

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06895

研究課題名(和文) 独自化合物ライブラリーを用いた自己免疫疾患に対する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Identification of novel compounds from original chemical libraries affecting autoimmune diseases.

研究代表者

米沢 朋 (Yonezawa, Tomo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：60515964

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)： エピソーマル型ベクターおよびヒト胎盤由来分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を用いて、IRFまたはNFkB応答配列の下流にSEAPを恒常的に発現させ、安定的な炎症リポーターを樹立した。また、IL-18シグナルもNFkBを介するので、NFkB-SEAP導入細胞へ、同様にエピソーマル型ベクターを用いて、IL-18受容体を恒常的に発現させ、IL-18特異的NFkB活性化を測定できる細胞も樹立した。最終的に、薬効植物、真菌および海洋微生物等から抽出した天然物抽出ライブラリーや、合成化学者が調整した化合物ライブラリーを用いて、ハイスループットスクリーニングを行い、薬効成分を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養細胞へエピソーマル型ベクターを用いて、恒常的に、NFkBまたはIRF制御下でSEAPを発現および分泌するリポーターを導入し、新規リポーター細胞を樹立し、ドラッグスクリーニングが可能な高感度および確度を持つ測定系を実現した。さらに、樹立したNFkB-SEAPリポーター細胞へ、IL-18受容体遺伝子を同様に導入し、IL-18特異的なNFkBを検出できるリポーター細胞およびアッセイ系も樹立した。最終的に、樹立したリポーター細胞を用いたドラッグスクリーニングにより、独自ライブラリーから薬効を保持する抽出物および化合物を同定した。抗がん剤および自己免疫疾患の治療薬創出に繋がる有意義な結果である。

研究成果の概要(英文)： We recently have established the cells stably expressing IRF- or NFkB-driven human secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) by episomal vector, which can maintain constructs synchronized to host cell replication. We also introduced another construct stably expressing two IL-18 receptor sub units and then, can monitor IL-18 specifically activated NFkB. Then, we demonstrated high-throughput screening by the novel reporter cells from natural extracts, which are derived from Chinese herb medicine plants, fungi or marine bacteria, or synthetic compounds, which are gifted from Japanese organic synthetic chemists. Finally, we identified several extracts and compounds affecting IRF- or NFkB-activation.

研究分野：分子生物学

キーワード：自己免疫疾患 NFkB IRF SEAP HTS IL-18

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患である多発性硬化症は、現在承認されている有効な治療薬が、I型インターフェロン製剤および冬虫夏草の成分であり生理活性脂質であるS1PのインバースアゴニストFTY720とその類縁体のみであり、社会的充足率も十分ではない。薬効の高い新規化合物の作出が望まれる。そこで長崎大学独自の海洋微生物ライブラリーを始めとする化合物ライブラリーにより多発性硬化症に薬効を持つ化合物の単離を目指す。また、京都大学から分譲していただいた1万化合物も利用し、新規骨格を保持し薬効を示す化合物の単離を目指す。新規骨格を保持する化合物を取得できたら、合成最適化を用いて、薬効、細胞へのデリバリーまたは毒性などを変化させ、さらなる有用な治療薬候補の取得を目指す。最終的には、多発性硬化症のマウス病態モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて、個体レベルでの概念検証(Proof of Concept)の取得を試みる。

