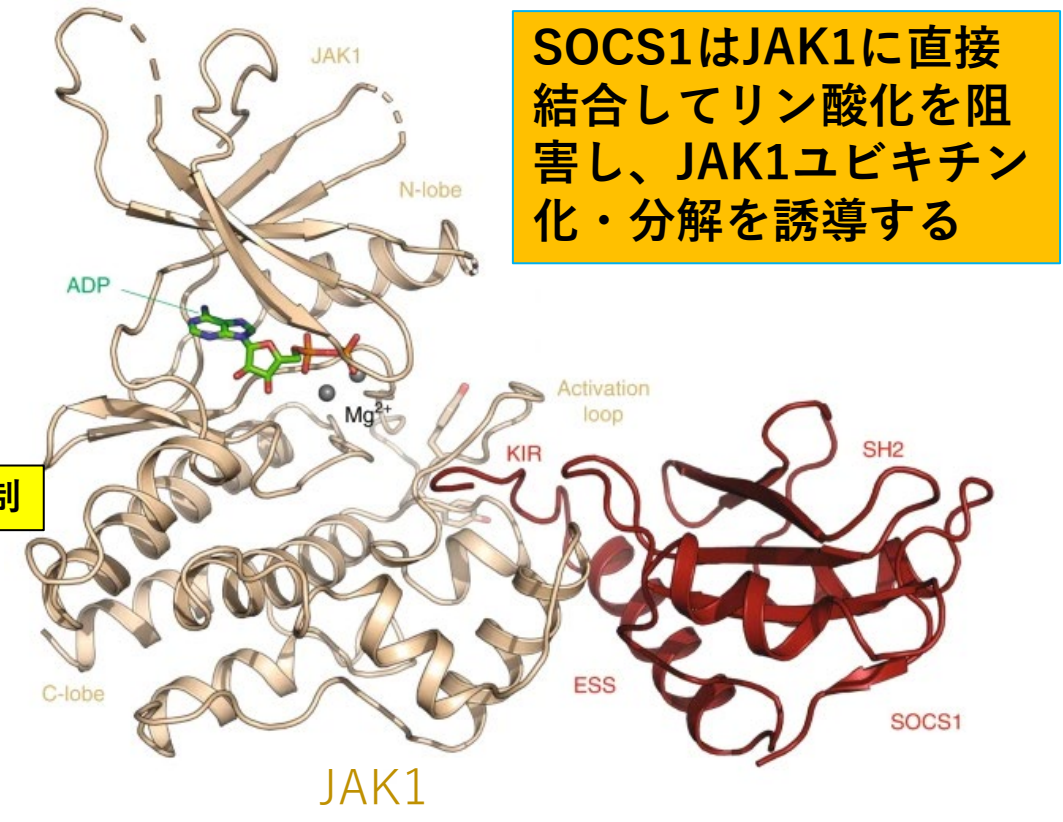
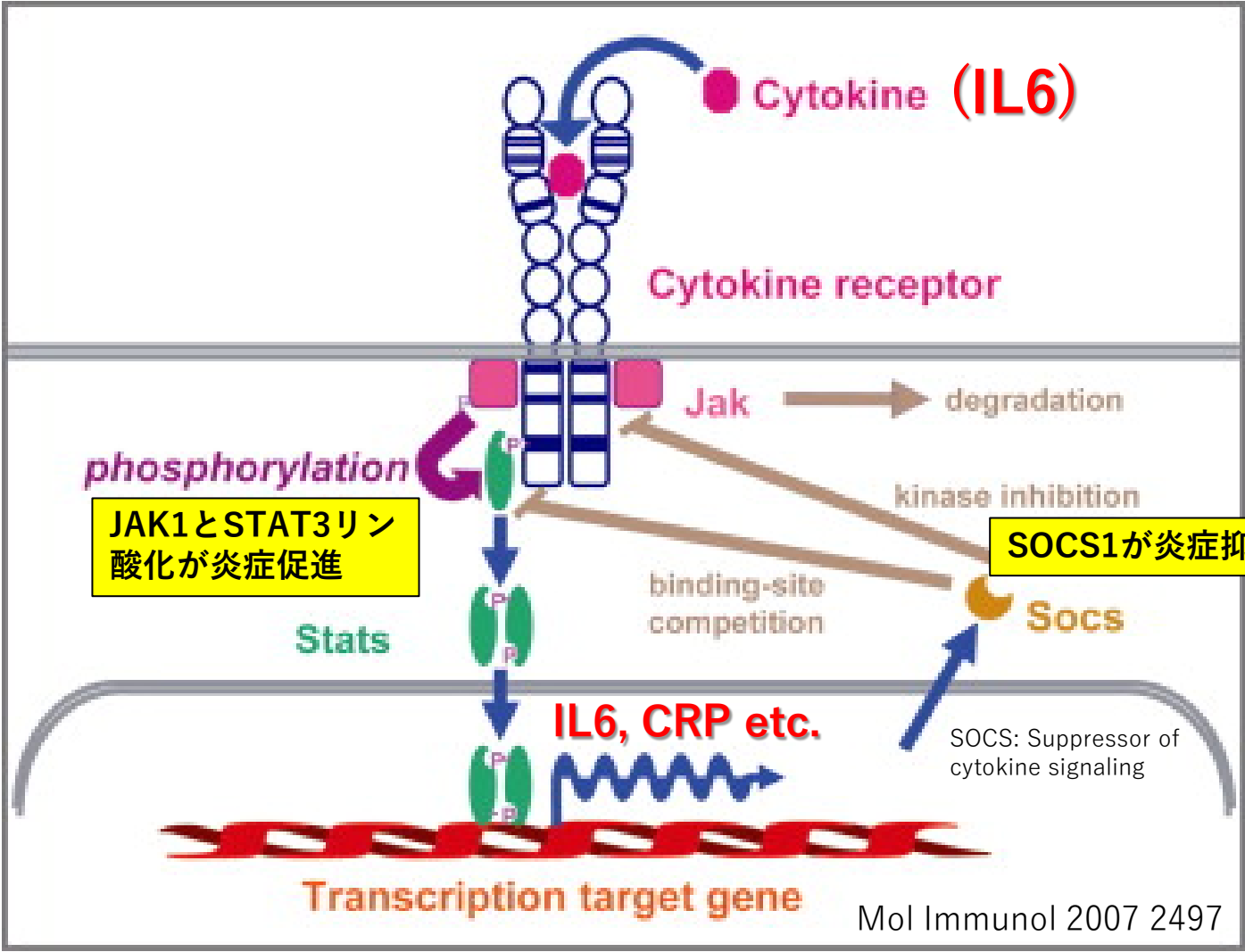
STAT3リン酸化を介し
た炎症の誘導

過度の炎症誘導による
COVID19重症化
(急性肺傷害、血管障害)

この機序をサイトカイン放出症候群 (CRS) という

背景 (6) COVID19における治療標的 (IL6AMP, SOCS1, JAK1, STAT3)

