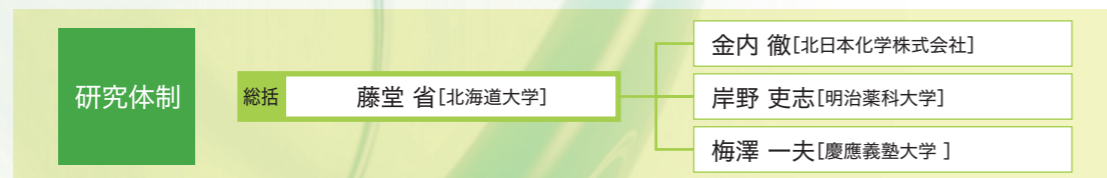


新規低分子NF-kB阻害剤(DHMEQ)による 新たな免疫抑制療法の開発

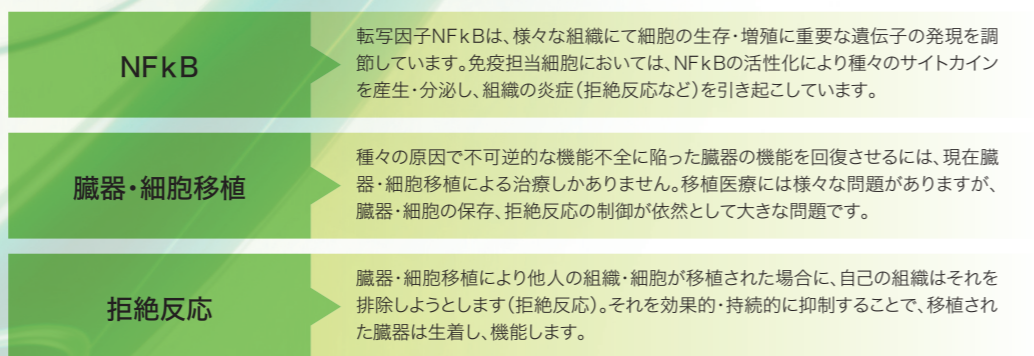
研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



※平成21年度における研究体制

分子標的薬による新たな免疫抑制療法の開発

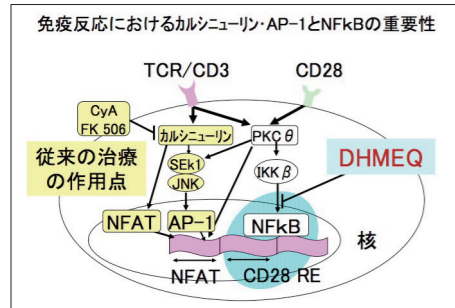
Project
KeyWord
キーワード



1 研究の背景・意義

移植における新規免疫抑制療法の必要性

臓器移植は拒絶反応の主体となるIL-2産生において中心的役割を果たすカルシニューリン-NFAT経路を阻害するシクロスポリンやタクロリムス(カルシウム阻害剤)の開発により急速に発展・普及してきました。しかし現在でもこれら免疫抑制剤を用いても克服できない急性拒絶や慢性拒絶が臨床重要な問題となっています。NFkBは、1980年代後半に発見された転写因子の一つであり、様々な細胞にユビキタスに存在し、様々な生理的状態・病態において重要な役割を果たしていることが知られており、細胞の生存、増殖などに深く関わっています。近年、NFkBはTリンパ球活性化における副刺激経路(CD28)を通じたIL-2産生、CD40刺激によるBリンパ球活性化、TLRを介する自然免疫活性化及び抗原提示細胞である樹状細胞の活性化などに主要な役割を果たしていることが明らかとなりました。図に示すように、免疫担当細胞におけるカルシニューリン-NFAT経路とNFkB経路の主要経路は、それぞれ独立した経路ですが、ともに炎症性サイトカインの産生に重要です。NFkB経路阻害による免疫抑制効果研究を進め、また既存の薬剤との併用効果を研究することにより、より有効な新たな移植免疫療法が開発が期待されます。