2. 研究の目的

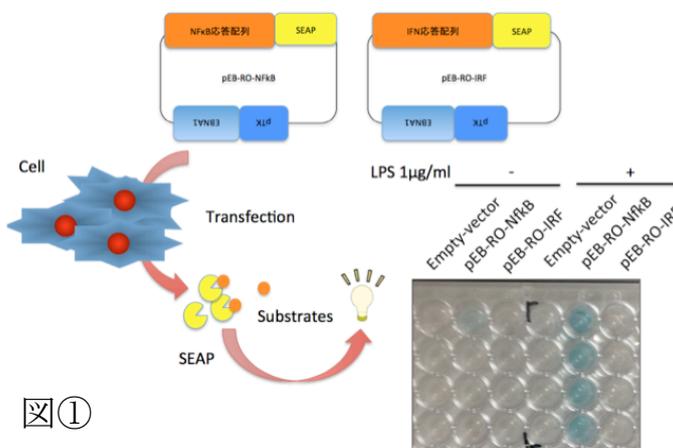
自己免疫疾患である多発性硬化症は、中枢性脱髄疾患の一つであり、脳、脊椎、視神経などに病変が起こり、多様な神経症状が再発と寛解を繰り返す疾患であり、特定疾患に認定されている難病である。我が国でも1万3千人の患者がおり、中枢性脱髄疾患では最も患者が多い。我が国では、2000年にインターフェロン(IFN)β1b製剤が自己皮下注射投与で承認されたものの全身性の強い効果により鬱の悪化、肝障害や長期投与による中和抗体出現などの問題が生じている。続いて、自己筋注射投与IFNβ1a製剤であるアボネックスは薬効がやや弱いものの副作用と中和抗体の出現が弱く奏功している。2011年には、冬虫夏草の成分でありS1P受容体のインバースアゴニストFTY720が経口投与薬として承認された。2014年には、α4インテグリン抗体であるタイサブリンも点滴薬として承認されたものの、重篤な副作用として進行性多巣性白質脳症があり使用には留意する必要がある。現在承認されている有効な治療薬が、I型インターフェロン製剤およびFTY720とその類縁体のみであり、根治薬はもちろんのこと、再発率軽減などの対処療法としても社会的充足率も十分ではない。そこで、本研究では、I型IFNの転写活性を指標に、化合物スクリーニングを実施するにあたり、ハイスループットスクリーニング(HTS)可能な確度のアッセイ系を樹立し、新規骨格を有する化合物の取得を目指す。また、その薬効、毒性や標的組織へのデリバリーについても考慮し、合成最適化を行い、官能基などを変えた新規化合物を取得し、薬効や毒性などを評価する。最終的には、多発性硬化症のマウス病態モデル実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を行い同定した化合物の治療効果を検証する。その際に、I型IFN様の応答を惹起する薬効概念を検証することを目指す。

3. 研究の方法

分泌型アルカリフォスファターゼを用いたHTSの至適化および実施

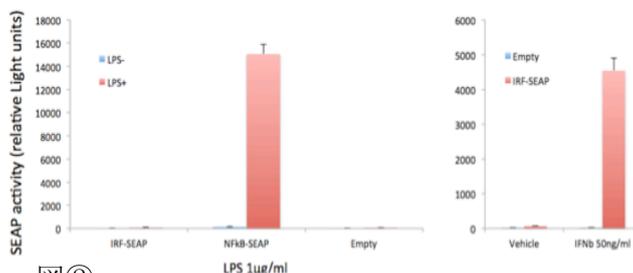
多発性硬化症の治療には、I型IFN経路の活性化が重要であり、実際に、IFNβ製剤であるアボネックスが既に認可されている。炎症応答を制御する重要なシグナル経路として、炎症性サイトカインにより作動するNFκBとIFNにより作動するIRF経路が存在する。特に後者は、定常時は作動しないように厳密に制御されている。我々は、ヒトを含む哺乳類細胞において、長期維持できるエピソーム型ベクターを用いて、NFκBおよびIRF応答配列下流にヒト胎盤由来分泌型アルカリ

