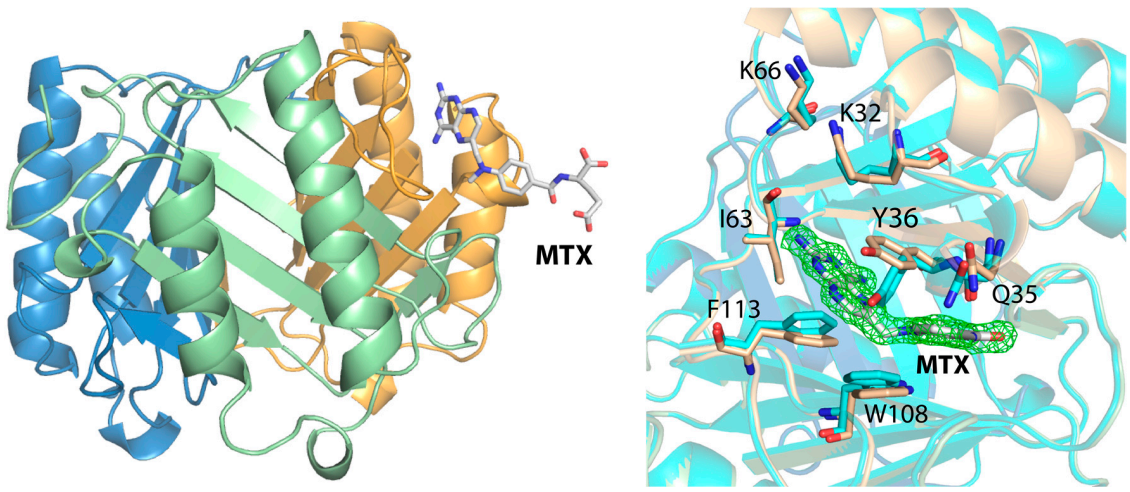
158　MTX作用機序・副作用解明に向けた新規標的蛋白質の解析	松村　洋寿

【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カ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



158. MTX 作用機序・副作用解明に向けた新規標的蛋白質の解析

松村　洋寿

秋田大学 大学院理工学研究科 生命科学専攻

Key words：メトトレキサート，自己免疫疾患，関節リウマチ，マクロファージ遊走阻害因子

緒　言

メトトレキサート（MTX）は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）を標的とし葉酸代謝を阻害する薬剤で、1950 年代から急性白血病の治療に用いられてきた。その後、骨破壊の進行抑制作用を示すことがわかり、1980 年代より関節リウマチの治療薬として使用され始めた［1］。その長期にわたる有効性と安全性から、現在 MTX は関節リウマチ治療のアンカードラッグとして広く用いられており、近年では全身性エリテマトーデス、血管炎、皮膚筋炎、乾癬など多彩な自己免疫疾患への有効性が確認されている。MTX の作用は、複数の免疫抑制及び調節効果の結果と考えられているが、DHFR に対する葉酸代謝阻害効果だけでは薬効を説明することは難しい。また、MTX の副作用として~7 %の症例で間質性肺炎を合併し、その死亡率は 13 %にもなるとの報告がある［2］。副作用の発生機序も、免疫系の抑制効果では説明することができない。今後、より安全で効果的な治療を行うためには、MTX の作用機序ならびに副作用の発生機序の解明が求められている。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

1. MTX 固定化カラムによるドラッグアフィニティークロマトグラフィー

MTX の新規標的タンパク質を探索するために、既報に従い MTX を Sepharose 樹脂に固定化したアフィニティーカラムを作製し［3］、ウシ脾臓または肺の粗抽液を用いてドラッグアフィニティークロマトグラフィーを行った。MTX-Sepharose カラムから溶出させたタンパク質を、15 % SDS-PAGE により分離し、ゲルから抽出後、逆相クロマトグラフィー質量分析装置 LCQ Deca XP（Thermo-Finnigan）により解析した。得られた MS データと MS/MS データを、NCBInr 20120123 database または Mascot Version 2.3 database（Matrix Science）で検索し、各タンパク質配列の帰属を行った。