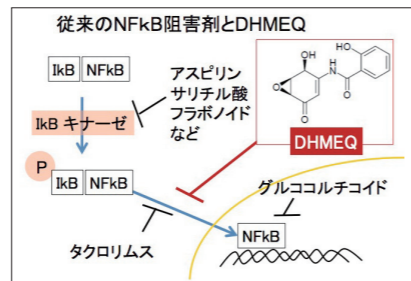


▲カルシニューリン/NFAT阻害剤の開発により移植成績は急速に向上しましたが、転写因子NFkB経路の抑制も免疫抑制には重要です。

2 研究プロジェクトの目標

NFkB阻害による新規免疫抑制療法の開発

本研究では安全で有効なNFkB阻害剤が臨床薬剤として未だ開発されていない現状を鑑みて、新しく開発された低分子NFkB阻害剤DHMEQ(dehydroxymethyl epoxyquinomicin)の細胞・臓器レベルでの移植実験を通して、免疫抑制効果に対する作用機序を系統的に研究・検討します。DHMEQは、これまでにない機序で特異的にNFkB分子の活性化を抑えることが知られていますので(図参照)、免疫抑制に向けたより特異的・効果的な作用が期待されます。これまでの動物実験でも副作用が認められていませんが、将来有効な薬剤となることが期待される薬剤です。本研究では、血液中・組織内濃度測定法の確立および体内薬物動態の解析、生体内での代謝・排泄の解析(薬物動態の解析)、毒性試験など、生体内における本薬剤の動態・作用を具体的に検討します。DHMEQの製剤化にむけては、難溶性DHMEQの水溶製剤化あるいは外用剤としての開発を試み、多様な用途に対応できる薬剤の開発を目指します。また、薬剤の高収率で経済的な合成方法および安価で効率的な薬剤(キラル体)合成法を検討し、具体的な前臨床試験までの研究・検討を進めることを目的とします。最終的に、臨床

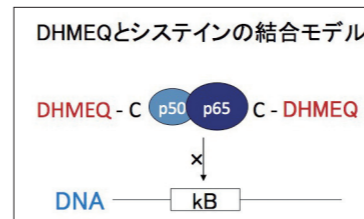


▲新規NFkB阻害剤DHMEQは、低分子の化合物で、転写因子であるNFkB分子に直接結合し特異的にNFkBの活性化を阻害します。

3 研究プロジェクトの成果

DHMEQの作用機序の解析

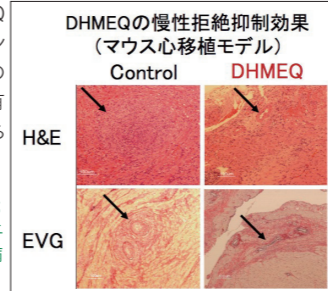
DHMEQは動物実験で強力な抗炎症作用、抗癌作用を示しますが、今までどの分子に結合してNF-kBの活性を阻害するのかわかっていませんでした。最近になって標的分子がNF-kBそのものであることがわかりました。マスマスペクトルや化学合成を用いた方法でDHMEQがNF-kB構成因子であるp65などの特定のアミノ酸に直接共有結合し、そのDNA結合活性を阻害することが解明されました(図)。このように特異的な標的分子への結合が化学で証明されている阻害剤はDHMEQだけで、DHMEQがどうして毒性が少なく、特異的にNF-kBを阻害できるのかわかりました。



▲DHMEQはNF-kBの構成因子であるp65とp50の特定のシステインに結合してDNAへの結合を特異的に阻害します。

DHMEQの拒絶反応抑制効果の解析

DHMEQは、臓器・細胞移植に関わるリンパ球のサイトカイン分泌、増殖活性(MLR)を有意に抑制しました。マウスを用いた異所性心移植モデルでは、移植後急性・慢性拒絶反応に対する抑制効果を検討しましたが、急性および慢性拒絶反応に対して、共に明らかな拒絶反応抑制効果を確認しました(図)。また、従来の免疫抑制剤との併用により、より有効に拒絶反応を抑制しました。マウス糖尿病モデルにおける膵島移植実験においても、DHMEQ投与はドナー投与あるいはレシピエント投与、細胞保存液への投与にて、移植膵島の機能の有意な延長と血糖正常化が得られました。



▶マウス心移植実験(bm12 → B6; 移植後28日目)では、DHMEQ投与により、慢性拒絶反応による血管病変が抑制されていました。

DHMEQの皮膚アレルギー疾患抑制効果の解析

DHMEQ軟膏(1%含有、プラスチックベース)を作成し、アトピー性皮膚炎モデルマウス(Nc/Nga)に対する皮膚炎症状の抑制効果を検討しました。DHMEQ軟膏連日2週間外用にて、コントロール(プラスチックのみ)に比べ皮膚炎症状は著明に改善しました。臨床症状および搔破行動などに基づき評価する重症度スコアも、コントロールではスコアの上昇が続くに対し、DHMEQ外用によりスコアは有意に低下しました。さらに、その改善効果は現在臨床で用いられているアトピー性皮膚炎治療薬とほぼ同等の効果でした(図)。

