

論文の内容の要旨

論文題目 カビの生産する新規免疫抑制物質 FR235222 に関する研究

氏名 森 泰 亮

カルシニューリン阻害剤(calcineurin inhibitors; CNIs)である cyclosporin A (CsA)及び tacrolimus (FK506)は、共に微生物が生産する代表的な免疫抑制剤であるが、両剤は移植医療（臓器移植及び骨髄移植）における基礎治療薬としてその発展に多大なる貢献を果たしてきた。また両剤は、慢性関節リウマチ（RA）などをはじめとする様々な自己免疫疾患に対してもその有用性が示されている。しかしながら、腎毒性、中枢毒性、耐糖能異常などの、カルシニューリン阻害作用に基づくものと思われる共通した副作用を有し、しばしばその使用が制限される。更に、CNIsはその強力な急性拒絶抑制作用に比して、慢性拒絶抑制作用や免疫寛容誘導作用、異種移植に対する拒絶反応抑制作用は、不十分であるか若しくは逆効果であることが指摘されている。また近年、CNIsが直接的に移植患者の発癌・癌増悪化のリスクを高めている可能性も指摘されている。従って、CNIsよりも安全で、かつ CNIsでは十分に満たされない unmet needs を満たし得るような、全く異なる作用機序を有する新規免疫抑制剤を探索することは、非常に意義のあることと言える。

このような状況を踏まえ、著者らは微生物生産物を対象として、CNIsとは異なる新しい作用機序を有する T 細胞活性化抑制物質を探索した。その結果、或る種のカビ（*Acremonium* sp. No. 27082）の培養液中に、T 細胞の増殖を選択的に阻害する活性を見出した。当初、その培養液

中に含まれる活性強度は、非常に弱いものであった。そこで、培養培地検討を含む培養条件の最適化を行い、その活性強度（生産力価）を向上させた上で、30L ジャー・ファーメンターによる液体培養を実施し、その活性を指標に培液中より活性物質 230mg を精製単離した。LC-ESIMS、高分解能 ESI-MS、FT-IR、¹H 及び ¹³C NMR、X 線結晶構造解析などの手法によって、活性物質の構造決定を行った結果、テトラ環状ペプチド構造を有する新規化合物であることを確認した（FR235222 と命名）。FR235222 は、フェニルアラニン残基以外に 3 つのユニークな異常アミノ酸残基、即ち、メチルプロリン（4-MePro）残基、イソバリン（iva）残基、及び 2-amino-9-hydroxy-8-oxodecanoic acid（aoh）残基を有していた。著者らの知る限りにおいては、テトラ環状ペプチド系化合物において、4-MePro 残基が認められたのは初めてのことである。iva 残基も珍しいアミノ酸であり、phoenistatin において報告されているのみである。 α -hydroxyketone を含む aoh 残基も報告例が少ないものであった。

FR235222 の *in vitro* における生物活性を検討した。本物質は、3 つのタイプのマウスリンパ球増殖活性化反応、即ち、one-way 混合リンパ球反応（MLR）、抗 CD3 抗体誘発 T 細胞増殖活性化反応（anti-CD3-blast）、及び TPA 誘発リンパ球増殖活性化反応（TPA-blast）の全ての反応に対して、強力な抑制効果を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 4.7、3.0 及び 1.7 ng/mL であった。一方、本物質の、正常細胞であるラット初代培養肝細胞及びヒト正常線維芽細胞株 HNF に対する細胞毒性は、IC₅₀ 値がそれぞれ 1000 ng/mL 以上及び 5000 ng/mL 以上と非常に弱かった。更に、本物質のリンホカイン産生及び NO 産生に対する阻害活性を調べた。anti-CD3-blast に伴う IL-2 及び IL-4 の産生に対して、本物質は強力な阻害活性を示し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 3.4 及び 0.35 ng/mL であった。一方、マウス RAW 264.7 細胞の LPS 誘発 NO 産生に対しては、本物質は 1000 ng/mL でも阻害活性を示さなかった。以上、FR235222 はリンパ球の増殖及びリンホカイン産生に対して、強力かつ選択的な阻害活性を示すことが明らかとなった。