分泌型アルカリフォスファターゼを用いたNFκBおよびIRFリポーター恒常発現株の樹立



図①

分泌型アルカリフォスファターゼを用いた高感度NFκBおよびIRFリポーターアッセイ系の樹立



図②

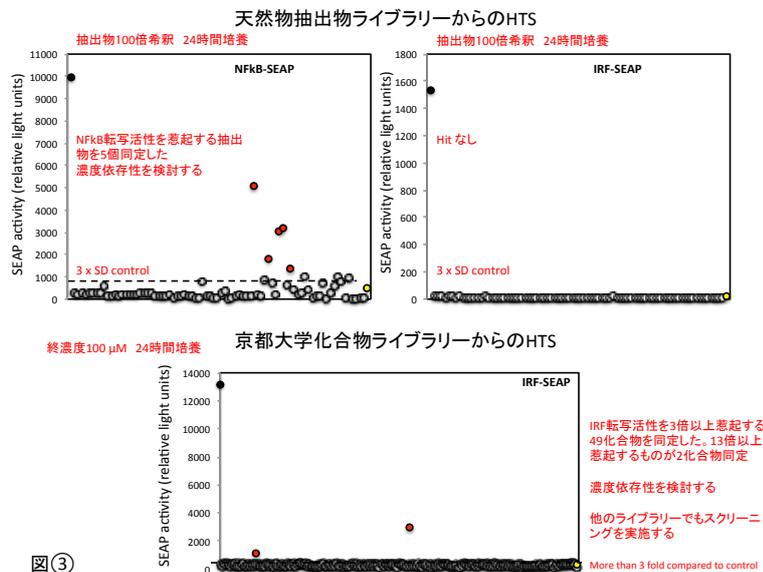
フォスファターゼ(SEAP)を組み込んだ新規リポーターベクターを新たに開発した(図①上)。このベクターをヒト培養細胞へ導入し新規リポーター細胞を樹立した。菌体成分LPSにより特異的

に NFκB 経路の活性化に応じて、培養上清に SEAP が分泌され、基質と反応し、青色の呈色が確認できた (図①下)。吸光度を利用して定量ができるが、化合物スクリーニングに適した高感度アッセイを実現するために、化学発光を用いてアッセイ系を検討した。LPS および INFβ 特異的に SEAP を誘導し、検出範囲が優れた化学発光の測定系を樹立することができた (図②)。初年度は、長崎大学独自の海洋微生物ライブラリーを始めとする低分子ライブラリーより多発性硬化症に薬効を持つ化合物の単離を目指す。化合物ライブラリーは数千から数万に及ぶので、効率よく安定的なハイスクリーン系の樹立が不可欠である。既に樹立済みの新規リポーター細胞を用いて、アッセイ間の精度 Z' 値および検出感度を示す S/B 値を実際のアッセイに合わせて 96 または 384 プレートを用いて指摘化を行う。Z' ≥ 0.5 および S/B ≥ 2.0 を満たす条件を決定する。予備検討では、NFκB は S/B 比 127.3 および IRF は S/B 比 61.9 だった。60 倍から 120 倍程度の測定値の差が定量できる。

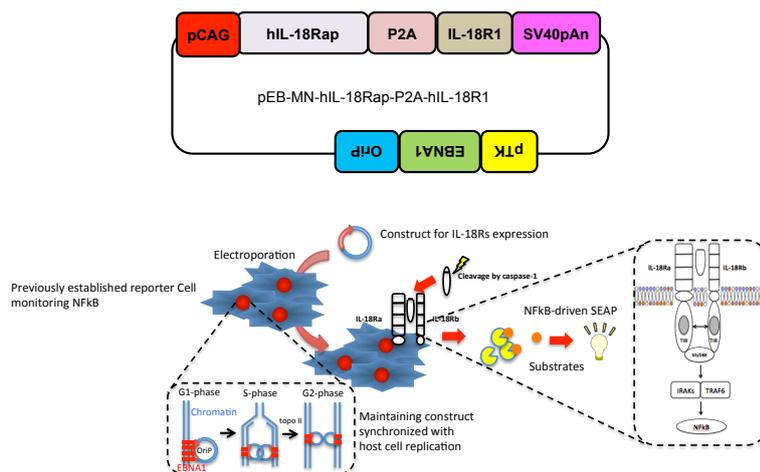
#### 4. 研究成果

海洋微生物、真菌や薬用植物由来の抽出物を用いて、HTS を行なった (図③上)。NFκB 転写を活性化する抽出物は多数認められたが (図③上左)、IRF 転写を活性化するのは認められなかった (図③上右)。次に、京都大学から提供して頂いた 1 万化合物を用いて、IRF 転写を活性化する化合物を単離するため、スクリーニングを行なった。IRF 転写を 3 倍以上活性化する 49 個の化合物が単離でき、うち 2 つは 13 倍以上活性化した

