

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 炎症性疾患の新規創薬ターゲットの同定

Identification of a novel drug target for inflammatory diseases

研究開発実施期間： 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：鈴木 一博

Kazuhiro Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・教授

Professor, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

II 研究開発の概要

我々は、免疫細胞の移動を司るケモカイン受容体の新たなシグナル伝達分子として、copper metabolism gene MURR1 domain-containing (COMMD) 3 と COMMD8 から成るタンパク複合体 (COMMD3/8 複合体) を同定し、COMMD3/8 複合体が B 細胞の移動と液性免疫応答の誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Nakai et al., *J. Exp. Med.* 216: 1630-1647, 2019)。我々の予備的な検討から、臨床的に関節リウマチに対する有効性が示されている生薬ライコウトウ (雷公藤, *Tripterygium wilfordii*) の薬効成分であるセラストロールが、COMMD3/8 複合体を解離させ、その機能を阻害することで抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。そこで本研究開発では、セラストロールが COMMD3/8 複合体を標的分子として抗炎症作用を発揮することを立証することにより、COMMD3/8 複合体が炎症性疾患の治療における新規の創薬ターゲットになり得ることを示すことを目的とした。

まず、COMMD3/8 複合体が炎症性疾患の病態に関与することを立証するため、関節リウマチのマウスモデルであるコラーゲン誘発性関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) において、COMMD3/8 複合体の機能を欠損させることにより病態が改善されるか検討した。COMMD3/8 複合体の機能は COMMD3 と COMMD8 の会合に依存するため、COMMD3 と COMMD8 のいずれか一方を欠損させることで、COMMD3/8 複合体の機能を欠損させることが可能である。そこで、COMMD3/8 複合体の機能を誘導性に欠損させることが可能なマウスとして、タモキシフェン誘導性の Cre リコンビナーゼを発現する *Commd3^{lox/lox}* マウス (*ERT2-Cre⁺Commd3^{lox/lox}* マウス) を作製した。このマウスに CIA を発症させた後で COMMD3 を欠損させたところ、関節炎の進行が停止するとともに、コラーゲンに対する液性免疫応答が抑制された (図 1)。このことから COMMD3/8 複合体が関節リウマチの病態の増悪に関与することが示唆された。

次に、セラストロールと COMMD3/8 複合体の結合様式を解析した。セラストロール (図 2A) は、タンパクのシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することが知られている。我々は、COMMD3 の 170 番目のシステイン残基 (C170) をアラニンに置換 (C170A) することで、COMMD3/8 複合体がセラストロールによって解離しなくなることを見出した (図 2B)。このことから、セラストロールが COMMD3 の C170 と共有結合を形成することで COMMD3/8 複合体を解離させることが示唆された。さらに、分子動力学シミュレーションにより、

