

様式3

平成30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31年3月5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	兵庫医療大学・薬学部	教授	実験計画立案、および実験材料の提供。
所(馬淵)美雪		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」(2)

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、我が国の人口の半数が何らかのアレルギー疾患で苦しんでおり、その割合はますます増加している。特に、アレルギー性鼻炎、花粉症の患者数は多く、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 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。申請者は、昨年度に引き続き山下と連携し、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た。これまでの SH-2251 の動物モデル等での有効性から、本テーマの遂行により同定される SH-2251 標的タンパク質は、新たな創薬シードとして極めて有望であると考えられる。

### 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)特異的結合タンパク質の同定

昨年度作成したアフィニティ樹脂を用い、我々はマウス Th2 細胞から、分子量 20-35 に LT244(昨年度報告済 SH-2251 誘導体) 添加による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を同定している(図 1)。我々は、すでにこのタンパク質は、Rab 蛋白質であることが明らかとしているが、サブタイプ同定は未実施であった。

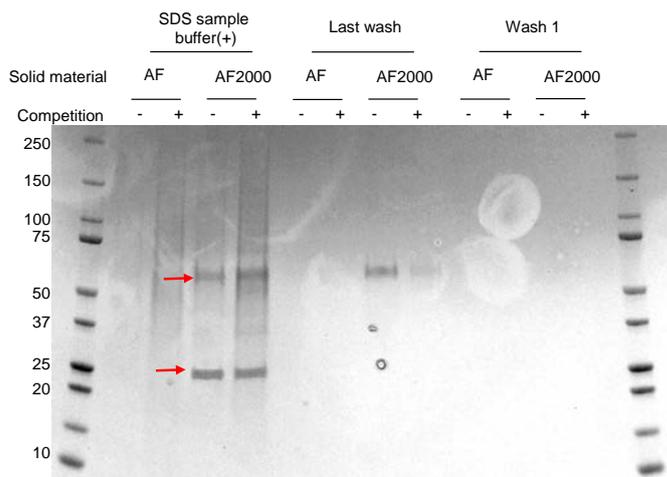


図1 アフィニティ樹脂を用いた結合実験の結果

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

## (2) LT244 と Rab 蛋白質との相互作用検証

我々は、LT244 と相互作用する Rab タンパク質の相互作用を検証する目的で、入手可能な抗体を用い Western blotting を実施した(図 2)。その結果、LT244 固定アフィニティ樹脂から得られたタンパク質は、抗 Rab1A および抗 Rab5C 抗体を用いた Western blotting で明確な拮抗効果が確認されており、この両者が特異的装用作用タンパク質として含まれていることが示唆された。

