新規脳梗塞治療薬 SMTP-7 の 抗炎症作用機序の解析

鈴木絵里子*

Soluble epoxide hydrolase as an anti-inflammatory target of the thrombolytic stroke drug SMTP-7

Eriko SUZUKI

Key words: SMTP, soluble epoxide hydrolase (sEH), ischemic stroke, inflammation, hemorrhage

鈴木絵里子

2003年3月 慶應義塾大学理工学部応用化学科 卒業
2005年3月 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻修士課程修了
2008年3月 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻博士課程修了
2010年3月 慶應義塾大学大学院医学研究科外科学泌尿器科専攻 博士課程中退
2008年4月 慶應義塾大学医学部 Global-COE特別研究助教
2010年4月 東京農工大学 助教 女性未来育成機構
2013年4月 東京農工大学 助教 大学院農学研究院(現在に至る)

1. はじめに

脳梗塞は、世界的に死因の上位を占める疾患である¹⁾。急性期脳梗塞治療においては、組織型 plasminogen activator (t-PA) の静脈内投与による血栓溶解型治療が第一選択として推奨されるが、t-PA の治療対象となるのは発症後 4.5 時間以内の患者に限定されるだけでなく、出血性変化の増加等の副作用を免れず、本剤の適応は全脳梗塞患者の 5% 程度にすぎない²⁻⁶⁾。t-PA による治療可能時間域が制限される理由として、虚血再灌流障害が挙げられる。虚血領域では、血液の供給が停止するため脳組織は低酸素且つ低栄養状態となり、脳神経細胞はネクロシス・アポトーシスを来し、虚血周辺部位には炎症が生じる。ここに血流の再開が起こると、reactive ox-

xygen species (ROS) 産生が誘導され、マクロファージや好中球などの炎症性細胞が動員され、MMP 等、組織分解に与するプロテアーゼの産生が促進される。この一連の反応により、過度な炎症が惹起されるほか、血液脳関門 (BBB) の破壊に伴い脳出血が生じるなど、脳組織に重度のダメージを与える。t-PA は急激な血流の再開を介し、MMP-9 や炎症細胞の活性化を促し、上述の虚血再灌流障害を更に悪化させることが報告されている。そこで、血栓溶解活性を保持しつつ、虚血再灌流障害に伴う組織炎症や出血性副作用を抑制する新しい急性期脳梗塞治療薬の開発が求められている^{7,8)}。

Stachybotrys microspora triprenyl phenol (SMTP) は、当研究室において発見された生理活性低分子化合物の一群であり⁹⁻¹¹⁾、plasminogen の構造変化を誘導し、生理的 plasminogen 活性化を促進する^{9,12-15)}。SMTP は、図 1 に示す基本骨格構造を有し、N 側鎖構造 (図中 R 部分) の異なる 60 種類以上の同族体から成る。同族体の 1 つである SMTP-7 には、げっ歯類および霊長類脳梗塞モデルにおける著効 (梗塞領域の縮小、浮腫・神経症状・出血性変化の抑制等) が見出されている。一般に、血栓溶解剤は止血の遅延を来すが、

*責任者連絡先:

東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学部門・発酵学研究室

〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

農学部 1 号館 216 室

Tel: 042-367-5724, Fax: 042-367-5708

E-mail: ersuzuki@cc.tuat.ac.jp

図1 SMTPの基本骨格構造(文献20より転載)

薬効用量のSMTP-7は止血時間に影響しない。マウスおよびスナネズミの塞栓性脳梗塞モデルでは、t-PAよりも広い治療可能時間域を示す。霊長類(カニクイザル)の血栓性脳梗塞モデルでは、梗塞領域、浮腫、神経欠損症状の改善と梗塞性出血の抑制が確認されている。また、カニクイザルの重篤な塞栓性脳梗塞モデルにおいてt-PAを凌ぐ薬効を確認している¹⁶⁻¹⁹⁾。さらに、マウス脳虚血再灌流モデルでは、t-PAが梗塞性出血を助長するのに対し、SMTP-7はそれを抑制することが明らかとなった^{16, 17, 20)}。SMTP同族体には、plasminogen活性化促進作用をもたず、抗炎症活性のみを有するものが存在することから、われわれは、SMTP-7とt-PAとの決定的な機序の差異は、血栓溶解作用に加うる抗炎症作用にあると確信し、SMTPの新たな分子標的を探索し、soluble epoxide hydrolase(sEH)を同定した²¹⁾。われわれは、SMTP-7による脳梗塞改善効果に、sEH阻害を介した抗炎症作用が関与することを明らかにし、その阻害機序の詳細を解析した。