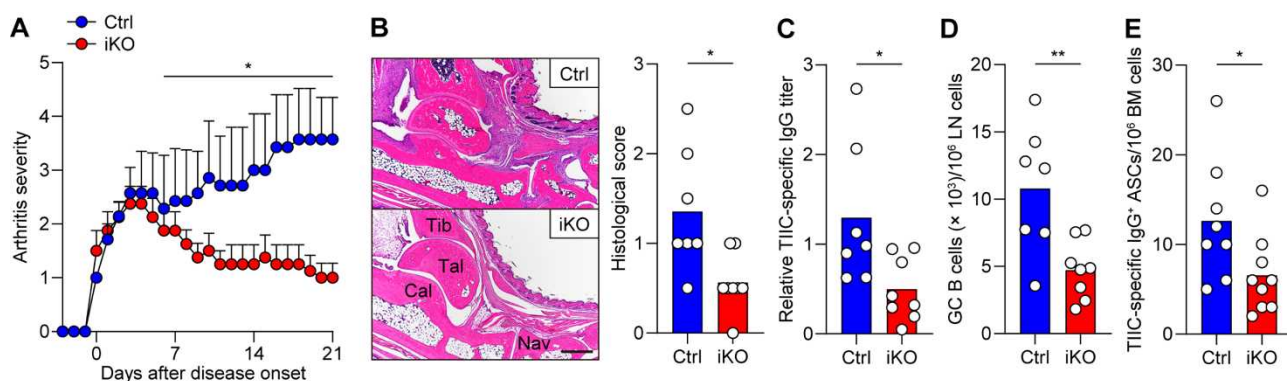


図 1. COMMD3/8 複合体が炎症性疾患の病態に関与することの立証。(A から E) *ERT2-Cre⁺Commd3^{lox/+}* (control, Ctrl) および *ERT2-Cre⁺Commd3^{lox/lox}* マウス (inducible knockout, iKO) におけるコラーゲン誘発性関節炎の重症度 (A), 病理組織 (B), 抗コラーゲン (chicken type II collagen, TIIC) 抗体価 (C), 所属リンパ節における胚中心 B 細胞 (germinal center B cells, GC B cells) の数 (D), 骨髄における抗体産生細胞 (antibody-secreting cells, ASCs) の数 (E). Tib, tibia; Tal, talus; Cal, calcaneus; Nav, navicular. Scale bar, 500 μ m.

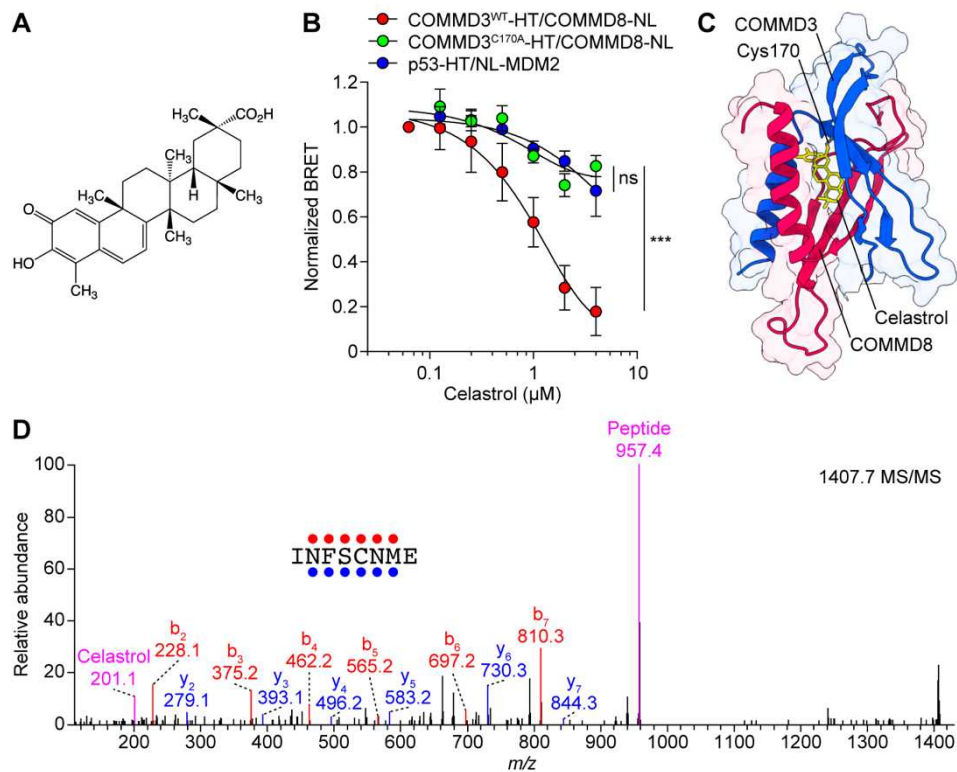


図 2. セラストロールと COMMD3/8 複合体の結合様式の解析. (A)セラストロールの化学構造. (B)COMMD3 の C170A 変異がセラストロールによる COMMD3/8 複合体の解離作用に及ぼす影響. (C)セラストロールと COMMD3/8 複合体の結合様式についての分子動力学シミュレーション. (D)質量分析によるセラストロールの結合部位の同定.