2. MTX ターゲットタンパク質候補のリコビナント体の作製

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、37°C で 0.1 mg/mL アンピシリンを含む 1 L LB 培地で OD_{600} = 0.6 まで培養し、0.1 mM IPTG 添加により発現誘導を 4 時間行った。大腸菌を超音波破砕した後、遠心分離を行い、上清を弱陰イオン交換カラム（DEAE Toyopearl）、弱陽イオン交換カラム（CM Toyopearl）で精製することで、ヒト MIF リコンビナント体を得た。

3. MIF の互変異性化活性に対する MTX の阻害効果の測定

L-ドーパクロムメチルエステル（300 μM）を基質として用いて、MIF の keto–enol 互変異性化活性に対する MTX の阻害効果を評価した。酵素反応は、30 nM MIF を添加することで開始し、keto 体由来の 475 nm の吸光度変化を UV-vis スペクトル装置 V-630 UV-vis spectrophotometer（JASCO）で継時的に測定した。MTX 存在下（0〜1 mM）でのトートメラーゼ活性をそれぞれ測定し、50 %阻害濃度 IC_{50} を算出した。

4. MTX–MIF 複合体の結晶化及びX線結晶構造解析

結晶化は10 mg/mLのMIFを用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。リザーバー溶液は2.0 M硫酸アンモニウム、4 %イソプロパノールを含む100 mM Tris-HCl（pH 8.0）を用いた。得られた結晶を、10 %グリセロールを含む4 mM MTX溶液に5分間ソーキングし、X線回折データを得た。測定は高エネルギー加速器研究機構（つくば、Photon Factory、AR-NW12）にて行った。回折データのprocessing とscalingはプログラムHKL2000とCCP4プログラムシステムを用いて行い、ヒト由来MIFの座標（PDB ID：1MIF）を用いた分子置換法により初期位相を決定した［4］。構造精密化の計算には、プログラムCCP4を用い、タンパク質構造の修正は（$2F_{obs} - F_{calc}$）を係数として計算した電子密度に対してプログラムCCP4のCootを用いた。

5. MIF 誘導炎症性サイトカインの測定

20 nM PMA、100 ng/mL ビタミンD3、10% FCSを含むRPMI1640培地で、ヒト単球性白血病細胞株THP-1を1週間培養後、1.5×10^5 cells/wellで播種し、0～1 mM MTXを加え30分間インキュベートした。5 μM MIFを添加し24時間曝露した後、細胞上清中のIL-8分泌量をELISAで測定した。

結　果

1. MTX ターゲットタンパク質候補の探索及び同定

ウシ脾臓または肺の粗抽液を用いて、MTXを固定化したカラムによるドラッグアフィニティークロマトグラフィーを行い、15 % SDS-PAGEにより解析したところ、数種類のタンパク質バンドが得られた。各タンパク質バンドをゲルから抽出し、逆相クロマトグラフィー質量分析装置により解析を行った結果、既知のMTXターゲットタンパク質であるDHFRのほか、MTXに親和性を示す炎症関連タンパク質の同定に成功した。

2. ヒト由来MIF リコビナント体の作製とMTXによる互変異性化活性阻害効果

ヒト末梢血単核球cDNAからMIF遺伝子のクローニングを行い、大腸菌によりリコンビナント体を発現させた。各種カラムで精製後、15 % SDS-PAGE解析を行ったところ、ヒト由来MIFのアミノ酸一次配列から計算される約12.5 kDaと一致する分子量に、単一なバンドが確認された。また、サイズ排除クロマトグラフィー–多角度光散乱法により、既報と同様に精製したMIFは三量体構造であることが確認された。基質にL-ドーパクロムメチルエステルを用いて、精製したMIFの互変異性化活性を測定したところ、既報のヒト由来MIFと同様な値を示した。MTXがMIFの高次構造に与える影響をサイズ排除クロマトグラフィー–多角度光散乱法（SEC-MALS）により確認した。その結果、MTXの有無で分子量ピークに大きな変化は見られず、MTX の存在下でもMIFは三量体構造であることが明らかになった。等温滴定型カロリーメトリー測定により、MIFに対するMTX結合の熱力学的パラメーターを算出したところ、エンタルピー変化の寄与が大きいことがわかった。また、MTXはMIFに1 : 1の量比で結合し、解離定数 $K_d = 313$ μMであることがわかった。

