特集：分子標的治療からみた病態へのアプローチ

総 説

チロシンキナーゼ Syk の生理機能とその阻害薬

千原一泰^{*1,*4}, 木村幸弘^{*1,*2}, 本定千知^{*1,*3}, 竹内健司^{*1,*4}, 定 清直^{*1,*4}

Syk inhibitors

Kazuyasu CHIHARA^{*1,*4}, Yukihiro KIMURA^{*1,*2}, Chisato HONJO^{*1,*3},
Kenji TAKEUCHI^{*1,*4} and Kiyonao SADA^{*1,*4}^{*1}*Division of Genome Science and Microbiology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui*^{*2}*Division of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui*^{*3}*Division of Respiratory Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui*^{*4}*Organization for Life Science Advancement Programs, University of Fukui*

(Accepted April 23, 2013)

summary

Non-receptor type of protein-tyrosine kinase Syk (spleen tyrosine kinase) was isolated in University of Fukui in 1991. Syk is most highly expressed by haemopoietic cells and known to play crucial roles in the signal transduction through various immunoreceptors of the adaptive immune response. However, recent reports demonstrate that Syk also mediates other biological functions, such as innate immune response, osteoclast maturation, platelet activation and cellular adhesion. Moreover, ectopic expression of Syk by epigenetic changes is reported to cause retinoblastoma. Because of its critical roles on the cellular functions, the development of Syk inhibitors for clinical use has been desired. Although many candidate compounds were produced, none of them had progressed to clinical trials. However, novel Syk inhibitors were finally developed and its usefulness has been evaluated in the treatment of allergic rhinitis, rheumatoid arthritis and idiopathic thrombocytopenic purpura. In this review, we will summarize the history, structure and function of Syk, and then the novel Syk inhibitors and their current status. In addition, we will introduce our research focused on the functions of Syk on Dectin-1-mediated mast cell activation.

Key words—Syk; Syk inhibitors; R788; fostamatinib

抄 録

Spleen tyrosine kinase (Syk) は、福井大学医学部において単離された非受容体型チロシンキナーゼである。Syk は IgE 受容体活性化を介したマスト細胞のヒスタミン放出やサイトカイン産生、マクロファージのファゴサイトーシス、破骨細胞の活性化、さらに B 細胞の分化や活性化に必須の役割を担っている。また、最近の研究からある種の癌や自己免疫疾患、真菌やウイルス感染との関連も明らかになってきた。Syk が細胞機能の根幹に関わる重要な分子であることが次々と明らかとなるにつれ、その阻害薬の開発と種々の疾患に対する臨床応用への期待が高まっている。このような強い要望に応え、これまでに多くの Syk 阻害薬が開発されてきた。しかし、そのすべてが臨床治験にまで至らなかった。ところが近年、新たな Syk 阻害薬が開発され、アレルギー性鼻炎や関節リウマチへの有効性が脚光を浴びている。特に R788 (フォスタマチニブ) は経口 Syk 阻害薬として開発され、米国において第 III 層試験が実施されている。本稿では Syk の発見の経緯、構造と生理機能を踏まえた上で、新しい Syk 阻害薬について概説したい。

^{*1}福井大学医学部ゲノム科学・微生物学領域^{*2}福井大学医学部耳鼻咽喉科学・頭頸部外科^{*3}福井大学医学部呼吸器内科^{*4}福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構

I. Syk の発見

1980年代後半より、内外の研究室では新しい細胞質型のチロシンキナーゼの同定とその性状解析が精力的に進められていた。福井医科大学（現福井大学医学部）の山村博平研究室では、ブタ脾臓の抽出物を様々なイオン交換カラムやアフィニティークラムを組み合わせた実験を繰り返しながら、新しい人工ペプチド [Val]⁵ アンギオテンシン II のチロシンリン酸化能を指標に、新規チロシンキナーゼの単離を試みていた。当時医学生であった筆者（K.S）は研究室に通い、教員スタッフや先輩大学院生に実験手技を教わりながら、教科書には載っていない未知の研究成果を心待ちにしたものである。その成果は、1988年に蛋白質の部分精製論文として¹⁾、また1991年には全長の cDNA が単離された。この全く新しいチロシンキナーゼは、脾臓から見つかったチロシンキナーゼ Syk (spleen tyrosine kinase) として報告された²⁾。なお将来の研究によりヒトの病気とのかかわりが明らかになることを願い、[sik] (=sick) と発音するよう原著論文に記載されている²⁾。

