

氏名	やまもと のり ゆき 山本倫行
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第699号
学位授与の日付	平成15年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Development of a selective inhibitor for Syk tyrosine kinase and investigation of its pharmacological activities (Sykチロシン・キナーゼ選択的阻害剤の開発とその薬理学的活性の検討)

論文調査委員 (主査) 教授 河合明彦 教授 川寄敏祐 教授 赤池昭紀

論文内容の要旨

現在の喘息治療薬は、発作時の気道狭窄を改善する吸入ベータ2刺激薬と、疾患原因である慢性気道炎症を治療する吸入ステロイド薬が主流を占めている。後者はその投与目的から、発作発現に関係なく定期的に連用する必要があるが、投与形態の不便さと副作用の不安から患者のコンプライアンスは高くない。従ってより簡便な投与形態である経口投与が可能で、かつ副作用の心配がなく、吸入ステロイド薬と同等の抗炎症作用を示す薬剤が長年切望されている。また抗アレルギー薬に関しては抗ヒスタミン薬を中心に様々な作用機序の薬剤が開発・使用されているものの、その原因である肥満細胞に直接作用して化学伝達物質遊離抑制作用を示す薬剤で著効を示すものはない。Spleen tyrosine kinase (Syk) は、主に白血球の細胞質に存在する非レセプター型のチロシン・キナーゼである。Sykノックアウト・マウスから培養した細胞やSyk欠損細胞を用いた実験により、本分子が種々の炎症性細胞の細胞膜表面に発現する免疫イムノグロブリン・レセプター (FcR) およびB細胞レセプター (BCR) のシグナル伝達において重要な役割を果たしていることが証明されている。特にアレルギー疾患においては、肥満細胞表面の高親和性IgEレセプターであるFcεRIの抗原架橋刺激による細胞活性化に必須であるため、Sykキナーゼの選択的阻害剤は、新たな抗アレルギー薬としての可能性を持つ。更に、IgGレセプター (FcγR) およびBCRのシグナルをも阻害することから、喘息等の過剰液性免疫疾患に対する抗炎症剤としての可能性も考えられる。そこで筆者らはSykに対する選択的阻害剤を探索することを目的として、組換え型ヒトSykタンパク質を用いたhigh throughput screening (HTS) 評価系を確立し、更に細胞での二次評価試験として、ヒト単球系細胞株U937を用いた活性酸素産生試験を確立した。これらの評価系を用いて最終的に、経口活性のあるSykキナーゼ選択的阻害剤BAY 61-3606を見出し、その薬理学的性状を検討した。

(第一章) Sykキナーゼ阻害剤探索のための一次評価試験の確立

一般にキナーゼ活性中心にはアクチベーション・ループと呼ばれる活性調節領域が存在し、この領域内のチロシン残基がリン酸化されるとキナーゼは活性化状態となる。Sykにおいてこれらのチロシン残基は、活性化FcεRIの細胞内部領域に結合した近接するSyk分子によってリン酸化されると考えられている。そこで筆者らは、ATP結合部位に対する阻害剤のみならず、基質認識部位に対する阻害剤をも探索できるスクリーニング系として、Sykのアクチベーション・ループに相当するペプチド基質を用いたSykキナーゼのHTS評価系を確立した。SykキナーゼはcDNAをヒト細胞よりRT-PCR法でクローニングし、バキュロ・ウイルス発現ベクターに組み込み、昆虫細胞にてglutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として発現させた。この酵素は、組換えGST融合タンパク質ではあるものの、その薬理学的性状は、ヒト細胞より免疫沈降したSykとほぼ同一であった。したがって、この酵素を用いて薬物探索を行う妥当性が示された。

(第二章) Sykキナーゼ阻害剤のための細胞評価系の確立

本章ではHTSで検出された化合物のヒト細胞における影響を検討するために、適度な化合物評価処理能力をもつ高次評価系の確立を行った。機能的なFcεRIを発現するヒト細胞株は存在しないことから、筆者らはFcεRI同様にSykの重要性が

証明されている高親和性IgGレセプター (FcγRI) を発現するヒト単球系細胞株U937に着目した。インターフェロン (IFN) -γの処置によりU937細胞は高レベルのFcγRIを発現し, anti-FcγRI/anti-mouse IgGによる架橋刺激で活性酸素を産生した。また架橋刺激に伴いSykはリン酸化された。フォルボールエステルによるCキナーゼ刺激によっても活性酸素は産生されたが, Sykのリン酸化は検出されなかった。更にSykに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチド処置は, Sykタンパク質の発現レベルを低下させ, FcγRI架橋刺激による活性酸素産生のみを抑制したが, フォルボールエステルによるものは抑制しなかった。以上の結果より, IFN-γ処置U937細胞をFcγRI架橋刺激した時の活性酸素産生は, Sykを介して起こることが確認され, Sykキナーゼ阻害剤の細胞での活性検討に適した系であると結論できる。