SOCS1はサイトカイン放出症候群 (CRS) を抑制する



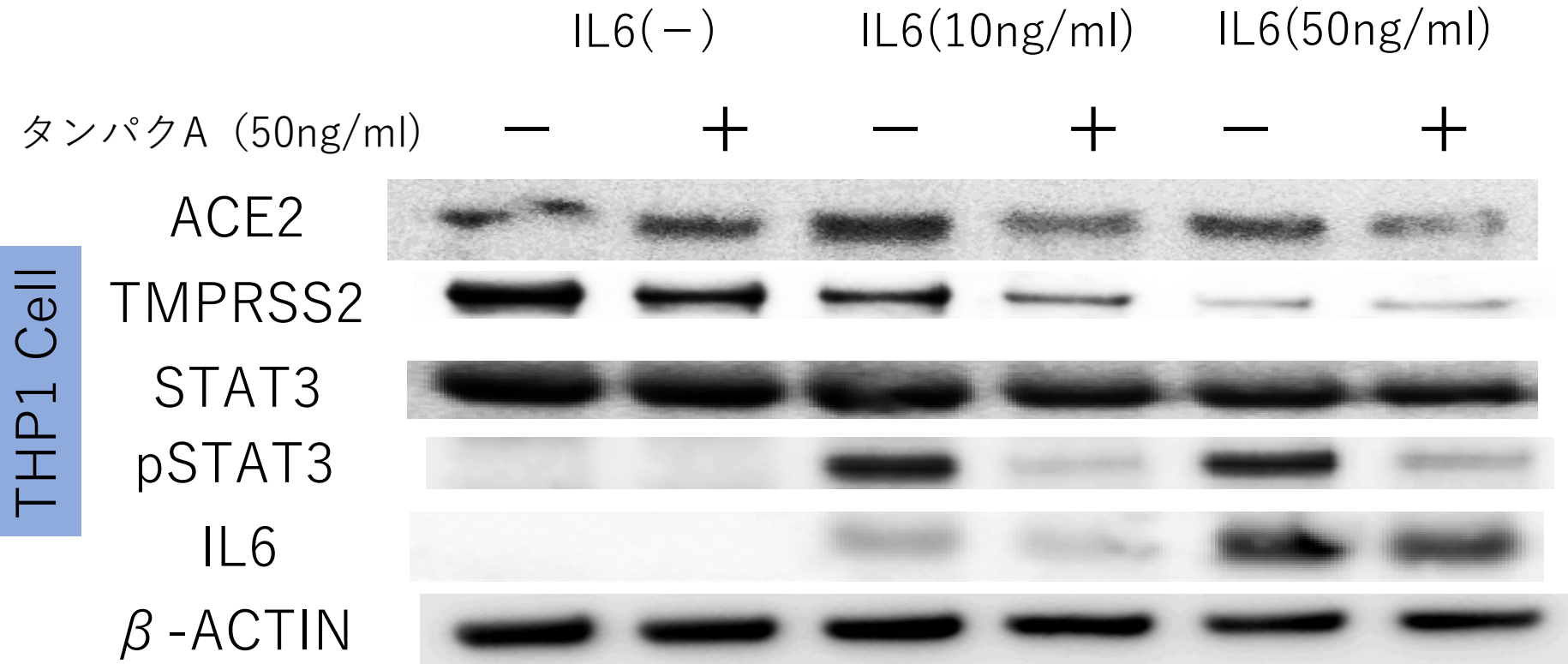
SOCS1はJAK1に直接結合してリン酸化を阻害し、JAK1ユビキチン化・分解を誘導する

Nat Communications 2018 1558

SOCS1によるJAK1/STAT3抑制がCRS抑制の鍵!

IL6自身がJAK/STATを介してIL6産生を増幅することをIL6AMPという。

タンパクAは、マクロファージのACE2・TMPRSS2発現・STAT3リン酸化・IL6発現を抑制する



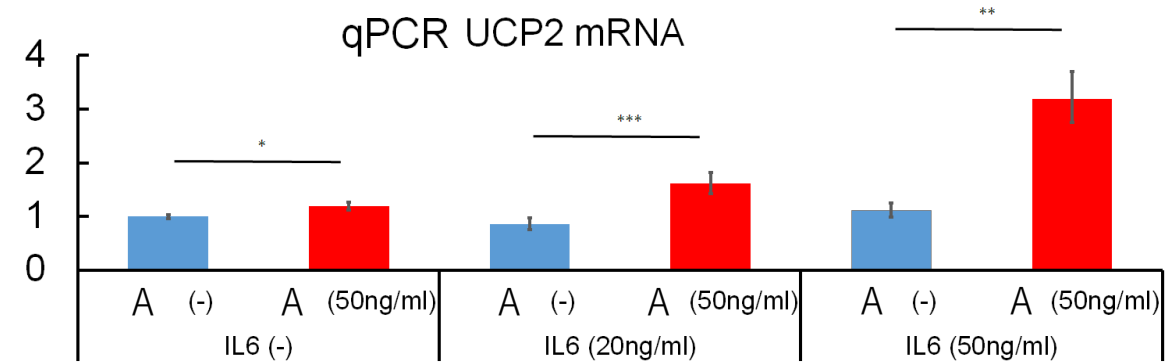
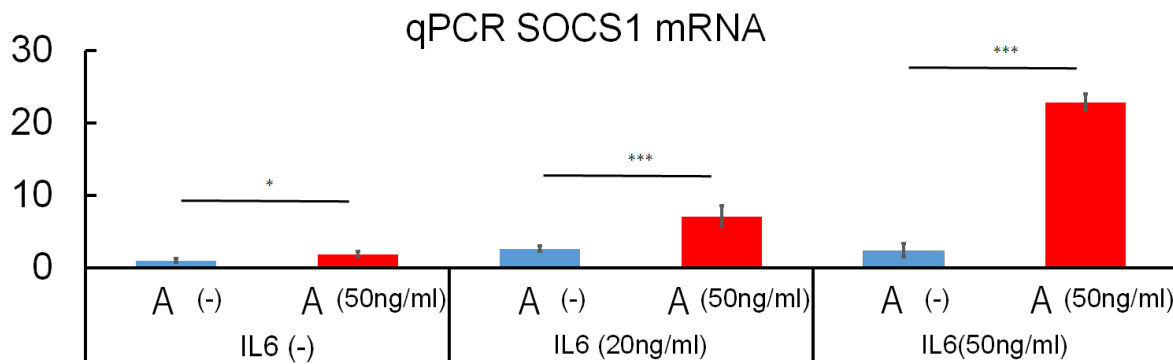
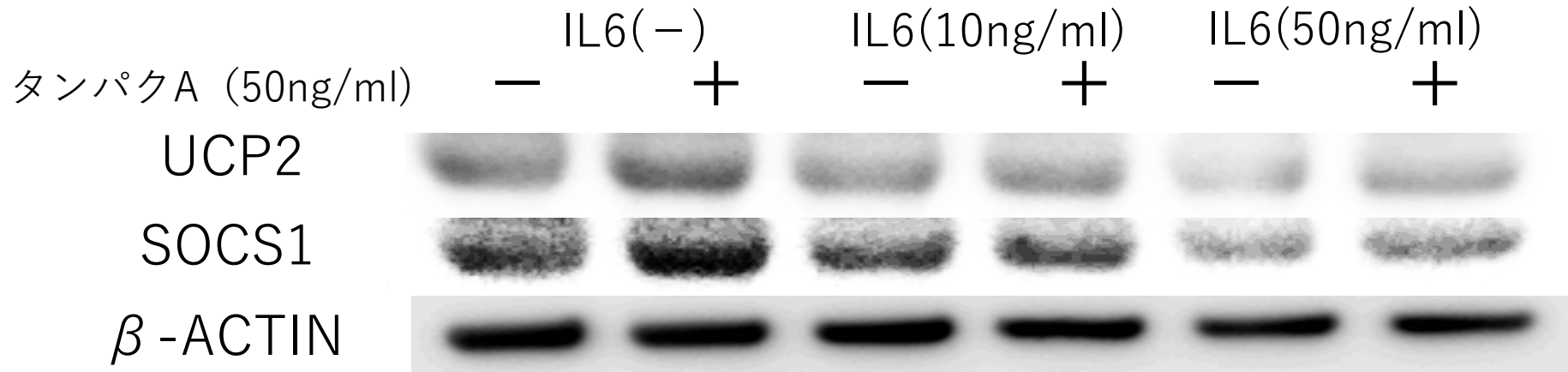
PMAでマクロファージに分化させたTHP1細胞に上記物質を添加し24時間後にウエスタンブロットを行った。AはACE2, TMPRSS2の発現、STAT3リン酸化、STAT3リン酸化やIL6自己誘導 (IL6 AMP)を抑制した。(IL6: インターロイキン6)

