〔生化学　第 81 巻　第 11 号，pp. 952–961，2009〕

総　説

立体構造に基づく個別カテプシンの分別阻害剤の開発と医学・生物学への応用

勝　沼　信　彦

カテプシンは，全ての細胞のリソソームに分布し，タンパク質の異化に必須の役割をしている．現在 11 種類のカテプシン遺伝子がヒトゲノムに見出されており，それぞれのカテプシンは異なる代謝的役割を分担している．カテプシン群に特異的で毒性の少ない阻害剤としては，梅沢らのアルデヒドを活性基とするロイペプチンやアンチパインが 1970 年代に，花田らのエポキシコハク酸を活性基とする E-64 が土壌菌から 1987 年に発見され[1]，1991 年代に我々によりカテプシン阻害剤として確立された．然し，これらは個々のカテプシンに対する選択的阻害剤ではなかった．

我々はカテプシンの基質結合ポケットの -SH 基と結合する物質として，上記の阻害剤をそれぞれ使用し，X 線結晶解析による個々のカテプシンの基質結合ポケットの立体構造から，各カテプシンに特異的な阻害剤をデザインした．次いで，これらの合成物について *in vitro*，*in vivo* でのカテプシン阻害性を確認した．

これらの阻害剤は，現在各種生理学，医学領域において世界中で活用されている．例えば骨粗鬆症の抑制，がんの骨転移抑制，自己免疫疾患の発症抑制，抗原タンパク質のプロセシングの抑制によるアレルギーの発現制御，抗原提示のクラススイッチの制御，生理活性物質のプロセシングの制御等である．更に，広く生物現象の解明や，病気の治療法の研究，特に自己免疫病の治療研究にも役立ちつつある．

1.　個々のカテプシンに選択的な阻害剤の開発

1.1　個々のカテプシンに対する選択的阻害剤開発の必要性

システイン性 -SH を活性基とするプロテアーゼ群は全ての細胞のリソソームに局在している．現在は 11 種のシステインカテプシン遺伝子がヒトゲノムに記載されている[1]．カテプシン群はあらゆる生物の生命維持に必須の役割を果たしている．例えば，体内でのタンパク質の異化，生理活性物質の産生等の役割である．それぞれのカテプシンは基質タンパク質に対して異なる切断部位（切断されるペプチド結合）特異性を持つので，異なるカテプシンはそれぞれ異なる生理活性ペプチドを作れる．従って，特定のカテプシンの異常な発現は，特有の異常な病的状態を発症する．個々のカテプシン機能の発現を抑制することは，その生理的役割を明らかにすると共に，そのカテプシンの発現異常により起こる疾患の治療にも使用できる可能性がある．

徳島文理大学健康科学研究所（〒770–8514 徳島市山城町西浜傍示 180）

Structure-based drug development and medical/biological application of cathepsin specific inhibitors

Nobuhiko Katunuma（Institute for Health Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Nishihamabouji, Yamashiro-cho, Tokushima City, Tokushima 770–8514, Japan）

投稿受付：平成 20 年 11 月 21 日

1.2　カテプシン阻害剤開発の歴史

毒性がなくカテプシン群に特異的な阻害剤の開発の歴史は，2 種類の土壌菌から抽出された化合物から出発した．第 1 の種類は，オリゴペプチド性のアルデヒド誘導体のロイペプチンやアンチパインであり，これらはアルデヒドがカテプシン群の活性基システイン性 -SH とチオエステル結合をする群であり，梅沢らにより 1970 年代に開発され

た[2]．他の一種は，エポキシ・スクシニル基のアミノ酸誘導体であり，カテプシンのシステイン性-SHとチオセミアルデヒド結合をする．この化合物は花田ら[3]により1978年に発見され，勝沼らによってカテプシン阻害剤として確立された，E-64がそれである[4~6]．しかし，これらはいずれも全てのカテプシン群を阻害し，個々のカテプシンに対する特異性は全く示さなかった．個々のカテプシンはそれぞれ異なる代謝的役割を持つため，それぞれに特異的な阻害剤の開発が望まれていた．我々は，個々のカテプシンのタンパク質立体構造をスロベニアのV. Turkら及び，ドイツ・マックスプランク研究所のHuberらと共同で解明し，それらの基質結合ポケットの立体構造の特異性に基づいて，個々のカテプシンに特異性のある阻害剤群の開発に成功した[4~7]．

1.3　個々のカテプシンに特異的な阻害剤の開発戦略

我々はエポキシコハク酸のペプチド誘導体とアルデヒド基のペプチド誘導体をカテプシンの基質結合ポケットとの結合母体とし，カテプシンそれぞれの基質結合ポケットの立体構造から，個々のカテプシンに特異的な阻害剤をデザインした．次いで大鵬製薬研究所の浅尾グループがこれらを合成した（**図1**）．

初めに合成されたのは，エポキシコハク酸の誘導体であるCA-074とCA-030であった．これらはカテプシンBに絶対的特異性を持ち，K_iは10^{-9}Mである[6,7]．次いで，カテプシンLの特異的阻害剤としてCLIK-148とCLIK-195を開発した[5]．また脂肪族のアルデヒドを活性基としたカテプシンSの特異的阻害剤CLIK-060を作り，更にカテプシンKに特異的な阻害剤として芳香族アルデヒド（ピリドキサール）誘導体CLIK-164を開発した[4,5]．このアルデヒド基をビニール基に変換したものがCLIK-166である．これらの阻害特異性の比較は**表1**にまとめてある．特異的阻害剤の化学構造を図1に示す．

