

論文内容の要旨

論文題目 IKK シグナルの活性化メカニズム解明と創薬への応用研究

氏名 後藤 祐輔

【序論】

現在国内において、関節リウマチに悩む患者は 70–100 万人と言われており、今後高齢化社会が進むにつれてその数はさらに増加すると考えられている。関節リウマチに対しては、これまで根治療法はみつかっておらず、関節リウマチの治療で重要なのは、関節の破壊を食い止めることである。その治療の標的として、炎症性サイトカインにより活性化される IKK/NF- κ B シグナルが注目されている。私は、リン酸化酵素 PKN1 による同シグナルの活性調節機構の解明と、IKK β と NEMO の結合阻害を標的とした新規創薬システムの構築という2つのアプローチにより、関節リウマチ等の炎症性疾患の治療に貢献することを目指し、本研究を行った。

I. PKN1 の TRAF/IKK/NF- κ B シグナルへの関与

【目的】

PKN1 は C 末端側に PKC ファミリーと相同性の高い触媒領域を有するセリン/スレオニンキナーゼである。生体内で PKN1 は多くの組織で発現が認められるが、特に胸腺・脾臓といった免疫系組織に発現が多い。近年我々は PKN1 の新規結合因子として TRAF2 を同定したが、両者の結合の生理的意義は不明である。TRAF2 は TNF 受容体ファミリーの下流で IKK/NF- κ B 活性化を仲介する鍵分子である。また IKK/NF- κ B 活性化は炎症反応を惹起することから、炎症性疾患の創薬における重要な標的である。従って、TRAF/IKK/NF- κ B の活性化機構を明らかにすることは、炎症性疾患治療薬の開発において重要な知見となる。そこで私は、PKN1 による TRAF/IKK/NF- κ B シグナルの活

性調節機構を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

(1) PKN1 と TRAF2 の結合

HEK293T 細胞内での PKN1 と TRAF2 の結合を観察した結果、両者の結合が認められた。また *in vitro* で PKN1 は TRAF2 の C 末側と直接結合することが分かった。さらに、PKN1 はアミノ酸番号 580-584 に TRAF2 の結合因子がもつ共通アミノ酸配列を有しており、PKN1 はこの領域を介して TRAF2 と結合することが分かった。

(2) PKN1 のノックダウンによる IKK/NF- κ B の基礎活性亢進

HeLa 細胞において、PKN1 のノックダウンにより IKK/NF- κ B の基礎活性の亢進が認められたことから、PKN1 は IKK 及び NF- κ B の活性を制御する機能を持つ可能性が示唆された。

(3) PKN1 による TRAF1 のリン酸化

これまでに PKN1 は TRAF2 以外に TRAF1、3、5、6 と結合することが分かっている。そこで TRAF 蛋白が PKN1 によりリン酸化されるかどうかを検討した結果、PKN1 は TRAF1 の 139 番目のセリンをリン酸化することがわかった。また HeLa 細胞内で TRAF1 が恒常的にリン酸化されていること、PKN1 のノックダウンにより TRAF1 のリン酸化が抑制されることが分かった。

(4) TRAF1 の IKK 活性抑制作用と PKN1 によるリン酸化

TRAF1 のノックアウトマウスの解析から、TRAF1 のノックアウトにより IKK 基礎活性が亢進し、TRAF1 は TNF α 刺激による IKK/NF- κ B 活性を抑制することが知られている。この作用における PKN1 による TRAF1 のリン酸化の関与を検討した結果、TRAF1 による IKK 活性抑制作用には 139 番目のセリンのリン酸化が必須であることが分かった。つまり、TRAF1 は PKN1 にリン酸化されることで、IKK 活性を抑制していると推測される。

(5) PKN1 による TRAF1/TRAF2 と TNFR2 の結合調節

これまでに TNF α 刺激による IKK/NF- κ B の活性化において、TRAF1 は負の因子、TRAF2 は正の因子として機能することが分かっている。そこで PKN1 による TRAF1 と TNFR2 の結合への影響を観察した結果、TRAF1 と TNFR2 の結合は PKN1 による TRAF1 のリン酸化に依存することが分かった。さらに、TRAF2 との関連を検討した結果、PKN1 による TRAF1 のリン酸化が起らない場合、TRAF1 と TNFR2 の結合は減弱し、TRAF2 と TNFR2 の結合が増強することがわかった。

【小括】

本研究で私は、PKN1 は TRAF1 をリン酸化し、TNFR2 との結合を促進することで、TNFR2 下流の IKK/NF- κ B の活性化を抑制すること、PKN1 による TRAF1 のリン酸化が起らない場合、TRAF1 と TNFR2 の結合は減弱し、TRAF2 と TNFR2 の結合が増強することで、IKK/NF- κ B の活性化が起こることを明らかとした。つまり PKN1 は TRAF1 をリン酸化し IKK/NF- κ B の恒常的活性化を抑制するこ