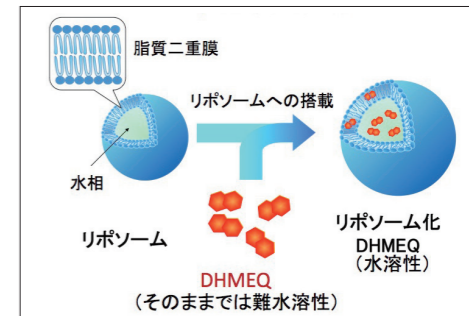


◀DHMEQ軟膏外用にて、アトピー性皮膚炎モデルマウス(Nc/Nga)の皮膚炎症状は著明に改善し、重症度スコアも有意に低下しました。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

リボソームを用いた水溶性DHMEQ製剤の作製

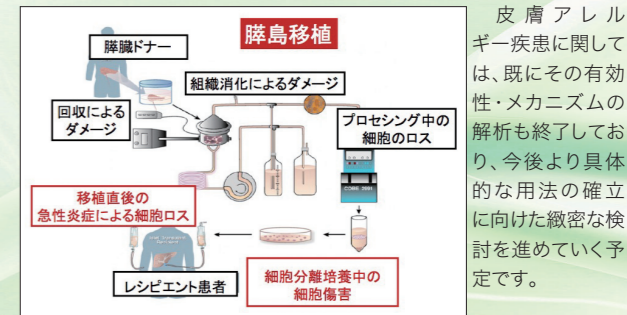
リボソームは脂質二重膜で構成され、内部に水相を有する閉鎖小胞です。リボソームはその性質上、脂溶性物質および水溶性物質を搭載することが可能であり、さらに脂質の種類やリガンド等の機能素子を修飾することで体内動態を制御することも可能と考えられます。そのため、様々な物質の「運び屋」として研究・臨床で使われています。本研究で開発を進めているDHMEQはそれ自体難溶性であり、種々の臨床的な応用に向けて対応するために、水溶製剤化を試みます(図)。我々は、リボソームにDHMEQを搭載することで水溶化を試みますが、様々な組成を持つリボソームに対してDHMEQを搭載し、もっとも有効な製剤をスクリーニングし、最適なものをDHMEQ水溶製剤として開発します。すでに予備実験により種々のリボソーム組成を検討しており、このリボソーム化DHMEQ製剤はin vitro細胞系におけるリンパ球混合試験において強力に免疫反応を抑制し、さらにin vivoのマウス臓器移植実験においても、効果的に免疫反応を抑制する可能性が示唆されています。今後、リボソームからのDHMEQのコントロール・リリースをさらに検討し、より臨床に即した製剤の開発を目指しています。



▲難溶性のDHMEQをリボソームに搭載することで、水溶性DHMEQ製剤の作製を目指します。

臨床薬剤の開発に向けた実験

臨床応用に向けた具体的な研究開発として、「膵島移植」および「皮膚アレルギー疾患」を目指しています。多くの糖尿病患者さんを救う有効な手段ではありますが、膵島移植が成功すれば毎日のインシュリン投与・内服治療、頻回に行なう血液検査などから患者さんは開放されます。膵島移植には、細胞採取から移植までの種々のプロセスにて多くの問題がありますが、DHMEQの採取細胞への投与、レシピエントへの投与により、膵島移植の効果の向上が期待されます。私たちは、こういった臨床における問題を大動物実験にてシュミレートし、臨床応用に向けた問題解決を目指します。同時に、臓器移植(腎移植、肝移植など)に対しても、同様に臨床応用を目指した大動物での実験を行なう予定です。また、大動物実験を通して、この薬剤の急性・慢性毒性の有無についても検討を開始します。



▲膵島移植では、移植までに種々の問題がありますが、DHMEQは移植後のダメージを抑制し、膵島移植の効率を高めると考えられます。

皮膚アレルギー疾患に関しては、既にその有効性・メカニズムの解析も終了しており、今後より具体的な用法の確立に向けた緻密な検討を進めていく予定です。

参考文献

Ariga A, Namekawa J, Matsumoto N, Inoue J, Umezawa K. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear translocation and activation of NF-kappa B by dehydroxymethyl epoxyquinomicin. J Biol Chem. 2002 Jul 5;277(27):24625-30. Epub 2002 Apr 30.

S. Ueki, K. Yamashita, T. Aoyagi, S. Haga, T. Suzuki, T. Itoh, M. Taniguchi, T. Shimamura, H. Furukawa, M. Ozaki, K. Umezawa and S. Todo: Control of allograft rejection by applying a novel NF-kB inhibitor, dehydroxymethyl epoxyquinomicin. Transplantation 82: 1720-1727, 2006.

Watanabe E, Mochizuki N, Ajima H, Ohno K, Shiino M, Umezawa K, Fukai M, Ozaki M, Furukawa H, Todo S, Kishino S. A simple and reliable method for determining plasma concentration of dehydroxymethyl epoxyquinomicin by high performance liquid chromatography with mass spectrometry. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 871: 32-36, 2008