2. SMTPの抗炎症活性の検証と作用標的の同定

われわれのこれまでの研究結果から、SMTP-7が血栓・塞栓性脳梗塞モデルにおいて、炎症症状を抑制することを見出してはいたものの、これがSMTPの血栓溶解活性による血流再開に依存した現象であるか否かは検証されてこなかった。そこでわれわれは、血栓溶解に依存しない炎症性疾患モデルとして、ギランバレー症候群モデル、潰瘍性大腸炎モデル、クローン病モデルの3つの炎症病態モデルにおいて、SMTP-7およびplasminogen活性化促進作用

を持たない同族体であるSMTP-44Dの抗炎症活性を評価した。興味深いことに、ギランバレー症候群モデルラットにおいて、血栓溶解活性を持たないSMTP-44DはSMTP-7と同様に神経症状を緩和した(図2)。また、ラット潰瘍性大腸炎モデル、クローン病モデルラットにおいても小腸内出血、体重減少を対照薬である、immunoglobulinや5-ASA、prednisoneと同等レベルに抑制することが明らかとなった。即ちSMTP同族体がplasminogen活性化促進作用に依存しない抗炎症活性を有していること、またその抗炎症作用には、共通の標的分子が存在することが示唆された。これを踏まえ、次にわれわれは抗炎症作用標的分子の同定を行った。われわれのこれまでの*in vivo*での実験結果から、SMTP-7は動物の肝臓により効率的に蓄積することがわかっていて、そこで、ICRマウスの肝臓ホモジネートを標的分子の同定に用いることとした。また、SMTPに特異的に結合する分子の同定にあたり、まずSMTPの抗炎症活性に必須と考えられる共通構造の側鎖にアミノ基を配したSMTP-50を合成し、側鎖アミノ基を介した共有結合をもつアフィニティービーズを作製した(図3A)。アフィニティーカラムにマウス肝臓ホモジネートを供し、溶出画分をSDS-PAGEおよびCBB染色によりSMTPアフィニティービーズに特異的に結合する4つのバンドが得られた。これについて、peptide mass finger print法により分子の特定を行ったところ、4本のバンドは全長soluble epoxide hydrolase(sEH)、あるいはその分解産物に由来するものと同定された(図3B)。sEHは、哺乳類では肝臓・腎臓・脳に高発現する分子量約65 kDaのタンパク質であり、図3Cに示すようにC末端に

図2 ギランバレー症候群モデルにおける SMTP-7, -44D による神経症状の緩和
線溶活性を有さない同族体である SMTP-44D も SMTP-7 同様に神経症状を抑制したことから, SMTP
には共通の抗炎症活性標的分子が存在すると考えられた. (文献 20 より転載)

エポキシドヒドロラーゼ活性(Cterm-EH), N 末端に脂質リン酸エステルに対するホスファターゼ活性(Nterm-phos)を有し, これらが 2 量体構造を成す bifunctional な酵素である²²⁾. Cterm-EH の生体内での主要な基質はアラキドン酸代謝産物である epoxy eicosatrienoic acid(EET)である. EET は抗炎症作用や降圧作用等, 有益な生理活性を有するが, sEH により, dihydroxy eicosatrienoic acid(DHET)へと代謝されることでその生理活性を失うことから, sEH の Cterm-EH 阻害剤には抗炎症活性が期待される. 実際, Cterm-EH 阻害剤は抗炎症活性や血圧降下作用を有することが明らかになっている²³⁻²⁷⁾. 一方で, Nterm-phos については脂質代謝やコレステロール合成経路への関与が示唆されているものの²⁸⁻³⁰⁾, その他の生理的な作用の詳細は明らかになっておらず, 生体内基質に関する情報も少ないことから, 有用な阻害剤は見つかっていない. Cterm-EH 阻害剤単独投与が長期的には虚血性脳卒中のリスクを高めることや, sEH KO マウスは脳梗塞のリスクが低減する

ことから^{31, 32)}, 脳梗塞治療に際しては, Cterm-EH と Nterm-phos の両者を阻害することのメリットがあるものと考えられる. そこでわれわれは次に, この Cterm-EH および Nterm-phos に対する阻害活性の評価と, 阻害様式の詳細を検討した.