表1　各種カテプシンに対する阻害特異性[4,5,7]

阻害剤＼カテプシン	10^{-X} M	B	L	S	K
CA-030	−7	100	0	0	0
CA-074	−7	100	0	0	0
CLICK-148	−6	0	100	30	0
	−7	0	63	0	0
CLIK-195	−6	0	100	25	0
	−7	0	85	0	0
CLIK-060	−6	25	30	100	10
	−7	0	0	86	0
CLIK-164	−5	0	20	60	100
	−6	0	0	20	60
CLIK-166	−4	0	0	17	100
	−5	0	0	0	100

（表示濃度での%阻害率を表す）

次に代表的例としてCA-074やCA-030がカテプシンBに絶対的特異性を持つ理由を**図2**により説明する[8,9]．R. Huber，D. Turkとの共同研究により，カテプシンBの立体構造をX線結晶解析により明らかにした[8]．それによると，カテプシンBは他のカテプシンとは異なり，基質結合ポケットの一番奥が大きな閉塞性の輪状の紐（occluding loop）で塞がれており，その紐を構成する2分子のヒスチジン（His110，His111）が，強いポジティブ荷電領域を作成している．我々はエポキシコハク酸のC末にプロリンを配置することで，この紐状構造にC末を強く固定できるようにし，更にオキソアニオンホールを酵素との間に作るようにした．その結果，図2に示すように，CA-030は強くカテプシンBの基質結合ポケットに固定されることになり，強い特異性を示した[9]．CA-030及びCA-074は非常に強いカテプシンB特異性を示しK_iは10^{-9}Mで，*in vitro*でも*in vivo*でも他のカテプシンを全く阻害せず特異的阻害を示した．またカテプシンL特異的阻害剤であるCLIK-148は，X線共結晶解析から**図3**のような特異的な結合をすることが明らかにされた[19]．

カテプシンSに対する特異的阻害剤のCLIK-060は，カテプシンSの基質結合ポケットの構造から幾多のデザインを試み，比較的カテプシンSに特異性の高いものを合成することにより開発された[5]．カテプシンKの抑制剤に関しては，ビタミンB_6補酵素ピリドキサールリン酸がカテプシンKを比較的良く阻害することから，この芳香族アルデヒド基の結合力を増加するようにし，更にリン酸基が結合していると細胞膜透過性が悪いことから，これをプロピオン酸に変換する方法をとった．この芳香族アルデヒドはビニール基に変換してもよい．こうしてCLIK-166[7]が得られた．これらCLIK-060とCLIK-166等は，表1に示すように，それぞれカテプシンSおよびカテプシンKを他のカテプシンより強く阻害するが，絶対的な特異性ではなく，他の阻害剤と併用して評価する必要がある．なお，E-64とCA-074はすでにSigma社で発売されており，世界で広く使用されているが，CLIK系はまだ市販されていない．しかしながら，当研究室からの供与により，世界で現在20以上の研究者により使用され，成果を上げている．

2.　選択的阻害剤の医学・生物学への応用

個々のカテプシンに対する選択的阻害剤は多くの医学・生物学の進歩に貢献している．それは生体内での多くの生理活性タンパク質やペプチドの生成は，カテプシンによるタンパク質やペプチドの限定分解（limited proteolysis）によるからである．また多くの生理活性タンパク質・酵素並びに生理活性ペプチドは，プレ・プロ型の前駆体で合成され，それらの限定分解により活性型になる．切断部位が異

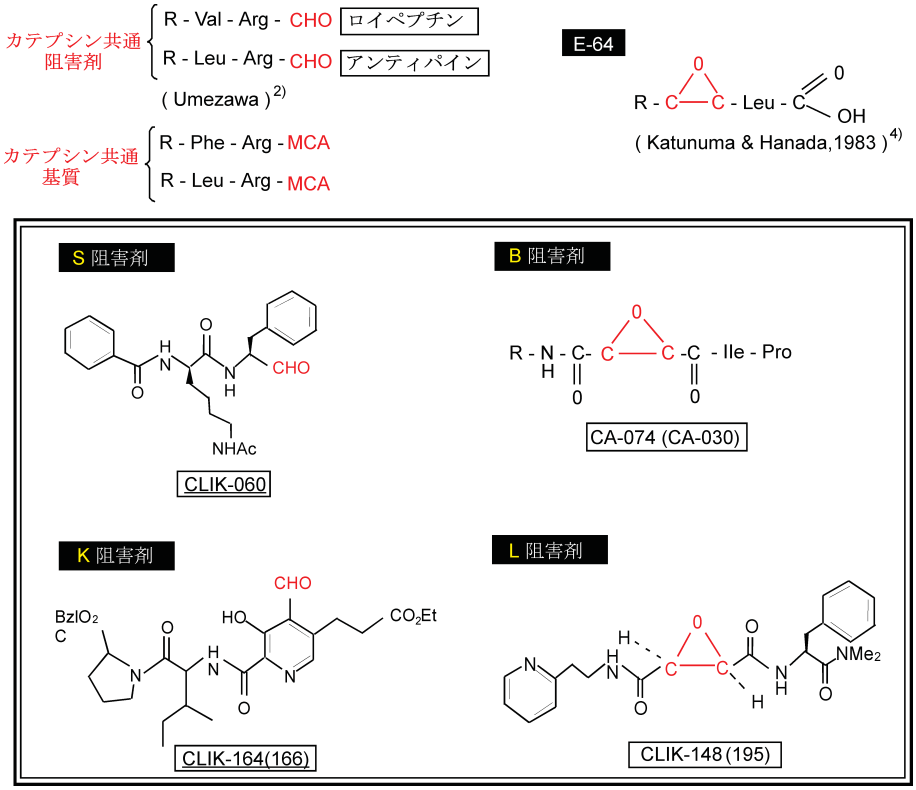
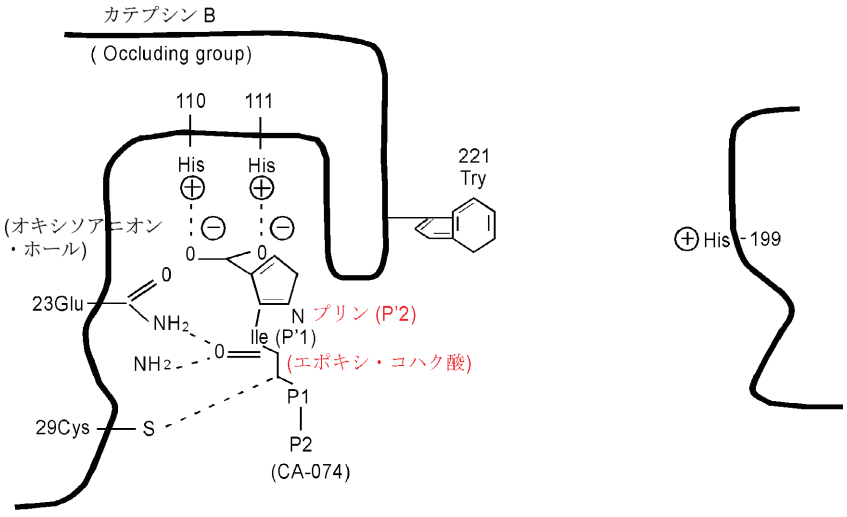