AのSTAT3リン酸化抑制能は非常に強力である

発表者データ (未発表)

タンパクAはマクロファージのUCP2,SOCS1発現を誘導する

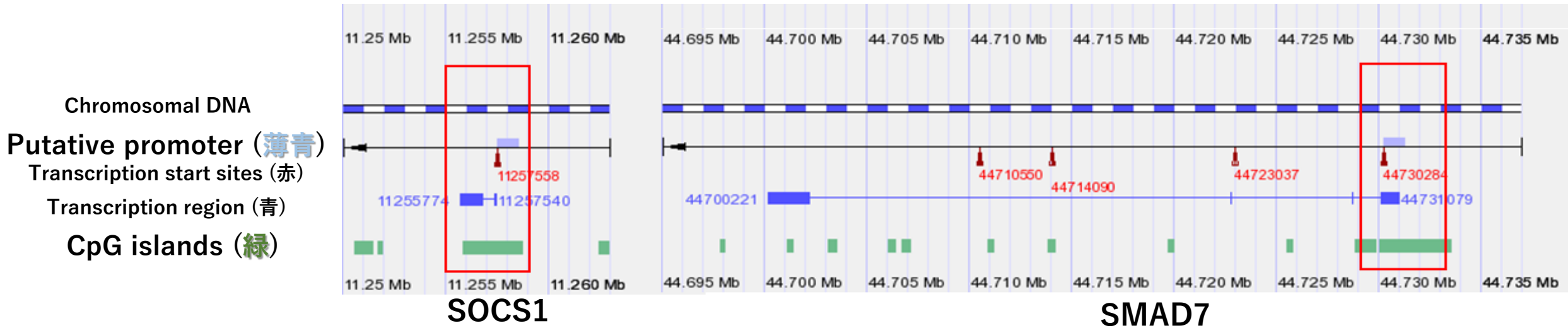
THP1 Cell



前スライドと同じ条件を用いてウエスタンブロットとqPCRを行った。
AはUCP2, SOCS1の発現を誘導した。

抗炎症因子SOCS1・抗線維化因子SMAD7はエピジェネティクス（メチル化）の影響を受けやすい

- プロモーター領域にCpGアイランドが豊富な遺伝子は、メチル化・脱メチル化の影響を受けやすい。
- プロモーター領域にCpG islandが豊富な抗炎症因子SOCS1,抗線維化作用SMAD7は、CpG islandが豊富である。



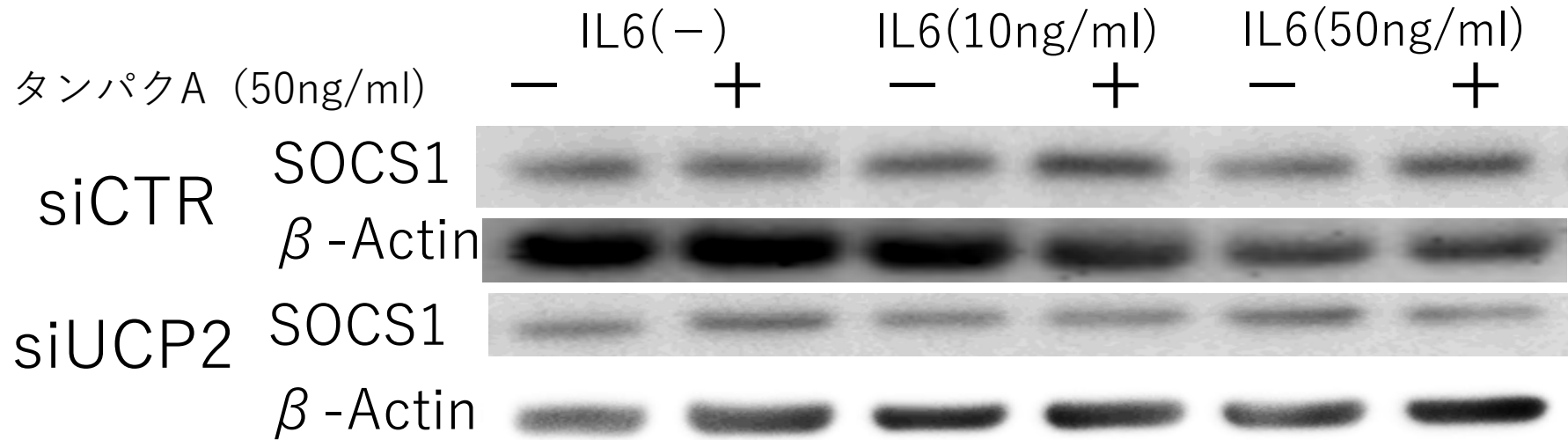
台湾大学 CpG islands finder

AはDNAメチル化酵素（DNMTs）抑制を介して、これらの因子の発現に影響？

新技術 (3)

