

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤による関節リウマチの病態解析と治療への展開

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月 入学

医学博士課程

内科学アレルギーリウマチ学専攻

氏名 岡崎 優子

[本研究の背景および目的]

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、関節滑膜を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患である。RA の滑膜組織は炎症性細胞浸潤と滑膜線維芽細胞の増殖を特徴とする。炎症性細胞の浸潤は未知の自己抗原に感作された T 細胞が惹起すると考えられているが、炎症がいったん惹起された後は、マクロファージ系の炎症細胞の活性化が中心となりさまざまな炎症性サイトカインを産生する。産生された炎症性サイトカインに滑膜線維芽細胞が反応して過剰に増殖しその結果生じる増生滑膜組織はパンヌス組織となって、骨・軟骨を破壊する。

現在、RA の治療の中心は疾患修飾性抗リウマチ薬(disease-modifying anti-rheumatic drugs: DMARD)とよばれる一連の薬剤であり、一定の有用性を認めるものの、効果発現まで数ヶ月以上かかること、種々の副作用の合併および有効性の予測が困難なこと、そしてその作用機序が十分に明らかにされていないことなどの問題がある。これに対し、病因となる分子を標的にした治療法の開発が行われつつある。すなわち炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )や interleukin-1(IL-1)などが RA における関節破壊に関連する各種炎症性メディエーターの発現調節に重要であることが明らかにされ、それらのサイトカインを標的にした生物学的製剤が開発されその有効性が示されている。

Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) は RA に関連する炎症性サイトカインの産生と機能を調節する重要な転写因子のひとつであり、RA の治療標的として注目されている。NF- $\kappa$ B は N 末端側に Rel homology domain(RHD)とよばれる構造を有する Rel family に属する転写因子であり、リンパ球、滑膜細胞を含む関節滑膜周囲のほとんどの細胞に存在し、無刺激時にはその阻害タンパクである I $\kappa$ B(Inhibitor of  $\kappa$ B)と複合体を形成して、細胞質にとどまっている。TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの細胞外刺激により

リン酸化された I $\kappa$ B はユビキチン化された後プロテアソームにより分解されるため、NF- $\kappa$ B は I $\kappa$ B から解離して核内へ移行し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着因子などの標的遺伝子の転写を促進する。NF- $\kappa$ B の活性化に必須の I $\kappa$ B のリン酸化は I $\kappa$ B kinase(IKK)複合体により行われる。IKK 複合体はキナーゼ活性をもつ IKK- $\alpha$  と IKK- $\beta$  の他、制御蛋白質である IKK $\gamma$  の少なくとも 3 種類のサブユニットから構成されている。TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性刺激による NF- $\kappa$ B の活性化には IKK- $\beta$  が重要であることが明らかにされている。

RA の治療に現在使用されている薬剤の中で、アスピリン、サリチル酸、金製剤、スルファサラジン、メトトレキサートが IKK を阻害することにより NF- $\kappa$ B 活性を抑制すると報告されている。さらに、NF- $\kappa$ B 阻害療法の有効性は関節炎モデルでも証明されている。このことから、NF- $\kappa$ B を標的とする治療法が RA の治療戦略として有力であると予想される。

従来の創薬研究は、天然化合物あるいは合成化合物のライブラリーの中から、標的とする生体高分子の活性に影響を与える化合物をランダムスクリーニングする方法が一般的であったが、高速ランダムスクリーニング法を採用しても、時間と労力を要する効率性の問題があった。これに対し、創薬ターゲットの立体構造に基づき、コンピュータを用いて標的分子に作用する薬剤分子をデザインし、創薬の効率化、成功率の向上を目指す論理的分子設計法が試行されつつある。

本研究では、コンピュータによる論理的分子設計に基づき IKK- $\beta$  阻害薬として設計された化合物の一群からスクリーニングにより最有力候補薬剤として IMD-0560 を選択し、*in vitro* の系で RA の培養滑膜細胞の機能に及ぼす影響と、*in vivo* のマウスコラーゲン誘発性関節炎(CIA)モデルにおける効果を評価し、新たな抗リウマチ薬としての IMD-0560 の役割を検討した。

## [方法]

コンピュータによる論理的分子設計に基づき IKK- $\beta$  阻害薬として設計された 15 種類の薬剤から、*in vitro* で RA 培養滑膜細胞でのサイトカイン産生を低濃度で抑制し、またマウス関節炎モデルにて関節炎を特に強く抑制する薬剤として新しい低分子化合物である IMD-0560 を選択した。

IMD-0560 の存在下で滑膜細胞を TNF- $\alpha$  にて刺激し、培養上清中に遊離される炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8、MCP-1)の量を ELISA 法にて測定した。また、滑膜の増殖に与える影響を BrdU の取り込み抑制の程度により検討した。RA 培養滑膜細胞の NF- $\kappa$ B 活性に与える IMD-0560 の効果を Gel shift assay にて評価した。また、

RA 培養滑膜細胞にて NF- $\kappa$ B の上流のキナーゼである IKK の活性に与える IMD-0560 の影響を Western blotting、In vitro kinase assay にて測定した。

