

論文の内容の要旨

論文題目 微生物が生産する新規免疫抑制物質
FR252921 および FR252922 に関する研究

氏名 藤根 清考

1970年代にサイクロスポリンA (CsA)、1980年代にFK506が発見され移植治療に使われるようになってから、臓器生着率は飛躍的に向上し、移植治療が標準的医療法の一つとして定着するに至った。代謝拮抗剤やステロイド等を併用する、いわゆる多剤併用療法により心移植・腎移植・肝移植では1年後生着率は90%以上の成績を収めている。しかしながら、効果のない患者も認められること、5年後生着率は70%程度であることなどの問題も残されている。また、CsA、FK506やステロイドには腎機能障害や高血糖誘発などの副作用が認められており、できるだけ投与量を低減させることが望ましい。このように薬効面と安全面を考慮すると、1)既存の薬剤と併用することにより相乗的に薬効が改善される薬剤、2)これまでの薬効を保持しつつ、既存の薬剤の投与量を低減できる併用剤がさらに必要であると考えた。そこで、本研究では現在もっとも広く利用されているCN阻害剤と併用効果を示す薬剤を探索した。臓器移植後の拒絶反応においてT細胞が免疫反応を制御していることが知られているが、CsAやFK506はT細胞活性化シグナル伝達で重要な働きをもつカルシニューリン(CN)のフォスファターゼ活性を阻害する。その結果、サイトカインなどの活性化遺伝子発現を阻害し、免疫抑制活性を発揮する。その一方で、T細胞に対して活性化の引き金を引く働きをもつ抗原提示細胞(APC)の機能を選択的に阻害する移植治療剤はない。そこで、筆者はAPCの活性化阻害剤を見いだすことを目標とした。

多くの免疫抑制剤が微生物生産物から見いだされていることから、APCの活性化阻

害剤も微生物生産物に含まれていると期待し、藤沢薬品工業（株）の所有する醗酵サンプル 50,000 検体の中からスクリーニングした。APC の活性化を検出する簡便な細胞アッセイ系として、リポポリサッカライド(LPS) 刺激脾細胞増殖をスクリーニング系として利用した。その結果、バクテリア No. 408813 株の培養液に増殖阻害活性があることを見いだした。この免疫抑制効果におけるポテンシーは、マウスリンフォーマ株 EL-4 に対する細胞毒性よりも、約 100 倍強かった。

定法に従い、生産菌株を分類学的に解析したところ、形態学的性質と生理学的性質から *Pseudomonas fluorescens* であることが判明した。この生産菌を、ジャーファーマンターを用いて大量に培養した。培養液より、溶媒抽出およびカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、2 つの活性物質の単離に成功した。それぞれを FR252921 および FR252922 (以下それぞれ 1 および 2 と略す) と命名した。

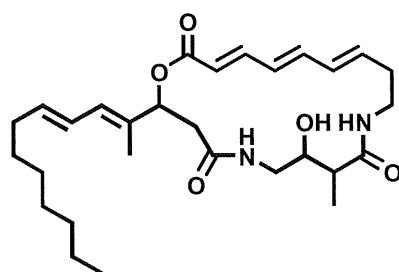
物理化学的解析から、1 および 2 は二つのアミド結合を含む 19 員環から構成される新規化合物、すなわち

7-hydroxy-8-methyl-2-[(1E,3E)-1-methyl-1,3-undecadienyl]-1-oxa-5,10-diazacyclonadeca-13,15,17-triene-4,9,19-trione および

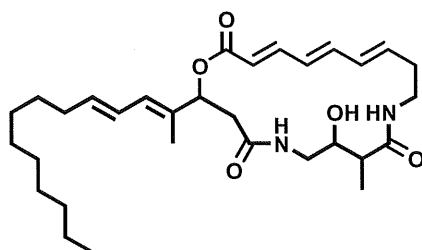
7-hydroxy-8-methyl-2-[(1E,3E)-1-methyl-1,3-tridecadienyl]-1-oxa-5,10-diazacyclonadeca-13,15,17-triene-4,9,19-trione であることが判明した。19 員環という環

構造はほとんど例がない、極めて珍しい構造である。また、二つのアミド結合と三連続共役二重結合を含んでいることから、全体に非常にコンフォメーションの自由度が低く、ひずみのかかった特異な構造であると推測された。1 および 2 は共役ジエンを含むヒドロキシカルボン酸、トリエンカルボン酸 9-amino-2,4,6-nonatrienoic acid、アミノヒドロキシカルボン酸(2S,3R)-4-amino-3-hydroxy-2-methylbutanoic acid の部分構造から構成されていた。これらのヒドロキシカルボン酸、トリエンカルボン酸のいずれも報告がない。1 および 2

