

Ⅲ. 富山発の自己免疫病治療薬の開発を目指した創薬研究： TLR7 選択的阻害作用を持つ天然薬物 シクロバクチオールの実用化研究

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）免疫バイオ・創薬探索研究講座

客員教授 長井良憲

【背景・目的】

全身性エリテマトーデス（Systemic Lupus Erythematosus：SLE）は厚生労働省指定の特定疾患，いわゆる難病であり，自己の DNA や核蛋白質に対する自己抗体が生じ，それにより多臓器（腎臓，肺，中枢神経系，関節・筋肉，皮膚・粘膜など）に様々な異常を生じる予後不良の自己免疫病である。若年から中年の女性に発症することが多く，妊娠・出産・育児などに関わる女性の Quality of Life に多大な悪影響を及ぼす。ステロイド剤や免疫抑制剤などによる薬物治療が中心であるが，根本的治療法は無く，多くは慢性の経過を取り，徐々に治療抵抗性となる。また，ステロイド剤の長期使用による糖尿病や骨粗鬆症などの副作用や，免疫抑制剤使用による日和見感染症などが大きな問題となっている。従って，SLE の発症や増悪に関連する分子を見だし，それを標的とした副作用の少ない治療薬の開発が求められている。

マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞に発現する Toll-like receptor 7（TLR7）は，ウイルスの 1 本鎖 RNA を認識し，IFN- α の産生を誘導することで抗ウイルス作用を発揮する（図 1）。一方，死細胞や組織障害に由来する自己 RNA の過剰な蓄積が，TLR7 の異常な活性化や自己抗体の産生に繋がり，SLE の発症や増悪に関与することが主にマウスを用いた研究から明らかにされている（図 1）。例えば，TLR7 シグナルが異常に活性化する TLR7 トランスジェニックマウスなどでは，SLE に類似した炎症病態が観察されることが明らかになっている。また，TLR7 が高発現している形質細胞様樹状細胞から産生される IFN- α が B 細胞の自己抗体産生を促進し，SLE の病態形成に重要な役割を担うことも分かっている（図 1）。さらに SLE 患者の免疫細胞では TLR7 の発現が高く，その活性化が亢進していることや，複数の SNP

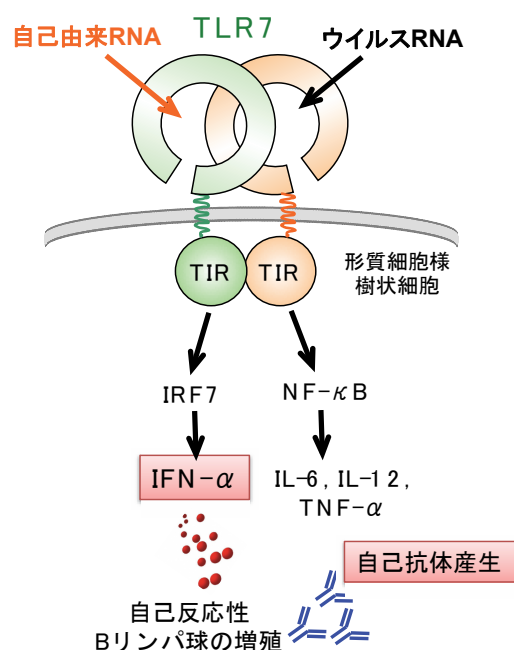


図1 TLR7によるウイルスまたは自己RNAの認識とそれらに対する応答

(一塩基多型)も報告されており、ヒトにおいても TLR7 と SLE との関連が示唆されている。以上から、TLR7 は SLE 治療における重要な標的分子の一つである。

そこで我々は、TLR7 の活性化を阻害する低分子化合物を探索することとし、TLR7 発現細胞株を用いて約 1,600 種類の天然薬物・化合物をスクリーニングした。その結果、マメ科植物オランダビユの成熟種子から分離され、漢方薬の補骨脂にも含まれるシクロバクチオールの 1 種(コードネーム CB-7)に、TLR7 の活性化を選択的に阻害する作用を見いだした(特願 2015-184215)。CB-7 のような分子量 300 未満の低分子薬物が TLR7 を選択的に阻害することを報告した例は無く、本研究が新規性に富んでいることを示している。