図1 個々のカテプシン群に対する特異的阻害剤[4~7]



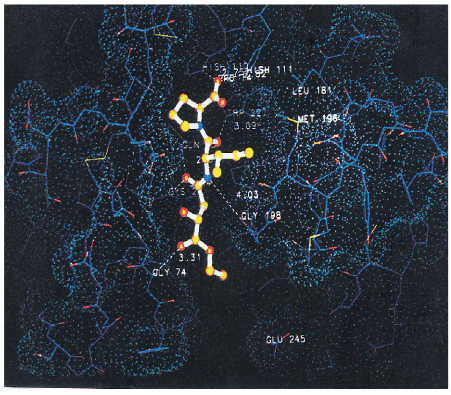
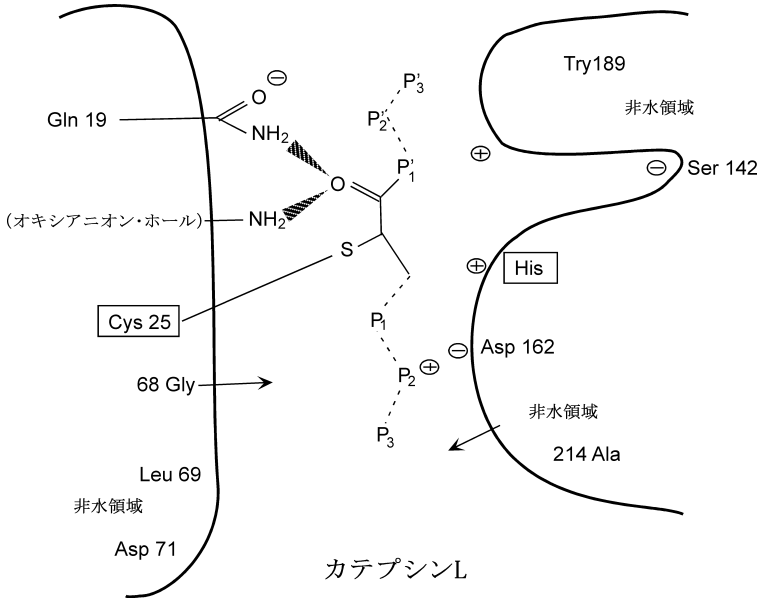


図2 CA-030 のカテプシン B 群に対する特異的結合.
X 線共結晶解析による[9].



