

様式3

平成 29 年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

平成 30 年 2 月 28 日

国立大学法人愛媛大学  
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関： 兵庫医療大学

部局・職名： 薬学部 教授

氏名： 田中明人

1. 研究課題

SH-2251 をシード化合物としたアレルギー性炎症新規治療戦略の確立

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 田中明人	兵庫医療大学・薬学部	教授	リガンドのデザインと合成。アフィニティ樹脂の合成。研究統括
研究分担者 山下 政克	愛媛大学大学院 医学系研究科	教授	実験計画立案、および実験材料の提供
所(馬淵)美雪	兵庫医療大学・薬学部	研究員	結合実験および蛋白質同定

3. 研究成果

別紙のとおり

## 研究課題名「SH-2251 をシード化合物としたアレルギー性炎症新規治療戦略の確立」

兵庫医療大学・薬学部・教授 田中明人  
愛媛大学医学系研究科・教授 山下 政克  
兵庫医療大学 薬学部・研究員 馬淵美雪

### 研究目的

現在、我が国の全人口の約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患しており、その数は急速に増加している。中でも、アレルギー性鼻炎、花粉症の患者数は著しく多く、アレルギー疾患の根治につながる低分子化合物創製が求められている。研究分担者・山下は低分子化合物 SH-2251(図 1)が、IL-5 産生 Th2 細胞の分化を強力に阻害し、好酸球浸潤を抑制することで、マウス OVA 誘発アレルギー性気道炎症モデルなどの病態を著しく改善することを見いだした。この結果は、SH-2251 標的分子がアレルギー性気道炎症の病態形成に深く関与しており、それを標的とした化合物の開発が新規治療戦略の確立につながることを示唆している。現在、申請者は山下と連携し、SH-2251 をシード化合物として構造最適化検討及び標的タンパク質の同定を行っている。申請者は、前職(アステラス製薬)における創薬経験を活かし、アステラス製薬で薬効評価を専門としていた馬淵博士の協力を得て、試薬作りにならないよう薬物動態試験など製薬企業が求めるスクリーニング系などを積極的に組み込み、患者ニーズを満足する新規抗アレルギー薬の創出及び、ターゲット探索及び当該化合物群のメカニズム解明に基づいた新規抗アレルギー疾患治療剤を実現する新規ターゲット探索を行う。

### 研究内容

山下らが発見した興味深い抗アレルギー活性を有する SH-2251 をシード化合物とし、  
1) 当該化合物のメカニズム解明を進め、新規抗アレルギー領域における創薬ターゲットを同定し、併せて2) 臨床応用可能な新規抗アレルギー薬創製を目指す。

## 研究成果

### (1)アフィニティ樹脂固定用リンカー付活性誘導体のデザインと合成

アフィニティ樹脂は 1988 年の S.L.Schreiber 教授 (Harvard 大学)による免疫抑制剤 FK506 のメカニズム解明の成功を契機に、現代創薬の重要なツールとなっている。本方法のメリットは、興味ある生理活性物質の発見をベースとし、先行知見に依存せず当該化合物と物理的に直接相互作用する蛋白質を簡便に同定できる点がある。今回の研究課題においても生理的考察のみでは推察困難な SH-2251 の新規な薬理作用解明に、当該化合物と直接相互作用を行う蛋白質の同定が肝要になると考え、アフィニティ樹脂によるメカニズム解明研究を開始した。LT-244 は、SH-2251 誘導体であるが(図 1)、SH-2251 構造にある蛋白質との非特異的な共有結合の形成懸念があるチオアミド構造を有していないメリットを有するため、本研究では LT-244 をリガンドとして選択し、LT-244 固定アフィニティ樹脂の合成を目指した。

生理活性物質を固定化したアフィニティ樹脂の合成には、生理活性を保持したリンカー付き LT-244 誘導体のデザインと合成が必要となるため、我々は LT-244 構造中に官能基を導入した誘導体を幾つか合成し、抗アレルギー活性の有無を検討した。その結果、AT474(図 1)に比較的強い抗アレルギー活性を見出すことに成功した。そのため、AT474 固定アフィニティ樹脂の合成を行うこととした。

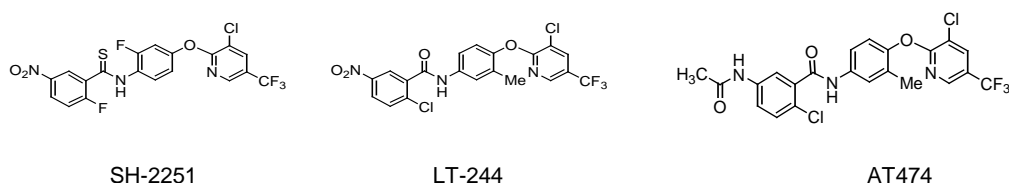


図 1 SH-2251 と関連誘導体の構造式

### (2) アフィニティ樹脂の合成

アフィニティ樹脂の成功は使用する固相担体の優劣に大きく依存するが、田中は、上述の Schreiber 研究室に留学以降、独自に化学的に固相担体の開拓研究を進め、化学的に安定で非特異的蛋白質吸着が少ない AquaFirmus™ 創製に成功している。当該固相担体は、世界的に汎用されるアガロース系樹脂より非特異的蛋白質吸着が少ないばかりでなく、アガロース系樹脂の最大の問題点である合成に使用する有機溶媒使用による変性という問題もない合成樹脂であるため、高純度のアフィニティ樹脂の