II. Syk の構造

Syk は全長が 635 アミノ酸で、分子量約 72 kDa の蛋白質である。アミノ末端側には種々の免疫受容体に存在する免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) に特異的に会合する 2 つの SH2 ドメインが、またカルボキシ末端側にはチロシンキナーゼドメインを有している (図 1)。この構造は、それまで知られていた Src 型キナーゼとは全く異なる²⁾。

図 1 Syk の構造

Syk との相同性を有する分子としては、ほ乳類では翌年発見された ZAP-70 (T 細胞と NK 細胞に限局して発現) のみであるが、より下等な動物では Hydra の HTK16, HTK18, ショウジョウバエの SHARK などが Syk ファミリー分子として知られている。

それぞれのドメインをつなぐ領域は後に “interdomain A”, “interdomain B” (リンカー領域) と名付けられ、キナーゼ領域のさらにカルボキシ末端にある数アミノ酸残基とともに Syk の高次構造変化のための分子内相互作用に重要であることが明らかにされた。特にリンカー領域のチロシン残基のリン酸化は SH2 会合分子との相互作用や、自らのキナーゼ領域を解放することにも重要であると考えられている。

Syk には 10 箇所の自己リン酸化部位があるが、リンカー領域のチロシン残基については、上流の Src 型キナーゼ (Lyn など) によってもリン酸化されると推定される。それぞれのリン酸化部位には個別の機能や会合分子が存在すると考えられる。

Syk とサブファミリーを形成する ZAP-70 との活性化機序の相違点について考察すると、一つ目は Syk が様々な ITAM に会合して活性化できる点、二つ目は Syk の活性化には必ずしも Src 型キナーゼを必要としない点が挙げられる。特に後者についてはリンカー領域に位置するチロシン残基 (Syk のチロシン 352 に相当) に Src 型チロシンキナーゼが会合することや、キナーゼドメインに位置するチロシン残基 (Syk チロシン 526 に相当) を Src 型キナーゼがリン酸化することが、Syk の場合必要ないことが理由として挙げられる。こうした点は Syk 阻害薬の開発において、特異性や有用性を考える上で重要であると考えられる。

III. Syk の機能

Syk は正常組織では主に血液免疫系細胞に発現し、骨髄細胞系ではマスト細胞、樹状細胞、マクロファージ、破骨細胞、血小板、リンパ球では B リンパ球に高い発現が認められている。Syk の活性化に関与する受容体としては、高親和性 IgE 受容体、IgG 受容体、コラーゲン受容体、C 型レクチン受容体、B 細胞抗原受容体、ストレス受容体などが知られている^{3,4)}。マスト細胞では、高親和性 IgE 受容体を介する脱顆粒 (ヒスタミン放出) やサイトカイン産生に、またマクロファージでは IgG の Fc 受容

体を介するファゴサイトーシスに、さらに単球から分化した破骨細胞の活性化やコラーゲン受容体を介する血小板凝集に Syk は必須の役割を担うことが証明された。またリンパ球では、抗原受容体を介する B 細胞の活性化や分化に不可欠であることが報告されている。さらに広く真菌やウイルス感染に対する免疫応答を制御する分子としての位置付けもなされている。一方、Syk は乳癌やメラノーマにおいて癌抑制因子として位置付けられているが^{5,6)}、急性前骨髄性白血病に対するゲフィチニブのオフターゲット機構として Syk の活性化抑制作用が挙げられている⁷⁾。更にごく最近、Syk が網膜芽細胞腫発症の過程で、治療のターゲットになり得ることが報告された⁸⁾。網膜芽細胞腫では、エピジェネティックな変化により、正常組織では発現していない Syk 蛋白質が癌組織にて高発現しており、その病態に深く関与することが明らかになった（後述）。

IV. Syk 阻害薬開発の歴史

Syk の様々な役割が明らかになるにつれ、Syk 阻害薬の開発も報告されるようになってきた。1994 年にはじめて報告された Piceatannol は Lyn を阻害することなく Syk を阻害する分子として報告され、その後様々な実験において Syk の特異的阻害薬として用いられた。しかし、他のチロシンキナーゼやセリンキナーゼをも阻害することが明らかとな