また、コラーゲン誘発性関節炎に与える IMD-0560 の効果を検討するために、オスの DBA/1J マウスを complete Freund's adjuvant とともに bovine type II collagen で免疫し、3 週後に incomplete Freund's adjuvant と bovine type II collagen で追加免疫し、コラーゲン誘発性関節炎を誘導した。IMD-0560 を予防的に第一回免疫時より 48 時間おきに腹腔投与した。第二回免疫後、関節炎発症率、関節炎スコア(発赤、腫脹、変形)を測定し、病理学的検討を行った。

#### [結果]

*In vitro* における RA 培養滑膜細胞での炎症性サイトカイン産生の優れた抑制効果により選択した IMD-0560 は、IL-6、IL-8、MCP-1 の産生を濃度依存的に抑制し、Gel shift assay の検討により濃度依存性に NF- $\kappa$ B の DNA への結合を抑制し、NF- $\kappa$ B 活性に対する直接的な効果を有することを確認した。

IMD-0560 の I $\kappa$ B の発現に対する影響を測定する Western blotting の検討の結果、IMD-0560 非存在下では TNF- $\alpha$  刺激により I $\kappa$ B $\alpha$  が 10 分以内に分解され、60 分後に再び出現するのに対し、10 $\mu$ M の IMD-0560 により I $\kappa$ B $\alpha$  の分解は完全に抑制された。また、免疫沈降した IKK 複合体を用いた In vitro kinase assay では、IMD-0560 処理により濃度依存性に GST-I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が抑制され、滑膜細胞の IKK 活性が低下した。Reporter gene assay の結果 IMD-0560 が IC<sub>50</sub> として 0.25 $\mu$ M 以下の低濃度で IKK- $\beta$  活性を抑制することを認めた。IMD-0560 は RA 滑膜細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。また、細胞周期解析では、滑膜細胞の増殖は G0/G1 期から S 期への進行が抑制されていることが判明した。

マウスコラーゲン誘発性関節炎に与える影響をみると、IMD-0560 は関節炎の発症率、関節炎の重症度ともに濃度依存性に抑制し、膝関節の病理学的検討より得られた病理スコアと関節炎スコアは有意な相関があり、IMD-0560 投与群では病理学的にも有意な改善を認めた。

## [考察]

本研究では、コンピュータによる分子設計により IKK- $\beta$ の ATP 結合部位に競合阻害しうる化合物の中から選択された低分子化合物 IMD-0560 が、RA の治療薬としての可能性があるかどうかを検討した。

滑膜細胞では TNF- $\alpha$ 刺激により亢進している IL-6、IL-8、MCP-1 の産生が IMD-0560 投与により濃度依存性に抑制され、IC<sub>50</sub> は 10 $\mu$ M 未満であることが確認された。RA 滑膜細胞における TNF- $\alpha$ から NF- $\kappa$ B へのシグナル伝達経路への影響については、IMD-0560 が滑膜細胞における NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を抑制することが示された。すなわち IMD-0560 のサイトカイン産生抑制の効果は、NF- $\kappa$ B の活性を直接抑制する機序によることが示唆された。

I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化とそれに続く分解が NF- $\kappa$ B の核内への移行に必須であり、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化は IKK によって制御されていることが報告されている。TNF- $\alpha$ 刺激による細胞内 IKK 活性と I $\kappa$ B $\alpha$ の分解は 10 $\mu$ M の IMD-0560 によって完全にブロックされた。このことから IMD-0560 の効果は TNF- $\alpha$ から IKK へのシグナル伝達経路を標的としていることが示唆された。

IKK- $\beta$ 阻害薬として創薬された IMD-0560 は、IKK- $\beta$ から NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路を低濃度で抑制していたが、キナーゼプロファイリングでは MAP kinase 系のシグナル伝達経路も 10 $\mu$ M の IMD-0560 により 50%以上抑制されることが判明した。したがって、IMD-0560 は IKK- $\beta$ に特異的に作用する薬剤ではなく、MAP kinase 系やさらに上流にある他のキナーゼなどを抑制している可能性も考えられた。

*In vivo* のマウスコラーゲン誘発性関節炎モデルの系において、IMD-0560 が濃度依存性に関節炎発症率、重症度ともに改善したことから、抗リウマチ薬として有効である可能性が示唆された。

## [結語]

本研究では、IMD-0560 が RA 滑膜細胞において NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路を抑制することが確認された。IMD-0560 の RA に対する治療効果が期待できる機序として IKK- $\beta$ の抑制が関与していると考えられた。また IMD-0560 はコラーゲン誘発性関節炎に対して非常に有効であり、臨床的有効性が示唆された。IMD-0560 が選択的な IKK- $\beta$ 阻害剤ではないことが判明したが、IKK- $\beta$ の結晶構造が解明されれば、論理的分子設計による創薬技術により、より特異的で強力な阻害剤の開発が可能になると考える。以上より、RA の新しい治療薬の開発に論理的分子設計による創薬が今後一層期待できると考える。