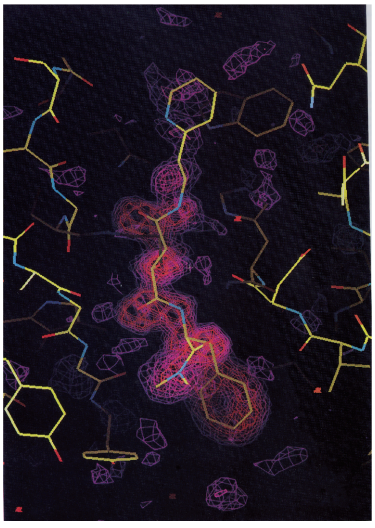


図3　CLIK-148のカテプシンLに対する特異的結合．X線共結晶解析による[19]．

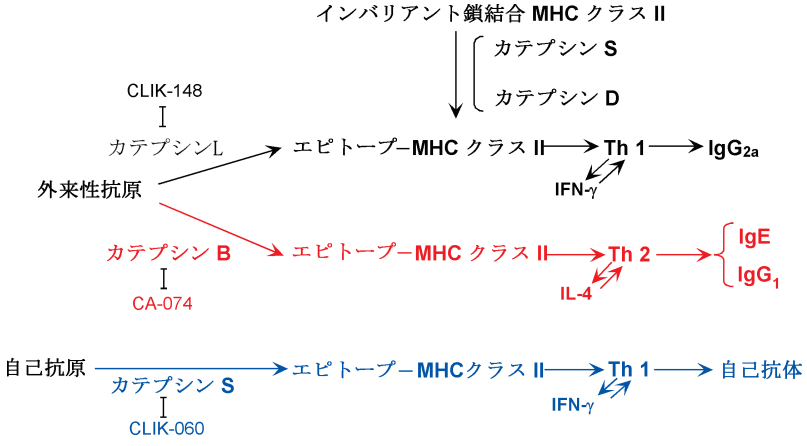


図4　抗原提示，Tリンパ球のクラススイッチに対するカテプシン類の関与

なると，同一前駆体タンパク質から異なる生理活性ペプチドができることもよく知られている．先ずカテプシン群の抗原提示への関与と，抗体産生のクラススイッチへの関与を紹介する．

2.1 抗原活性ペプチド（エピトープ）のカテプシンによる生成（プロセシング）と抗体産生のクラススイッチ

エピトープ形成及び抗体産生のクラススイッチに対するカテプシンの関与の全体像を，**図4**に総括した[11,12]．外来抗原のエピトープ提示に際して，カテプシンLによって作られたエピトープの情報はヘルパーT1（Th1）細胞に伝達されて，IgG2a，IFNγの生成に向かう．従ってこの切断・提示はCLIK-148で抑制される．一方，カテプシンBで抗原が切断されるとヘルパーT2（Th2）細胞に伝達されるエピトープが生成され，IgE，IgG1とL-4の産生に向かう．従ってCA-074又はCA-030の投与でこれらのプロセシングは止まり，ヘルパーT1(Th1)に伝達されるエピトープ産生に切換えられる[12]．

卵アルブミンを抗原とした抗体産生系において，CA-074投与によってTh2タイプの抗体産生からTh1タイプの抗体産生にクラススイッチが生じた結果を示す（**図5**）．逆に，同じ系にCLIK-148を与えカテプシンLを抑制すると，IgE，IgG1及びIL-4が上昇し，IgG2a及びIFNγの発現が抑制される．Th2タイプ産生にクラス・スイッチされ

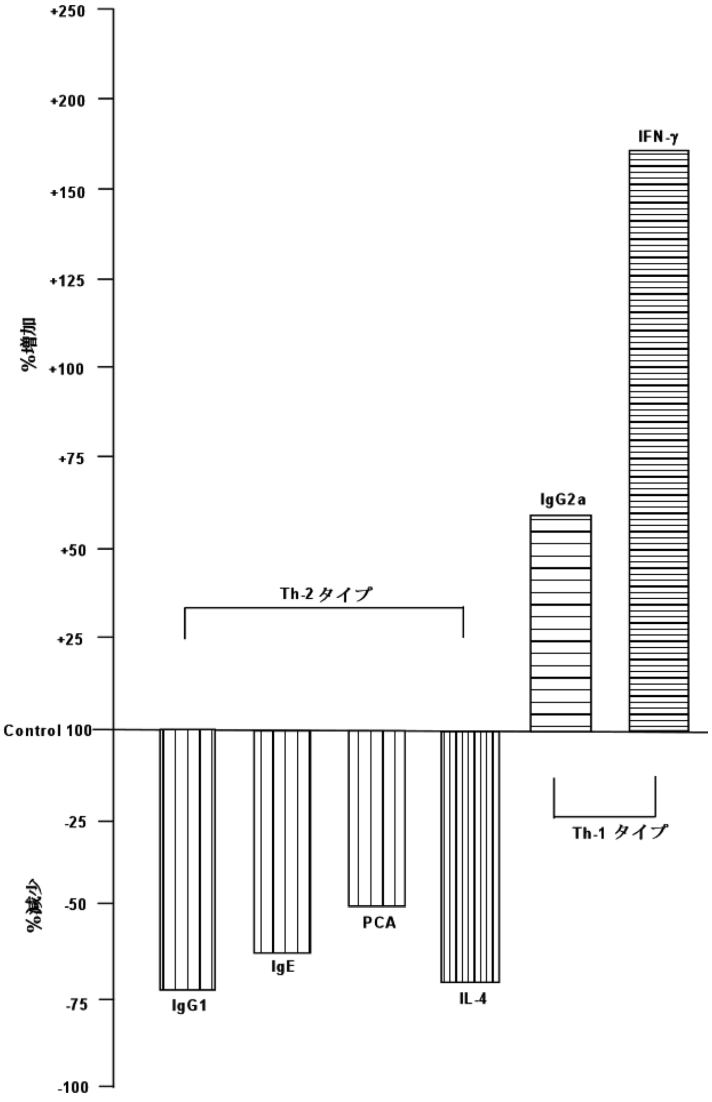
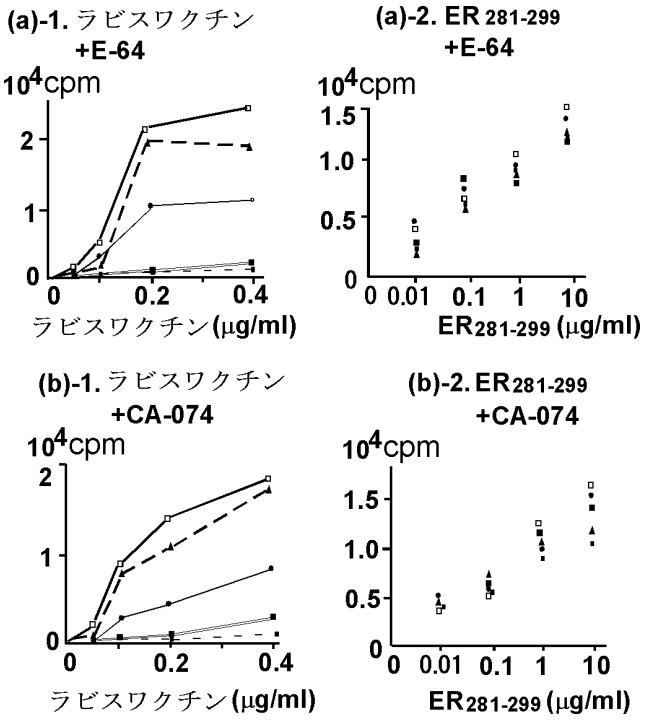


