

論文の内容の要旨

論文題目 血小板活性化因子生合成酵素 (LPCAT2) 阻害剤の探索

氏名 垂井 愛

血小板活性化因子 (platelet-activating factor : PAF) は、1972 年にウサギ好塩基球由来の血小板凝集因子として発見された強力な生理活性リン脂質である。PAF は、私の所属研究室でクローニングに成功した G タンパク質共役型の PAF 受容体を介して作用する。喘息やアナフィラキシーショックを含むアレルギー疾患や急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome : ARDS)、敗血症、自己免疫疾患など様々な疾患に関与することが知られている。特に一部の疾患では、患者の血清 PAF 濃度の上昇とともに、PAF 分解酵素である PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) の活性低下も認められている。

生体の細胞膜を構成するグリセリン脂質は、*de novo* 経路 (ケネディ経路) で生合成され、リモデリング経路 (ランズ回路) で成熟する。ランズ回路では、一度合成されたリン脂質がホスホリパーゼ A₂ の作用でリゾリン脂質となる。これがリゾリン脂質アシル転移酵素の作用で再び組織に特有な成熟型リン脂質になる。PAF は、このうちのリゾリン脂質の一種であるリゾ PAF から、リゾ PAF アセチル転移酵素によって生合成される。この生合成経路により、PAF は細胞外刺激に応じて急激に産生され、産生された PAF は、PAF-AH の作用によって速やかにリゾ PAF に分解される。

これまで、リゾ PAF アセチル転移酵素 (PAF 生合成酵素) は 2 種類発見され、共に、私の所属研究室で 2007 年 (LPCAT2)、2008 年 (LPCAT1) に報告された。2 つのリゾ PAF アセチル転移酵素はともに、リゾリン脂質アシル転移酵素 (リン脂質生合成酵素) グループに属した。

LPCAT1 は肺胞 II 型上皮細胞に多く発現し、出生前に誘導される。PAF の他に **dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)** もよく生合成し、これは肺サーファクタント全体の 40% 近くを占める主成分と知られている。この DPPC は肺の表面張力を低下させ、肺胞構造を保つことで呼吸に必須である。LPCAT2 は、マクロファージや好中球といった炎症性細胞に多く発現しており、PAF だけでなく細胞膜構成成分であるアルキル PC や PC も生合成する。以上の他に両者には大きな違いがある。LPCAT2

は、細菌の持つ内毒素、リポ多糖 (LPS) による Toll 様受容体 4 (TLR4) の活性化を介し、長時間 (16 h) で発現誘導される。短時間 (30 min) では p38 MAP キナーゼ/MK2 を介しリン酸化 (活性化) される。一方で LPCAT1 は、同様の Toll 様受容体刺激では発現誘導も活性化もされない。つまり、LPCAT1 は出生後は恒常的に働く酵素であり、LPCAT2 は誘導型かつ活性調節型の酵素である。これらの関係は、アラキドン酸からプロスタグランジン H₂ を生合成するシクロオキシゲナーゼ (COX)-1 (恒常型) と COX-2 (誘導型) の関係と類似している。

前述したように、炎症性メディエーターである PAF は、喘息や ARDS、敗血症など多くの関連疾患が知られている。PAF 受容体の同定以降、新薬開発を目指して多くの PAF 受容体拮抗薬の研究が行われた。しかし、効果が不十分なものや、高容量で PAF 類似の副作用を示すものなどがあり、現段階では実用化に至っていない。そこで視点を変え、合成酵素阻害剤、特に炎症時に働く LPCAT2 のみの阻害剤の発見により、副作用の少ない治療薬開発を考えた。