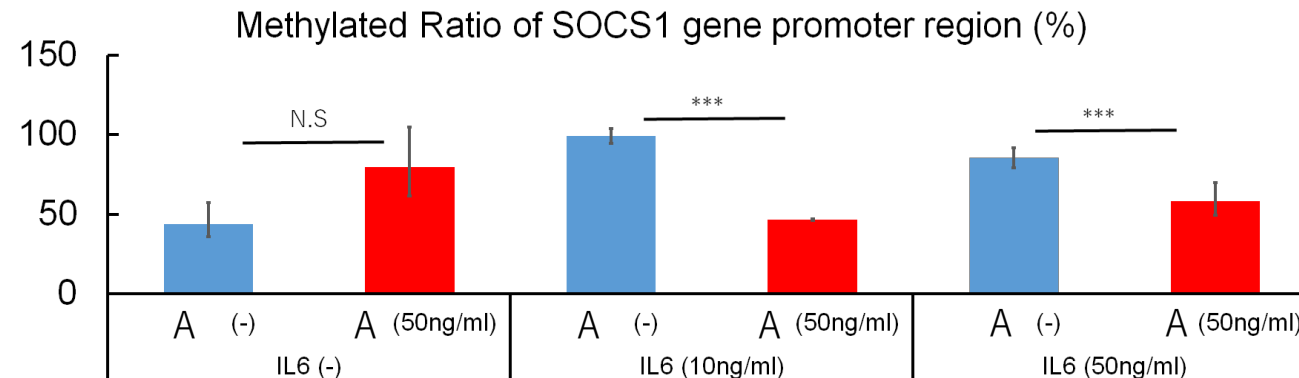
AはUCP2依存性にSOCS1の発現を誘導する

THP1 Cell



PMAでマクロファージに分化させたTHP1細胞にsiRNAをトランスフェクションした後に、上記物質を添加しウエスタンブロットを行った。AによるSOCS1発現はUCP2依存性であった。

AはSOCS1遺伝子プロモーター領域のメチル化を抑制する



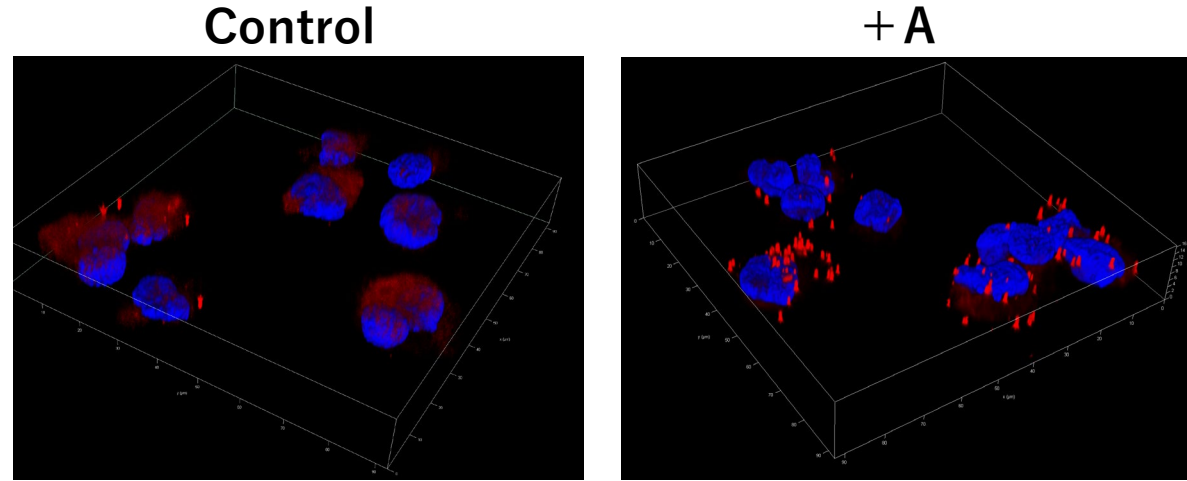
発表者データ (未発表)

細胞由来genomicDNAを、バイサルファイト処理 (WAKO291-78501)した。Methyl Primer Expressソフトウェア (Applied Biosystem) にてメチル化、非メチル化特異的プライマーを設計後、定量的メチル化PCR用キット (Takara R100A)を用いてSOCS1遺伝子プロモーター領域のメチル化を測定した。

新技術 (4)

AはSOCS1とJAK1の結合と、JAK1ユビキチン化を促進する

THP1 Cell



THP1細胞
in situ proximity
ligation assay
(原理はSigma-Aldrich
のHPを参照のこと)

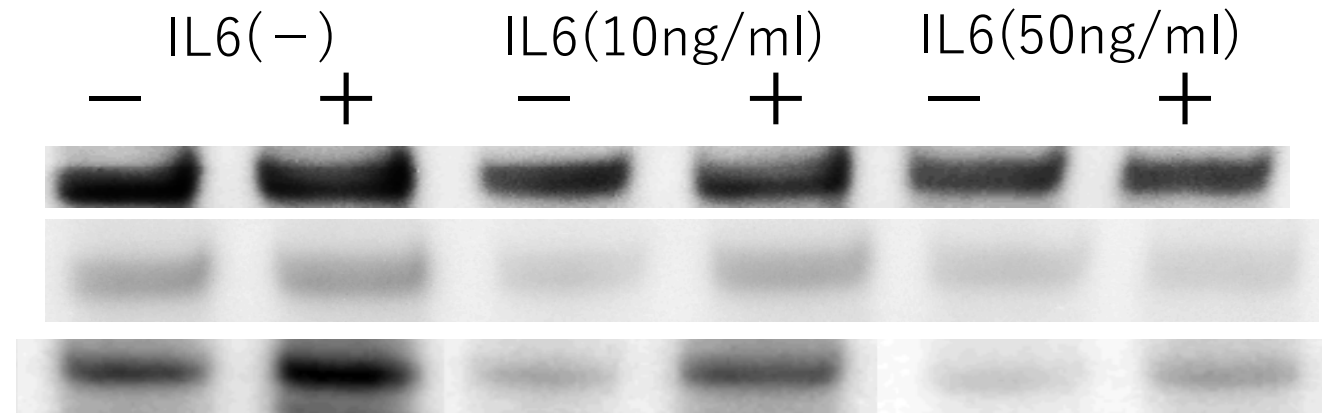
AはSOCS1/JAK1の結合 (写真の赤い点) を増加させる

AはSOCS1とJAK1の結合を促進する。

発表者データ (未発表)