3. SMTP 同族体による sEH 阻害および阻害様式の検討

SMTP 同族体 3 種について, sEH の Cterm-EH および Nterm-phos に対する阻害活性を蛍光基質 (3-phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-methyl ester (PHOME) および Attophos を用いた *in vitro* の系で評価した. 結果, SMTP-0, -7, -44D はそれぞれ Cterm-EH に対し 6, 23, 27 μ M, Nterm-phos に対してはそれぞれ 14, 6, 24 μ M の阻害活性を示した(図 4A). 3 種の同族体のうち, plasminogen 活性化促進作用を有するのは SMTP-7 だけである. このことから, SMTP による sEH 阻害活性は, plasmino-

図3 SMTP アフィニティービーズの作製(A)とマウス肝臓ホモジネートから得られた SDS-PAGE のバンド(B). (C)SMTP の抗炎症標的分子 soluble epoxide hydrolase(sEH) の結晶構造(文献 20 より転載, 一部は https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.1.3.76 より転載)

gen 活性化促進作用とは独立した活性であることが明らかとなった. 続いて, sEH の生体内の基質である 14, 15-EET を用いて Cterm-EH と Nterm-phos に対する阻害様式を検証するべく, 反応速度論的解析を行った. sEH は epoxide hydrolase 活性とは独立した領域に脂質リン酸 phosphatase 活性を有する二機

能性酵素である. また, SMTP-7 は 2 つの core-unit が非対象に組み合わさった構造をとり, これらが上述の sEH の独立した複数の領域と相互作用するものと考えられたため, 数理解析における煩雑性を回避するために, 解析には, SMTP の core-unit のみ, 即ち *N* 側鎖を有さない同族体である SMTP-0 を用

図4 SMTPによるCterm-EHおよびNterm-phos阻害(A)およびHepG2細胞におけるEET加水分解阻害活性(B)(文献20より転載)

いた。結果、SMTP-0はCterm-EHに対しては基質に対して拮抗阻害の様式を取ることが明らかとなった。一方、Nterm-phosに対しては、SMTP-0は擬似的非競合阻害の様式を取ることが明らかとなった。われわれは次に、SMTP同族体によるsEH Cterm-EHおよびNterm-phos阻害における構造活性相関を検討した。その結果、N側鎖にphenylamineを有する同族体はCterm-EH、Nterm-phos両者に対して阻害活性が高い傾向にあり、側鎖にnaphthaleneあるいはglucoseを有する同族体はSMTP-0と比較して両者への阻害活性が低下する傾向にあることが明らかとなった(図5)。SMTP-0、-7、-44Dは、いずれもヒト肝癌由来HepG2細胞においても、14, 15-DHETレベルの低下をもたらしたことから(図4B)、SMTP同族体は、生体内で内因性のsEHを阻害するものと考えられる。

4. ギランバレー症候群モデルラット血漿を用いたアラキドン酸由来脂質メディエーターのメタボローム解析

われわれは、さらに抗炎症作用におけるsEH阻害の寄与およびSMTPのsEHへの特異性を検証するべく、ギランバレー症候群モデルラットの血漿サンプルについて、48種のアラキドン酸代謝産物(COX, LOX, CYP経路由来エイコサノイド)の定量解析を行った。その結果、3種のアラキドン酸経路由来のエイコサノイドの分布は、SMTP投与によって大きく変化することはなかった(図6A)。また、SMTP-7投与群に、生理食塩水投与群と比較して有意な血中11, 12-DHETレベルの減少が認められた(図6B)。驚くべきことに、48種のエイコサノイドの内、有意な減少が認められたのは11,12-DHETのみであり、DHETの位置異性体(5, 6-DHET, 8, 9-DHET, 11, 12-

図5 SMTP同族体のN側鎖構造とCterm-EH, Nterm-phos阻害活性の構造活性相関 (文献20より転載)

図6 (A)ギランバレー症候群モデルラット血漿中のCOX, LOX, CYP経路由来エイコサノイドの分布 (B)SMTPによるラット血漿中のDHETの各regioisomerの相対量の変化

DHET, 14, 15-DHET)では有意な変化は認められなかった。即ち, SMTP-7のsEHに対する特異性が明らかとなった。異なる位置異性体間で阻害強度が異なる理由に関しては, 生理的条件下では, sEHの14, 15-EETに対する比活性は11, 12-EETと比較して2倍以上高いとされているが, モデルにおいてはこれが約1.1倍と低値であったことから, 14, 15-DHET濃度に影響しなかった可能性が高い。

5. カニクイザル脳塞栓症モデルにおけるSMTP-7の薬効評価

このような優れた作用を有するSMTP同族体の開発の一環として, カニクイザルの脳塞栓症モデルを用いた実験が株式会社ティムスとの共同研究にて行われた。このモデルは脳以外の部位(主に心臓)で形成された血栓が血流に乗り, 脳血管に詰まることで生じる塞栓性の脳梗塞モデルである。塞栓性脳梗塞の特徴は, 突発的に生じ, 大きな梗塞巣と共にいくつかの塞栓による多発性の梗塞巣が生じ, 重症化する。

