

PI3K δ 選択的阻害剤に注目した
全身性エリテマトーデス治療薬としての可能性
に関する研究

**(Potential therapeutic agents for
systemic lupus erythematosus,
with a focus on PI3K δ selective inhibitors)**

2021年10月

金子 洋子

目次

略語表	3
緒言	6
第 1 章 ; PI3Kδ 選択的阻害剤 AS2819899 の <i>in vitro</i> プロファイリング	15
1 緒言	15
2 材料と方法	17
3 結果	22
4 考察	24
第 2 章 ; PI3Kδ 選択的阻害剤 AS2819899 の抗体産生に対する作用	38
1 緒言	38
2 材料と方法	40
3 結果	43
4 考察	44
第 3 章 ; AS2819899 のマウス自然発症ループス腎炎モデルにおける評価	51
1 緒言	51
2 材料と方法	54
3 結果	59
4 考察	68
総括および結論	96
出典	99
謝辞	100
引用文献	101
要旨 (和文)	110
要旨 (英文)	116

略語表

AAALAC International; The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory

Animal Care International

APC; Allophycocyanin

APC; Antigen presenting cell

ATP; Adenosine triphosphate

AUC; Area under the curve

BAFF; B cell activating factor belonging to tumor necrosis factor family

British Isles Lupus Assessment Group Index; BILAG Index

BLys; B lymphocyte stimulator

BCR; B cell antigen receptor

DMSO; Dimethyl sulfoxide

DNP-KLH; Dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin

dsDNA; Double stranded DNA

ELISA; Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FACS; Fluorescence-activated cell sorting

FCS; Fetal calf serum

FDA; Food and Drug Administration

FITC; Fluorescein isothiocyanate

GC; Germinal center

Geo MFI; The geometric mean fluorescent intensity

GPCR; G-protein-coupled receptor

HLA; Human Leukocyte Antigen

HTRF; Homogeneous Time-Resolved Fluorescence

IC₅₀; Half maximal Inhibitory Concentration

IGF1R; Insulin-like growth factor 1 receptor

IMPDH; Inosine monophosphate dehydrogenase

LPS; Lipopolysaccharide

MC; Methyl cellulose

MHC; Major Histocompatibility Complex

MMF; Mycophenolate mofetil

mTOR; Mammalian target of rapamycin

MZ; Marginal zone

NP-CGG; NP-chicken gamma globulin

PAS; Periodic Acid Schiff

pBUN; Plasma blood urea nitrogen

PBS; Phosphate Buffered Saline

pCre; Plasma creatinine

PE; Phycoerythrin

PI3K; Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP₂; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP₃; Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PD; Pharmacodynamics

PK; Pharmacokinetics

SRI; SLE responder index

SLE; Systemic lupus erythematosus

TCR; T cell receptor

TI antigen; Thymus-independent antigen

TNP-Ficoll; Trinitrophenylated aminoethylcarboxymethyl-Ficoll

UCre; Urinary creatinine

UPro; Urinary protein

緒言

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) は、皮膚、関節、腎臓、肺、中枢神経に及ぶ多臓器病変を呈する自己免疫疾患である。出産可能年齢の女性に多い病気で 15~44 歳における女性と男性の比率は 13:1 である[1]。

SLE の病態は寛解と再発を繰り返す。患者の 30~40%はループス腎炎と呼ばれる糸球体腎炎を発症し、そのコントロールは予後に影響する[2, 3]。SLE の病態では、遺伝的、環境的要因のもと、T 細胞、B 細胞の異常な活性化が起き、自己反応性の B 細胞が抗体産生細胞へと分化することで、anti-double stranded DNA antibody (抗 dsDNA 抗体) に代表される自己抗体が産生される。自己抗体と抗原の免疫複合体は、腎臓、皮膚、肺などの臓器に沈着し、病態の発症に繋がる[4] (Fig. 1)。したがって、T 細胞、B 細胞の活性化、増殖を抑制し、自己抗体の産生を抑制することが SLE の治療につながると考えられる。