本研究では、「富山県発の新規 SLE 治療薬の開発」を目指すために、CB-7 を創薬シーズとした開発研究を行うことを目的とする。一方、創薬研究を進展させるためには、SLE モデルマウスにおける有効性評価や SLE 患者免疫細胞における阻害作用の確認、さらに低濃度で有効性を示す誘導体の合成など詳細な解析が必要である。これらを解決するために研究班を形成し、モデルマウスとヒト細胞を用いて有効性を多面的に解析すると共に、分子シミュレーションなどを活用して作用機序の分子的解明を目指す。また、本学では解決が困難な研究計画について、これまで共同研究を行ってきた各分野における第一線の研究者との連携を強化し、CB-7 と TLR7 との詳細な結合様式の解析、阻害活性を向上させるための誘導体合成の試みなどについて大学間および産学連携を強化して研究を遂行する。

【各班の概要】

1. シクロバクチオールとその合成誘導体による TLR7 阻害活性の試験管内及びモデル動物、インシリコによる解析(長井良憲, 渡邊康春, 岡本直樹)

東工大との共同研究により合成された誘導体および AMRI 社に合成委託した誘導体の TLR7 阻害活性を検討した。その結果、CB-7 よりも強い TLR7 活性化阻害作用(IC_{50} : 3~4 μ M)を有する化合物を複数見いだした。本研究成果を基に、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の産学連携医療イノベーション創出プログラム「ACT-MS」に申請し、高い競争率の中、採択され、平成 29 年 10 月より研究を開始した。また、国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研)との共同研究により、TLR7 と CB-7 との分子動力学シミュレーションを行い、CB-7 が TLR7 に結合する部位・阻害作用機序を明らかにした。今後、本研究の成果を基に、AMED の研究費も活用し、TLR7 阻害活性が CB-7 よりも 10 倍以上強い誘導体をデザイン・合成することで、創薬シーズの最適化を図っていく。

2. 自己免疫病患者由来免疫細胞を用いたシクロバクチオールの臨床研究(多喜博文)

富山大学附属病院で外来通院中の SLE 患者 40 症例および関節リウマチ患者 40 症例の末梢血単核球を単離し、TLR7 や IFN- β の発現を比較解析した。また、末梢血中の細胞成分の割合についても、比

較解析した。その結果、関節リウマチ患者に比べて SLE 患者では、末梢血単核球における TLR7、IFN- β および Mx1 の遺伝子発現が有意に高かった。また、SLE 患者および関節リウマチ患者由来の末梢血単核球において、CB-7 は TLR7 アゴニスト（Gardiquimod または CL264）の刺激による IL-6 の産生を濃度依存的に抑制した。今後、CB-7 よりも強い TLR7 阻害活性を持つ合成誘導体を用いて同様の解析を行う。

【結論】

上記の通り、研究は計画通りに順調に進捗し、期待以上の成果をあげてきた。その中で、CB-7 よりも強い誘導体を複数見いだしたことは大きな進展であり、今後の最適化合成の弾みとなることが期待できる。また、AMED 研究の採択も大きな成果の一つであり、本研究と連携して誘導体のデザインを設計し、最適化合成を更に推進していく予定である。来年度以降、SLE モデルマウスの解析などを進めていくことで、TLR7 を標的とした SLE 治療薬の創成により近づくことが期待できる。

Ⅲ-1 シクロバクチオールとその合成誘導体による TLR7 阻害活性の試験管内及びモデル動物、インシリコによる解析

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）免疫バイオ・創薬探索研究講座

客員教授 長 井 良 憲

客員講師 渡 邊 康 春

研究員 岡 本 直 樹

【目的】

我々は、TLR7 阻害作用を持つ初めての低分子化合物として、CB-7 を発見した。CB-7 の阻害作用は TLR7 選択的であり、ヒト細胞でも有効性を確認しているが、活性を示す濃度は 5~10 μM 以上である。CB-7 を SLE の創薬シーズとして開発を進めるには、より低濃度で阻害活性を示す誘導体を合成する必要がある。そこで本研究では、分子シミュレーションなどを活用した作用機序の分子的解明や低濃度で有効性を示す誘導体の合成、SLE モデルマウスにおける有効性評価、SLE 患者免疫細胞における阻害作用の確認など、多面的な解析を行うことを目的とする。