図5 CA-074投与（カテプシンB阻害）による卵アルブミン抗原提示のクラススイッチ[7]

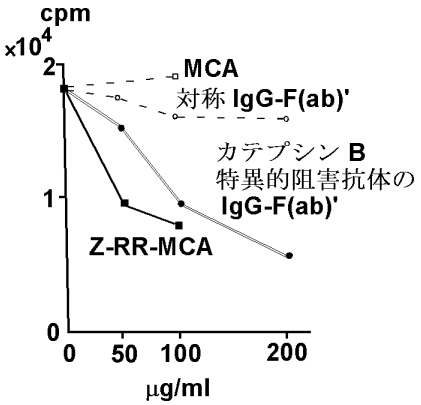
卵アルブミンで免疫したウサギに，CA-074を腹腔内投与することによる卵アルブミン特異的抗体及びサイトカインの産生の減少を示す．カテプシンBの阻害によりTh2タイプの発現が抑制され，Th1タイプの発現が促進された（PCA：抗原抗体皮内反応）．



(a)-1, 2　□：単球＋ラビスワクチン
▲：単球（ラビスワクチン添加後）＋E-64（5μg/ml）
●：単球＋ラビスワクチン＋E-64（1.25μg/ml）
■：単球＋ラビスワクチン＋E-64（2.5μg/ml）
◆：単球＋ラビスワクチン＋E-64（5μg/ml）

(b)-1, 2　□：単球＋ラビスワクチン
■：単球（ラビスワクチン添加後）＋CA-074（5μg/ml）
▲：単球＋ラビスワクチン＋CA-074（1.25μg/ml）
○：単球＋ラビスワクチン＋CA-074（2.5μg/ml）
△：単球＋ラビスワクチン＋CA-074（5μg/ml）

(a)　ヒトTリンパ球クローン2C5における狂犬病ワクチンへの応答のカテプシンB阻害剤による抑制
狂犬病ワクチン（ラビスワクチン）によるヒトリンパ球における［^{3}H］チミジン取り込みは，B阻害剤により抑制されたが，プロセスされたエピトープ（$ER_{281-299}$）による応答は抑制されなかった．



(b)　ラビスワクチンによる2C5Tリンパ球における［^{3}H］チミジン取り込みのカテプシンB阻害による抑制
(a)と同一の系におけるチミジン取り込みもカテプシンBを抑制することで，抑制される．(Z-RR-MCAはカテプシンBの特異的基質，MCA；4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)

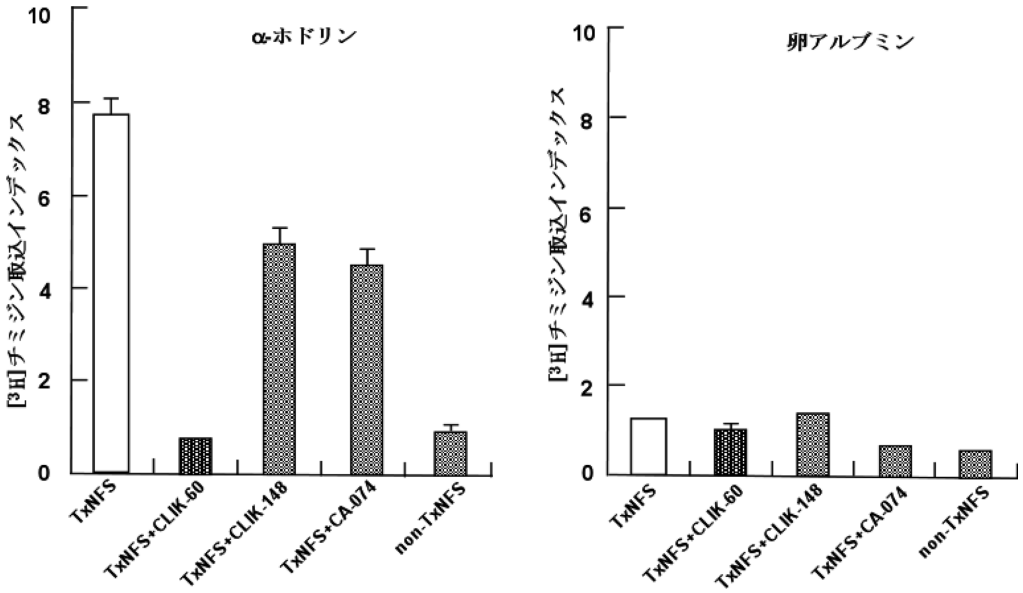
図6　カテプシンB阻害に対する狂犬病ワクチン応答の感受性[11]