(第三章) Sykキナーゼ阻害剤のスクリーニングと薬理的性状の検討

前記の二つの評価系を中心としたスクリーニング・カスケードにより, 経口活性のあるSykキナーゼ選択的阻害剤を探索した結果, BAY 61-3606 (2-[7-(3,4-dimethoxy phenyl)-imidazo [1,2-c] pyrimidin-5-ylamino]-nicotinamide dihydrochloride) を得た。BAY 61-3606はKi値, 7.5nMの高活性の阻害剤でATPに競合的であったが, 他のチロシン・キナーゼに対してKi値比較で626倍以上の優れた選択性を示した。これは既にSykキナーゼ選択的阻害剤として広く汎用されているピセアタノール ((E)-4-[2-(3,5-dihydroxyphenyl)-ethenyl] 1,2-benzenediol-3,3',4,5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) の結果を大きく上回るもので, 今後BAY 61-3606を用いることでSykキナーゼの種々の細胞における役割の解明に役立つものと期待される。BAY 61-3606は, FcεRI架橋刺激したラット肥満細胞の脱顆粒を抑制し, 更にヒト培養肥満細胞においては脱顆粒のみならずPGD₂, ロイコトリエン及び顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) の産生を抑制した。このことは, Syk欠損肥満細胞の結果と一致するものである。また, 比較に用いた化学伝達物質遊離抑制薬のクロモグリク酸ナトリウムは, 極めて高濃度で脱顆粒のみ抑制した。さらに, ヒト末梢血リンパ球からの抗IgE抗体刺激によるヒスタミン遊離を, アトピー/非アトピー・ドナー間の大差なくIC50値, 8.1-10nMで抑制したことは, ヒトでの抗アレルギー効果を示唆するものである。また, 単球系細胞および好酸球におけるFcγRシグナル, またB細胞におけるBCRシグナルも同様に抑制したことも以前のSyk欠損細胞の結果と一致した。これらの結果は, Sykタンパク質全体ではなくキナーゼ活性こそが, 上記レセプターからのシグナル伝達に必須であることを証明するものである。更に抗原特異的IgE感作ラットを用いた*in vivo*の評価系で, BAY 61-3606は3 mg/kgの経口投与で, 皮膚の肥満細胞依存的な抗原誘発血管透過性亢進反応を抑制した。また肺においても抗原誘発による浮腫および気道抵抗上昇反応を抑制した。これらの肥満細胞活性化に伴うアレルギー反応抑制効果に加え, 抗原感作・抗原誘発による気道の好酸球性炎症をも抑制した。以上の結果より, BAY 61-3606の新しいタイプの抗アレルギー薬・抗喘息薬としての可能性が示唆され, またSykの気道炎症における重要性が証明された。

論文審査の結果の要旨

現在使用されている喘息治療薬や抗アレルギー薬には, 投与形態の不便さ, 副作用の不安等の点から, より優れた薬物の開発が長年切望されている。この目的に, 申請者は主に白血球に存在する非レセプター型チロシンキナーゼであるSpleen tyrosine kinase (Syk) に着目した。すなわち, Sykは種々の炎症性細胞の細胞膜表面に発現する免疫グロブリン・レセプター (FcR) およびB細胞レセプター (BCR) のシグナル伝達において重要な役割を果たしており, 特にアレルギー疾患においては, 肥満細胞表面の高親和性IgEレセプター (FcεRI) の抗原架橋刺激による細胞活性化にも必須であることから, Sykキナーゼの選択的阻害剤は, 新たな抗アレルギー薬のみならず, 喘息等の過剰液性免疫疾患に対する抗炎症剤としての可能性も考えられる。そこで, 申請者はSykに対する選択的阻害剤の探索を目的として, (1) 組換え型ヒトSykタンパク質を用いたhigh throughput screening (HTS) 評価系を確立し, (2) 二次評価系として, ヒト単球系細胞株U937を用いた活性酸素産生抑制試験法を確立した。さらに, (3) これらの評価系を用いたスクリーニングによりSykキナーゼ選択的阻害剤としてBAY 61-3606を見出し, その薬理的性状を調べた。

(第一章) Sykキナーゼ阻害剤探索のための一次評価試験の確立

一般にキナーゼ活性中心にはアクチベーション・ループと呼ばれる活性調節領域が存在し, この領域内のチロシン残基がリン酸化されて活性化状態となる。Sykのチロシン残基も活性化FcεRIの細胞内部領域に結合した近接するSyk分子によっ