THP1 Cell

タンパクA (50ng/ml)
IP JAK1 WB JAK1
IP JAK1 WB SOCS1
IP JAK1 WB Ubiquitin

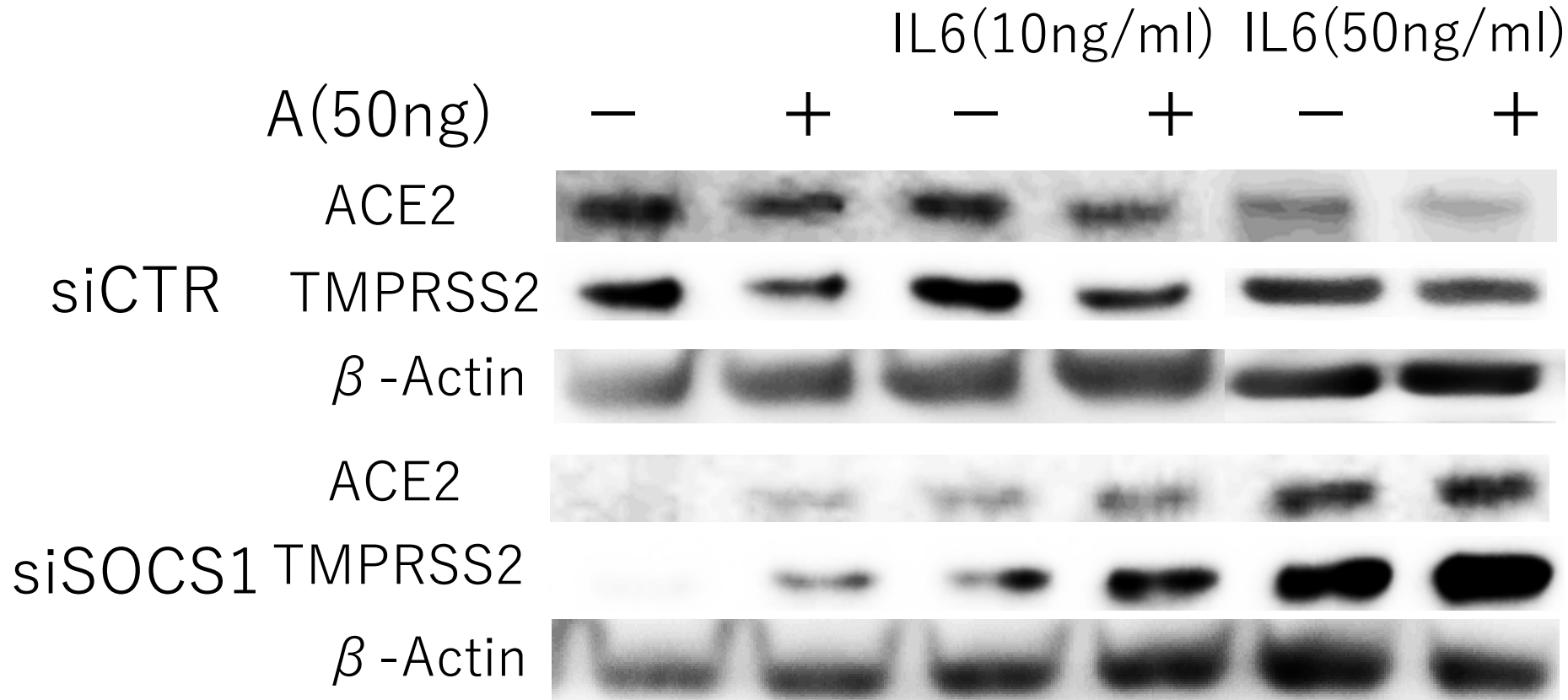


発表者データ (未発表)

AはJAK1のユビキチン化を促進することが明らかとなった。(IP免疫沈降、WBウエスタンブロット)

AのACE2, TMPRSS2発現抑制能はSOCS1依存性

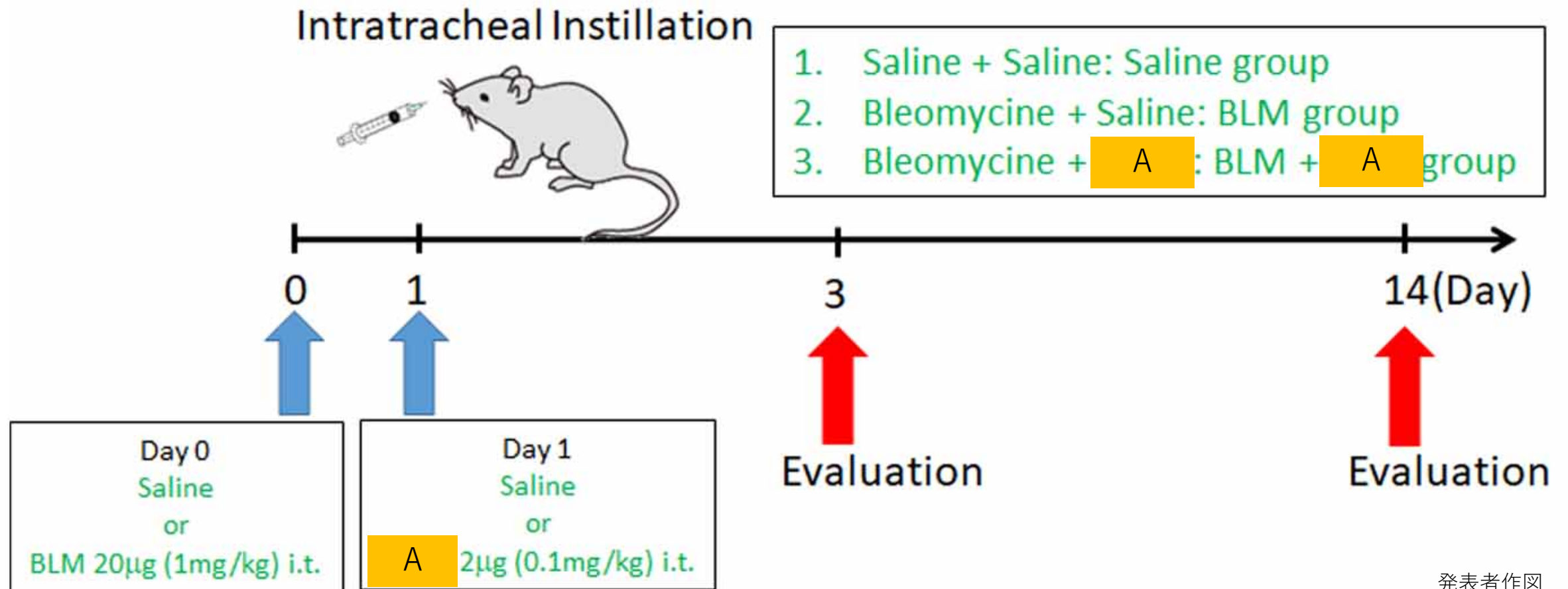
THP1 Cell



発表者データ (未発表)

AのACE2, TMPRSS2抑制能は、siRNAでSOCS1をノックダウンすると減弱した。SOCS1はJAK/STAT系に加えて、ACE2, TMPRSS2の制御も行っていることが示唆された。

参考 (ブレオマイシン動物モデル)