る．

次に特定カテプシンによる抗原の限定分解によるエピトープ産生の典型的例を示す．狂犬病ワクチン感受性のヒトリンパ球クローン2C5株では，狂犬病ワクチン（ラビスワクチン）投与に対するチミジン取り込み応答はCA-074で停止する．しかし，プロセスされたワクチンの応答性ペプチド（エピトープ）であるE_{281}-R_{299}によるチミジン取り込み応答は抑制されなかった（**図6**(a)）[11]．即ち，狂犬病ワクチンのプロセシングは，カテプシンBによりなされていることが明らかになった．

2.2　自己免疫病シェーグレン病の発症におけるカテプシンSによる抗原提示

現在はステロイド以外に有効な治療法のない自己免疫疾患を，自己抗原プロセシングの抑制で治療する試みを行った．林らは，典型的な自己免疫疾患であるシェーグレン病（Sjögren病）の自己抗原が，α-ホドリン（α-Fodrin）であることを見出した．林及び勝沼らは，シェーグレン病のモデル動物（アラス）を使用してCLIK-060（カテプシンSの特異阻害剤）投与により著明に病状の発現が抑制されることを報告した[15]．**図7**に示すように，α-ホドリンの抗原としての分解はカテプシンSによりなされることが，CLIK-060により特異的に抑制されることから明らかになった．また図7(b)に示すように，病巣のグレードと涙



(a) 抗原α-ホドリンに対するモデルマウスT細胞応答のカテプシンB阻害剤CLIK-060による抑制．シェーグレンモデルマウスのT細胞のα-ホドリンに対する［^{3}H］チミジン取り込みのCLIK-060による特異的抑制．（TxNFS；甲状腺切除シェーグレンモデルマウス，non-TxNFS；甲状腺切除していないNFSマウス）

病巣のグレード		
	涙腺	顎下腺
non-Tx NFS	0.3	0.3
Tx	3.8	3.0
NFS + CA-074	2.8	2.5
NFS + CLIK-148	3.5	2.8
NFS + CLIK-060	0.9	1.0
唾液及び涙の量(20分間)		
	唾液	涙
non-Tx NFS	9.0	3.0
Tx-NFS	2.0	1.0
Tx-NFS+ CLIK-060	7.0	2.9

(Tx:甲状腺切除マウス)

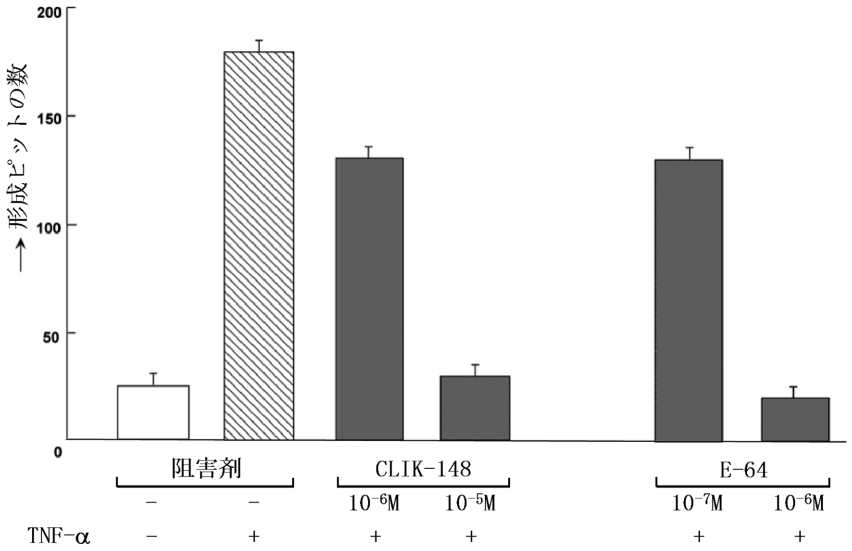
(b) モデルマウスにおけるシェーグレン症状発症のCLIK-060による抑制．

図7 シェーグレン病発症のカテプシンS阻害剤CLIK-060による抑制[15]

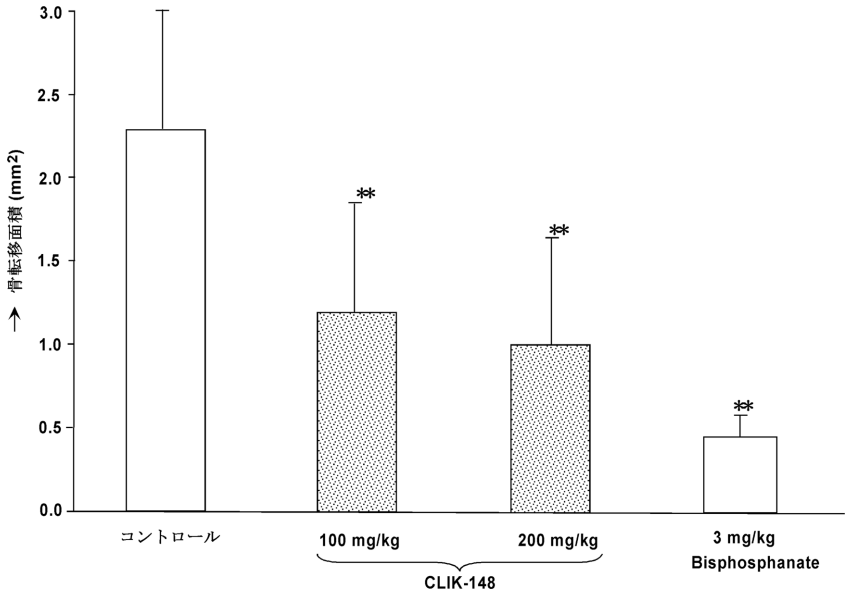
や唾液の分泌量の減少はCLIK-060投与によって著明に改善された．これらの結果により，シェーグレン病の自己抗原は，α-ホドリンであり，この自己抗原のプロセシングは，カテプシンSにより行われることが明らかになった．CLIK-060などのカテプシンS阻害剤でシェーグレン病の治療が可能であることを示している[16]．

