

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08474

研究課題名(和文) 高選択性JAK3阻害薬創生に向けたJAK3活性化の時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the spatiotemporal control mechanism of JAK3 activation to discover highly selective JAK3 inhibitors

研究代表者

天野 勇治 (Amano, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：50624681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸性細胞小器官であるエンドソームはシグナル伝達のプラットフォームとして機能する。本研究では、エンドソーム中和剤(IAVN)が、共通サイトカイン受容体鎖(c)サイトカイン誘導性シグナル伝達を選択的に妨害できることを見出した。JAK3は酸性pH依存的にエンドソーム膜に結合し、これがcサイトカイン誘導性のシグナル活性化に必須であった。IAVNの一種であるモネンシンは、in vitroでのcサイトカイン誘導性の細胞増殖を高選択的に抑制した。またin vivoではTh-17細胞を選択的に抑制することでコラーゲン誘導性関節炎に対する治療効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IAVNsの一種であるヒドロキシクロロキンは、古くから自己免疫疾患の治療薬として用いられてきた一方、その作用機序に関しては明らかにされてこなかった。本研究成果はクロロキンの作用機序解明に寄与するのみでなく、モネンシン等のキャリア型のイオノフォアの免疫抑制薬としての有用性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The endosome, an acidic organelle, is a platform for endocytic trafficking and signal transduction. This study found that intercellular acidic vesicle neutralizer (IAVN)s can selectively interfere with common cytokine receptor chain (c) cytokine-induced signal transduction. Our data show that JAK3 targets endosomal membranes in an acidic pH-dependent manner, which is essential for c-cytokine-induced functional signal complex formation and signal activation. Among IAVNs, Monensin and similar ionophores were particularly effective in suppressing c-cytokine-induced cell proliferation in vitro. Monensin exerted therapeutic effects in a collagen-induced arthritis mouse model by interfering with T helper 17 cells. Our findings help further understand the immunosuppressive mechanism of IAVNs and unveil the spatial regulation of JAK3-mediated signal transduction via endosomes.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：JAK3 エンドソーム シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制薬の標的分子として Janus kinase (JAKs) が注目されている。2012 年に Tofacitinib(Phizer) が関節リウマチを適応症として承認されたのを皮切りに、現在では自己免疫疾患やアレルギーを対象に、10 以上の JAK 阻害薬の開発が進められている。JAK 阻害薬は関節リウマチや潰瘍性大腸炎に対し、非常に高い治療効果が得られており、JAKs が免疫抑制薬の優れた標的分子であることは明らかである。しかしながら、免疫抑制に起因しない有害事象の発生が問題であり、免疫系のみならず作用する高選択性 JAK 阻害剤の開発が喫緊の課題である。

JAK family は JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 の 4 分子からなる。JAK1, JAK2, TYK2 が全身の細胞に発現するのに対し、JAK3 は免疫系細胞のみに発現する。すなわち JAK3 の選択的阻害は、免疫系に限局した作用をもたらす。更に JAK3 は、IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 の共通受容体サブユニットである common 鎖(c 鎖)と協働し、これらサイトカインのシグナル伝達に必須な役割を担う。実際に c 鎖や JAK3 の欠損・機能不全は、原発性免疫不全を引き起こす。従って、JAK3 特異的な阻害によって、十分な免疫抑制効果が期待できる。これら特徴を勘案すると、高選択性 JAK3 阻害薬は、免疫系のみならず作用する副作用の少ない免疫抑制薬となる可能性が高い。高選択性プロテインキナーゼ阻害薬の開発は、様々なキナーゼで企てられてきたが、成功例は僅かである。その主な要因として、JAK 阻害薬を含むプロテインキナーゼ阻害薬は、キナーゼドメイン、特に ATP 結合領域を分子標的としてデザインされている点が挙げられる。キナーゼドメインは、阻害薬の分子デザインが比較的容易である一方、分子間での類似性が高く、特異性の高いキナーゼ阻害薬の標的には適していない。従って、高選択性 JAK3 阻害薬の開発には JAK3 活性化制御機構の詳細を解明し、JAK3 特有の活性制御部位を見出すことが必須である。

2. 研究の目的

申請者らは高選択性 JAK3 阻害薬の開発を目標として、JAK3 活性化メカニズムの解明を進めてきた。その結果、JAK3 はサイトカイン刺激依存的に c 鎖と会合すること JAK3 はエンドソームに局在し、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれたリガンド-受容体コンプレックスとエンドソームで会合・活性化すること。JAK3 のエンドソーム局在はエンドソーム pH(酸性 pH)依存性であること エンドソームの酸性化阻害は、JAK3 のエンドソーム局在化不全に起因する JAK3 依存性シグナルの選択的阻害を引き起こすことを明らかにした。pH 依存的なエンドソームへのターゲティング機構は、他の JAK ファミリー分子には見られず、JAK3 固有の制御機構といえる。即ち、エンドソーム局在化という全く新たな活性化制御機構は、革新的な高選択性 JAK3 阻害薬の創造に繋がる可能性を秘めている。そこで本研究は、JAK3 のエンドソームターゲティング機構を創薬標的として確立することを目的とする。

