

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05364

研究課題名(和文) アフィニティ技術により同定した新規標的分子Rabを制御する抗アレルギー薬の創製

研究課題名(英文) Discovery of anti-allergic drugs regulating a novel target molecule, Rab, identified by affinity technology.

研究代表者

所 美雪(馬淵美雪)(TOKORO(MABUCHI), MIYUKI)

兵庫医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60714897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SH-2251はTh2細胞からのIL-5産生を強力に阻害し、*in vivo*でも有効な低分子化合物だが機序は不明だった。独自アフィニティ樹脂AquaFirmusを用い、特異的結合蛋白質Rab1A、1B、5C、8、11B、35、10、12を同定し、Western Blottingやピアコアにて特異性、親和性(0.28-1.3nM)を確認した。タンパクの強発現やノックダウン細胞におけるIL-5産生や化合物の影響への変化を確認したが、明確な結論付けが出来なかった。より強い化合物合成を進める中で、ターゲット探索等で用いたリンカー付加部分も重要であった可能性から、現在新たなターゲットを見いだしつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患しており、アレルギー性鼻炎、花粉症や気管支喘息の患者は多い。抗ヒスタミン剤、Th2細胞性炎症に対してはステロイドが主に用いられ、近年、重症患者にはヒト化モノクローナル抗体(ヌーカラ、ソレア、デュピクセント等)が続々と上市されているが、生物製剤のため、高価な注射剤であり、利用しづらい。この様にアレルギー疾患の根治に繋がる低分子化合物の開発研究は未だ立ち後れた状態にある中、SH2251はTh2細胞への分化を抑制してIL-5産生を抑制し、*in vivo*モデルにも有効性を示す、有望な低分子化合物で、メカニズム解明や化合物合成展開には意義がある。

研究成果の概要(英文)：SH-2251 is a small molecule compound that potently inhibits IL-5 production from Th2 cells and is effective *in vivo*, but the mechanism was unknown. Specific binding proteins Rab1A, 1B, 5C, 8, 11B, 35, 10 and 12 were identified using the proprietary affinity resin AquaFirmus, and specificity and affinity (0.28-1.3 nM) were confirmed by Western blotting or biacore. Using overexpressing or knockdown techniques of Rabs in cells, changes of IL-5 production and the effects of the compounds on IL-5 production were investigated, but no clear conclusions could be drawn. During synthetic development of more effective compounds, it is considered that the linker addition part used in the target search was also important, thus, a new target is currently being found.

研究分野：創薬科学

キーワード：アレルギー 低分子化合物 アフィニティ樹脂

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国の全人口の約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患に罹患しており、近年その数は急増し、中でもアレルギー性鼻炎、花粉症や気管支喘息の患者は著しく多い。アレルゲンの侵入は IgE 産生(I 型アレルギー)や Th2 細胞の誘導(Th2 細胞性炎症)を惹起し、相互に影響し合う。I 型アレルギーに対しては抗ヒスタミン剤が、Th2 細胞性炎症に対してはステロイドが主に用いられ、対症療法と合わせて一定レベルの制御は可能であるが、アレルギー疾患の根治に繋がる低分子化合物の開発研究は未だ立ち後れた状態にある。また近年、舌下免疫療法をはじめとした抗原特異的な減感作療法が開発され一定の治療効果をあげているが、複数抗原がアレルゲンの場合や、アレルゲン種の拡大等の問題が多く患者ニーズは十分満足されていない現況にある。この様な中、2015 年、好酸球機能を亢進する Th2 細胞サイトカインの一つ IL5 を標的としたヒト化モノクローナル抗体(ヌーカラ、GSK)が本邦において 12 歳以上の気管支喘息(既存治療によるコントロール不能な難治の喘息症状患者に限る)に対して認可された。しかしながら生物製剤のため高価であり、継続的な投与を前提とするため、社会保障費が膨らむ中、使用が制限される。

研究分担者の山下らは、低分子化合物 SH-2251 が IL-5 産生 Th2 細胞の分化を強力に抑制し、好酸球浸潤を減弱することで、マウス OVA 誘発アレルギー性気道炎症モデル、OVA 誘発アレルギー性鼻炎モデル(投稿準備中)の病態を著しく改善することを見出している。さらに SH-2251 は IL-5 産生 Th2 細胞分化や II 型自然リンパ球(ILC2)からの IL-5 産生に必要な転写調節因子 Gfi1 の発現を低下させることにより効果を発揮していることも明らかとした。この結果は、SH-2251 標的分子がアレルギー性気道炎症の病態形成に深く関与しており、それを標的とした化合物の開発が新規治療戦略の確立につながることを強く示唆しているだけでなく、既存薬と異なるメカニズムを有する画期的な抗アレルギー薬創製の可能性を期待させる。また Th2 細胞性炎症に有効な低分子化合物は存在しないため、既存薬抗 IL-5 抗体に置き換わる可能性もある。しかしながら、SH-2251 標的分子(結合分子)やメカニズムは不明であった。

