

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09516

研究課題名(和文) 各種免疫抑制剤・免疫調節剤の新規標的蛋白質の同定と免疫系における臨床的意義

研究課題名(英文) Identification of novel proteins that bind to various immunosuppressive / immunomodulatory drugs and clinical implications in the immune system

研究代表者

涌井 秀樹 (WAKUI, Hideki)

秋田大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70240463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：有効性と安全性が評価されてきた既存の免疫抑制剤・免疫調節剤は、一般に安価である。医療経済的な観点から、これら既存薬の薬理作用の再評価は、今後の重要課題である。

本研究では、関節リウマチなどの自己免疫疾患や、アレルギー性疾患の治療において、日常診療で広く用いられてきた既存薬を選定し、新たな薬剤結合蛋白質(標的蛋白質の候補)を同定した。これらの蛋白質は、免疫反応の課程で重要な機能を有していることが明らかになった。選定した既存薬の新たな薬理作用が示唆され、今後の臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Clinical effectiveness and safety of widely used immunosuppressive / immunomodulatory drugs have been confirmed. Since these drugs are generally cheap, it is an important clinical issue to reassess their pharmacological actions from a pharmacoeconomical point of view.

In this study, several drugs widely used in the treatment of autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, and allergic diseases are selected. Novel drug-binding proteins having important roles in the immune response processes (candidates for drug-target proteins) were identified. The results suggest novel pharmacological actions of these drugs and their clinical applications in the future.

研究分野：内科学

キーワード：免疫抑制剤・免疫調節剤 薬剤アフィニティークロマトグラフィー ヒト血液 動物臓器 薬剤結合蛋白質(標的蛋白質候補) 新規薬理作用 臨床応用 温故知新創薬

## 1. 研究開始当初の背景

免疫異常に伴う炎症性疾患の治療は、主にサイトカインを分子標的とした薬剤の導入により進展したが、薬価が高額である点と、稀ならず重篤な副作用を惹起する点が問題である。

一方、有効性と安全性が評価されてきた免疫抑制剤・免疫調節剤は一般に安価であり、基本薬剤として重要な位置を占めている。既存の免疫抑制剤・免疫調節剤の薬理作用の再評価は、drug repositioning (温故知新創薬とも呼ばれる) の観点から、今後の重要な臨床薬理学的課題である。

## 2. 研究の目的

日常診療で広く使用されてきた免疫抑制剤・免疫調節剤には、免疫系への多彩な薬理作用が想定されているが、その作用機序の解明は十分には進んでいない。

本研究では、これら薬剤の新規結合蛋白質(標的蛋白質候補)をヒト血液や動物組織から同定する。更に、各薬剤と結合蛋白質との結合様式や、薬剤が結合蛋白質の機能に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 全身性エリテマトーデスの治療薬として欧米で広く使用され、本邦でも認可された hydroxychloroquine (HCQ)、関節リウマチ治療のアンカードラッグである methotrexate (MTX)、潰瘍性大腸炎の第一選択薬である 5-aminosalicylic acid (5-ASA)、アレルギー性疾患治療に頻用される glycyrrhizic acid (GA)、ステロイドパルス療法で用いられる methylprednisolone (mPSL) を選定した。

(2) 対象薬剤をカップリング担体に結合させ、薬剤アフィニティークロマトグラフィーを行った。ヒト赤血球、種々の動物組織から抽出した蛋白質溶液をカラムに添加し、カラムを十分に洗浄した。その後、対応薬剤を含むバッファーをカラムに添加し、薬剤結合蛋白質を競合的、特異的に溶出した。

(3) 上述の溶出サンプルに含まれる薬剤結合蛋白質バンドを、電気泳動ゲルで分離した。ヒト赤血球の場合には、特異抗体を用いた Western blot 法で蛋白質を同定した。動物組織の場合には、蛋白質バンドを切り出し、酵素処理をしてペプチドを得た。質量分析法により、得られたペプチドのアミノ酸配列を調べた。配列結果をデータベースに照合し、薬剤結合蛋白質を同定した。

