

氏 名 (本籍)	おお くろ まさ よし 大 黒 理 勝 (茨 城 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5383 号		
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Discovery of E6007, an Orally Active inhibitor of the Calreticulin-Integrin Interaction, as a Therapeutic Agent for Inflammatory Bowel Disease</b> (カルレティキュリン-インテグリン相互作用抑制に基づく新規炎症性腸疾患治療剤 E6007 の創出)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠
副 査	筑波大学教授	博士 (薬学)	柳 澤 純
副 査	筑波大学准教授	博士 (農学)	谷 本 啓 司

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis: UC)、そしてクローン病 (Crohn's Disease: CD) に代表される炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は、緩解と再燃を繰り返す原因不明の慢性炎症性疾患である。薬物療法や外科手術の向上により生命予後は比較的良好であるものの、UC における大腸全摘出手術以外には根治が期待できず、IBD 患者は生涯この病との共生を余儀なくされている。

IBD 患者の病変部位には、種々の白血球浸潤が認められる。白血球が炎症部位に浸潤するには、白血球膜上の integrin がサイトカイン刺激等により一過性に活性化され、そのリガンドである血管内皮細胞上の ICAM-1 等の接着分子と強固に結合することが重要である。Integrin  $\alpha 4$  に対するモノクローナル抗体 (Tysabri®) が CD 治療剤として欧米で承認され、白血球除去療法も本邦で UC 治療の保険適用を受けている。これら一連の知見は、白血球の接着・遊走能を調節することが、IBD 治療における魅力的な創薬アプローチであることを支持している。しかしながら、細胞接着抑制作用を有し、経口有効性のある新規薬剤は未だ登場していない。

Integrin は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロダイマーから構成され、18 種の  $\alpha$  鎖と 8 種の  $\beta$  鎖との異なる組み合わせから、現在 24 種類が知られている。著者は、integrin の活性化において、すべての  $\alpha$  鎖の膜貫通直下に共通に保存されているアミノ酸配列 lysine-x-glycine-phenylalanine-phenylalanine-lysine-arginine (KXGFFKR) と、この配列への結合が報告されている calreticulin (CRT) との「蛋白-蛋白相互作用」に着目し、創薬研究をスタートさせた。その結果、リンパ球・好中球双方の接着及び浸潤を抑制し、経口有効性を有する新規 IBD 治療剤候補化合物 E6007 を見出した。

第一章では、ヒト白血球が内皮細胞に接着する際に、白血球に発現している integrin の活性化が重要であること、そしてその反応が一過性であることを示した。更に、KXGFFKR 配列を細胞透過性ペプチドに連結し白血球内に封入したところ、その接着応答が抑制される知見を得た。これらの結果は、 $\alpha$  integrin の共通

保存配列である KXGFFKR が、integrin を介した白血球接着に重要な役割を担っていることを強く示唆している。

第二章では、 $\alpha$  integrin の共通保存配列である KXGFFKR と CRT との相互作用を遮断することが、integrin 活性化を制御できるとの仮説のもと、CRT と KXGFFKR を用いた cell free binding assay を構築し、新規 IBD 治療剤候補化合物 E6007 を見出した。NMR 解析では、E6007 が CRT に結合することで、CRT と integrin の相互作用を抑制する知見を得た。E6007 は、ヒト T 細胞性白血病細胞株 Jurkat 細胞の fibronectin、及びヒト好中球の内皮細胞への両接着を抑制した ( $IC_{50} = 3.0, 2.3 \mu M$ )。更に、内皮細胞をコートしたボイデンチャンバー実験では、E6007 は各種ケモカインに誘導されるヒトリンパ球及び好中球の両細胞浸潤を抑制した ( $IC_{50} = 0.34, 0.14 \mu M$ )。In vivo 試験では、oxazolone や dextran sulfate sodium による誘発、そして  $CD^{4+}CD45RB^{high}$  T 細胞移入 IBD マウスモデルにおいて、E6007 は用量依存的な改善効果を示し、最小有効用量はいずれも 1.3mg/kg (1 日 1 回経口投与) であった。

以上の結果から、CRT をターゲット分子とし integrin-CRT 細胞内相互作用を阻害する E6007 は、リンパ球及び好中球双方の細胞接着・浸潤を抑制し、種々の IBD 動物モデルにおいて改善効果を示すことが明らかとなった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

Integrin を標的とした創薬アプローチとしては、主に安全性の観点から、Tysabri<sup>®</sup> に代表されるように細胞特異性（特にリンパ球）を指向するケースが大半を占めるが、Tysabri<sup>®</sup> の臨床的有効性は低い。一方、好中球を含む白血球全般を体外に取り除く白血球除去療法は、難治性 IBD 患者で著効する等、リンパ球のみの制御では治療効果としてそれほど期待できないとの観測もある。近年、抗 TNF $\alpha$  抗体の Remicade<sup>®</sup> は IBD の治療体系に変革をもたらし、抗体生物製剤の治験開発に拍車をかけることとなった。しかし、特に緩解維持療法においては、引き続き経口有効性のある新薬の登場が IBD 患者に強く待ち望まれている。

CRT と integrin との相互作用を遮断し integrin 活性化を抑制する E6007 は、創薬アプローチとしては「undruggable」とされる「蛋白-蛋白相互作用」にフォーカスし見出された化合物である。そして、細胞特異性を追求するアプローチが創薬の主流にあって、本研究は、敢えて白血球全般を広範に抑制するユニークな特長も有している。E6007 は「白血球除去療法の経口投与可能な低分子化合物版」とも捉えることもでき、今後実施される臨床試験で、E6007 の有効性と安全性が確認されることを期待する。

以上のように、著者は CRT と integrin との細胞内相互作用に着目した独創的な研究を行い、リンパ球・好中球双方の接着及び浸潤を抑制し、経口有効性を有する新規 IBD 治療剤候補化合物 E6007 を見出した。unmet medical needs の高い IBD 治療に、新たなオプションとなり得る有望な新薬候補品を創出したと判断される。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。