今回、東京大学創薬オープンイノベーションセンター内の化合物ライブラリーのうち、利用可能な 17 万 4 千化合物全てをスクリーニング対象とした。これらはすべて、DMSO に溶解保存されたストック溶液にて提供された。スクリーニング I ; High-throughput screening 法として、7-diethylamino-3-(4'-maleimidyl-phenyl)-4-methylcoumarin (CPM) によるチオール定量法を採用し、スクリーニングを開始した (図 2)。LPCAT2 の作用により、リゾ PAF と acetyl-CoA から PAF が産生される (図 1 主活性 a)。その際に副産物として遊離する CoA-SH のチオール基に、チオール反応性蛍光発色試薬である CPM を反応させる。350 nm の波長で励起し、450 nm の蛍光測定することにより、定量を行った。酵素は、ヒト型遺伝子の LPCAT2 を、チャイニーズハムスター卵巣由来である CHO 細胞の亜種、CHO-S (浮遊系) に強制発現させ、得られた膜画分を用いた。384 ウェルプレート上で、20 μM の化合物 0.6 nl に 15 mg/ml の膜画分 (3 μl, 45 ng) と 5 μM リゾ PAF、25 μM acetyl-CoA を添加し室温で 30 分反応させた後、5 μM CPM を添加、2 時間後に測定した。その結果、約 1.1% の 1,941 化合物が 1 次ヒットとして得られた。スクリーニング II -1; このうち、重複化合物および欠品を除いた 1,794 化合物について、化合物の消光作用などによる偽陽性を除外するため、高精度で反応産物の測定が可能な LC-MS/MS による酵素活性の定量を施行した。LC-MS/MS 測定では、基質の一つであるリゾ PAF に重水素ラベルがされたものを使用し、反応産物の重水素ラベルされた PAF を測定した。反応は、96 ウェルプレート上で 20 μM の化合物 600 nl と 5 mg/ml の膜画分 (30 μl, 150 ng)、5 μM のリゾ PAF、250 μM

acetyl-CoA を用いて行い、室温で 20 分反応させた後、測定した(図 1 主活性 a)。阻害率 45%以上を示した 617 化合物がヒットした。スクリーニング II -2;次に、ヒト(h)LPCAT1 の膜画分を使用し、酵素選択性のある化合物を探索した。hLPCAT1 の PAF 生合成反応(図 1 活性 b)と、DPPC 生合成反応(図 1 活性 c)を阻害しない化合物を LC-MS/MS で検出した。阻害率 20%未満となる化合物を抽出した結果、32 個の酵素選択性のある化合物が見つかった。スクリーニング II -3;さらに、hLPCAT2 の PAF(図 1 主活性 a)および alkyl-PC 生合成(図 1 活性 d)、hLPCAT1 の PAF(図 1 活性 b)および DPPC 生合成反応(図 1 活性 c)それぞれに対する阻害効果と化合物の濃度依存性を調べた。

その結果、hLPCAT1 には作用せず、hLPCAT2 に選択性のある化合物を 2 群、発見した。ひとつは、hLPCAT2 の活性のうち、PAF 生合成活性(図 1 主活性 a)のみを阻害する化合物群 I である。hLPCAT2 による alkyl-PC 生合成(図 1 活性 d)を阻害する作用は有意に弱く、hLPCAT2 の PAF 生合成に選択性をもった阻害効果を示した。化合物群 I には 2 化合物、MMI-12、MMI-32 のみが属し、その母核 A は共通であった。もうひとつは LPCAT2 の活性そのものを阻害する化合物群 II である。これは、PAF だけでなく alkyl-PC 生合成活性(図 1 活性 a と d)も同時に阻害し、両者の阻害率には差が認められなかった。化合物群 II には 22 化合物が属した。

スクリーニング II -4;次に、0.4% BSA 添加下で hLPCAT2 の PAF 生合成(図 1 主活性 A)阻害作用を調べた。化合物群 I の 2 化合物、II のうち 11 化合物は、BSA 存在下でも hLPCAT2 の PAF 生合成阻害作用が認められた。スクリーニング III;さらに、これらの化合物の細胞毒性を調べた。マウスのマクロファージ系の培養細胞である RAW264.7 細胞に、化合物を 0-20 μM 添加し、36 時間後に Cell Counting Kit-8(Dojindo)を用いて吸光度を測定した。化合物群 I の 2 化合物、II のうち 8 化合物には明らかな細胞毒性は認められなかった。この II 群の 8 個のうち、2 つは同じ母核 B を、5 化合物は類似の骨格 C を有していた。これらの化合物は全てマウス(m)LPCAT2 の活性も阻害することを確認した。