そこで、研究代表者らは独自開発アフィニティ樹脂 AquaFirmus を用い、特異的結合蛋白質を同定し、Biacore を用いた相互作用解析等を行いつつあった。

2. 研究の目的

SH-2251 等をシードとした新規抗アレルギー薬の創出が第一の目的である。本研究では独自開発アフィニティ樹脂 AquaFirmus を用い、SH-2251 の特異的結合蛋白質を見出すと共に親和性の確認をし、当該化合物によるアレルギー性病態抑制機構を解明すると共に構造展開を進め、経口投与可能な新規抗アレルギー薬の創製を目指した。

3. 研究の方法

独自開発アフィニティ樹脂 AquaFirmus を用い、SH-2251 の特異的結合蛋白質を見出した。見出したタンパクは低分子量 G 蛋白質 Rab で、60 種以上ある Rab 蛋白質のうち、ヒットしたサブタイプについて、入手可能な抗体を用いてウエスタンブロッティングにて結合特異性を確認した。さらに、これらのタンパクについて、ターゲット探索の lysate に用いたマウスと臨床を反映したヒトの配列のタンパクをカイコにて発現させて取得し、ピアコアにて化合物をセンサーチップに固定化して相互作用を確認し、親和性の確認をした。さらに、メカニズム解明のため、標的タンパクとして同定された Rab1A、Rab1B、Rab5C、Rab8A、Rab10、Rab11B および Rab35 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入し、Th2 細胞分化における Rab ファミリー分子の役割を検討した。さらに、CRISPR-Cas9 で knockout も試み、化合物の効果への影響も検討した。メカニズム解明と並行して、化合物の合成展開も行った。in vitro での Th2 細胞からの IL5 産生阻害活性の検討に加え、製薬企業時代の経験を利用し、ラット経口吸収性や 2 週間の連投による体重、主要臓器重量及び血液パラメータ(GOP、GPT、BUN、creatinine 等)を測定して簡易的な毒性も観察した。また、in vivo アレルギーモデルにおける評価を行った。

4. 研究成果

SH-2251 のターゲットタンパク及びメカニズム解明の目的で、SH-2251 の類縁化合物からリンカー候補部位のニトロ基を変換した化合物 AT474 で Th2 細胞への分化抑制作用を確認したところ、SH-2251 が 100 nM で 77 %の阻害、AT474 が 1000 nM で 49 %の阻害活性を保っていたことから、リンカーを付加した化合物 AT477 をデザインした(図 1)。AT477 のカルボキシル基を用いてアフィニティ樹脂 AquaFirmus および AquaFirmus2000 のアミノ基に脱水縮合反応により固定した。脾臓から分離したナイーブ CD4 T 細胞を、Th2 細胞分化条件下(抗 TCR 抗体、抗 CD28 抗体、IL-2、IL-4 刺激、抗 IFN- γ 中和抗体)で 48 時間活性化した後、Th2 細胞の lysate を用いてターゲット探索を行ったところ、SH-2251 による拮抗のかかったふたつのバンドを見出した

(図2) これらのバンドを解析すると、ひとつはアルブミンでもう一つには Rab のタンパクが見いだされた。この実験を2回繰り返したところ、1回目には Rab1B、1A、8A、5C、11B がヒットし、それぞれペプチド cover 率は 50、55、28、44、26 %、2 回目には Rab1B、1A、35、5C、10 がヒットし、cover 率は 28、17、10、17、11%であった (data not shown)。これらの lysate について、入手可能な抗体を用いて Western Blotting による確認を行ったところ、少なくとも Rab1A、1B、5C では拮抗のあるバンドの濃度が認められた。Rab8 については拮抗がない方がむしろバンドが濃かった。これは拮抗がある条件では、lysate 中の遊離リガンドに、より結合の強いサブタイプがまず結合し、結合の弱いサブタイプが緩やかに樹脂上のリガンドに結合したために起こった現象ではないかと考えた。