ったために、現在では Syk 阻害薬と記載されることはほとんどなくなった。Piceatannol が登場した後も、様々な化合物が *in vitro* で Syk 阻害薬としての役割を有することが明らかとなった（図 2）。Syk のキナーゼドメインの自己リン酸化部位を含む領域のペプチドに対するリン酸化阻害能を指標としたハイスループットの実験系も開発され（Syk Inhibitor IV, BAY 61-3606）、阻害薬の開発に大きく貢献した。しかしながら、これら化合物はいずれも臨床応用に至ることがなかった⁹⁾。このまま Syk 阻害薬は永遠に開発されないのではないかと、そもそも細胞膜を通過して細胞内に存在する Syk に対する阻害薬が出来たとしてどの程度有効なのか、当時我々を含めた多くの研究者が Syk 阻害薬の開発について懐疑的であったのではないかと考えられる。

V. 新しい Syk 阻害薬

近年、Syk のシグナル伝達経路についての理解が進み、細胞内に存在する Syk 標的分子（アダプター蛋白質 LAT）のリン酸化を指標とした新しい Syk 阻害薬が Rigel 社により開発され、低分子化合物による関節リウマチ治療の新たな展開として注目されている（図 3）。まずはじめに、ヒトマスト細胞を用いた実験系より、R112 が Syk 阻害薬として開発された。マスト細胞の脱顆粒反応を抑制し、アラキドン代謝物やサイトカインの放出も抑制する。

薬剤名	商品名	主な文献
3,4,3',5'-tetrahydroxy- <i>trans</i> -stilbene (Piceatannol)	Piceatannol	Oliver <i>et al.</i> J. Biol. Chem. 1994
3,4-dimethyl-10-(3-aminopropyl)-9-acridine oxalate (ER-27319)		Moriya <i>et al.</i> Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997
3-(1-Methyl-1H-indol-3-yl -methylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonamide (Oxindoles)	Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor	Lai <i>et al.</i> Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003
(2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino] -nicotinamide dihydrochloride)	Syk Inhibitor IV, BAY 61-3606	Yamamoto <i>et al.</i> J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003
5,7-disubstituted[1,6]naphthyridines (Naphthyridines)		Cywin <i>et al.</i> Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003
4-anilino-pyrimidine-5 -carboxamide derivatives		Hisamichi <i>et al.</i> Bioorg. Med. Chem. 2005
3,4-Methylenedioxy-b-nitrostyrene	Syk Inhibitor III	Wang <i>et al.</i> Mol. Pharmacol. 2006

図 2 従来の Syk 阻害薬
いずれも臨床応用には至らなかった。
羽溪ら 炎症と免疫 2009

Fostamatinib (R788) - RA
Phase III
(R406のプロドラッグ)

R343 - Asthma
Phase II

R333 - Discoid Lupus
Phase II
(JAK/Syk阻害薬R348のactive
metabolite)

R348-Dry eye
Phase I

図3 新たな Syk 阻害薬
<http://ir.rigel.com> より

R112 は Syk の ATP 結合部位に結合することで、ATP 競合阻害剤として Syk のキナーゼ活性を抑制する。2006 年に報告された R406 は、Syk のリンカー領域にあるチロシン 352 のリン酸化には影響しないが、LAT のチロシン 191 のリン酸化を濃度依存的に抑制し、IgE を介するマスト細胞の脱顆粒反応を同様に抑制することが明らかとなった。さらに経口での投与が可能で R406 のプロドラッグである R788/フォスタマチニブが開発され、その有用性が明らかとなった。この低分子化合物はアレルギー性鼻炎や関節リウマチ¹⁰⁾、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の新たな治療薬として注目され、米国においては関節リウマチでは現在第 III 相試験、ITP では第 II 相試験が行われている。その他、R343 は喘息の治療薬として第 II 相試験、R333 (JAK/Syk 阻害薬 R348 の active metabolite) は Discoid Lupus の治療薬として第 II 相試験、R348 はドライアイの治療薬として第 I 相試験がそれぞれ進行中である。Syk 阻害薬の長期投与は、免疫抑制や発癌、癌転移、出血傾向などの副作用が懸念され、臨床応用にあたっては、安全性に対する十分な配慮が必要であると考えられる。2013 年 4 月に発表された R788 の第 III 相試験の結果 (一部) によると、他の抗リウマチ治療薬 (メトトレキサート) に反応性が乏しい患者を対象に R788 を投与した結果、プラセボ投与群と比較して臨床症状には改善が認められたが、病態のスコアには改善が認められなかった。また高血圧、感染、消化器症状などの副反応も認められている。この新薬は長期投与が予想されるため、発癌や癌転移、感染症を含む様々な副作用のリスクを十分に検討する必要があることを強調したい。第 III 相試験の残りの結果も 2013 年度中に発表される見込みである。