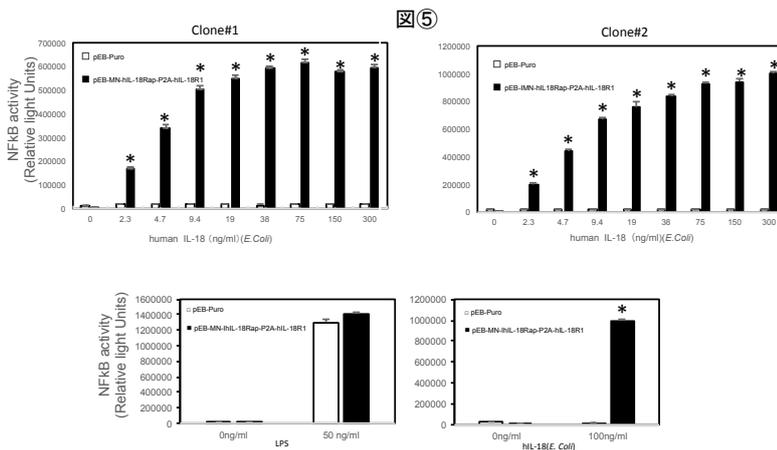
(図③下)。その後、単離した 49 化合物に関して、濃度依存的に IRF 転写を活性化するかどうか検討したところ、残念ながら、濃度依存性は認められなかった。現在、国内の合成化学者から提供して頂いている化合物ライブラリーを中心に IRF 転写を活性化する化合物を単離するために HTS を行なっている。また、我々は、IL-18 を標的に、多発性硬化症を含む自己免疫疾患およびガンに対する治療薬または方法の創出を目指している。IL-18 は、IL-18Racp および IL-18R1 ヘテロ二量体から成る受容体を介して、最終的に NFκB を活性化させ、免疫応答を惹起する (図④右)。それを踏まえて、樹立した NFκB-SEAP を恒常的に発現維持するリポーター細胞へ、エピソーマル型ベクターを用いて、hIL-18Racp および hIL-18R1 を恒常的に導入することにより IL-18 特異的な NFκB 転写活性を測定できるリポーター細胞に改良することを試みた