は他に類を見ない極めて特異な構造を持つことが明らかとなった。ユニークな構造を持つ新規物質が見いだされたことから、筆者が用いたスクリーニング系、すなわち LPS 刺激脾細胞増殖、抗 CD3 抗体刺激脾細胞増殖および EL-4 増殖を用いたアッセイ法は、新しい免疫抑制剤を探すために有用であると考えられる。



FR252921 (1)



FR252922 (2)

1 および 2 の生物学的活性を *in vitro* および *in vivo* の両面で解析した。先に述べたように、両物質は LPS 刺激によるマウス脾細胞増殖および抗 CD3 抗体刺激によるマウス脾細胞増殖をともに阻害した。1 および 2 が脾臓細胞中の T 細胞あるいは APC のいずれに作用する薬剤なのか、それとも同じように作用する薬剤なのかを明らかにするために次の実験を行った。すなわち、脾細胞から T 細胞と APC を分画し、それぞれに薬剤を添加・培養した。引き続き薬剤を洗浄した後、それぞれの細胞群に、薬剤処理していない APC あるいは T 細胞をそれぞれ添加し、抗 CD3 抗体にて刺激した。その結果、はじめに 1 を APC に作用させた場合には阻害効果が認められたが、T 細胞に作用させた場合は阻害効果が認められなかった。従って、1 は APC に選択的に作用する物質であることが示唆された。また、脾細胞より分離した樹状細胞を LPS および抗 CD40 抗体にて刺激すると増殖応答を示すが、1 はこれを強く阻害した。対照的に、脾細胞より分離した T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激したときの増殖応答、IL-2 産生、CD154 発現のいずれも阻害しなかった。これらの結果から 1 は脾臓細胞中の APC に作用する薬剤であると判断した。APC に選択的に作用する免疫抑制剤は報告されていないことから、1 は構造だけでなく、その薬理作用もユニークであることが判明した。

また、様々なサイトカイン遺伝子発現を制御する転写因子である NF-AT、NF- κ B あるいは AP-1 の DNA 結合部位を、それぞれルシフェラーゼ遺伝子の上流に接続したプラスミドおよび各種培養細胞を用い、レポータージーンアッセイを行った。その結果、1 は AP-1 の転写活性を阻害することが明らかとなった。

このように、1 は AP-1 に至る経路を阻害し、APC に選択的に作用する薬剤であることが示唆された。この性質は、移植治療で中心的に使用されている CN 阻害剤とは明らかに異なる。そこで、*in vivo* において CN 阻害剤と薬剤が認められるか否かを明らかにする目的で、マウス皮膚移植試験における FK506 との併用効果を調べた。FK506 は投与量依存的に生着日数を延長した。投与量を 10 mg/kg から 32 mg/kg に増量しても薬効に大きな変化はなかったことから、FK506 の至適投与量は 10 mg/kg であると判断した。1 は単剤では生着延長効果を示さなかったが、至適投与量の FK506 と併用すると、FK506 のみを投与した場合よりさらに皮膚片生着を延長した。同様に、2 もまた単剤では生着延長効果を示さなかったが、至適投与量の FK506 と併用すると、FK506 のみを投与した場合よりさらに皮膚片生着を延長した。これらの結果より、至適投与量である 10 mg/kg の FK506 の薬効を増強するためには、FK506 を増量するよりも 1 あるいは 2 を併用剤として使用する方が有効であると考えられる。また、現在臨床で FK506 と併用して広く使われているミコフェノール酸モフェチル (MMF) をこのモデルで評価したところ、MMF による FK506 併用効果は 1 と同等であった。

1 あるいは 2 は FK506 との相乗効果を示したが、FK506 の血中濃度を上昇させることにより薬効が強まる、という可能性が考えられた。そこで、1 および 2 による FK506 の代謝調節に対する影響を解析した。1 および 2 は FK506 代謝酵素として知られる CYP3A4 の酵素活性

には影響を及ぼさなかった。また、FK506 投与後の FK506 の血中濃度は、1 あるいは 2 を併用投与した場合にも影響を受けなかった。以上の結果から、1 および 2 は FK506 の代謝を調節することなく、免疫抑制作用を増強することが示唆された。

以上の結果から、本研究において新たに見いだした新規化合物 1 および 2 は、移植治療における併用療法に組み込める可能性があると期待される。

免疫抑制療法は、移植臓器とレシピエント細胞の間におこる免疫反応を阻害するために行われる。移植臓器が存在する限り免疫反応が生じることから、拒絶反応を抑制するためには患者は免疫抑制剤の投与を受け続けなければならない。このような問題を根本的に解決するために、免疫寛容を誘導する試みがなされている。抗原特異的 T 細胞に対して寛容を誘導するためには、APC からの活性化シグナルを調節することが必要であるとされている。つまり、APC 機能を人為的に調節することができれば、免疫寛容を誘導できると考えられる。従って、本研究で探索した APC 阻害剤は、免疫抑制療法としてだけでなく、寛容誘導療法においても有用であると期待される。