図7 (A)カニクイザル塞栓性脳梗塞モデルにおける SMTP-7 および t-PA による脳梗塞体積に与える影響とサル血漿中の各種パラメーターの変化 (B)サル血漿中の plasmin- α_2 -antiplasmin (PIC) レベルの変化と梗塞体積との相関

るリスクが大きいことである。また、血栓の溶解および遠位側への移動により梗塞巣に大量の血液が流入し、血管が破綻する出血性梗塞を生じ易いことが挙げられる。このようなモデルにおいても、SMTP-7

は有意に梗塞体積を減少させた。われわれは、本モデルのサル血漿中の凝固・線溶系因子、各種炎症性メディエーター、神経障害マーカーを定量し、さらにエイコサノイド解析により DHET の位置異性体 4

種について、定量的解析を行った。その結果、DHETに低下傾向が認められ($P=0.085$)、さらにMCP-1の上昇抑制傾向($P=0.160$)、MMP-9の有意な発現抑制($P=0.024$)が認められた(図7A)。さらに、fibrin zymographyを用いて血漿中のPICレベルを解析したところ、SMTP-7投与による有意なPICの上昇が認められた($P=0.018$)。さらに驚くべきことに、SMTP-7によるPICレベルの上昇は、梗塞体積の減少と強く相関していた($R^2=0.997$)。一方で、t-PA投与群にはそのような傾向は認められなかった(図7B)。

6. おわりに

本研究より、SMTP-7はplasminogenのコンフォメーション変化促進活性を介した血栓溶解活性と、sEH阻害を介した抗炎症作用の2つのユニークな活性により、優れた脳梗塞治療効果を示すことが明らかとなった。SMTPは、脳虚血再灌流障害による組織・神経の炎症や出血変化を抑制することから、t-PA非適応患者をも救う画期的な脳梗塞治療薬として期待される。現在、SMTP同族体の1つ(TMS-007)は、新規脳梗塞治療薬として臨床開発中であり、現在GLP毒性試験・安全性薬理試験、GMP原薬・製剤製造検討および臨床第I相試験を実施し、臨床第II相試験の準備段階にある。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM: Stroke. *Lancet* **371**: 1612–1623, 2008.
- Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brodt TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, Tilley BC, Davis SM, Donnan GA, Hacke W; ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, Allen K, Mau J, Meier D, del Zoppo G, De Silva DA, Butcher KS, Parsons MW, Barber PA, Levi C, Bladin C, Byrnes G: Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* **375**: 1695–1703, 2010.
- Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo G, Sandercock P, Lindley RL, Cohen G: Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**: 2364–2372, 2012.
- Kleindorfer D, Lindsell CJ, Brass L, Koroshetz W, Broderick JP: National US estimates of recombinant tissue plasminogen activator use: ICD-9 codes substantially underestimate. *Stroke* **39**: 924–928, 2008.
- Nadeau JO, Shi S, Fang J, Kapral MK, Richards JA, Silver FL, Hill MD; Investigators for the Registry of the Canadian Stroke Network: TPA use for stroke in the Registry of the Canadian Stroke Network. *Can J Neurol Sci* **32**: 433–439, 2005.
- Kleinig TJ, Vink R: Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options. *Curr Opin Neurol* **22**: 294–301, 2009.
- Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D: Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* **32**: 48–55, 2009.
- Hasumi K, Yamamichi S, Harada T: Small-molecule modulators of zymogen activation in the fibrinolytic and coagulation systems. *FEBS J* **277**: 3675–3687, 2010.
- Koide H, Narasaki R, Hasegawa K, Nishimura N, Hasumi K: A new series of the SMTP plasminogen modulator with a phenylglycine-based side chain. *J Antibiot* **65**: 91–93, 2012.
- Koide H, Hasegawa K, Narasaki R, Nishimura N, Hasumi K: A new series of the SMTP plasminogen modulators with a phenylamine-based side-chain. *J Antibiot* **65**: 361–367, 2012.
- Hu W, Ohyama S, Hasumi K: Activation of fibrinolysis by SMTP-7 and -8, novel staplabin analogs with a pseudosymmetric structure. *J Antibiot* **53**: 241–247, 2000.
- Hu W, Narasaki R, Nishimura N, Hasumi K: SMTP (Stachybotrys microspora triphenyl phenol) enhances clot clearance in a pulmonary embolism model in rats. *Thromb J* **10**: 2, 2012.
- Koyanagi K, Narasaki R, Yamamichi S, Suzuki E, Hasumi K: Mechanism of the action of SMTP-7, a novel small-molecule modulator of plasminogen activation. *Blood Coagul Fibrinolysis* **25**: 316–321, 2014.
- Miyazaki T, Kimura Y, Ohata H, Hashimoto T, Shibata K, Hasumi K, Honda K: Distinct effects of tissue-type plasminogen activator and SMTP-7 on cerebrovascular inflammation following thrombolytic reperfusion. *Stroke* **42**: 1097–1104, 2011.
- Hashimoto T, Shibata K, Nobe K, Hasumi K, Honda K: A novel embolic model of cerebral infarction and evaluation of Stachybotrys microspora triphenyl phenol-7 (SMTP-7), a novel fungal triphenyl phenol metabolite. *J Pharmacol Sci* **114**: 41–49, 2010.
- Shibata K, Hashimoto T, Nobe K, Hasumi K, Honda K: A novel finding of a low-molecular-weight compound, SMTP-7, having thrombolytic and anti-inflammatory effects in cerebral infarction of mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **382**: 245–253, 2010.
- Akamatsu Y, Saito A, Fujimura M, Shimizu H, Mekawy M, Hasumi K, Tominaga T: Stachybotrys microspora triphenyl phenol-7, a novel fibrinolytic agent, suppresses superoxide production, matrix metalloproteinase-9 expression, and thereby attenuates ischemia/reperfusion injury in rat brain. *Neurosci Lett* **503**: 110–114, 2011.
- Sawada H, Nishimura N, Suzuki E, Zhuang J, Hasegawa K,