合成が可能である。また、最近新たに超ロング親水性スパーサーを導入し、捕捉するターゲット蛋白質と固相担体の距離を十分とった AquaFirmus2000 の開発にも成功しているため、併せてアフィニティ樹脂を合成した。

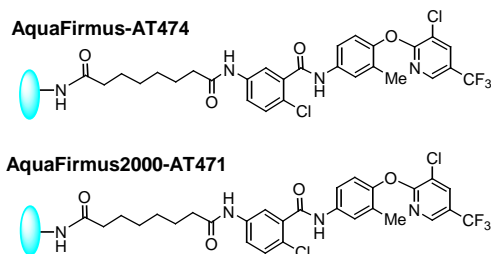


図2 今回合成した AT474 固定アフィニティ樹脂の構造

### (3)結合実験とターゲット候補蛋白質の同定

結合実験を行うに使用したマウス Th2 細胞は山下らによって取得された細胞を使用した。細胞を lysate buffer で洗浄後、超音波処理で粉碎し、不溶物を遠心分離で除去した上澄み液を lysate として使用した。特異的結合蛋白質の同定は定法に従い LT244 添加の有無による拮抗法によって行った。結合実験はすべて4度あるいは氷冷下で行った。結合実験は蛋白質変性を避けるため 45 分間結合し、非結合蛋白質を lysate buffer で洗浄後、結合蛋白質を溶出し解析を行った(図3)。その結果、分子量 20-35 に LT244 拮抗により明らかに結合量が減少しているターゲット候補蛋白質が明らかとなった。当該蛋白質を切り出し、in gel digestion 法で蛋白質を同定した結果、上側が血清由来と思われるアルブミン(LT244 は *in vivo* では蛋白結合率が高いことが推定)で、下側が Rab 蛋白質であることが明らかとなった。Rab 蛋白質には複数のサブタイプが知られているが、各 Rab 蛋白質のホモロジーは非常に高く、共通するアミノ酸シーケンスが多く今回の解析のみでは、本誘導体の薬理活性の本体を担う Rab サブタイプの同定は困難であった。

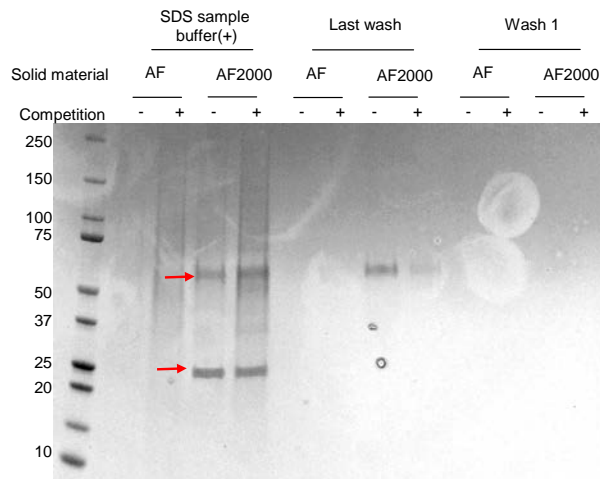


図3 AT474 固定アフィニティ樹脂を用いた結合実験の結果

結合蛋白質を矢印で示す。上側は血清由来と思われるアルブミンであった。下側の矢印が LT-244 に特異的に結合していると思われるターゲット候補蛋白質

## 成果発表

上述の通り、重要なターゲット候補蛋白質 Rab 群同定に成功したが、より質の高い研究成果創出のため、現在、共同研究者との協議の結果、外部発表を控えている。

## 今後の課題

今回、SH2251 のターゲット蛋白質として、新たに Rab 蛋白質の同定に成功した。しかし、質量分析によって同定された Rab 蛋白質シーケンスは各サブタイプで共通配列であったため、サブタイプの同定は困難であった。今後更に検討を進め、各サブタイプのタンパク質合成し、BIACORE などを活用することで、より強く相互作用する Rab サブタイプ同定を行う計画である。また、SH-2251 をはじめとする関連誘導体による抗アレルギー活性と Rab 蛋白質との関連を含め、メカニズム解明を進めたいと考えている。また、近年注目を集める Rab 蛋白質が偶然ターゲット候補蛋白質として同定されたが、今後の免疫系における Rab 蛋白質の機能解明を進めたいと考えている。

一方、本年度の検討から SH-2251 あるいは LT-244 は免疫系細胞において特異的なターゲットを基盤として未知メカニズムに基づき興味深い抗アレルギー作用を有することから、臨床的に有用な新規抗アレルギー薬の開拓を進めたいと考える。