図③

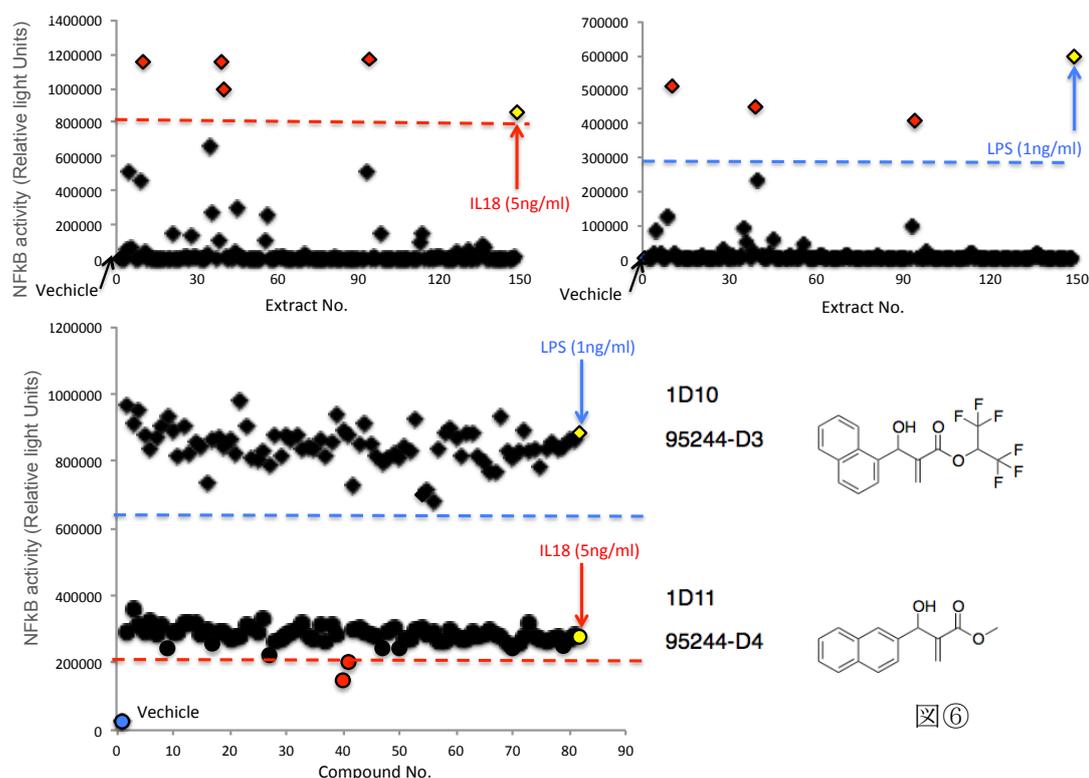


図④



図⑤

(図④)。結果として、大腸菌で作製した組み替え体 hIL-18 の濃度依存的に、特異的な NFκB 転写活性を測定できる新たなリポーター細胞を樹立できた (図⑤)。親細胞である NFκB-SEAP に空ベクターを導入したものは、LPS で NFκB が活性化するものの IL-18 では全く活性化が認められなかった (図⑤下)。この結果からも IL-18 特異的なシグナルを検出できていることが示された。アッセイ感度および精度も HTS を実施するのに十分な測定計となっていた。親和性は弱いもののマウス組み替え体 IL-18 によっても NFκB の活性化が確認できた。また、培養細胞に発現させ分泌させた組み替え体 IL-18 の生物活性の測定にもこのリポーター細胞が使用できることが示された。最終的に、我々の独自ライブラリーを用いて、IL-18 を模倣する NFκB を惹起するアゴニスト、または、IL-18 特異的な NFκB 活性化を抑制するアゴニストを単離するために HTS を行なった。アゴニストに関しては、天然物由来抽出物ライブラリーより、IL-18 と同様の生物活性を示す抽出物 4 個を同定した (図⑥上左)。空ベクターを導入した NFκB-SEAP を用いたカウンターアッセイとは異なる抽出物が単離された (図⑥上右)。今後、この抽出物を有機溶媒お