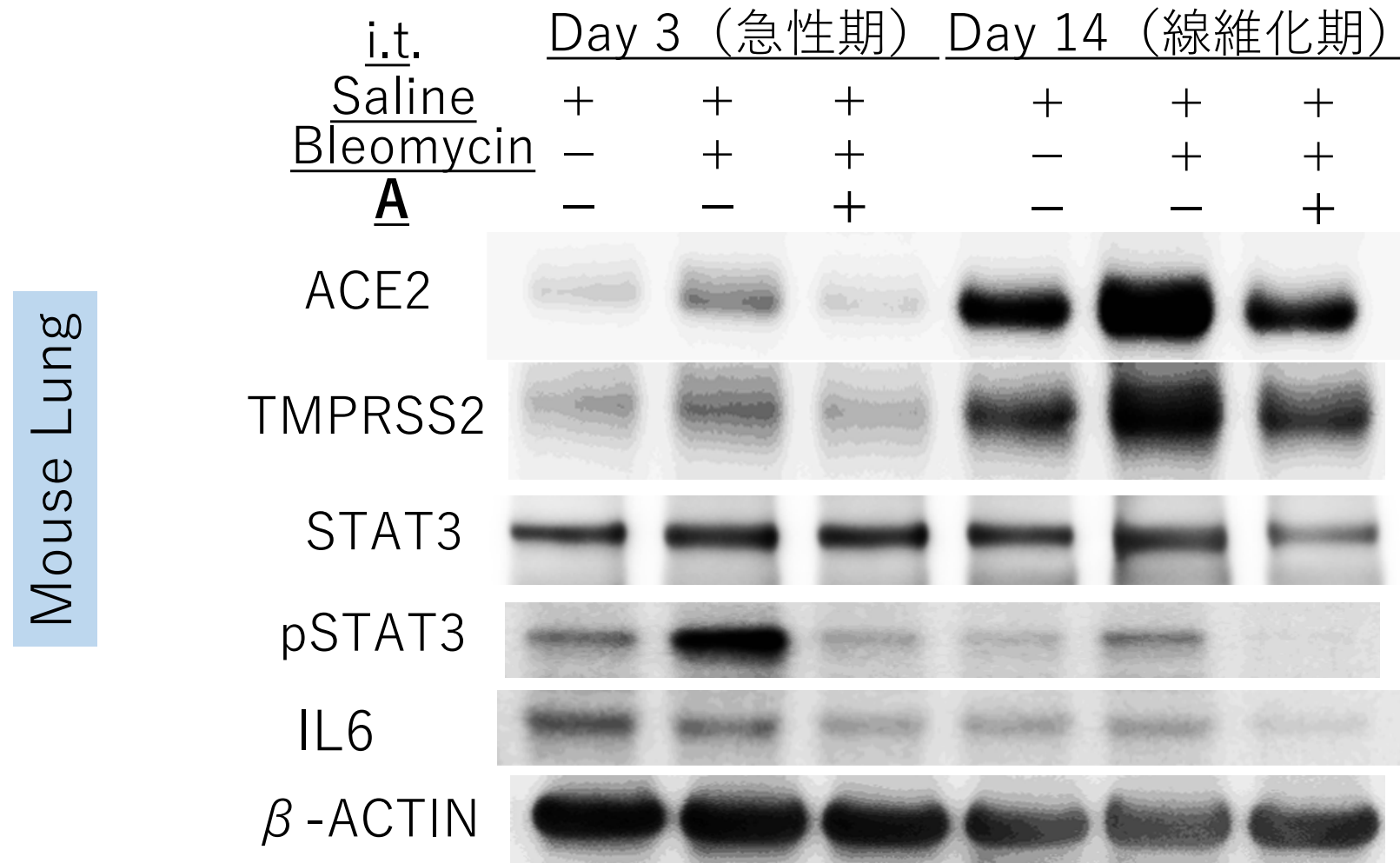


発表者作図

Aが細胞を用いた実験と同様の効果を動物モデルにおいて発揮するか検証した。C57BL6マウスの気管にブレオマイシンを投与した翌日に上記薬剤を経気管投与した。急性期の評価として3日目、慢性期の評価として14日目を選んだ。

新技術 (6) (動物モデル)

AはACE2・TMPRSS2発現、STAT3リン酸化、IL6産生を抑制する

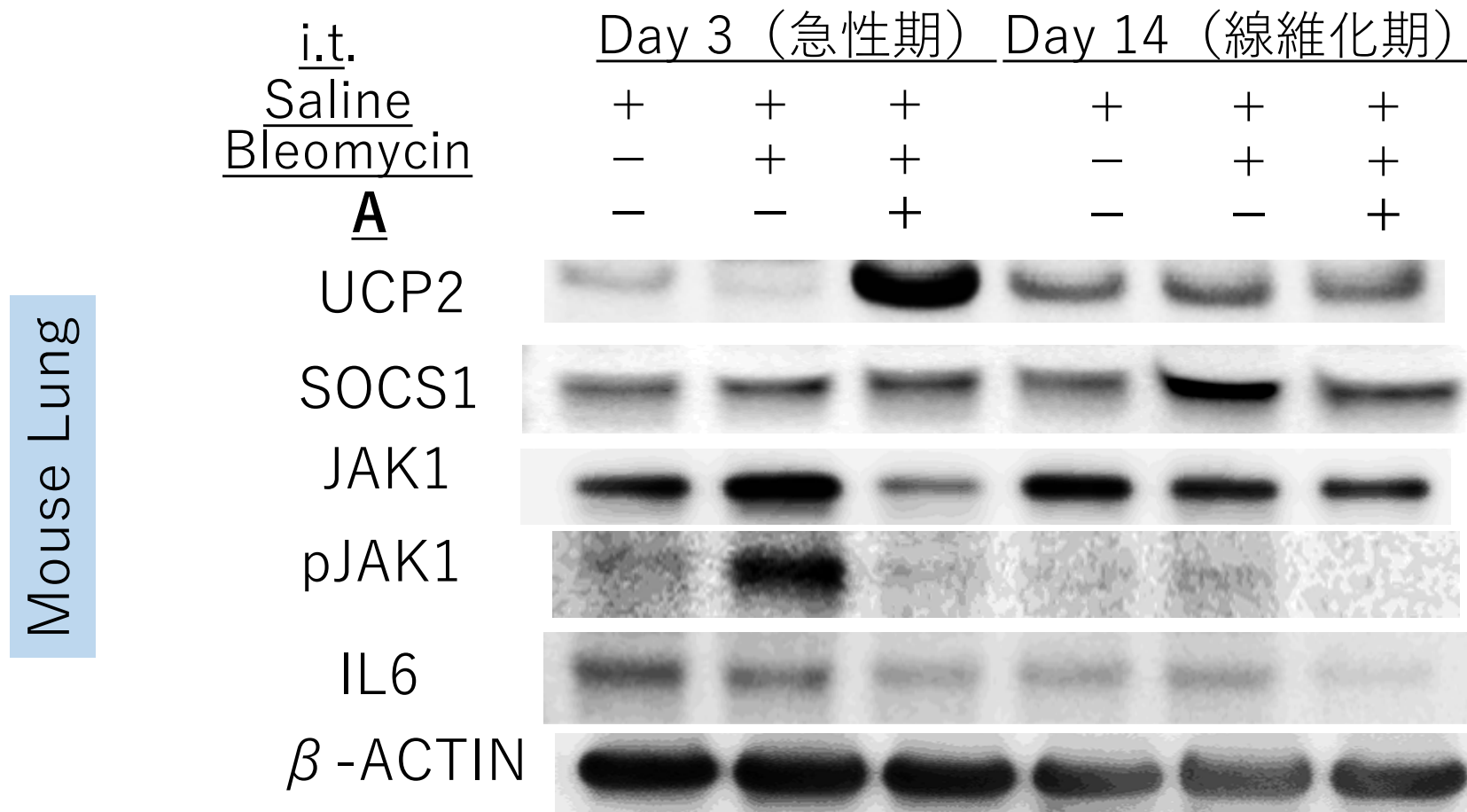


発表者データ (未発表)