他の新規 Syk 阻害薬としては PRT062607 (PORTOLA 社) が挙げられる。PRT062607 は精製したキナーゼを用いた化合物のハイスループットスクリーニングにより見出された。ATP 競合阻害剤として Syk のキナーゼ活性を抑制することが示されている。濃度依存的に B 細胞受容体刺激を抑制し、関節リウマチのモデル動物において経口投与における有効性が確認されている¹¹⁾。

また、最近キナ皮に含まれる植物アルカロイドに Syk と基質蛋白質の会合を阻害する活性が見出された。この植物アルカロイドは Compound-61 と名付けられ、細胞や動物レベルにおける薬理作用について基礎的データの収集が開始されている¹²⁾。Compound-61 は Syk と基質蛋白質の会合を阻害することから、Syk と ATP の結合を阻害する従来の Syk 阻害薬とは活性阻害のメカニズムが大きく異なっている。その意味でも、今後の研究開発に期待が持たれる。

なお、これら新規 Syk 阻害剤の特異性であるが、チロシンキナーゼのみならず、全てのプロテインキナーゼのキナーゼドメインはアミノ酸相同性を有している。このことはあるキナーゼ阻害薬から、構造を少しずつ変化することにより他のキナーゼ阻害薬が開発できることを示しており、例としてプロテインキナーゼ C の阻害薬で v-Abl にも阻害効果を持つ化合物から Bcr-Abl に阻害効果を持つ化合物が開発され、さらにより特異性を高めたイマチニブ (STI-571) が開発されたことが挙げられる。このことは、*in vitro* で特異性が高い阻害薬を開発しても、*in vivo* での投与例では他のキナーゼにも影響を及ぼす可能性を示唆するものである。その点では新しい低分子化合物に限らず、Syk 阻害薬について厳密な特異性を有する阻害剤であると断言することは難しいと考えられる¹³⁾。

VI. Syk 阻害剤についての新しい知見

急性前骨髄性白血病 (AML M3) の分化誘導を引き起こす shRNA の網羅的同定と、ゲフィチニブ (EGF 受容体阻害薬) によりチロシンリン酸化が減少する蛋白質の網羅的同定という 2 つの研究により Syk が AML M3 の分化誘導療法の標的分子であることが示唆された⁷⁾。実際 R406 を投与してみると、他の白血病細胞には影響を及ぼさないが、AML M3 の患者由来の細胞では標準的治療薬である ATRA (all-trans retinoic acid) 同様に分化誘導を

図4 網膜芽細胞腫と Syk 阻害薬

引き起こすことが明らかとなった。またごく最近 *syk* 遺伝子のエピジェネティックな調節と疾患についての知見が明らかとなった。網膜芽細胞腫は *RBI* 遺伝子の対立遺伝子が原因であるが、*RBI* 遺伝子はゲノムの安定性に関わるものであり、エピジェネティックな解析を行った結果、*syk* 遺伝子のプロモーター領域が活性化し、正常組織では発現していない Syk が癌組織において異常発現し活性化していること、さらに Syk が癌細胞の生存に必要であることが明らかとなった⁸⁾ (図4)。これらの知見により Syk 阻害剤がこれら疾患の治療薬としても応用される可能性が示唆された。なおこれまでのところ先天性の *syk* 遺伝子変異は筆者の知る限り報告がない。一部の白血病で融合遺伝子が報告されているが、それが疾患の原因であるか否かについては明かではない。

このように、新たに登場した Syk 阻害薬は基礎研究にも応用されており、これまで不明であった Syk の新たな生理的役割が明らかにされている。Syk の生理機能に関する基礎的研究と、Syk 阻害薬が持つ薬理作用の解析は、有効な Syk 阻害薬の開発に切っても切れない関係にあると考えられる。なお、Syk 阻害薬については最近のわれわれの総説も参考にされたい^{14,15)}。