(4) 同定された薬剤結合蛋白質のリコンビナントヒト蛋白質(一部では機能ドメイン)を発現し、各種クロマトグラフィーに

より蛋白質を精製した。

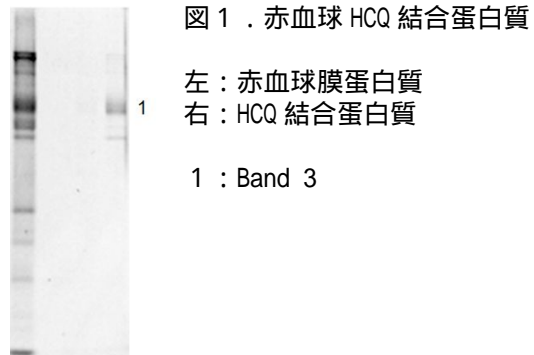
(5) 各薬剤と薬剤結合蛋白質との結合様式について、分析化学的方法により解析した。

(6) 薬剤結合蛋白質の機能が知られている場合には、薬剤が蛋白質機能に及ぼす影響について検討を加えた。

## 4. 研究成果

### (1) HCQ

HCQ は、かつての抗マalaria薬であることから(引用文献)、薬剤アフィニティークロマトグラフィーにより、ヒト赤血球 HCQ 結合蛋白質を同定した(図1)。



Band 3 は、赤血球膜での陰イオン輸送体であるが、リコンビナント細胞質ドメインが HCQ との結合性を示した。HCQ は、Band 3 の輸送体機能を、軽度ながら阻害した。

以上の結果を、発表論文 に報告した。

また、発表論文 において、HCQ が赤血球内の乳酸脱水素酵素に対する阻害作用を有することを観察しており、更なる検討を行った。ブタの主要組織から乳酸脱水素酵素を精製し、HCQ の阻害作用を解析した結果、H2M2型アイソザイムが、最も強く阻害された。

以上の研究成果を、学会発表 - と、発表論文 で報告した。

加えて、薬剤アフィニティークロマトグラフィーにより、ウシ組織から2種類の主要な HCQ 結合蛋白質を同定した(図2)。

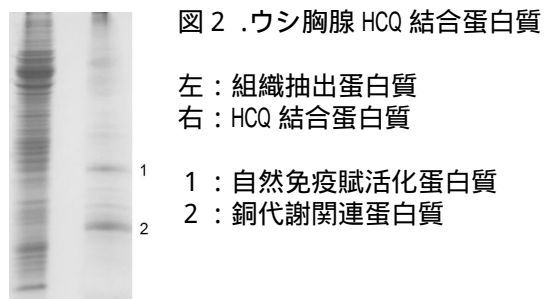


図2に示したHCQ結合蛋白質について、リコンビナントヒト蛋白質の発現・精製を進めている。

## (2) MTX

薬剤アフィニティークロマトグラフィーにより、ウシ組織から3種類の主要なMTX結合蛋白質を同定した(図3)。

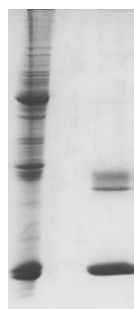


図3 . ウシ肺 MTX 結合蛋白質

左: 組織抽出蛋白質  
右: MTX 結合蛋白質

1: 自然免疫の賦活化蛋白質  
2: ジヒドロ葉酸レダクターゼ (既知の標的蛋白質)  
3: マクロファージ遊走阻害因子 (MIF)

次に、リコンビナントヒト MIF (hMIF) を発現・精製し、control Sepharose と MTX Sepharose を入れたチューブ内で混和し、pull-down 実験を行った。hMIF は、MTX Sepharose に特異的に結合した(図4)。

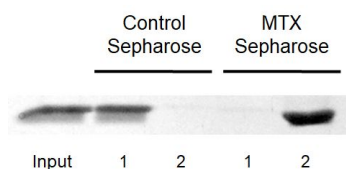


図4 . Pull-down 実験 (MTX 結合蛋白質)

Input: 精製した hMIF  
1: チューブの遠心上清  
2: チューブの遠心後に Sepharose を回収し洗淨した Sepharose からの抽出サンプル

