

## 論文の内容の要旨

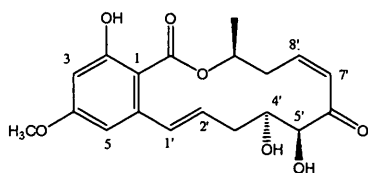
論文題目 MAPキナーゼ系を標的とした抗炎症物質の探索

氏名 大堀 誠

グルココルチコイド/GR複合体はAP-1活性化を抑制し、炎症関連遺伝子の発現を阻害することで強力な免疫抑制・抗炎症作用をもたらす一方、グルココルチコイド応答配列(GRE)に結合することでエネルギー代謝などに関わる遺伝子発現を亢進させ重篤な副作用を惹起すると考えられている。AP-1 選択的阻害物質は、この副作用を回避しつつ強力な抗炎症作用を発揮する画期的な抗炎症薬になり得ると考え、研究を開始した。

AP-1 及び GR 応答配列制御レポータージーンアッセイを用いたハイスループットスクリーニングの結果、AP-1 選択的阻害物質 FR148083 を見出し(表1)、それが慢性関節リウマチ(RA)モデルであるマウスコラーゲン関節炎(CIA)及び CII 誘導性遅延型過敏反応において抗炎症作用を発揮することを示した(図1)。

表1 AP-1 選択的阻害物質 FR148083



	AP-1阻害 IC <sub>50</sub> (nM)	GRE活性化 EC <sub>50</sub> (nM)
FR148083	6.1	>1000
methylprednisolone	0.1	1.1

次に標的分子探索を実施し、FR148083 が ERK2、MEK1、MKK7 といった複数の MAPK 系キナーゼ分子を標的とすることで AP-1 を阻害することを示し(図 2a)、更に FR148083/ERK2 複合体 X 線構造解析を実施して、FR148083 8' 位炭素と ERK2 Cys166 S $\gamma$  との共有結合など、その相互作用パターンを明らかにした(図 3)。また、ERK2 結晶構造及び誘導体の構造活性相関から FR148083 は ATP 結合サイトを認識して錯体構造を形成した後に、ERK2 Cys166 と共有結合するという標的認

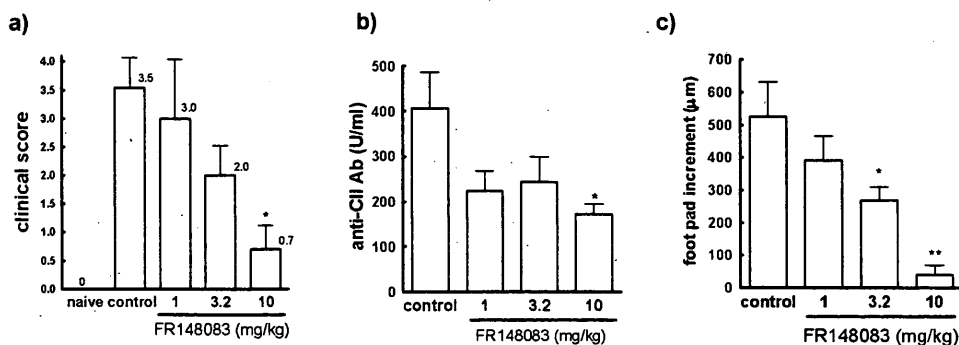


図1 FR148083の動物モデル評価

a) CIA 臨床関節炎スコア、及び b) CIA 血漿中抗 CII 抗体価、は Day12 に測定した。vehicle control (0.1% MC) または FR148083 を Day 0 から Day 12 まで、一日二回投与した。データは平均値±SEM で示した(n=10)。関節炎スコアについて各群の平均値をグラフ上に示した。c) CII 誘導性 DTH 足趾厚。CII/PBS 接種 24 時間後の足趾厚を測定した。薬剤または vehicle は CII 接種の 10 分前、8 時間後に投与した。データは平均値±SEM で示した(n=7-8)。\* 及び \*\*: control 群と比較して  $P < 0.05$  及び  $P < 0.01$ 。

識機構を明らかにした。更に種々キナーゼの Cys166 近傍配列のアラインメントの結果から、FR148083 の標的分子は共通して KXCDFG 配列を有し、そのシステインとの共有結合が FR148083 の標的選択性に重要であることが示唆された(図 3)。