てリン酸化されると考えられている。そこで申請者は、ATP結合部位に対する阻害剤のみならず、基質認識部位に対する阻害剤をも探索できるスクリーニング系の確立を目的として、Sykのアクチベーション・ループに相当するペプチド基質を用いたSykキナーゼのHTS評価系を作成した。用いたSykキナーゼは、ヒト細胞からRT-PCR法によりcDNAのクローニングを行い、バキュロウイルス発現ベクターを用いて、昆虫細胞でglutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として発現させたもので、このGST融合組換えSykは、ヒト細胞から得たSykとほぼ同一の薬理的性状を示したので、これを用いての薬物探索が可能となった。

(第二章) 培養細胞を用いたSykキナーゼ阻害剤評価系の確立

次の段階として、*in vitro*評価系で検出された阻害活性のある化合物がヒト細胞に影響を及ぼすかどうかを調べるために、培養細胞を用いた評価系の確立を行った。

この目的に有用な機能的なFcεRIを発現するヒト肥満細胞株がなかったため、申請者らはSykが関与するもう一つの高親和性IgGレセプター (FcγRI) を発現するヒト単球系細胞株U937を用いた。U937細胞はインターフェロン (IFN) -γで処理すると高レベルのFcγRIを発現し、抗FcγRI抗体による架橋刺激によって活性酸素を産生するようになり、架橋刺激に伴うSykのリン酸化もみられた。一方、フォルボールエステルによるCキナーゼ刺激では活性酸素が産生されたが、Sykのリン酸化はみられなかった。また、アンチセンス・オリゴヌクレオチドによりSykの発現レベルを低下させると、FcγRI架橋刺激による活性酸素産生が大きく低下したが、フォルボールエステルによる活性酸素産生には影響がなかった。以上から、IFN-γ処置U937細胞をFcγRI架橋刺激した時に見られる活性酸素産生はSykを介して起こることが確認され、Sykキナーゼ阻害剤の探索にも利用できることが示された。

(第三章) Sykキナーゼ阻害剤のスクリーニングと薬理的性状の検討

上記の二つの評価系をスクリーニングに用いて、申請者らはSykキナーゼに対する選択的阻害剤を探索し、経口活性のあるBAY 61-3606 (2- [7- (3, 4-dimethoxy phenyl) -imidazo [1, 2-c] pyrimidin-5-ylamino] -nicotinamide dihydrochloride) を得た。Sykに対するKi値は7.5nMと高活性で、ATPに競合的な阻害作用を示した。他のチロシン・キナーゼに対するKi値との比較では626倍以上の優れた選択性を示した。この値は、既にSykキナーゼに対する選択的阻害剤として広く用いられてピセアタノールのKi値を大きく上回った。さらに、BAY 61-3606は、抗体によるFcεRI架橋刺激で見られるラット肥満細胞の脱顆粒を抑制し、またヒト培養肥満細胞では脱顆粒のみならずPGD₂、ロイコトリエンおよび顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) の産生も抑制した。ちなみに、比較に用いた化学伝達物質遊離抑制薬の一つ、クロモグリク酸ナトリウムは、極めて高濃度において脱顆粒のみを抑制した。さらに、BAY 61-3606は抗IgE抗体刺激によるヒト末梢血リンパ球からのヒスタミン遊離を、アトピー/非アトピー・ドナーの間で大差なく、IC₅₀値 8.1-10nMで抑制した。また、単球系細胞および好酸球におけるFcγRシグナル、B細胞におけるBCRシグナルも同様に抑制される。

さらに、実験動物における本薬物の薬理作用を検討した。まず、抗原特異的IgE感作ラットを用いた*in vivo*の評価系において、BAY 61-3606は3 mg/kgの経口投与で、皮膚の肥満細胞依存的な抗原誘発血管透過性亢進反応を抑制した。また、肺においても抗原誘発による浮腫および気道抵抗上昇反応が抑制された。さらに、抗原感作・抗原誘発による気道の好酸球性炎症をも抑制された。

以上、申請者は肥満細胞や白血球において抗原レセプターを介するシグナル伝達に関わるSykキナーゼを標的として、試験管内および培養細胞での評価系を開発し、Sykに対する選択的阻害剤の探索を可能とした。この評価系を用いて、経口投与可能なBAY 61-3606を得て、その薬理作用等を検討し、Sykが気道炎症において重要な関わりを持つことを証明すると同時に、新しいタイプの抗アレルギー薬および抗喘息薬としての可能性を示した。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年10月7日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。