スクリーニング IV;次に、これらの阻害剤を用いて、細胞 PAF 測定を行った。mLPCAT2 を恒常的に発現させた RAW264.7 細胞に 0-50 μM の化合物を添加し、1 時間後にカルシウムイオノフォアである A23187(最終濃度 5 μM)で 5 分間刺激し、PAF およびリゾ PAF をメタノールで抽出した。II 群の 8 化合物すべてにおいて、細胞内 PAF 生合成阻害作用をみることはできなかった。

I 群の 2 化合物、MMI-12、MMI-32 については、粉末にて提供されたものを新たに DMSO に溶解して使用した。両者とも細胞 PAF 濃度の低下がみられ、 IC_{50} は約 25 μM であった。PAF 生合成の基質

であるリゾ PAF の濃度については、MMI-12 は PAF の低下とともに上昇しており、PAF 生合成阻害効果と考えられた。一方 MMI-32 では細胞 PAF 濃度の低下とともにリゾ PAF 濃度が低下しており、リゾ PAF を生合成する cPLA₂ など他の酵素への影響も考えられた。また、粉末にて提供された化合物を用い、酵素および基質の特異性を再度調べたところ、両者とも DMSO ストック溶液を用いたときより、特異性の低下がみられた。しかし IC₅₀ でみると MMI-12 は、hLPCAT2 の活性阻害能は hLPCAT1 に対して約 5 倍、acetyl-CoA の基質特異性は alkyl-PC を生合成する基質であるアラキドノイル CoA に対して約 3 倍は保たれていた。

私の所属研究室で単離した二種類の PAF 生合成酵素 (LPCAT1 と LPCAT2) を用いて、選択的 PAF 生合成酵素阻害剤、MMI-12 を発見した (図 1, 2)。これは、LPCAT2 による細胞内 PAF 生合成活性を抑制することができた。酵素特異性、基質選択性などには、改善の余地があるが、これらをリード化合物として、より副作用の少ない PAF 関連疾患治療薬候補が見つかる可能性がある。また、これらの発見は PAF 関連疾患の治療薬として有望であるだけでなく、LPCAT1 による PAF 生合成の生体内における意義や、炎症時の LPCAT2 による PC 生合成活性化の役割などを、解明する一端も担うことも期待される。

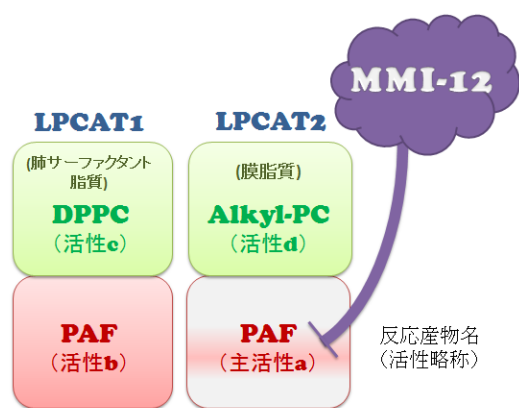


図1. 酵素活性のまとめ

LPCAT1 と LPCAT2 はそれぞれ2種類の活性をもつ。MMI-12 は LPCAT2 による PAF 生合成活性 (主活性 a) を阻害する。

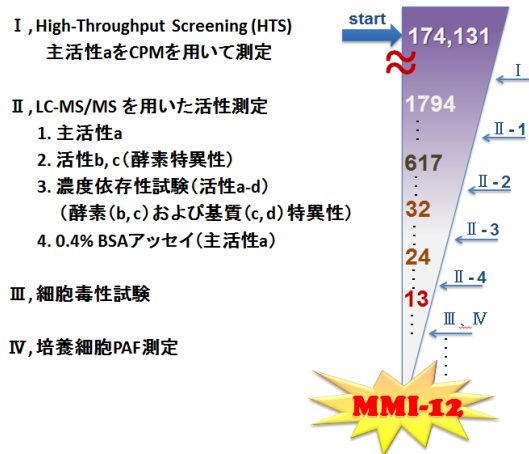


図2. スクリーニングのまとめ

I からIVまでのスクリーニングを行った結果 選択的阻害剤 MMI-12 を得た。活性 a-d は図 1 に図示。