今年度は、東工大小林雄一教授との共同研究で合成された誘導体と、ARMI 社に合成委託した誘導体（テイカ製薬株式会社からの委託）の阻害活性を評価し、CB-7 より強い活性を持つ誘導体を見出すことを目的とした。また、産総研の広川貴次研究チーム長との共同研究により、TLR7 と CB-7 との結合様式や TLR7 阻害作用における CB-7 の構造活性相関を解明するために、分子動力学シミュレーションを行った。

【方法と結果】

図 1 に示すように、Pro-B 細胞株である Ba/F3 細胞にマウス TLR7 を発現させた細胞を用いて、合成誘導体の TLR7 阻害活性を解析した。本細胞では、TLR7 による転写因子 NF- κ B の活性化を、緑色蛍光タンパク

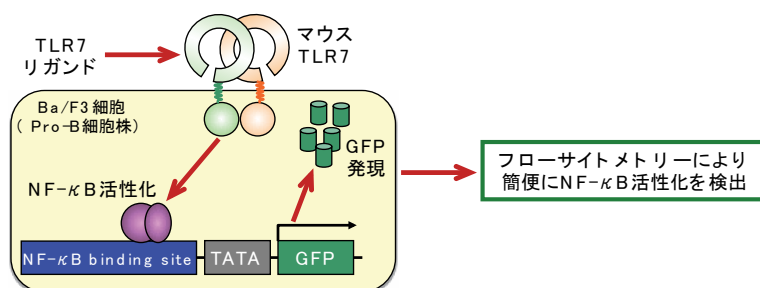


図1 合成誘導体のスクリーニングに用いるTLR7発現細胞

ク (GFP) の発現で簡便に検出が可能である。東工大で合成された 9 種類、AMRI 社で合成された 91 種類（合成中間体を含む）について、それらの TLR7 阻害活性を検討した。まず TLR7 発現 Ba/F3 細

胞に合成誘導体を 30 分反応させ、その後、TLR7 リガンドであるロキソリビンで 18 時間刺激した後、GFP の発現をフローサイトメトリーで検出した。その結果、東工大からの合成誘導体 1 種類と AMRI 社からの合成誘導体 6 種類に、CB-7 と同等またはそれよりも強い TLR7 阻害活性を認めた。その内、2 種類の合成誘導体については、 IC_{50} が 2.6 または 3.4 μM と CB-7 よりも阻害活性が 2~3 倍上昇していた (図 2)。

次に、産総研との共同研究により、分子動力学シミュレーションを行い、TLR7 と CB-7 との結合様式を解析した。サル TLR7 の結晶構造を参考にマウス TLR7 を構築し、1%濃度の CB-7 を溶媒中に配置して、50 ns のシミュレーションを行った。その結果、CB-7 は TLR7 のリガンド結合部位近傍で最も高いドッキングスコアを示した。その結合様式は、多数の誘導体の活性評価により得られた構造活性相関と一致していた。

