

【目的】メトトレキサート (MTX) は、急性白血病の治療薬として開発されたが、その後、炎症性関節炎患者に有効であることが判明し、現在では関節リウマチの第一選択薬として広く利用されている。急性白血病治療における MTX の薬理作用は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) に対する葉酸代謝阻害効果による DNA 合成の抑制に起因することが明らかになっている。しかしながら、免疫調節薬としての MTX の作用機序については、DHFR に対する阻害効果だけでは説明することが難しい。また、MTX によるリウマチ治療では、副作用として間質性肺炎を合併することが報告されており、その発生機序も明らかになっていない。そこで本研究は、MTX の免疫系における作用機序及び副作用の発生機序の解明を目的として、新規 MTX 標的タンパク質の探索同定を行い、MTX の標的タンパク質の機能及び構造への影響、ならびに標的タンパク質が誘導する炎症性サイトカイン産生への影響を検討した。

【方法】MTX の新規標的タンパク質を探索するために、MTX を Sepharose 樹脂に固定化したアフィニティークラムを用いたドラッグアフィニティークロマトグラフィーを行った。SDS-PAGE により、MTX に特異的に結合したタンパク質を分離し、ゲルから抽出後、逆相クロマトグラフィー質量分析法により各種タンパク質の同定を行った。ヒト末梢血単核球 cDNA からマクロファージ遊走阻害因子 (MIF) 遺伝子のクローニングを行い、pET-21b に導入し、大腸菌発現ベクターを構築した。E. coli BL21(DE3) の形質転換を行い、大量培養後、弱陰イオン交換カラム (DEAE Toyopearl)、弱陽イオン交換カラム (CM Toyopearl) により、ヒト MIF リコンビナント体を精製した。単一精製した MIF を各生化学測定、結晶構造解析に用いた。細胞実験には、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて、MTX 存在下、非存在下における MIF 曝露による IL-8 分泌量変化を ELISA で測定した。

【結果】ドラッグアフィニティークロマトグラフィーの結果、MTX に特異的な結合を示す数種類の炎症関連タンパク質の同定に成功した。本研究では、それらのタンパク質のなかで、受容体 CD74 を介した炎症反応を惹起するシグナル伝達に関与している炎症性サイトカイン MIF に着目し研究を進めた。MIF は、サイトカインとしての生理機能を有するほか、L-ドーパクロムメチルエステルの互変異性化を触媒することが知られている。MIF の L-ドーパクロムメチルエステル互変異性化に対する MTX の阻害効果を評価したところ、MTX の添加に伴い、MIF の互変異性化活性の低下が観測された。次に、MTX と MIF の結合様式を分子レベルで解析するために、MTX と MIF 複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果、MTX は受容体 CD74 との結合に重要であると予想されている MIF の基質ポケット近傍に結合することが明らかになった。また、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて、MIF 曝露による IL-8 分泌量変化に対する MTX の影響を検討したところ、MTX の添加量増加に伴い IL-8 の分泌量の減少が観測された。

MTX と MIF 複合体の X 線結晶構造全体図と結合部位の拡大図