3. MTX－MIF 複合体の結晶化及びX線結晶構造解析

MIFの単結晶化を行い、X線結晶構造解析を行ったところ、既報通りに三量体のMIFの立体構造を得ることができた。次に、MIF結晶をMTX溶液にソーキングし、MTX-MIF複合体のX線結晶構造解析を行った。その結果、MTXはMIF三量体構造のサブユニット間に位置する基質ポケットに結合していることが明らかになった。MTXの結合により、Tyr36の側鎖が約90°回転し、MTXのプテリジン環との間にπ–π相互作用の形成がみられた。また、MTXの結合によるMIF三量体構造全体の大きな歪みは見られず（RMSD_Cα: 0.152 Å）、SEC-MALSの結果と一致した。

4. MTX による炎症性サイトカイン産生誘導抑制効果

予備実験段階ではあるが、MIFによる炎症性サイトカイン産生誘導に対するMTXの抑制効果の検討を行った。MIF曝露による刺激により、THP-1によるIL-8の産生量は0.8 ng/mLから1.6 ng/mLへと約2倍の増加がみられ、これは既報のデータと一致していた。MIF曝露前にMTXでTHP-1を処理することで、IL-8産生量の抑制が観測された。現在、引き続き詳細な検討を進めている。

a)　　b)