COMMD8 と複合体を形成した COMMD3 の C170 にセラストロールが結合可能であることが示唆された(図 2C)。そこで、セラストロールと反応させた COMMD3/8 複合体について質量分析を行ったところ、セラストロールが COMMD3 の C170 と共有結合を形成することが確かめられた (図 2D)。

COMMD3/8 複合体がセラストロールの標的分子であることを立証するため、COMMD3 の C170A 変異体 (COMMD3^{C170A}) を *Commd3* 遺伝子座から発現するマウス (COMMD3^{C170A} マウス) を作製し、このマウスにおいてセラストロールの作用が消失するか検討した。それに先立って、セラストロールを投与することによって、COMMD3/8 複合体の機能を遺伝学的に欠損させた場合と同様に、CIA の病態が改善されることを確認した (図 3A から E)。その上で、CIA を発症させた COMMD3^{C170A} マウスにセラストロールを投与したところ、セラストロールによる病態改善作用は認められなかった (図 3F から J)。このことから、COMMD3/8 複合体がセラストロールの主要な標的分子であることが明らかになった。

以上の結果から、COMMD3/8 複合体が炎症性疾患の治療標的になり得ることが示された。また、本研究は、セラストロールの薬理作用のメカニズムを分子レベルで解明した点においても有意義である。本研究成果は、米国科学誌「Science Immunology」に掲載された (Shirai et al., *Sci. Immunol.* 8: eadc9324, 2023)。