よび水層に分画し、さらにクロマトグラフィーによる分画を行う。また、質量分析装置により、薬効成分を同定していく予定である。最終的には、免疫細胞の抗腫瘍効果を促進させる新規の免疫細胞治療へ繋げる。アンタゴニストに関しては、独自合成化合物ライブラリーより、IL-18 が誘導する NFκB 活性化を抑制する薬効を保持する化合物を 2 個同定できた (図⑥下左)。空ベクターを導入した NFκB-SEAP を用いたカウンターアッセイでは有意なヒットは確認できなかった。加えて、ヒットした二つの化合物は類縁体であり、共通の骨格を保持していた (図⑥下右)。今後、この化合物の類縁体を集め、構造と薬効の活性相関を検証し、化合物骨格の薬効を保持する構造を決定する。加えて、薬効、薬物動態や毒性などに合わせて合成最適化する。最終的に、多発性硬化症を始めとする自己免疫疾患の治療薬として薬効および安全性を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurata R, Shimizu K, Cui X, Harada M, Isagawa T, Semba H, Ishihara J, Yamada K, Nagai J, Yoshida Y, Takeda N, Maemura K, Yonezawa T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Novel Reporter System Monitoring IL-18 Specific Signaling Can Be Applied to High-Throughput Screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md18010060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Masamitsu Harada, Jun Nagai, Riho Kurata, Kenji Shimizu, Xiaofeng Cui, Takayuki Isagawa, Hiroaki Semba, Jun Ishihara, Yasuhiro Yoshida, Norihiko Takeda, Koji Maemura, Tomo Yonezawa	4. 巻 18
2. 論文標題 Establishment of Novel High-Standard Chemiluminescent Assay for NTPase in Two Protozoans and Its High-Throughput Screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md18030161.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Asuka Kumagai, Kenji Shimizu, Riho Kurata, Xiaofeng Cui, Takayuki Isagawa, Msamitsu Harada, Jun Nagai, Yasuhiro Yoshida, Kei-ichi Ozaki, Norihiko Takeda, Hiroaki Semba and Tomo Yonezawa	4. 巻 20
2. 論文標題 Establishment of novel cells stably secreting various human IL-18 recombinant proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Biotechnology	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389201020666190206203640.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 米澤 朋、倉田 里穂、熊谷 飛鳥、尾崎 恵一、吉田 安宏
2. 発表標題 大気汚染物質を評価するための分泌型アルカリフォスファターゼを用いたリポーター細胞の樹立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 環境因子と生体修復反応（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asuka Kumagai, Kenji Shimizu, Riho Kurata, Xiaofeng Cui, Takayuki Isagawa, Masamitsu Harada, Jun Nagai, Yasuhiro Yoshida, Kei-ichi Ozaki and Tomo Yonezawa
2. 発表標題 Establishment of novel cells stably secreting various human IL18 recombinant proteins.
3. 学会等名 ASCB/EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Kumagai, Riho Kurata, Xiaofeng Cui, Masamitsu Harada, Jun Nagai, Yasuhiro Yoshida, Kei-ichi Ozaki and Tomo Yonezawa
2. 発表標題 Establishment of novel reporter cells stably maintaining transcription factor-driven human secreted alkaline phosphatase expression.
3. 学会等名 ASCB/EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷 飛鳥、清水 謙次、倉田 里穂、Xiaofeng Cui、砂河 孝行、原田 将光、永井 潤、吉田 安宏、尾崎 恵一、米澤 朋
2. 発表標題 多様なヒト組み替えタンパク質を安定に分泌する新規細胞の樹立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉田 里穂、熊谷 飛鳥、Xiaofeng Cui、原田 将光、永井 潤、吉田 安宏、尾崎 恵一、米澤 朋
2. 発表標題 ヒト分泌型アルカリフォスファターゼ発現を安定に維持する新規リポーター細胞の樹立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

## 〔図書〕 計4件

1. 著者名 熊谷飛鳥, 倉田里穂, 尾崎恵一, 砂河孝行, 仙波宏章, 武田憲彦, 前村浩二, 米澤朋	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 100
3. 書名 BIO Clinica 2019年 8月臨時増刊号 ヒト T細胞抗腫瘍活性を用いた新規免疫細胞治療のための創薬研究	

1. 著者名 倉田 里穂、米澤 朋、尾崎 恵一、猪子 英俊	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 90
3. 書名 アレルギーの臨床 2019年9月臨時増刊号 新規ペーチェット病感受性遺伝子TRIM39Rおよび 型IFN応答	

1. 著者名 倉田 里穂、熊谷 飛鳥、尾崎 恵一、米澤 朋	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 106
3. 書名 BIO Clinica 2019年 5月号 多発性硬化症等の自己免疫疾患治療薬作出のための化合物スクリーニング	

1. 著者名 倉田 里穂, 原田 将光, 米澤 朋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 66
3. 書名 Medical Science Digest 9月号 自己免疫疾患への治療薬作出のための新規リポーター細胞の樹立: 独自ライブラリーを用いた創薬への取り組み	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マウスIL-18の製造方法及びそのための組換えDNA	発明者 長崎大学、米澤 朋、 砂河 孝行、前村 浩 二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-076349	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	倉田 里穂  (Kurata Riho)  (70711729)	大阪薬科大学・薬学部・助教    (34413)	

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
---------	---------