- Takamatsu H, Honda K, Hasumi K: SMTP-7, a novel small-molecule thrombolytic for ischemic stroke: a study in rodents and primates. *J Cereb Blood Flow Metab* **34**: 235–241, 2014.
- 19) Shibata K, Hashimoto T, Nobe K, Hasumi K, Honda K: Neuroprotective mechanisms of SMTP-7 in cerebral infarction model in mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **384**: 103–108, 2011.
 - 20) Matsumoto N, Suzuki E, Ishikawa M, Shirafuji T, Hasumi K: Soluble epoxide hydrolase as an anti-inflammatory target of the thrombolytic stroke drug SMTP-7. *J Biol Chem* **289**: 35826–35838, 2014.
 - 21) Newman JW, Morisseau C, Hammock BD: Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **44**: 1–51, 2005.
 - 22) Gomez GA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW: Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis. *Biochemistry* **43**: 4716–4723, 2004.
 - 23) Michaelis UR, Fleming I: From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacol Ther* **111**: 584–595, 2006.
 - 24) Spector AA, Norris AW: Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol, Cell Physiol* **292**: C996–1012, 2007.
 - 25) Iliff JJ, Jia J, Nelson J, Goyagi T, Klaus J, Alkayed NJ: Epoxyeicosanoid signaling in CNS function and disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **91**: 68–84, 2010.
 - 26) Inceoglu B, Jinks SL, Ulu A, Hegedus CM, Georgi K, Schmelzer KR, Wagner K, Jones PD, Morisseau C, Hammock BD: Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **105**: 18901–18906, 2008.
 - 27) Tran KL, Aronov PA, Tanaka H, Newman JW, Hammock BD, Morisseau C: Lipid sulfates and sulfonates are allosteric competitive inhibitors of the N-terminal phosphatase activity of the mammalian soluble epoxide hydrolase. *Biochemistry* **44**: 12179–12187, 2005.
 - 28) Morisseau C, Schebb NH, Dong H, Ulu A, Aronov PA, Hammock BD: Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids. *Biochem Biophys Res Commun* **419**: 796–800, 2012.
 - 29) Oguro A, Imaoka S: Lysophosphatidic acids are new substrates for the phosphatase domain of soluble epoxide hydrolase. *J Lipid Res* **53**: 505–512, 2012.
 - 30) Zhang W, Koerner IP, Noppens R, Grafe M, Tsai HJ, Morisseau C, Luria A, Hammock BD, Falck JR, Alkayed NJ: Soluble epoxide hydrolase: a novel therapeutic target in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**: 1931–1940, 2007.
 - 31) Zhang W, Otsuka T, Sugo N, Ardeschiri A, Alhadid YK, Iliff JJ, DeBarber AE, Koop DR, Alkayed NJ: Soluble epoxide hydrolase gene deletion is protective against experimental cerebral ischemia. *Stroke* **39**: 2073–2078, 2008.
 - 32) Jouihan SA, Zuloaga KL, Zhang W, Shangraw RE, Krasnow SM, Marks DL, Alkayed NJ: Role of soluble epoxide hydrolase in exacerbation of stroke by streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**: 1650–1656, 2013.