2.3 骨粗鬆症およびがんの骨転移の抑制[10]

骨I型コラーゲンを分解できるのは，カテプシンLとKである．この二つはコラゲノリティックカテプシンズと言われている．骨粗鬆症は，破骨細胞から分泌されるカテプシンLとKによる骨1型コラーゲンの過剰分解によるものである．破骨細胞をRANCLで活性化した培養系で骨ペレット（硬骨のスライス片）に穴を開けるモデル実験（ピット形成）の結果を**図8**(a)に示す．骨粗鬆症の実験モデル



(a)　破骨細胞性ピット形成のカテプシンL阻害剤による抑制[10].



(b)　CLIK-148によるメラノーマA375の遠隔がん転移と，そのCLIK-148による抑制.

ウサギの左心室にメラノーマ細胞を注入し，上腕骨へのがん転移によるピット形成を測定した.

図8　カテプシンL阻害剤によるがん骨転移の抑制

として最も良く使用されるのは，このピット形成実験であり，活性化した培養骨芽細胞を入れた硬骨片にできるピット（骨溶解穴）の数と面積ではかる測定法である．TNFα存在下で測定すると，ピット形成は全カテプシン群を阻害するE-64で著明な抑制が認められたが[10]，CLIK-148（カテプシンL阻害剤）によって著明に抑制された．がんの骨転移は，最も悪性ながんの副症状である．これは，がん細胞から分泌されるTNFαとの共同作用で起こる．ラットの左心室にメラノームA375細胞を注入すると，がん細胞は全身に到達し，全身骨に転移巣ができる．がんの骨転移面積は，CLIK-148で著明に抑制された（図8b）[10].

3.　各種生物活性受容体（bioactive receptor）等の分解に関与するカテプシン群と，その阻害剤による調節

カテプシンSは，MHCクラスIIのインバリアント鎖を分解して活性なMHCクラスIIにする重要な作用を持っていることを明らかにした．この遊離したインバリアント鎖ペプチドは，カテプシンBを阻害しないが，カテプシンLとHを強く阻害した（**図9**）[13].

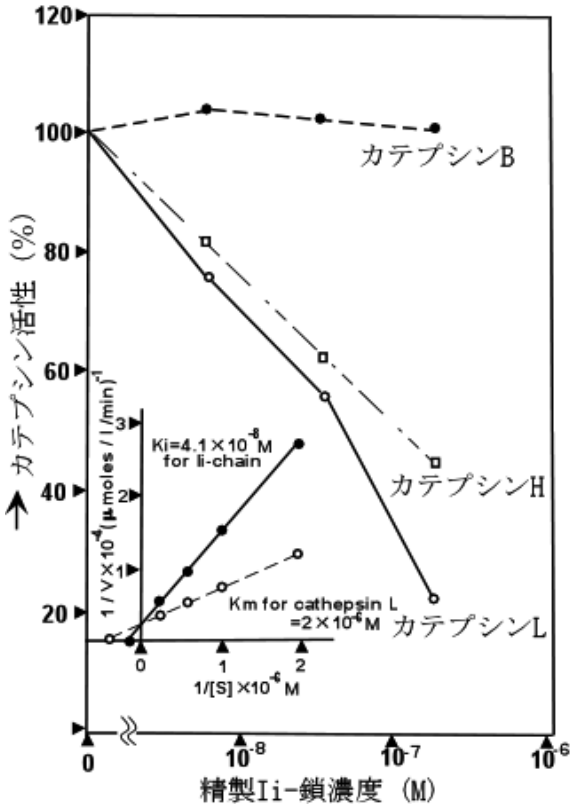


図9 インバリアント鎖（Ii）によるカテプシン群の阻害
インバアリアント鎖のカテプシンLに対する結合力 K_m は 1.97×10^{-6} 及び阻害の K_i 値は 4.1×10^{-8}M[13].
インバリアント鎖は，カテプシンのHとLを強く阻害したが，カテプシンBは全く阻害しなかった．

瀬尾らとの共同研究でレチノイン酸（ビタミンAの成分）の受容体はカテプシンLで分解されることがわかった．つまりCLIK-148の投与は，レチノイン酸の作用を強くした[17]．またG.P. Shiらとの共同研究により（2007），カテプシンL活性はグルコースの取り込みをコントロールしていることが明らかになった（**図10**）[18]．CLIK-148又は-195の投与は尿生成の減少，脂肪生成及び脂肪蓄積を減少させ，インシュリンレセプターの増加を起こし，グルコースの利用度を増加させた[18]．平野らとの共同研究により，樹状細胞（免疫発現性）でMHCクラスIIレベルはカテプシンS活性を通してIL-6-STAT3がコントロールしていることがわかった[16]．従ってカテプシンS阻害剤CLIK-060により，MHCクラスIIα-βダイマーIi（インバリアント鎖）の発現が増強された[16]．

