

# 免疫抑制剤 DMF の標的に対する選択的プローブの開発

スクリプス研究所分子医学部門クラヴァット研究室

高屋 潤一郎

## 目的

免疫抑制剤ジメチルフマレート (DMF) は、古くから自己免疫疾患である乾癬の治療薬として利用されており、2013 年には、同じく自己免疫疾患である多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) の経口治療薬としても FDA に認可された。市販薬としての成功にもかかわらず、DMF の自己免疫疾患における作用機序はいまだ解明されていない。

DMF は、極めてシンプルな構造にマイケルアクセプターを有する反応性化合物であり、反応性を有さない類縁体 (ジメチルスクシネート) が活性を持たないことから、その作用機序は何らかのタンパク質のシステインへの修飾を介したものであると考えられている。我々の研究グループでは、反応性化合物と生体内のシステインの反応性を定量的かつ網羅的に評価する手法 (isotopic Tandem Orthogonal Proteolysis- Activity-Based Protein Profiling; *Nature* (2010), *Nature Method* (2014)) を用い、DMF が結合する T 細胞内の免疫関連タンパク質とその結合部位であるシステイン残基を複数同定した。 (*Science signaling* (2016))

本研究では、上記成果をさらに発展させ、免疫関連タンパク質に複数存在する DMF 反応性システインに結合するプローブの開発、免疫抑制剤ジメチルフマレート (DMF) の作用機序の解明、そして究極的には自己免疫疾患の新規治療薬の開発に資することである。

## 研究経過

### 1. Fragment-based ligand discovery (FBLD) に基づいたフラグメントライブラリの構築およびスクリーニング

FBLD は、低分子量の化合物ライブラリからリガンドを探索することで、高分子量で複雑な化合物群からの探索では得難い良質なリード化合物を、より少ない化合物数から探索できる広く知られた方法論である。この FBLD に基づき、おおむね分子量 300 以下、かつ、クロロアセチルやマイケルアクセプターなどの反応性部位をもった反応性フラグメントライブラリを構築・拡張した。我々の研究室では、以前から所有していた化合物と合わせ、現在までに、500 種を超える反応性フラグメントライブラリを揃えた。

当初予定していたゲルベースのスクリーニングに先立ち、反応性フラグメントライブラリの T 細胞における作用を、フローサイトメトリーにより解析した。いくつかの化合物は DMF と同様に細胞内サイトカイン生産を抑制していた。ヒット化合物は、現在ケミカルプロテオミクス解析によってターゲットの同定と DMF との比較を試みている。

### 2. 長命形質細胞の作製と DMF の影響

当初の計画に加え、長命形質細胞における DMF の影響及びターゲット同定を行っている。長命形質細胞は、数年から数十年、時には一生の間増殖することなく生存し、抗体を生産しつづける。そのため、自己反応性抗体を生産する長命形質細胞は、慢性・難治性自己免疫疾患において、重要な創薬ターゲットとして認識されている。B 細胞における DMF の効果は、近年徐々に明らかになってきているが (*J. Immunol.* (2017))、最終分化段階にある長命形質細胞における DMF の効果はいまだ不明のままである。実験に先立ち、長命形質細胞を大量培養する方法を確立した。端的に述べると、ヒト血液から抽出した B 細胞をサイトカインカクテルの存在下で 25 日間培養すること CD19<sup>-</sup> CD38<sup>++</sup> CD20<sup>-</sup> CD138<sup>+</sup> (骨髄中

の長命形質細胞と矛盾しない表面抗原を有する)抗体生産細胞を得た。作用濃度における DMF は、作製した長命形質細胞の生存率に大きな影響を与えなかった。現在は、抗体やサイトカイン生産能への影響を調査している。

### 考察および今後の展開

これまでのところ、T 細胞に作用しサイトカイン産生を抑制する複数の化合物が見つかったが、DMF が結合するターゲット群のどれか一つに選択的に結合するコバレントプローブという当初の目的は達成できていない。完全な選択性を有する化合物を同定するにはフラグメントライブラリーの規模が十分ではないのかもしれない。今後は、複数のターゲットに結合する、弱い選択性を有する化合物を同定することから始め、構造展開することで、選択性をより高める方向で開発を進めることを計画している。

本研究の副産物として、活性化した免疫細胞全般に作用する強力な細胞増殖抑制剤 (ナイーブ T/B 細胞は耐性を持つ) や、新規骨格を有する長命形質細胞の抗体生産抑制剤を同定した。前者に関しては、ケミカルプロテオミクスによる解析により、標的候補を数種類のタンパク質にまで絞り込んだ。結合するタンパク質が異なることから、DMF とは異なるメカニズムで作用していることが予想される。現在は作用機序の探索を行っている。後者は、抗 CD20 抗体医薬の効果がみられない難治性自己免疫疾患に対する創薬につながる可能性がある。今後、ケミカルプロテオミクス解析を行いターゲットを同定する予定である。いずれの化合物も今後の追加解析により、新規の免疫抑制剤の創薬に寄与することを期待している。

### 謝辞

海外留学補助金を賜り、これまで門外漢であったプロテオミクスや免疫学における最先端の知見を学ぶことが出来ていることは、望外の喜びです。アステラス病態代謝研究会におかれましては、ここに改めて感謝を申し上げます。

### 参考文献

1. Wang C, Weerapana E, Blewett MM, Cravatt BF. A chemoproteomic platform to quantitatively map targets of lipid-derived electrophiles. *Nat. Methods* **2014**; 11(1):79-85
2. Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*. **2010**; 468:790-795
3. Blewett MM, Xie J, Zaro BW, Backus KM, Altman A, Tejjaro JR, Cravatt BF. Chemical Proteomic Map of Dimethyl Fumarate-Sensitive Cysteines in Primary Human T Cells. *Sci. Signal.* **2016**; 9, 1-10.
4. Rui Li, Ayman Rezk, Mathab Ghadiri, Felix Luessi, Frauke Zipp, Hulun Li, Paul S. Giacomini, Jack Antel and Amit Bar-Or, Dimethyl Fumarate Treatment Mediates an Anti-Inflammatory Shift in B Cell Subsets of Patients with Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **2017**; 198 (2) 691-698