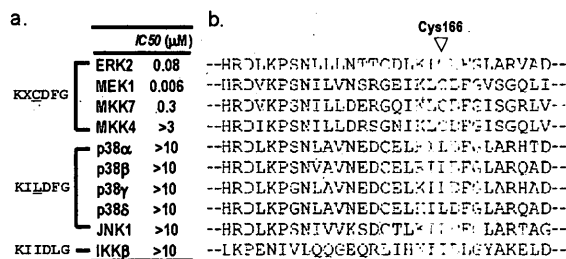


図2 FR148083のキナーゼ阻害活性と共通配列 KXCDFG

a)FR148083キナーゼ阻害作用。b)アミノ酸配列アラインメント。共通配列 KXCDFG 及びその相当配列を緑色網掛けで強調した。

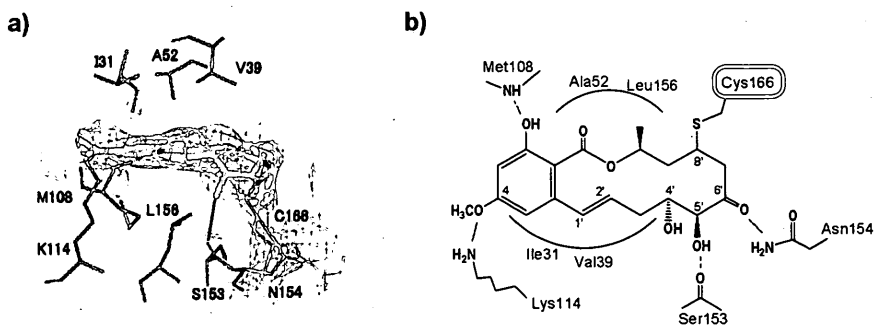


図3 FR148083/ERK2複合体 X線結晶解析

FR148083/ERK2 複合体 X線結晶解析 (accession number: 2E14)。a) FR148083/ERK2 相互作用部位。FR148083 分子を水色で、蛋白質炭素原子をグレーで、酸素原子を赤で、窒素原子を青で、硫黄原子を黄色で示した。水素結合を緑線で示した。オレンジ色格子は FR148083 と Cys166 の電子密度マップである。b) 相互作用パターン。

FR148083 の標的分子である ERK は FR148083 が抗炎症作用を発揮する上で重要な標的分子であると考えられた。ELISA を用いた ERK 阻害活性評価系を構築し、そのハイスループットスクリーニングの結果見出された FR180204 は、ERK 経路シグナル伝達及び AP-1 活性化を選択的に阻害する新規 ERK 阻害物質であった (図 4)。FR180204 がマウス CIA の発症ならびに CII 反応性 T 細胞の活性化を抑制することから (図 5)、ERK がマウス CIA の病態成立に重要な役割を果たしていること、更には抗炎症薬や RA 薬物治療の標的として ERK が有望であることを示唆された。

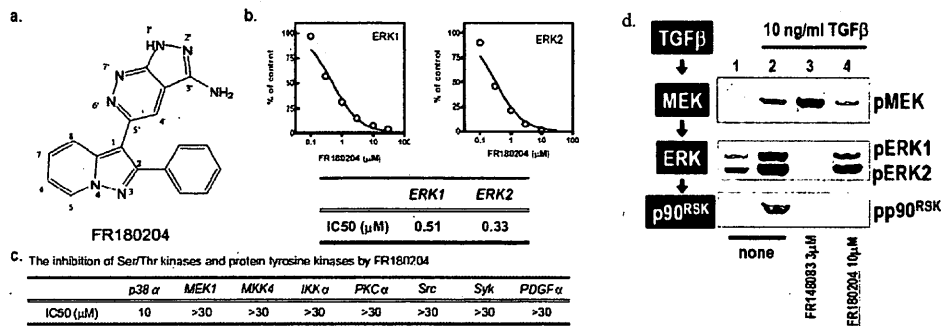


図 4 FR180204 の ERK 選択的阻害活性

a) FR180204 の化学構造。b) ERK に対する用量阻害曲線および IC<sub>50</sub> 値。vehicle (0.1% DMSO) 添加時及びキナーゼ非添加時の MBP リン酸化をそれぞれ 0%、100% 阻害として計算した。c) FR180204 の特異性検討。d) 各阻害物質で処理した Mv1Lu 細胞に TGF $\beta$  を添加し、10 分間後 ERK 経路蛋白質のリン酸化レベルを測定した。

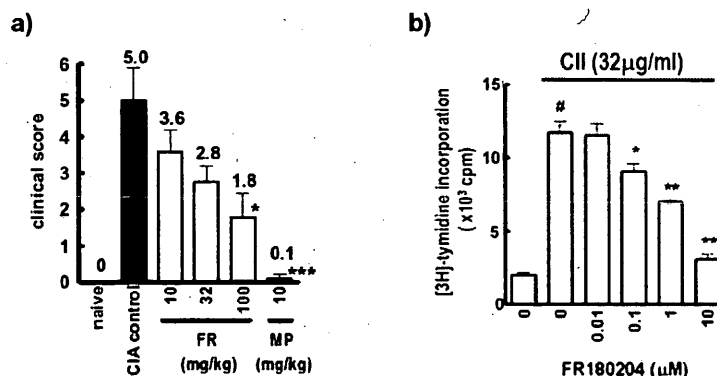


図 5 FR180204 のマウス CIA 及び CII 反応性 T 細胞増殖に対する有効性

a) マウス CIA 臨床関節炎スコア。Vehicle(0.1% MC)、FR180204(FR)、またはメチルプレドニゾン(MP)は Day0 から Day12 まで、一日二回投与した。データは平均値  $\pm$  SEM で示した ( $n=9-12$ )。臨床スコア及び抗 CII 抗体価について各群の平均値をグラフ上に示した b) CII 反応性 T 細胞増殖。CII 免疫マウスのリンパ節細胞に CII を添加し [3H]チミジン取り込みを誘導した。白およびグレー棒はそれぞれ CII 刺激無し、有りを示す。データは平均値  $\pm$  SEM で示した ( $n=3$ )。b) ConA 刺激 IL-2 産生。データは平均値  $\pm$  SEM で示した ( $n=3$ )。#:naive もしくは CII 非添加群と比較して  $P<0.001$ ; \* 及び \*\*: control 群と比較して  $P<0.05$  及び  $P<0.01$ 。