とで、過剰な炎症反応を抑制していると考えられる。以上、本研究から得られた知見はリウマチ等の慢性的な炎症疾患の病態理解において重要な知見であると言える。

II. IKK β -NEMO の結合阻害を指標とした新規 IKK 阻害薬のスクリーニングシステムの開発

【目的】

サイトカインにより活性化される IKK/NF- κ B は、リウマチ病態の炎症反応で中核的な役割を担っている。特に IKK β は抗リウマチ薬の開発において重要な標的分子であるが、IKK β のキナーゼ活性阻害薬として臨床試験入りしている化合物は少ない。一方、IKK β が機能を発揮するには NEMO との結合が必須であり、両者の結合を阻害する NBD peptide が種々刺激による IKK β /NF- κ B の活性化を抑制することが報告されている。そこで私は、両者の結合を阻害する低分子化合物を探索するために、ハイスループットスクリーニング (HTS) に適した新規スクリーニングシステムの開発を目指した。

【方法・結果】

(1) HTRF 法を応用した IKK β -NEMO 結合測定法

私は IKK β と NEMO の結合を阻害する化合物を高速かつ高効率で探索するために、HTS に適した HTRF 法を応用した新規スクリーニング方法を開発した。本方法では IKK β -FLAG の濃度依存的にシグナルは増加し高い S/B 比が得られ、NBD peptide は濃度依存的な阻害作用を示した。従って本方法は S/B 比が高い点、低容量かつ高密度プレートが使用可能、洗浄操作が不要な点、NBD peptide の阻害作用が観察される点から、HTS に適した方法である。

(2) ELISA 法を応用した IKK β -NEMO 結合測定法

HTRF 法を用いて HTS を実施した場合、自家蛍光を持つ化合物等が偽陽性化合物となる可能性がある。それらを除くため、洗浄操作を含む ELISA 法を応用した結合測定系を開発した。本方法では、固層化した IKK β -FLAG に種々濃度の His-NEMO(1-265)を添加すると、濃度依存的にシグナルは増加し高い S/B 比が得られ、NBD peptide は濃度依存的な阻害作用を示した。従って本方法は S/B 比が非常に高く、NBD peptide の阻害作用が観察され、化合物自身の影響を受けない方法であることから、HTRF 法で得られた陽性化合物から偽陽性化合物を除くことが可能なアッセイ系である。

(3) IKK complex を用いたキナーゼ活性測定法

両者の結合を阻害する化合物が、酵素活性を阻害するかを検討するために、精製 IKK complex を用いたキナーゼ活性測定系を構築した。本方法では時間依存的に反応が進行し、高い S/B 比が得られ、NBD peptide は濃度依存的な阻害作用を示した。このことは NBD peptide がすでに結合している両者を解離することで酵素活性を阻害することを示している。従って、本方法により、結合阻害作用のある陽性化合物の IKK complex に対する酵素阻害作用を評価できることが示された。

(4) IKK β -NEMO の結合阻害を指標とした HTS

約 15000 検体の化合物を対象として HTRF 法を用いた HTS を実施し、11 種の陽性化合物を得た。

次に 11 化合物について ELISA 法を実施した結果 8 化合物が陽性となった。陰性となった 3 化合物は HTRF 法における何らかの偽陽性化合物であったと推測される。陽性 8 化合物について IKK complex の酵素活性に対する阻害作用を評価したところ、7 化合物が陽性となった。これら 7 化合物は IKK complex として結合している両者を解離することで酵素活性を阻害する化合物であり、強力な IKK 阻害薬になると期待される。一方、陰性となった 1 化合物は、両者の結合を阻害する作用はあるが、すでに結合している両者を解離できないと考えられる。

【小括】

本研究において私は、HTRF 法に着目し、高速かつ高感度な IKK β -NEMO 結合阻害化合物探索を実現し、ELISA 法を応用した結合測定法や IKK complex を用いたキナーゼ活性測定法を組み合わせることで、効率的なスクリーニングシステムを構築した。今後、陽性であった 7 化合物の更なる解析を通して、新規 IKK 阻害薬の開発を推進したい。

【総括】

以上の研究により私は、PKN1 による IKK/NF- κ B 活性の新規調節機構の一端を明らかとし、PKN1 がリウマチ等の炎症性疾患の病態における IKK 異常活性化に関与する可能性を示した。また創薬の観点から、IKK β -NEMO の結合阻害を指標とした新規スクリーニングシステムを構築した。IKK は炎症性疾患や癌疾患の標的分子として重要であり、本研究より得られた知見及び創薬方法は、今後これらの疾患理解や治療において重要な報告となると考えている。