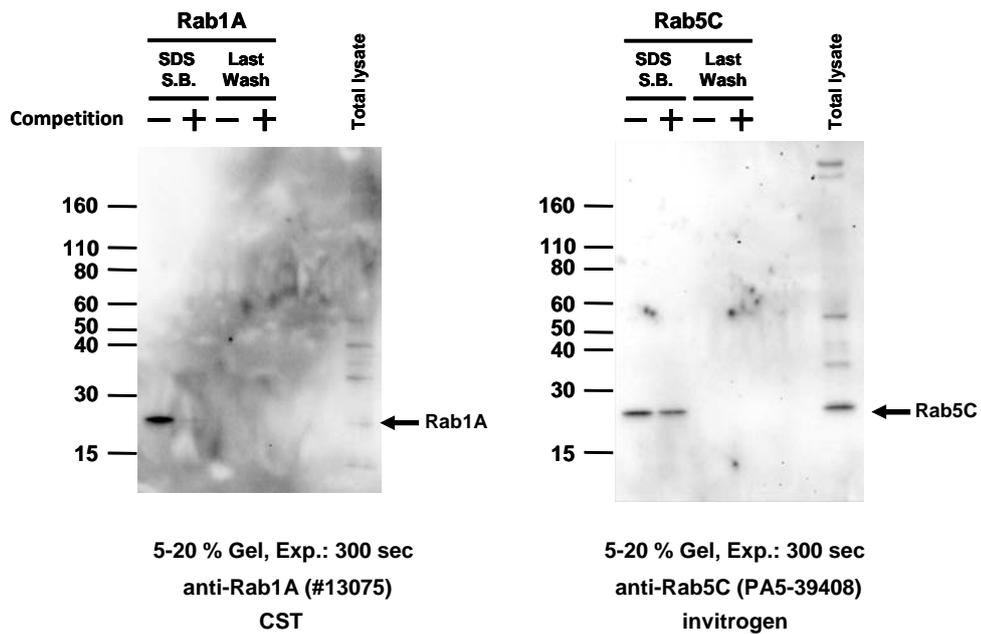


図2 アフィニティ樹脂で拮抗が確認されたバンドに関する Western blotting 実験結果

図1で確認された特異的結合タンパク質 Rabs タンパク質を同定する目的で入手可能な抗体を用い Western blotting を実施した。その結果、Rab1A および Rab5C が特異的結合タンパク質として同定された。

(3)LT244 と Rab5C 蛋白質との相互作用検証(BIACORE を用いた KD 測定)

(2)の検討で LT244 と Rab5C との特異的相互作用が示唆されたため、カイコを用いた系で精 Rab5C を作成し、アフィニティ樹脂合成で活用した化合物固定化技術を活用し、BIACORE 解析用チップを自作し、兵庫医療大学の BIACORE3000 を用い相互作用解析を実施した(図 3)。その結果、特異的な相互作用を示唆する飽和効果(200 nM において LT244 固定化 BIACORE チップへの Rab5C の結合量が飽和)が観測され、かつ KD 値として 7.73 nM と十分に強い相互作用が観測された。

(2)の結果とあわせ、LT244 の特異的結合タンパク質として Rab5C が確定された。他の Rab タンパク質との相互作用解析も順次行う計画である。

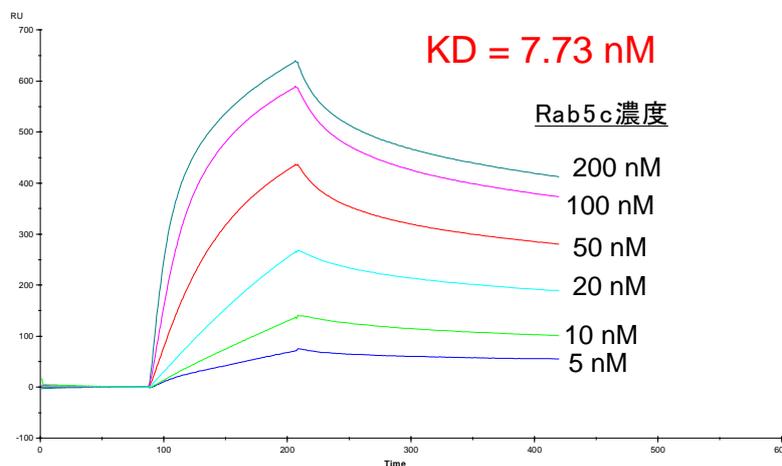


図3 LT244 固定チップとカイコ発現 Rab5C との BIACORE 解析結果

市販品を用い、LT244 固定化 BIACORE チップを自作し、カイコ由来 Rab5C を移動相とし、各 Rab5C 濃度を流し、相互作用を測定した。その結果、①200nMにおいて飽和効果が観測、②相互作用 KD=7.73 nM が観測され、LT244 と Rab5C との強い相互作用が観測され、図 2 の結果とあわせ、両者の特異的相互作用が観測された。

## 成果発表

上述の通り、重要なターゲット候補蛋白質 Rab1A および 5C 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

我々は、SH2251 のターゲット蛋白質として、Rab 蛋白質の同定に成功している。今年度の検討から Rab5C が western blotting および BIACORE 解析から LT244 特異的相互作用タンパク質として同定された。今後、過去の見当で LT244 特異的結合タンパク質候補として

同定済の各 Rab サブタイプとの解析を進め Rab サブタイプの同定を進め、山下が進める生化学的な解析と融合し、SH2251 の抗アレルギー効果のメカニズム解明をすすめ、近年注目を集める Rab タンパク質の新たな役割を明らかにしながら、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。