3. 研究の方法

エンドソームの酸性化阻害がサイトカインシグナルに及ぼす影響に関して、各種サイトカイン依存性の細胞増殖を示す細胞株、並びにヒト末梢血単核球を用いて解析を行った。更に、エンドソーム酸性化阻害薬が免疫系に及ぼす影響、並びに自己免疫性炎症に対する治療効果を確認するために、疾患モデルマウスを用いて解析をおこなった。

4. 研究成果

サイトカインシグナル活性化におけるエンドソームの酸性環境要求性に関して検証するために、申請者らはまずヒト抹消単核球をエンドソーム酸性化阻害薬存在下において様々なサイトカインで刺激し、そのシグナル活性化を確認した。エンドソーム酸性化阻害薬は、 γ 鎖を受容体サブユニットとして共有し、JAK3を介してシグナル活性化するIL-2、IL-7、IL-15によるシグナル活性化を一貫して阻害した。一方、IL-6、IL-10、IFN γ 、IFN β などのシグナル活性化にJAK3を必要としないサイトカインシグナルには影響を及ぼさなかった。この結果はエンドソーム酸性化阻害薬が、酸性環境依存的なエンドソーム局在化というJAK3に固有の活性制御機構を標的とした、新たな高選択性JAK3阻害薬となり得ることを示唆している。そこで申請者らはエンドソーム酸性化阻害薬がサイトカイン依存性の細胞増殖に及ぼす影響について検討するためにマウス pro-B 細胞由来の細胞株である BAF 細胞を用いた評価系を構築した。BAF 細胞は IL-3 依存性の細胞増殖を示す細胞株であるが、恒常的に γ 鎖を発現しており各 γ サイトカインの鎖を強制発現させることで、各サイトカイン応答性の細胞増殖能を獲得する。申請者らは IL-2、IL-4、IL-7 応答性の BAF 細胞を樹立し、各種エンドソーム酸性化阻害薬（クロロキン、モネンシン、塩化アンモニウム）が γ サイトカイン並びに IL-3 依存性の細胞増殖に及ぼす影響を確認した。その結果、すべてのエンドソーム酸性化阻害薬は、 γ サイトカイン依存性の細胞増殖を選択的に抑制した。特にモネンシンは極めて高い選択性をもって γ サイトカイン依存性の細胞増殖を抑制した (EC50 BAF_IL2R: 79.3nM (IL-2) 1.4 μ M (IL-3), BAF_IL4R: 4.4nM (IL-4) 147nM (IL-3), BAF_IL7R: 2.6nM (IL-7) 114nM (IL-3))。モネンシンはキャリアタイプのイオノフォアであり、カチオン/プロトン交換輸送体として働くことで、エンドソーム内部を中和すると考えられる。同様の作用機序によってエンドソームの酸性化を阻害する薬剤としてニゲリシンやサリノマイシンが知られている。申請者らはこれらイオノフォアの細胞増殖に及ぼす影響を確認したところ、モネンシンと同様に高い選択性をもって γ サイトカイン依存性の細胞増殖を抑制することが明らかとなった。ここまでの *in vitro* での評価から、イオノフォアであるモネンシンが最も選択的に JAK3 依存性の細胞増殖を抑制する結果を得た。モネンシンをはじめとしたイオノフォアは、家畜用の飼料添加物として広く使われており、動物での安全性は確立されている。一方、抗炎症薬としての有用性を検討した報告はこれまでにない。そこで申請者らは、モネンシンによる抗炎症効果についてコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを用いて検証した。モネンシンは、関節リウマチ治療薬として用いられている JAK 阻害薬、トファシチニブと同程度に関節炎を抑制した。さらにモネンシン投与はマウスの一般状態や体重に影響を及ぼさなかったことから、有効かつ安全な抗炎症薬となる可能性が示された。一方で、関節炎誘導により生じる脾肥大を有意に抑制したことから、炎症細胞を選択的に抑制していると考えられる。そこで、モネンシンが炎症細胞に及ぼす影響に関して確認したところ、モネンシンはリウマチ等の自己免疫疾患の病態形成に深く関与する Th17 細胞を選択的に抑制することが明らかとなった。興味深いことに、モネンシンは一般的な自己免疫疾患治療薬と異なり、Th1 細胞に影響を及ぼさなかった。この結果から、モネンシンが免疫抑制薬の宿命である感染症リスクの増大を伴わない安全な自己免疫疾患治療薬となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amano Yuji, Tanaka Nobuyuki, Takeshita Toshikazu, Kojima Katsuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Essential role of an acidic endosomal environment in JAK3-mediated signal transduction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.09.07.556780	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 カチオン選択性イオノフォアを用いた c サイトカインのシグナル伝達を阻害する方法	発明者 天野勇治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-43568	出願年 2023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	竹下 敏一 (Takeshita Toshikazu) (60212023)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

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