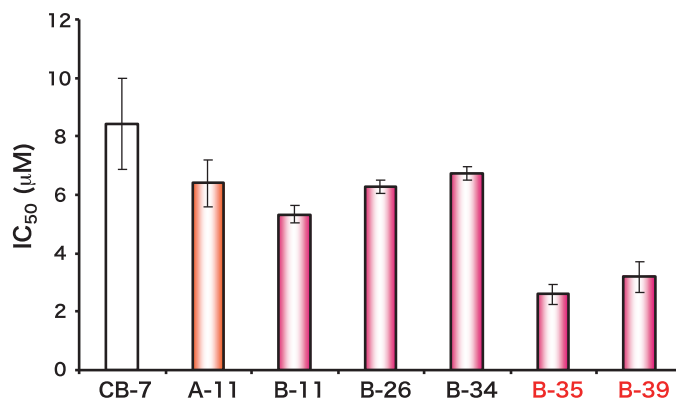


図2 CB-7よりも強いTLR7阻害活性 (IC_{50}) を示した合成誘導体

【考察と今後の展望】

誘導体の合成により、CB-7 よりも強い TLR7 阻害活性を持つ誘導体を見いだした。それにより、化合物の構造と TLR7 阻害活性との相関性を解析することが可能となった。また、分子動力学シミュレーションにより、マウス TLR7 と CB-7 との結合様式を推察することが可能となった。今後は、これらの情報を基に、より強い TLR7 阻害活性 (IC_{50} : 0.1~1 μM 以下) を持つ化合物を見いだすために、誘導体のデザインの設計を進める。

来年度は、東京大学薬学部との共同研究により、精製 TLR7 蛋白と CB-7 または合成誘導体との共結晶を作製し、構造を解析することで、両者の結合様式を直接解明する。また、カロリーメトリー法及び Biacore を用いて、両者の結合親和性を算出する。さらに、複数の SLE モデルマウスを用いて、CB-7 または合成誘導体 (特に B-35 と B-39) の SLE 病態における有効性を評価する。

Ⅲ-2 自己免疫病患者由来免疫細胞を用いた シクロバクチオールの臨床研究

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）内科学（一） 准教授 多喜博文

【目的】

SLE 患者の免疫細胞では TLR7 の発現が高く、その活性化が亢進していることが報告されており、ヒトにおいても SLE と TLR7 との関連性が示唆されている。本研究においても、これらの報告について再現性を確認するために、SLE 患者免疫細胞を用いて解析を行う。また我々は、健常人由来免疫細胞において、CB-7 が TLR7 活性化を阻害することを確認している。本研究では、健常人だけでなく、SLE 患者由来免疫細胞においても、CB-7 または合成誘導体が TLR7 活性化を阻害するかどうか明らかにする。

【方法と結果】

富山大学附属病院で外来通院中の SLE 患者 40 名および対照として関節リウマチ（rheumatoid arthritis : RA）患者 40 名の末梢血より単核球を単離し、全 RNA を抽出した。全 RNA を鋳型とし、逆転写反応およびリアルタイム PCR 反応を行い、TLR7 および IFN- β （インターフェロン- β ）、IFN によって制御される Mx1 の各遺伝子発現を測定した。その結果、RA に比較して SLE の単核球において、TLR7、IFN- β および Mx1 の各遺伝子発現が有意に高かった。また、SLE の単核球において、TLR7 と IFN- β との遺伝子発現量に正の相関性が認められた。一方、RA の単核球においては、そのような相関性は認めなかった。

また、SLE または RA の単核球を CB-7 で 30 分反応させ、その後、TLR7 リガンドである Gardiquimod または CL264 で 24 時間刺激した後、培養上清中の IL-6（インターロイキン-6）産生量を ELISA 法で測定した。その結果、SLE の単核球において、Gardiquimod または CL264 刺激による IL-6 産生量を CB-7 が有意に減少させた。RA の単核球においても同様に、CB-7 は IL-6 産生を減少させた。また、TLR7 リガンドによる IL-6 産生量は、SLE と RA の単核球で大きな差は認められなかった。

【考察と今後の展望】

今年度、SLE および RA 患者の末梢血単核球を用いた臨床研究を行い、当初の予定通り、各 40 名のサンプルを解析することができた。その結果、RA に比較して、SLE の単核球においては、TLR7、IFN- β

および Mx1 の各遺伝子発現が有意に高いという、他の報告と同様の結果を得ることができた。一方、TLR7 リガンドに対する応答性には両者で差は無く、他の報告の再現性は得られなかった。その理由として、サンプル自体の問題や人種差などが考えられた。

来年度は、今年度新たに見いだした CB-7 よりも強い TLR7 阻害活性を持つ合成誘導体について、解析を行う予定である。これらの誘導体の中で、特に強い阻害活性を示す B-35 と B-39 が、SLE の単核球において CB-7 よりも強力に TLR7 活性化を阻害するかどうか検討する。