次に FR180204/ERK2 複合体 X 線構造解析を実施して、FR180204 が ERK2 ATP 結合サイトに図 6 の相互作用様式で結合することを明らかにした。また p38  $\alpha$  との配列アラインメント、複合体構造解析、及び 3 位誘導体の ERK 阻害活性測定 (表 2) を実施し、ERK Gln105、Asp106 と 3 位アミノ基との水素結合が活性並びに選択性発現に重要であることを示した。更に、FR296110/ERK2 複合

体結晶構造解析を実施して、ERK2 グリシンリッチループおよび Met108 主鎖カルボニル基が柔軟性に富む構造であること、それらの移動に伴って疎水性サブサイトが形成され、1 位誘導体の活性に影響を及ぼすことを示した(図 7)。

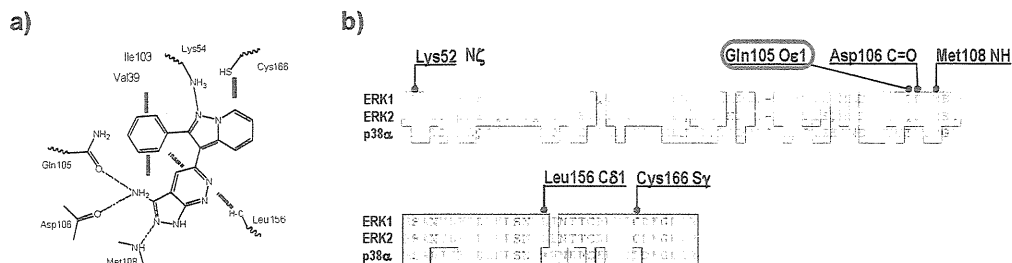
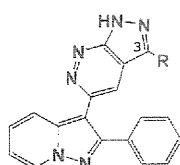


図 6 ERK2/FR180204 相互作用解析

a)FR180204/ERK2 複合体 X 線解析結果に基づく相互作用パターン。水素結合:Met108NH, Lys54 N $\zeta$ , Gln105O $\epsilon$ 1, Asp106C=O, CH 及び SH- $\pi$  結合:Leu156, Cys166 疎水性サブサイトとの相互作用:Val39, Ile103。b) ERK 及び p38  $\alpha$  アミノ酸配列アラインメント。FR180204/ERK2 相互作用部位を图示した。

表 2 FR180204 3 位誘導体の ERK2 阻害活性



Compound	R	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
		ERK1	ERK2
FR180204	NH <sub>2</sub>	0.51	0.33
FR180289	OH	>10	>10

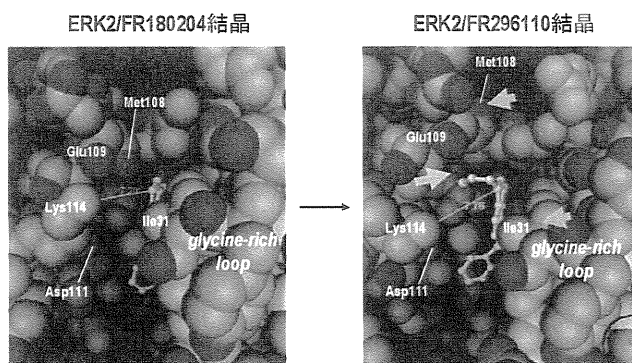


図 7 FR296110 によって誘導されるコンフォメーション変化と疎水性サブサイト

FR180204/ERK2 (1TVO)およびFR296110/ERK2 (1WZY)のATP結合サイト近傍を示した。化合物を黄色、蛋白質酸素原子を赤、窒素原子を青、炭素原子をグレーで示す。FR296110 /ERK2 ではグリシンリッチループの移動(ピンク矢印)、Met108 カルボニル基のフリップ(緑矢印)、疎水性サブサイトの形成(オレンジ矢印)が起きていることがわかる。

以上のように、MAPK 系を標的とした AP-1 阻害物質 FR148083 及び FR180204 が抗炎症作用を有し、RA 治療薬としても有望であることが示された。X 線結晶解析で明らかになった標的蛋白質との複合体構造は、その後の創薬方針を決定する上で有用な情報をもたらした。今回得られた知見が RA をはじめとする炎症性疾患の治療に役立つことを期待する。