4. おわりに

これらのカテプシンの特異的阻害剤は，特定カテプシンの異常発現に起因する疾患の病因を明らかにすることに役立つばかりでなく，それら疾患の治療に役立つことが期待できる．それには疾患モデル動物を用いた治療研究が望まれる．更にはヒトにおける治療研究が求められ製薬会社との共同研究を行う必要がある．治療効果が期待できるものとしては，(1)骨粗鬆症及びがんの骨転移阻止におけるカテプシンLの阻害剤CLIK-148又は-195及びカテプシンK阻害剤CLIK-164又は-166．(2)IgEアレルギー発現抑制におけるカテプシンBの阻害剤CA-074又はCA-030．(3)シェーグレン病の治療に対するCLIK-060．(4)糖尿病・リポゲネーシスに対するCLIK-148又は-195等である．カテプシンSの阻害剤CLIK-060は利用範囲が広いと期待されるが，吸湿性が高く不安定なので，構造の改良の必要がある．現代社会において増加の傾向にある各種メタボリックシンドロームに対しても，カテプシン群の特異的阻害剤の使用の必要性は増加するものと思われる．

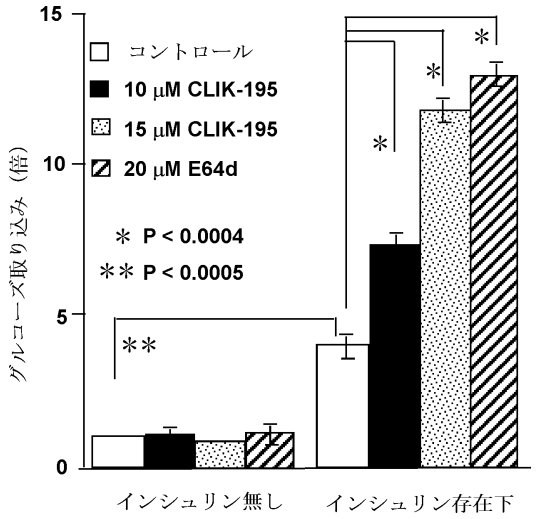


図10 カテプシンL阻害によるグルコース取り込みの増加．
CLIK195によるカテプシンL阻害によりインシュリン共在下でグルコースの利用が著明に増加した[17]．

文　献

1) Turk, V., Turk, B., & Turk, D.（2001）*EMBO J*., **20**, 4629–4633.
2) Umezawa, H., Morishita, T., Kunimoto, S., & Takeuchi, T.（1970）*J. Antibiot*., **23**, 425–427.
3) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., & Tanaka, I.（1978）*Agric. Biol. Chem*., **42**, 523.
4) Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T., & Katunuma, N.（1991）*FEBS Lett*., **280**, 307–310.
5) Katunuma, N., Murata, E., Kakegawa, H., Matsui, A., Tsuzuki, H., Tsuge, H., Turk, D., Turk, V., Fukushima, M., Tada, Y., & Asao, T.（1999）*FEBS Lett*., **458**, 6–10.
6) Katunuma, N. & Kominami, E.（1995）*Methods Enzymo*., **251**, 382–397.
7) Katunuma, N., Matsui, A., Inubushi, T., Murata, E., Kakegawa, H., Ohba, Y., Turk, D., Turk, V., Tada, Y., & Asao, T.（2000）*Biochem. Biophys. Res. Commun*., **267**, 850–854.
8) Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber,

R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N., et al. (1991) *EMBO J*., **10**, 2321–2330.
9) Turk, D., Podobnik, M., Popovic, T., Katunuma, N., Bode, W., Huber, R., & Turk, V. (1995) *Biochemistry*, **34**, 4791–4797.
10) Katunuma, N., Tsuge, H., Nukatsuka, M., Asao, T., & Fukushima, M. (2002) *Arc. Biochem. Biophys*., **397**, 305–311.
11) Matsunaga, Y., Saibara, T., Kido, H., & Katunuma, N. (1993) *FEBS Lett*., **324**, 325–330.
12) Maekawa, Y., Himeno, K., Ishikawa, H., Hisaeda, H., Sakai, T., Dainichi, T., Asao, T., Good, R.A., & Katunuma, N. (1998) *J. Immunol*., **161**, 2120–2127.
13) Katunuma, N., Kakegawa, H., Matsunaga, Y., & Saibara, T. (1994) *FEBS Lett*., **349**, 265–269.
14) Kamon, H., Sawa, S., Park, S.J., Katunuma, N., Ishihara, K., Murakami, M., & Hirano, T. (2005) *Immunity*, **23**, 491–502.
15) Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Arakaki, R., Ogawa, K., Saito, I., Katunuma, N., & Hayashi, Y. (2002) *J. Clin. Invest*., **110**, 361–369.
16) Kitamura, H., Kamon, H., Sawa, S., Park, S.J., Katunuma, N., Ishihara, K., Murakami, M., & Hirano, T. (2005) *Immunity*, **23**, 491–502.
17) Nagaya, T., Murata, Y., Yamaguchi, S., Nomura, Y., Ohmori, S., Fujieda, M. & Katunuma, N., Yen, P.M., Chin, W.W., & Seo, H. (1998) *J. Biol. Chem*., **273**, 33166–33173.
18) Yang, M., Zhang, Y., Pan, J., Sun, J., Liu, J., Libby, P., Sukhova, G.K., Doria, A., Katunuma, N., Peroni, O.D., Guerre-Millo, M., Kahn, B.B., Clement, K., & Shi, G-P. (2007) *Nat. Cell Biol*., **9**, 970–977.
19) Tsuge, H., Nishimura, T., Tada, Y., Asao, T., Turk, D., Turk, V., & Katunuma, N. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **266**, 411–416.