VII. マスト細胞における Syk の新たな生理機能

マスト細胞は I 型アレルギー反応において中心的役割を担っている。マスト細胞は細胞膜上に IgE 受容体を発現しており、抗原により IgE 受容体が凝集すると細胞内領域に存在する ITAM がチロシンリン酸化を受け、Syk を活性化する。Syk の活性化は抗原によるヒスタミン放出やサイトカインの産生に必須である。一方、最新の研究から、ヒトのマ

図5 Dectin-1 を介するマスト細胞の応答

スト細胞に真菌の感染防御に重要な役割を担う Dectin-1 の発現が確認された¹⁶⁾。Dectin-1 はマクロファージや樹状細胞において細胞内領域の ITAM により Syk を活性化し、炎症性サイトカインや活性酸素の産生を促進することが示されている¹⁷⁾。しかし、マスト細胞における Dectin-1 の生理機能やその細胞内シグナル伝達機構は明らかとなっていない (図5)。

そこで、我々はマスト細胞のモデルとして使われる RBL-2H3 細胞が Dectin-1 の特異的アゴニストと考えられている Curdlan (真菌の細胞壁構成成分) に反応するのか解析した。その結果、Curdlan 刺激後 40 分をピークに細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルの上昇と転写因子 ERK のリン酸化が認められた。これらの反応は Dectin-1 を安定発現する RBL-2H3 細胞で増強された。さらに、Dectin-1 安定発現細胞株において Curdlan 刺激に依存した Dectin-1 と Syk の会合が認められた。以上の結果は、マスト細胞が Dectin-1 を介して真菌感染に対する免疫応答に関与する可能性を示唆している。現在、Dectin-1 の ITAM をチロシンリン酸化するキナーゼの同定を進めている。また、Syk の活性化状

態の解析やシグナル伝達機構，マスト細胞の細胞応答についても解析も進める予定である．我々が日夜行っている研究が，有効な Syk 阻害薬の開発に少しでも貢献できれば幸いである．

VIII. おわりに

Syk はさまざまな生体反応において核心的役割を果たす重要な分子である．それゆえ，種々の疾患に対する分子標的治療の有力なターゲットに成り得る．Rigel 社が開発した新たな Syk 阻害薬は現在臨床試験に入っており，有効性が注目されている．他にも新たな Syk 阻害薬が次々と登場しており，臨床試験に向けた開発が進められている．今後も，種々の疾患治療へ向けた，より有効な Syk 阻害薬の開発に注目していきたい．

文 献

- 1) Sakai, K., et al. : Characterization of partially purified cytosolic protein-tyrosine kinase from porcine spleen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152** : 1123–1130, 1988.
- 2) Taniguchi, T., et al. : Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J. Biol. Chem.* **266** : 15790–15796, 1991.
- 3) Sada, K., et al. : Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biochem.* **130** : 177–186, 2001.
- 4) Mocsai, A., et al. : The Syk tyrosine kinase : a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* **10** : 387–402, 2010.
- 5) Coopman, P.J., et al. : The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* **406** : 742–747, 2000.
- 6) Bailet, O., et al. : Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res.* **69** : 2748–2756, 2009.
- 7) Hahn, C.K., et al. : Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target. *Cancer Cell* **16** : 281–294, 2009.
- 8) Zhang, J., et al. : A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature* **481** : 329–334, 2012.
- 9) 羽溪朋子, 定 清直 : Syk 阻害薬．炎症と免疫 **7** : 530–537, 2009.
- 10) Weinblatt, M.E., et al. : An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **363** : 1303–1312, 2010.
- 11) Coffey, G., et al. : Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340** : 350–359, 2012.
- 12) Uckun, F.M., et al. : STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** : 2902–2907, 2010.
- 13) Karaman, M.W., et al. : A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **26** : 127–132, 2008.
- 14) 千原一泰, ほか : Spleen tyrosine kinase (Syk) の生理的役割とその阻害薬の作用．リウマチ科 **47** : 694–699, 2012.
- 15) 定 清直 : Syk 阻害薬．特集 リウマチ治療薬の新展開．医薬ジャーナル **48** : 1531–1534, 2012.
- 16) Ribbing, C., et al. : Mast cells generated from patients with atopic eczema have enhanced levels of granule mediators and an impaired Dectin-1 expression. *Allergy* **66** : 110–119, 2011.
- 17) Vautier, S., et al. : C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine* **58** : 89–99, 2012.