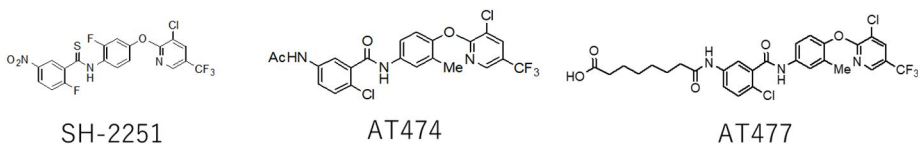


図1 ターゲット探索用化合物デザイン

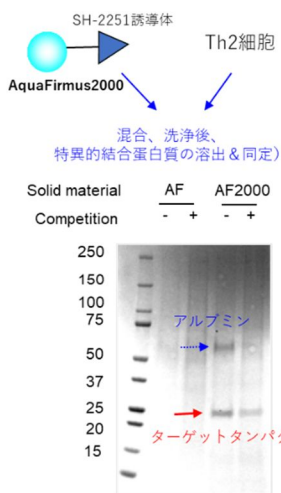


図2 ターゲットタンパクの同定

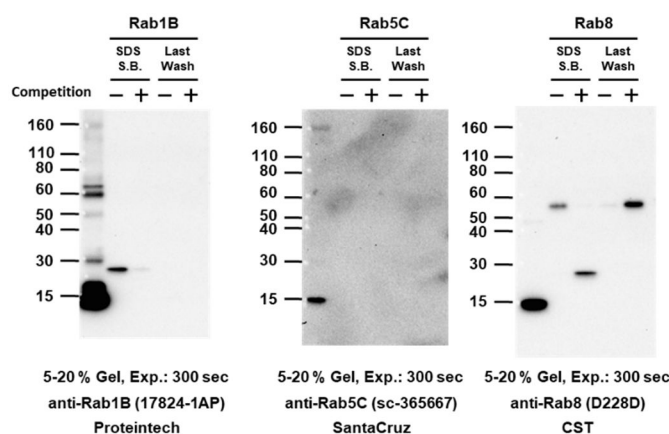


図3 抗Rab抗体を用いたウエスタンブロッティング

次に、同定したタンパクと化合物との結合親和性を確認する目的で、ピアコアを用いた検討を行った。タンパクはカイコで発現させたマウスおよびヒト Rab1A、1B、5C、8A を取得し、透析後、タンパク定量して純度を元に濃度を算出した。化合物は AT477 を用いてセンサーチップに固定し、タンパクを流すことによって、ピアコア 3000 にて親和性を測定した (表1)。Mouse Rab 1B の例を図4に示すが、saturation もみられ、特異的に相互作用していると考えられた。表1に示すように、0.1-10 nM の高い親和性が認められ、確かに SH-2251 と Rab とは相互作用するものと考えられた。

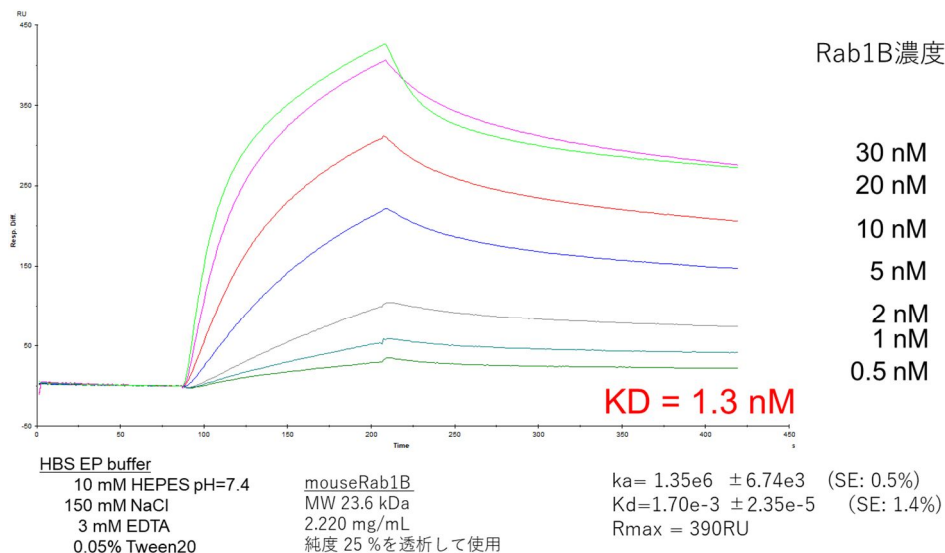


図4 mouseRab 1B (カイコ発現蛋白質) を用いたピアコア相互作用測定

表1 Rab 5C, 8A, 1B, 1Aのピアコア相互作用測定結果

	KD (nM)	Ka	Kd	Rmax
Rab5C	7.7	2.41e5 ± 1.33e3	1.86e-3 ± 2.62e-5	587RU
Rab8A	0.28	4.12e6 ± 4.19e4	1.13e-3 ± 5.03e-5	525RU
Rab1B	1.3	1.35e6 ± 6.74e3	1.70e-3 ± 2.35e-5	390RU
Rab1A	0.42	5.27e6 ± 1.66e5	2.20e-3 ± 8.03e-5	166RU