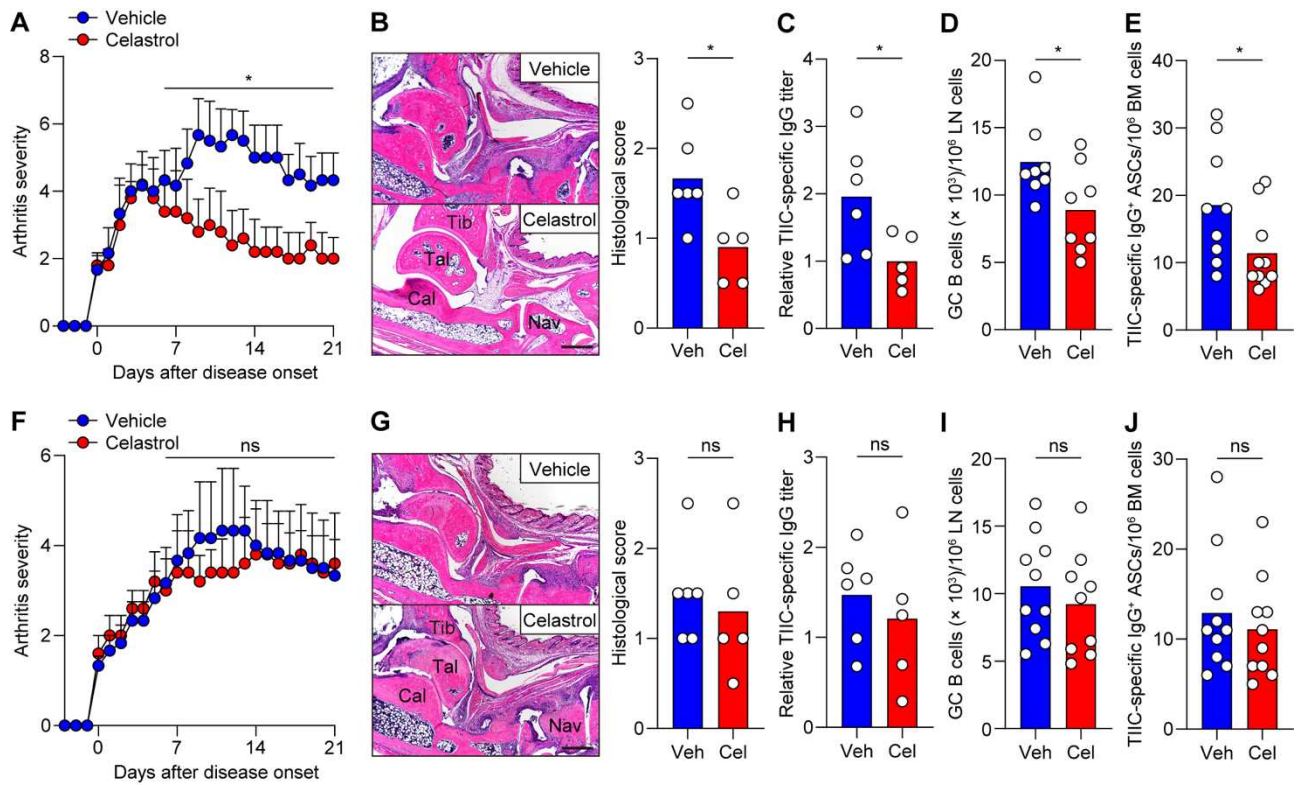


図 3. COMMD3/8 複合体がセラストロールの標的分子であることの立証. (A から E)野生型マウスにセラストロールを投与した際のコラーゲン誘発性関節炎の重症度(A), 病理組織(B), 抗コラーゲン抗体価(C), 所属リンパ節における胚中心 B 細胞の数(D), 骨髄における抗体産生細胞の数(E). (F から J)COMMD3^{C170A} マウスにセラストロールを投与した際のコラーゲン誘発性関節炎の重症度(F), 病理組織(G), 抗コラーゲン抗体価(H), 所属リンパ節における胚中心 B 細胞の数(I), 骨髄における抗体産生細胞の数(J). Veh, vehicle; Cel, celastrol. Scale bars, 500 μ m.

We identified a protein complex consisting of copper metabolism MURR1 domain-containing (COMMD) 3 and COMMD8 (COMMD3/8 complex) as a positive regulator of chemokine receptor signaling. Our study demonstrated that the COMMD3/8 complex plays important roles in the control of B cell migration and the induction of humoral immune responses (Nakai et al., *J. Exp. Med.* 216: 1630-1647, 2019). However, the contribution of the COMMD3/8 complex to the pathogenesis of immunological disorders was unclear.

Based on the important role of the COMMD3/8 complex in humoral immune responses, we tested its involvement in collagen-induced arthritis, a B cell-dependent mouse model of rheumatoid arthritis. COMMD3/8 complex deficiency induced at the onset of arthritis inhibited disease progression. This was accompanied by a reduced humoral immune response to collagen. These findings indicated that the COMMD3/8 complex contributes to the pathogenesis of collagen-induced arthritis.

Prompted by this finding, we performed a chemical screen to identify inhibitors of the COMMD3/8 complex that could be used for the treatment of autoimmune diseases. Since the function of the COMMD3/8 complex depends on the association between COMMD3 and COMMD8, we sought for compounds that disrupt the physical interaction between the two COMMD proteins. After screening of a chemical library that was relatively enriched in natural products, we identified celastrol as the most potent compound. Celastrol is a bioactive molecule extracted from a medicinal herb, *Tripterygium wilfordii*, and exhibits anti-inflammatory properties. However, its mechanism of action had been poorly understood. Celastrol disrupted the COMMD3/8 complex in living cells or in the purified form, indicating direct action of celastrol on the COMMD3/8 complex. Using site-directed mutagenesis, molecular dynamics simulations and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, we revealed that celastrol covalently binds to cysteine 170 (C170) on COMMD3 to dissociate the COMMD3/8 complex.

We then asked whether celastrol reproduces the functional consequences caused by COMMD3/8 complex deficiency. Celastrol inhibited chemotactic migration of B cells in vitro and in vivo. Celastrol treatment suppressed antibody responses with reduced production of germinal center B cells and plasma cells. The progression of collagen-induced arthritis was blocked by celastrol treatment started at the disease onset. Thus, celastrol treatment phenocopied COMMD3/8 complex deficiency, suggesting that celastrol may target the COMMD3/8 complex in the context of humoral immune responses and autoimmunity.

Since alanine substitution of C170 (C170A) on COMMD3 rendered the COMMD3/8 complex resistant to celastrol while preserving the function of the protein complex, we generated a mouse strain expressing COMMD3^{C170A} from the endogenous *Commd3* locus and examined whether the effects of celastrol are abolished in these mice. B cells isolated from COMMD3^{C170A} mice showed complete resistance to celastrol in chemotactic migration. Humoral immune responses and collagen-induced arthritis in the mutant mice were not suppressed by celastrol treatment. These findings indicated that the COMMD3/8 complex is a major target of celastrol.

Having established the involvement of the COMMD3/8 complex in a mouse model of rheumatoid arthritis, we demonstrated that celastrol exerts anti-inflammatory activity by targeting the COMMD3/8 complex. These findings provide a proof of concept that disrupting the interaction between COMMD3 and COMMD8 may be a useful strategy for the treatment of autoimmune diseases and supports the consideration of celastrol as a lead candidate in that endeavor.

This study was published in Science Immunology (Shirai et al., *Sci. Immunol.* 8: eadc9324, 2023).