MIF は、多機能性炎症性サイトカインであり、酵素としてトートメラーゼ活性を有することも知られている(引用文献)。hMIF のトートメラーゼ活性保持と、MTX がこの活性に及ぼす影響を検討した結果、MTX の阻害作用が示された(図5)。

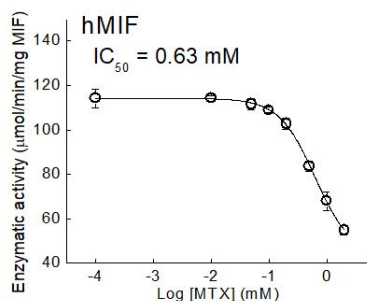


図5 . hMIF のトートメラーゼ活性に及ぼす MTX の阻害作用

更に、hMIF と MTX 複合体の結晶構造を解析した結果、MTX が MIF に結合する部位は、MIF がその受容体である CD74 と結合する部位に一致することが明らかになった(図6)。

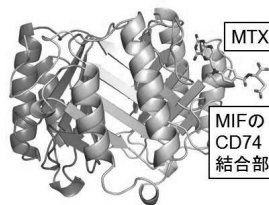


図6 . hMIF と MTX 複合体の結晶構造

MTX は MIF の CD74 結合部に結合した。

MIF は種々の細胞から分泌され、抗原提示細胞の細胞膜に存在する CD74 受容体と結合し、免疫賦活化に働く。この作用が過剰な場合には、炎症増幅や異常免疫反応を惹起することが知られている(引用文献)。

MTX が MIF に結合する部位は、CD74 受容体との結合部位であることから、MTX の新規免疫調節作用の一つとして、MIF-CD74 受容体を介する情報伝達系の阻害作用が示唆された(図7)。

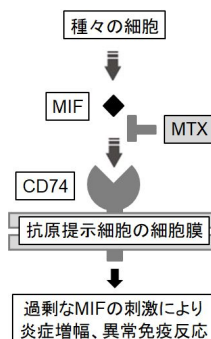


図7 . MTX の新規薬理作用 (仮説)

MTX は、MIF と CD74 との相互作用を阻害し、過剰な炎症増幅と異常免疫反応を抑制する可能性がある。

以上の研究成果を、学会発表 - で報告し、全体をまとめた原著論文の投稿準備中である。

## (3) 5-ASA

薬剤アフィニティークロマトグラフィーにより、ウシ組織から 5-ASA 結合蛋白質を同定した(図8)。

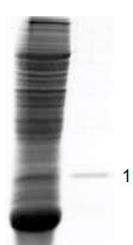


図8 . ウシ脾臓 5-ASA 結合蛋白質

左: 組織抽出蛋白質  
右: 5-ASA 結合蛋白質

1: 顆粒球蛋白質

次に、リコンビナントヒト顆粒球蛋白質を発現・精製し、control Sepharose と MTX Sepharose を入れたチューブ内で混和し、pull-down 実験を行った。リコンビナントヒト顆粒球蛋白質は、5-ASA Sepharose に特異的に結合した(図9)。

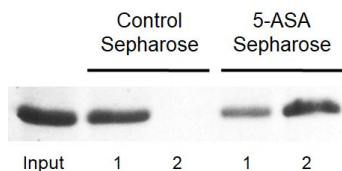


図 9 . Pull-down 実験 (5-ASA 結合蛋白質)

Input : 精製したリコンビナントヒト顆粒球蛋白質

- 1 : チューブの遠心上清
- 2 : チューブの遠心後に Sepharose を回収し洗淨した Sepharose からの抽出サンプル

5-ASA との結合性を有する顆粒球蛋白質は、潰瘍性大腸炎の病態に強く関与することから、5-ASA とリコンビナントヒト顆粒球蛋白質との結合様式について、解析を進めている。また、この顆粒球蛋白質の機能に及ぼす 5-ASA の影響についても検討し、動物モデルでの研究展開も含め、5-ASA の新たな薬理作用を示したい。