次に、メカニズム解明のため、Rab1A、Rab1B、Rab5C、Rab8A、Rab10、Rab11B および Rab35 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入した。遺伝子導入 3 日後に、細胞を再刺激し、IL-4、IL-5、IL-13 の細胞内サイトカイン染色を行い、Th2 細胞分化における Rab ファミリー分子の役割を検討した。その結果、コントロール (Mock) に比べ、Rab8A および Rab35 遺伝子の導

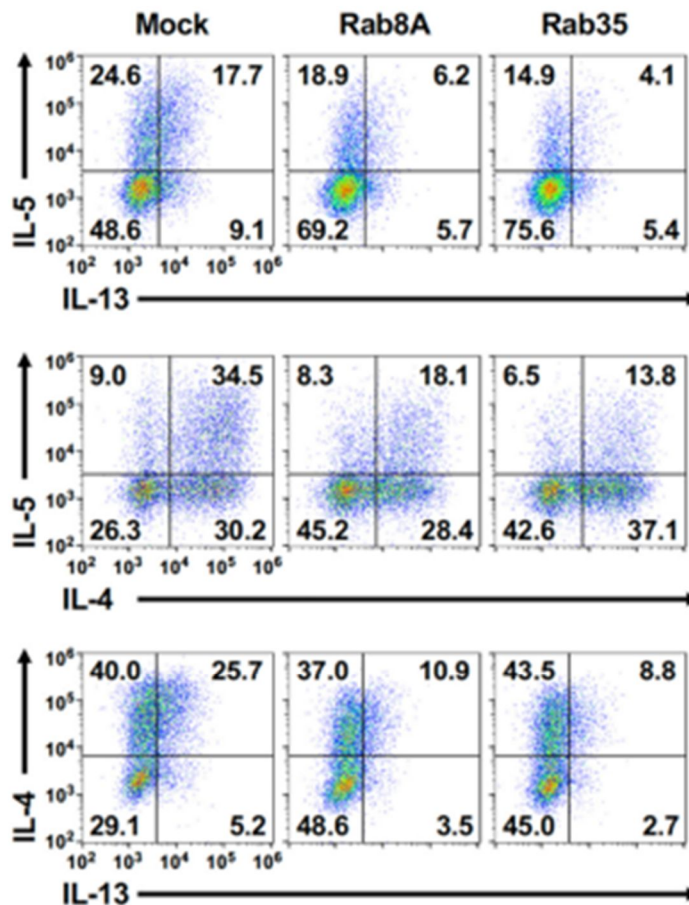


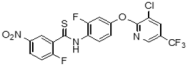
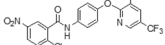
図5 Rab8A、Rab35 発現によるIL-5/IL-13 産生Th2 細胞分化抑制

入群では、IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞分化の低下が認められた (図 5)。一方、IL-4 産生 Th2 細胞への分化は、Rab8A および Rab35 の導入では影響を受けなかった。この結果から、SH-2251/AT-523 結合 Rab 分子の中で、Rab8A および Rab35 は、IL-5/IL-13 を産生する 2 型慢性炎症を誘導する Th2 細胞の分化に対して抑制的に働くことが示された。しかしながら、化合物による作用の影響はいずれも認められなかった (data not shown)。また、CRISPR-Cas9 で knockout も試みたが、明らかな変化は認められなかった (data not shown)。

抗アレルギー薬として経口剤を目指すことから、SH-2251 の 10 mg/kg 経口投与後のラットに

おける血漿中濃度を測定したところ、Cmax は 1.5 μM であり、IL-5 産生阻害濃度が 100 nM で約 80 % であることから、in vivo で薬効を発揮するに十分な血中濃度であることがわかった(表2)。しかし、SH-2251 はチオアミド構造を有し、毒性の懸念があることから、アミド構造に変えて in vitro における活性を保持した AT523 の血中濃度を測定したところ、Cmax は 64.5 nM と低かった。経口吸収性の高い化合物を目指して展開を進めたが、SH-2251 を上回る化合物は見いだせなかった。