3,14日目に犠死したマウス肺のウェスタンブロットの結果。ACE2,TMPRSS2発現低下、STAT3リン酸化,IL 6 の産生抑制を認める。AのACE2,TMPRSS2抑制効果は14日目により強く、AのSTAT3リン酸化,IL 6 産生抑制効果は3日目により強かった。

新技術 (7) (動物モデル)

Aは肺障害の急性期にUCP2・SOCS1を強く誘導し、JAK1リン酸化を強く抑制する



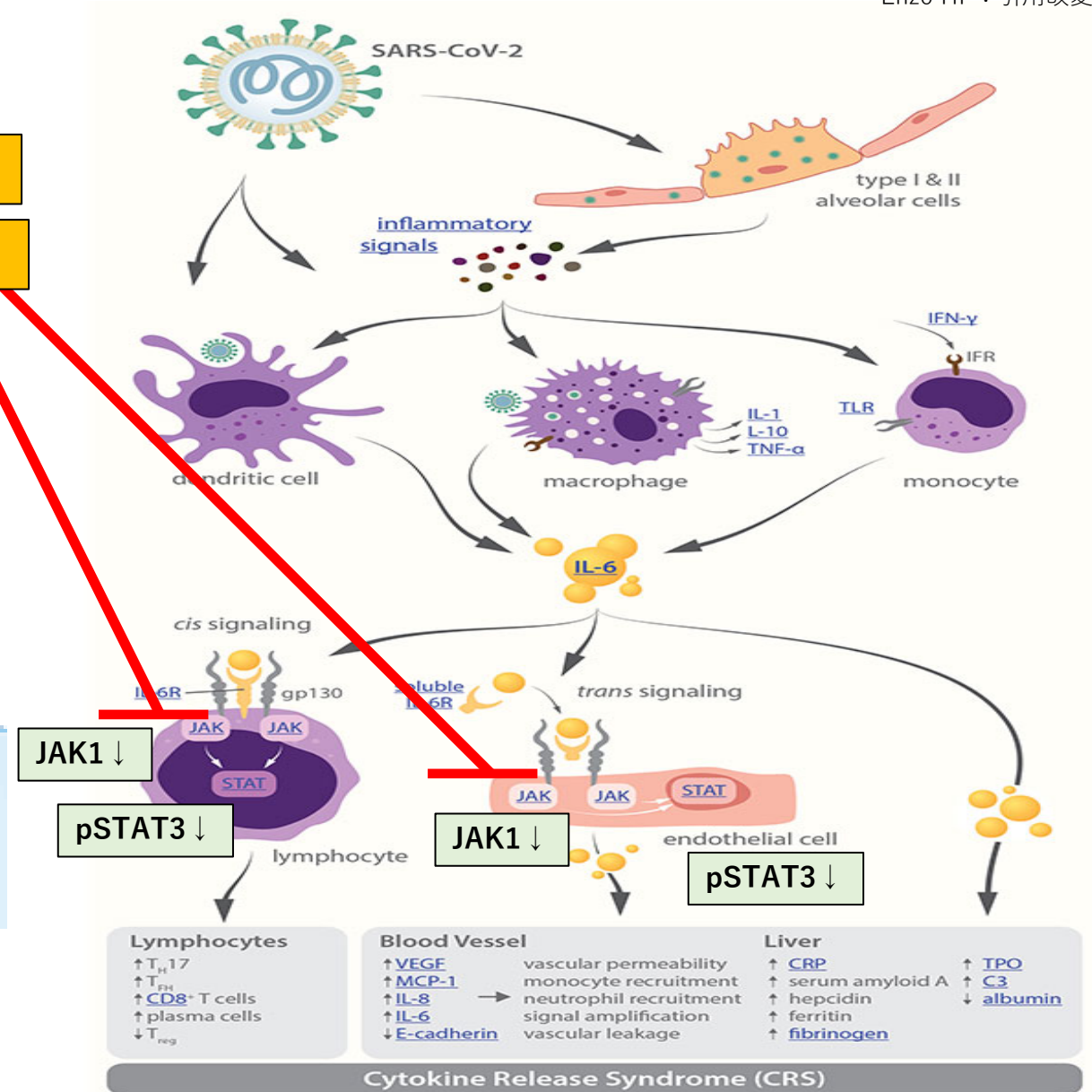
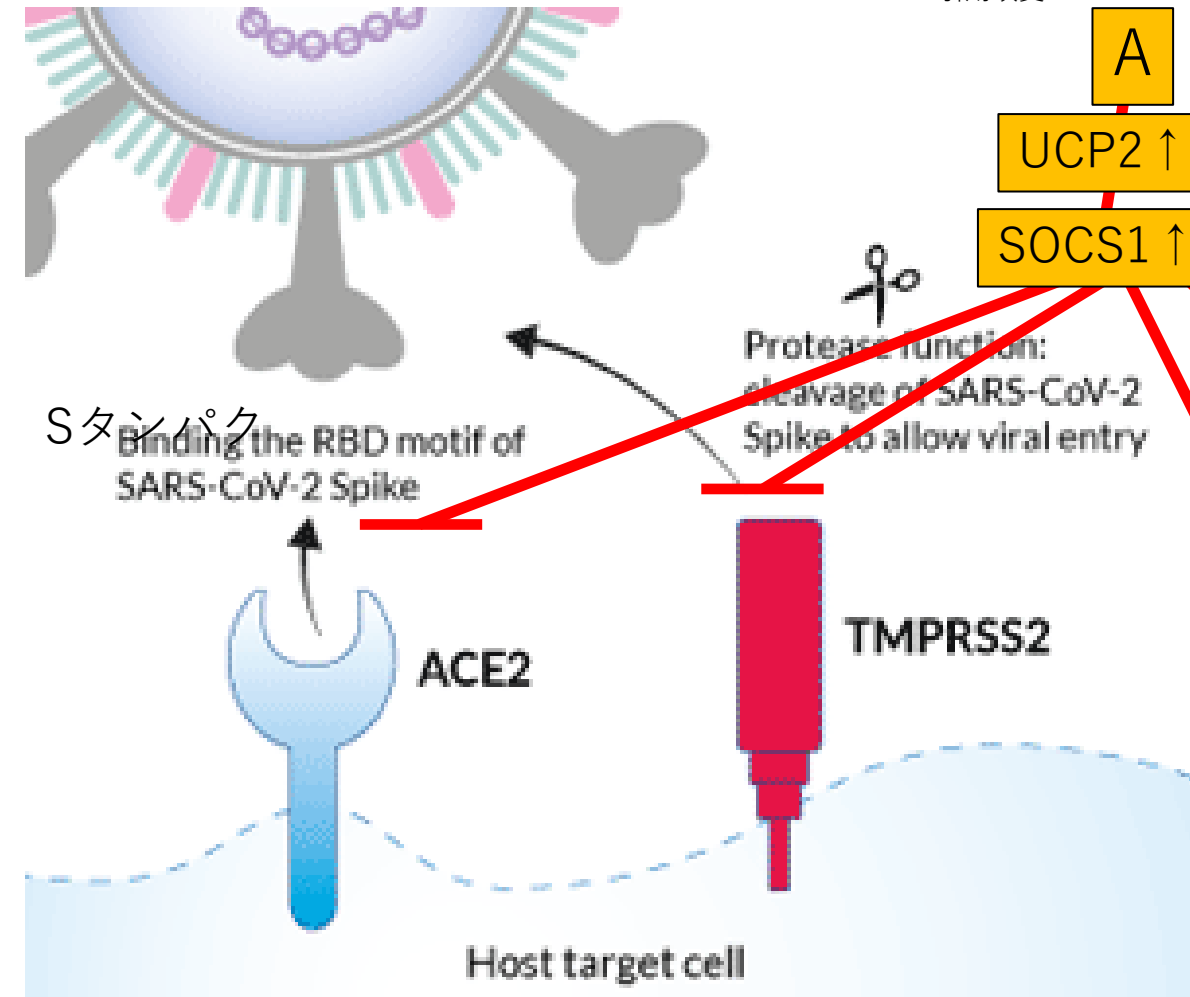
発表者データ (未発表)