#### (4) GA

薬剤アフィニティークロマトグラフィーにより、ウシ組織から GA 結合蛋白質を同定した (図 10)。

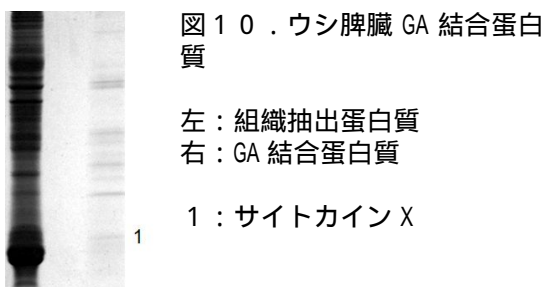


図 10 . ウシ脾臓 GA 結合蛋白質

左 : 組織抽出蛋白質  
右 : GA 結合蛋白質

- 1 : サイトカイン X

次に、リコンビナントヒトサイトカイン X を発現・精製し、control Sepharose と GA Sepharose を入れたチューブ内で混和し、pull-down 実験を行った。リコンビナントヒトサイトカイン X は、GA Sepharose に特異的に結合した (図 11)。

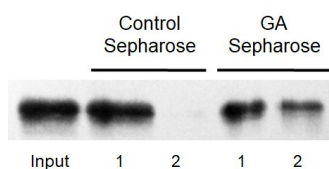


図 11 . Pull-down 実験 (GA 結合蛋白質)

Input : 精製したリコンビナントヒトサイトカイン X

- 1 : チューブの遠心上清
- 2 : チューブの遠心後に Sepharose を回収し洗淨した Sepharose からの抽出サンプル

GA と結合するサイトカイン X は、アレルギー性疾患の病態に強く関与することから、GA とリコンビナントヒトサイトカイン X との結合様式について、解析を進めている。また、このサイトカイン X の機能に及ぼす GA の影響についても検討し、動物モデルでの研究展開も含め、GA の新たな薬理作用を示したい。

#### (5) mPSL

薬剤アフィニティークロマトグラフィーにより、ウシ組織から mPSL 結合蛋白質を同定した (図 12)。

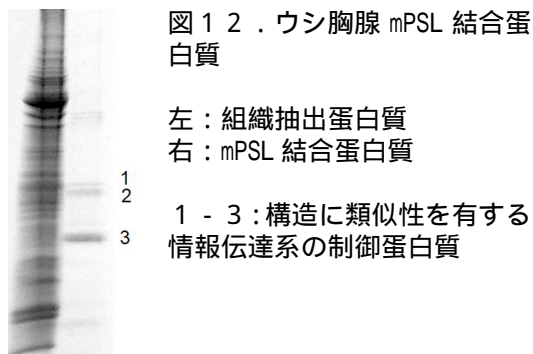


図 12 . ウシ胸腺 mPSL 結合蛋白質

左 : 組織抽出蛋白質  
右 : mPSL 結合蛋白質

- 1 - 3 : 構造に類似性を有する情報伝達系の制御蛋白質

図 12 に示した mPSL 結合蛋白質について、リコンビナントヒト蛋白質の発現・精製を進めている。

本研究に関連する臨床研究として、ステロイド骨粗鬆症の分子標的治療薬デノスマブの効果と安全性も検討した (発表論文)。

#### <引用文献>

Ben-Zvi H, et al: Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clinic Rev Allerg Immunol* 42: 124-153, 2012.

Bloom J, et al: MIF, a controversial cytokine: a review of structural features, challenges, and opportunities for drug development. *Expert Opin Ther Targets* 20: 1463-1475, 2016.

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Nakagawa M, Sugawara K, Goto T, Wakui H, Nunomura W: Hydroxychloroquine binding to cytoplasmic domain of Band 3 in human erythrocytes: novel mechanistic insights into drug structure, efficacy and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 473: 999-1004, 2016. 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.005

Goto T, Sugawara K, Nakamura S, Kidokoro S, Wakui H, Nunomura W: Enzymatic

and thermodynamic profiles of a heterotetramer lactate dehydrogenase isozyme in swine. Biochem Biophys Res Commun 479: 860-867, 2016. 査読あり  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.118

Sawamura M, Komatsuda A, Togashi M, Wakui H, Takahashi N: Effects of denosumab on bone metabolic markers and bone mineral density in patients treated with glucocorticoids. Intern Med 56: 631-636, 2017. 査読あり  
DOI: 10.2169/internalmedicine.56.7797