表2 経口投与後の血漿中濃度測定 (ラット)

	構造式	血漿中濃度(nM)			IL-5産生阻害(%) @ 100nM
		30 min	1 hr	6 hr	
SH2251		1517	1231	1502	81%
AT523		61	64.5	ND	83%

SH-2251 の安全性を確認する目的で、ラットに 32 mg/kg にて 1 日 1 回 2 週間反復経口投与し、簡易毒性試験を行った (n=5)。最終投与の翌日に全採血を行った後、臓器を摘出し、重量を測定したところ、若干の体重減少が認められたものの、肝機能、腎機能等への明らかな毒性は観測できなかった(図6)。

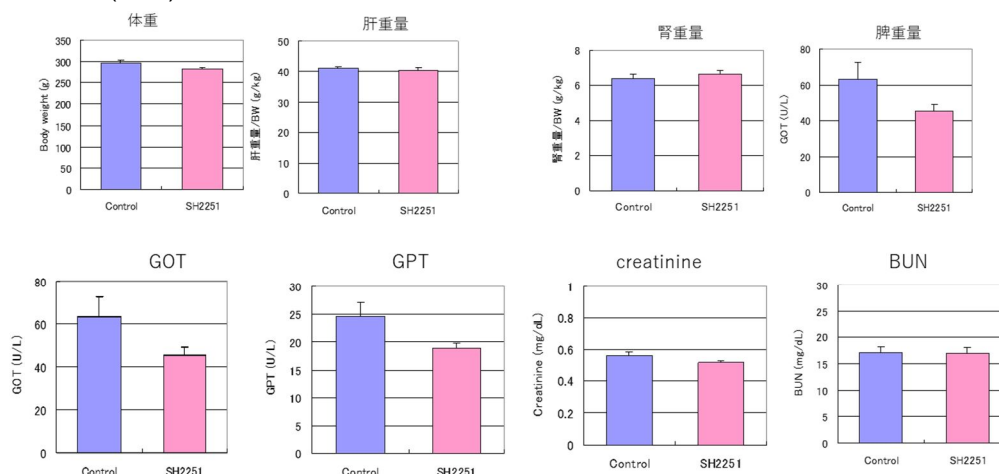


図6 SH-2251 32 mg/kg投与後の体重、組織重量および血漿中パラメーター

山下らは SH-2251 をツール化合物として検討を進め、病原性 Th2 細胞の IL-33 受容体の発現を低下させ、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎などの幅広いアレルギー疾患モデルマウスにおいて症状を改善させることを明らかとした (未公開データ)。

より強力な Th2 分化抑制作用を有する化合物取得を目指して、SH-2251 を元に化合物合成展開を進め、AT523 をはじめとした化合物が見いだされたが、検討を進めるうちに、下記のように、SH-2251 の A パートがより活性に重要である仮説が考えられてきた (図7)。ターゲット探索に用いた AT477 は A パートからリンカーを伸ばしており、活性に重要な部分に結合するタンパクを見いだせてきていない可能性が考えられた。そこで現在 C パートからリンカーを伸ばした化合物を用いて、A パートに結合するタンパクを見出しつつある。BC パートは輸送タンパクである Rab と、A パートは別のタンパクと相互作用して薬効を発揮している可能性を考えている。

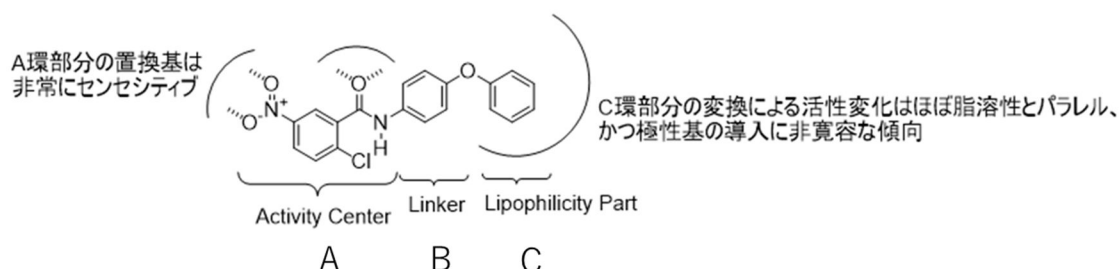


図7 SH-2251 誘導体の構造活性相関からの仮説

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 政克 (Yamashita Masakatsu) (00311605)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	
研究分担者	田中 明人 (Akito Tanaka) (30454789)	兵庫医科大学・薬学部・教授 (34533)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関