3,14日目に犠死したマウス肺のウェスタンブロット。Aは3日目ではUCP2・SOCS1を強く誘導し、JAK1リン酸化を強く抑制する。14日目ではAのUCP2・SOCS1誘導効果は消失している。

今回の新技術のまとめ

Enzo HP : 引用改変

InvivoGen HP : 引用改変

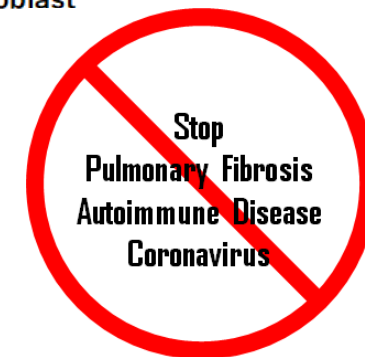
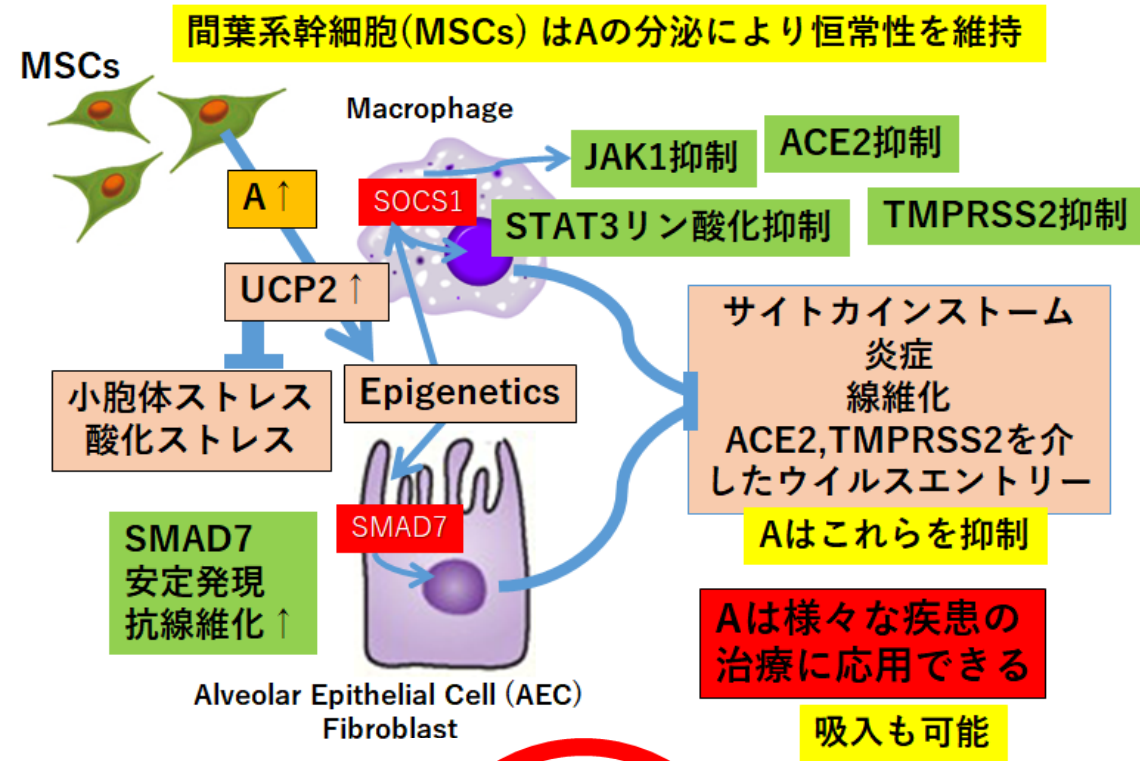


これらは新型コロナウイルス・インフルエンザ感染症の治療に加えて、関節リウマチ等の自己免疫疾患の治療にも有効と予想される！

Aの想定される用途

- 新型コロナウイルス、インフルエンザの感染・重症化予防薬、治療薬。
- JAK/STATが関連する関節リウマチ等の自己免疫疾患に対する治療薬。
- TGFβ / SMADが関連する特発性肺線維症等の線維性疾患に対する治療薬。
- 全身投与、吸入の双方が可能。

我々が考えている仮説



実用化に向けた課題

- GMPグレードのタンパクを大量に生成する必要がある。
- 霊長類を用いた非臨床試験を行う必要がある。
- 臨床試験の立案等の経験が乏しいこと。
- 規制当局との折衝経験がないこと。
- 専門的人材の不足、資金不足。
- 研究に専念できず、研究のスピードが遅いこと。

企業の皆様に期待すること

- 製薬に向けてのロードマップを共同して立案していただくこと。
- GMPグレードのタンパクを安定して大量に供給していただくこと。
- 非臨床試験、臨床試験、規制当局との折衝、追加の基礎実験等を共同して行っていただくこと。
- 新しい自己免疫疾患治療薬、COVID19治療薬、抗線維化薬の開発を考えている企業には、本技術の導入は有用と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : S T A T 3 のリン酸化抑制剤、自己免疫疾患及びコロナウイルス感染症の予防又は治療剤
- 出願番号 : 特願2020-112680
- 出願人 : 東北大学
- 発明者 : 大河内真也、兼平 雅彦、岡田 克典、黒澤 一

産学連携の経歴

- 2012年 JST A-STEP FS シーズ顕在化タイプに採択

お問い合わせ先

東北大学医学系研究科産業医学分野

大河内 真也（オオコウチ シンヤ）

TEL 022-717-7874

FAX 022-717-7883

E-mail shinya.ohkouchi.a8@tohoku.ac.jp

東北テクノアーチ

張 鈺爽（ジャン ユウシャン）

TEL 022-222-3049

FAX 022-222-3419

e-mail zhang@t-technoarch.co.jp

東北大学産学連携機構 総合連携推進部

Website

<https://www.rpip.tohoku.ac.jp/jp/>

TEL 022-795-5274

FAX 022-795-5286

E-mail souren@grp.tohoku.ac.jp