FR235222 の有する特徴的なテトラ環状ペプチド構造には、核内酵素ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）の阻害剤として知られている trapoxin との構造類似性が認められた。そこで、本物質の標的分子を明らかにする為に、その HDAC 阻害活性を検討した。著者らの予想した通り、本物質は 2 種類のリンパ球系癌細胞株、human T cell leukemia Jurkat 細胞及び mouse lymphoma EL-4 細胞のそれぞれから粗精製した HDAC 画分の酵素活性に対して強力な阻害活性を示し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 9.7 及び 27.9 ng/mL であった。著者らが後に行った FR235222 の合成誘導体に関する実験から、それらの免疫抑制活性と HDAC 阻害活性との間には良好な相関があることが明らかとなり、

よってそのリンパ球（T 細胞）に対する強力かつ選択的な免疫抑制活性は、同細胞中に存在し機能している HDAC(s) の酵素活性に対する阻害を介して、発現しているものと推察された。

HDAC 阻害剤の有する免疫抑制作用に関しては既に幾つかの報告があるが、その殆どが *in vitro* の作用に限定されたものである。そこで著者らは、FR235222 の移植及び自己免疫疾患領域での臨床応用の可能性を探る為に、また *in vivo* で有効な免疫抑制剤を創出する為の新しい標的分子として HDAC(s) が妥当な対象であることを見極める為に、本物質の *in vivo* における免疫抑制効果を幾つかの動物モデルにおいて検討した。

FR235222 は結核死菌体により誘発されるラットアジュバント関節炎（AA）モデルにおいて、皮下投与及び経口投与にて強力且つ用量依存的な足浮腫抑制効果を示した。皮下投与 0.05、0.16、0.5 及び 1.6 mg/kg（1 日 2 回）における足部肥厚抑制率は、死菌体投与足部（非投与足部）でそれぞれ 25 (37)、34 (64)、50 (97) 及び 69 (105) % であり、また経口投与 0.16、0.5、1.6 及び 5 mg/kg（1 日 2 回）における足部肥厚抑制率は、投与足部（非投与足部）でそれぞれ 21 (20)、34 (32)、39 (58) 及び 51 (76) % であった。その時、毒性（副作用）所見は何ら伴っておらず、高投与量群においては著明な体重回復効果が認められた。以上から、本物質は慢性間接リウマチ（RA）などのような自己免疫疾患に対して、安全係数に優れる忍容性の高い治療薬になり得る可能性が示唆された。

更に、LEW ラットをドナー、ACI ラットをレシピエントとした異所性頸部心移植モデルにおいて、FR235222 の 5 mg/kg を移植翌日より 1 日 2 回、14 日間経口投与した群の生着日数の中央値（MST）は >100 日と、vehicle 投与群の MST（9 日）に比して著明な生着延長を示した。薬剤投与終了後の移植心の長期生着は、免疫寛容（トレランス）誘導の可能性を示唆するものであった。FR235222 投与群のラットのうち 1 例が途中死亡したが、残り全 12 例に薬剤投与による体重変化や毒性（副作用）所見は全く認められなかったことから、その途中死亡の原因は薬物の毒性ではなく投与ミスなどのテクニカルエラーによるものと考えられた。本物質のこのような良好な忍容性を伴った著明な薬効は、その移植領域における臨床応用の可能性を示唆するものであると考えられた。

結論として、著者らは本研究において、カビの生産物質として見出した新規 HDAC 阻害剤 FR235222 が、臨床応用可能な新しい免疫抑制剤として更に評価を進めていくに値するものであることを確認した。また著者らは、有効な免疫抑制剤を創出する為の新しい標的分子として HDAC(s) が妥当な対象であることを見極めた。