〔学会発表〕(計9件)

Goto T, Sugawara K, Nakagawa M, Kobayashi I, Ubukawa K, Asanuma K, Yamashita J, Sawada K, Wakui H, Nunomura W: Inhibition of lactate dehydrogenase isozymes blocked cell proliferation. ASCB 2015 Meeting, B742/P1107, Dec 14, 2015, San Diego, USA

後藤樹史, 菅原琴美, 浅沼研, 中川瑞希, 小林五十鈴, 鶴生川久美, 山下順助, 高橋直人, 澤田賢一, 涌井秀樹, 布村渉. ヒドロキシクロロキンをを用いた乳酸脱水素酵素の活性阻害による細胞増殖抑制. 第68回日本細胞生物学会大会/日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会/合同大会, P1-67, 2016年6月15日, 京都市

Goto T, Sugawara K, Asanuma K, Ubukawa K, Guo Y, Kobayashi I, Takahashi N, Wakui H, Nunomura W: Inhibition of heterotetramer lactate dehydrogenase isozyme blocked cell proliferation of K562. 12th International Congress of Cell Biology, P 040, July 22, 2016, Prague, Czech Republic

Goto T, Nakagawa M, Sugawara K, Takahashi T, Yonezawa M, Wakui H, Nunomura W: Conserved and unique enzymatic and thermodynamic properties of lactate dehydrogenase in skeletal muscle of ectothermic, mesothermic and endothermic vertebrates. 22nd International Congress of Zoology, Poster Presentation 3, Nov 17-18, 2016, Okinawa, Japan

松村洋寿, 杉島小雪, 面川歩, 布村渉, 堂前直, 尾高雅文, 廣川誠, 涌井秀樹. メトトレキサート新規標的タンパク質としてのマクロファージ遊走阻害因子の同定と構造機能解析. 第44回生体分子科学討論会, 07, 2017年6月23日, 秋田市

杉島小雪, 松村洋寿, 面川歩, 布村渉, 堂前直, 尾高雅文, 廣川誠, 涌井秀樹. リウマチ薬メトトレキサート新規標的タンパク質としてのマクロファージ遊走阻害因子との相互作用解析. 第44回生体分子科学討論会, P08, 2017年6月23日, 秋田市 (ポスター賞受賞)

松村洋寿, 杉島小雪, 面川歩, 布村渉, 堂前直, 尾高雅文, 廣川誠, 涌井秀樹. メトトレキサート新規標的タンパク質マクロファージ遊走阻害因子の構造機能解析. 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 1A-15, 2017年9月7日, 東京都

杉島小雪, 松村洋寿, 面川歩, 布村渉, 堂前直, 尾高雅文, 廣川誠, 涌井秀樹. 抗リウマチ薬メトトレキサートとMIFサイトカインファミリータンパク質の相互作用解析. 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 1PB-75, 2017年9月7日, 東京都

杉島小雪, 松村洋寿, 面川歩, 尾高雅文, 廣川誠, 涌井秀樹. リウマチ薬メトトレキサート新規標的タンパク質としてのマクロファージ遊走阻害因子の機能及び相互作用解析. 第69回日本生物工学会大会, 3P-G037, 2017年9月13日, 東京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.riko.akita-u.ac.jp/intro/courses/life\\_sciences.html](http://www.riko.akita-u.ac.jp/intro/courses/life_sciences.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

涌井 秀樹 (WAKUI, Hideki)  
秋田大学・理工学研究科・教授  
研究者番号: 70240463

### (2) 研究分担者

布村 渉 (NUNOMURA, Wataru)  
秋田大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 70256478

小松田 敦 (KOMATSUDA, Atsushi)  
秋田大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 70272044

### (3) 連携研究者(該当者なし)

### (4) 研究協力者

堂前 直 (DOHMAE, Naoshi)  
尾高 雅文 (ODAKA, Masafumi)  
松村 洋寿 (MSTSUMURA, Hirotoshi)  
面川 歩 (OMOKAWA, Ayumi)