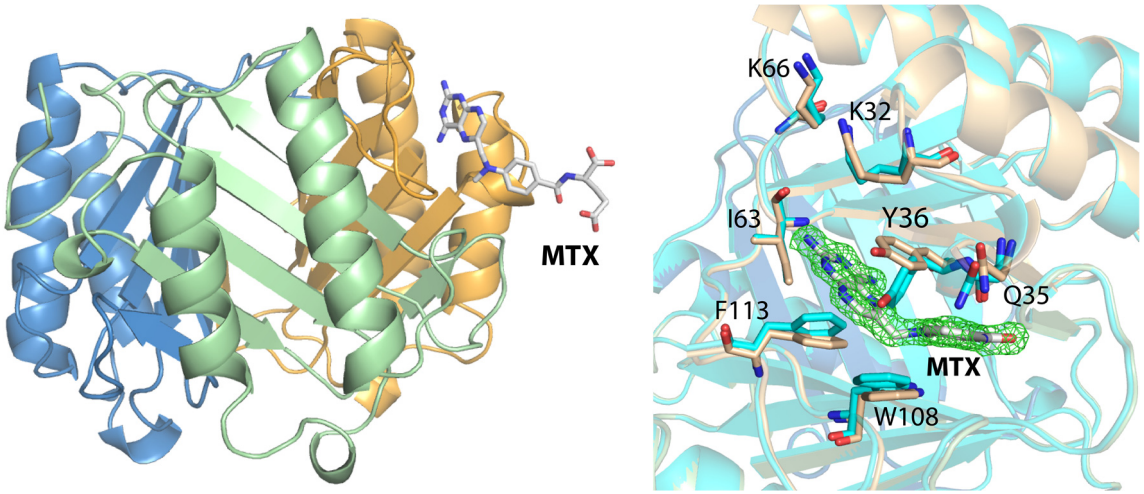


図1. MTX と MIF 複合体の X 線結晶構造

a) MTX と MIF 複合体の結晶構造の全体図。MIF 三量体の各サブユニットを青色、緑色、黄色で示す。

b) MIF 基質ポケットにおける MTX 結合部位の拡大図。MTX ありの結晶構造をシアン色、MTX なしの結晶構造を茶色で示し、重ねて表示している。

考　察

ドラッグアフィニティークロマトグラフィーにより、MTX ターゲットタンパク質候補として MIF を同定することに成功した。MIF はサブユニットあたり分子量約 12.5 kDa で三量体構造をとり、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として知られており［5, 6］、自己免疫疾患ほか免疫系に広範な作用を示す［7, 8］。そのため、MTX が自己免疫疾患に対して薬効を持つ上で、非常に関連性が高いタンパク質であると考えられる。L-ドーパクロムメチルエステルを用いた酵素反応測定により、MTX による MIF のトートメラーゼ活性阻害が観測された。既知の MIF の酵素活性阻害剤として、MIF の三量体構造を変化させる作用、もしくは基質ポケットに結合し酵素活性を拮抗阻害する作用の 2 通りが報告されている［9］。SEC-MALS 測定と MTX-MIF 複合体の X 線結晶構造解析の結果から、MTX は MIF の 3 量体構造には大きな影響を与えず、サブユニット間に位置する基質ポケットに結合することで阻害効果を示すことが示唆された。また、等温滴定型カロリーメトリー測定の結果から、MTX の MIF への結合は、エンタルピー変化の寄与が大きいことから、特異性の高い相互作用が結合の駆動力になっていることが予測された。MIF の基質ポケット近傍に位置するアミノ酸残基は、CD74 とのタンパク質間相互作用に重要であると予想されていることから［10］、MTX の MIF への結合により、MIF-CD74 複合体形成が阻害されシグナル伝達が抑制される可能性が示唆された。現在、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて、MIF による炎症性サイトカイン産生誘導に対する MTX の抑制効果の検討を進めており、予備実験結果として細胞レベルでの MTX の効果がみられている。今後、細胞実験ならびにモデルマウスを用いた動物実験により、MIF と MTX の関連性について詳細な検討を進めることで、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指していきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、秋田大学大学院理工学研究科の涌井秀樹教授、秋田大学大学院理工学研究科の尾高雅文教授、秋田大学大学院医学研究科の廣川誠教授、東京農工大学大学院工学府の養王田正文教授、東京農工大学大学院工学府の野口恵一准教授、理化学研究所環境資源科学研究センターの堂前直博士、東京大学大学院工学系研究科の津本浩平教授、東京大学大学院工学系研究科の長門石曉特任准教授である。

文　献

1) Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. Expert Rev Clin Immunol. 2014 Nov;10(11):1519-30. Epub 2014 Sep 22. PMID: 25245537 DOI: 10.1586/1744666X.2014.962996

2) Imokawa S, Colby TV, Leslie KO, Helmers RA. Methotrexate pneumonitis: review of the literature and histopathological findings in nine patients. Eur Respir J. 2000 Feb; 15(2):373-81. PMID: 10706507

3) Nakagawa M, Sugawara K, Goto T, Wakui H, Nunomura W. Hydroxychloroquine binding to cytoplasmic domain of Band 3 in human erythrocytes: Novel mechanistic insights into drug structure, efficacy and toxicity. Biochem Biophys Res Commun. 2016 May 13;473(4):999-1004. Epub 2016 Apr 2. PMID: 27049308 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.005

4) Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-A resolution of human macrophage migration inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 May 28;93(11):5191-6. PMID: 8643551

5) Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. Nat Rev Drug Discov. 2006 May;5(5):399-410. PMID: 16628200

6) Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. J Exp Med. 2003 Jun 2;197(11):1467-76. PMID: 12782713

7) Subbannayya T, Variar P, Advani J, Nair B, Shankar S, Gowda H, Saussez S, Chatterjee A, Prasad TS. An integrated signal transduction network of macrophage migration inhibitory factor. J Cell Commun Signal. 2016 Jun;10(2):165-70. Epub 2016 May 3. PMID: 27139435 DOI: 10.1007/s12079-016-0326-x

8) Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Nicoletti F. MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches. Autoimmun Rev. 2009 Jan;8(3):244-9. Epub 2008 Aug 20. PMID: 18721909 DOI: 10.1016/j.autrev.2008.07.037

9) O'Reilly C, Doroudian M, Mawhinney L, Donnelly SC. Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities. Med Res Rev. 2016 May;36(3):440-60. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26777977 DOI: 10.1002/med.21385

10) Meza-Romero R, Benedek G, Leng L, Bucala R, Vandenbark AA. Predicted structure of MIF/CD74 and RTL1000/CD74 complexes. Metab Brain Dis. 2016 Apr;31(2):249-55. Epub 2016 Feb 6. PMID: 26851955 DOI: 10.1007/s11011-016-9798-x