SLE の治療は、ステロイド薬を基本に、免疫抑制薬を併用することで免疫反応を抑制し、病態をコントロールしてきた。しかし、ステロイド薬は長期使用において、易感染性、骨粗鬆症、糖尿病、白内障、皮膚の菲薄化、体重増加などの複数の副作用が問題となっている[5-7]。近年、自己抗体産生抑制を目的とした B 細胞抑制薬が SLE の新しい創薬標的として注目されている。例えば B 細胞特異的表面抗原である CD20 を認識するモノクローナル抗体 Rituximab は、いくつかの小規模臨床試験において、SLE 患者に対する有効性が確認されている[8, 9]。し

かし、Rituximab は、維持量の免疫抑制剤を併用した大規模臨床試験において、プラセボ群と比較し、SLE の疾患活動性の指標である British Isles Lupus Assessment Group Index (BILAG Index) を改善せず、未だ SLE を適応症とした、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) の承認は得られていない[10]。

BAFF (B cell activating factor belonging to tumor necrosis factor family)/BLys (B lymphocyte stimulator) は、B 細胞の生存・分化・抗体産生に重要な役割を果たす。

抗 BAFF/BLys モノクローナル抗体である Belimumab は、標準療法抵抗性の SLE 患者を適応とし、生物製剤として初めて 2011 年、FDA の承認を受けている。しかし、Belimumab は、SLE 患者を対象にした第 3 相試験において、52 週のエンドポイントの、Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment-Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index および BILAG Index に基づくタンパク尿等の腎機能項目について、プラセボ群と比較し有意な改善は認められず、ループス腎炎に対する作用が比較的弱いと考えられる[11]。また SLE の再発についても有効性が十分とは言えない[12-14]。今後、ループス腎炎を改善し、再発を抑えることのできる治療薬の開発が望まれている。

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K) は、細胞膜直下に存在し、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質のイノシトール環 3 位をリン酸化することで、細胞内シグナル伝達を活性化し、生体反

応を調節する脂質キナーゼである[15, 16]。PI3K は構造により Class I、Class II および Class III の 3 つのクラスに分類されるが (Table. 1)、細胞内シグナル伝達に重要とされるのは Class I の PI3K であり[15]、各種レセプターの刺激を受けて、細胞膜の成分であるイノシトールリン脂質のイノシトール環 3 位のヒドロキシル基 (-OH 基) のリン酸化を行い、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスホスフェート (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PIP₂) から、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリスホスフェート (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate: PIP₃) を生成する。PIP₃ は、Akt などの主要な細胞内シグナル伝達タンパク質のドッキングドメインとして作用し、さらに下流の様々な分子を介して、細胞の活性化、増殖、成長、生存および物質の輸送や分泌を含む代謝などの機能に寄与している (Fig. 2) [15]。

Class I PI3K は 2 つのサブクラス IA および IB に分類される (Table. 2)。Class IA PI3K は更に PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ の 3 つのアイソフォームに細分化され、それぞれ、p110 α 、p110 β 、p110 δ の触媒サブユニット (Catalytic subunit) と主に p85 の調節サブユニット (Regulatory subunit) から成るヘテロダイマーである。Class IB PI3K には PI3K γ が分類され、触媒サブユニットである p110 γ と、調節サブユニットである p110 もしくは p87 から成る。PI3K α 、PI3K β はユビキタスに種々の細胞に発現しており、PI3K α はインスリンシグナルに、PI3K β は血小板凝集に、それぞれ重要な役割を果たしており、PI3K α および PI3K β を抑制することは様々な毒

性の懸念に繋がる[17, 18]。一方で PI3K δ および γ は主に B 細胞および T 細胞等のリンパ球系の細胞に発現しており[19]、PI3K δ および γ 欠損マウスは、リンパ球系細胞の活性化および増殖の抑制がみられる[20]。PI3K γ は、炎症部位での自然免疫系の細胞遊走に特に重要であり、PI3K δ は、抗原レセプターや、T 細胞および B 細胞の分化や機能に重要な役割を果たす[21]。SLE においては、自己反応性の B 細胞、T 細胞の活性化、またそれに伴う自己抗体の産生が病因であるため、PI3K δ を選択的に阻害することが、SLE の治療薬に繋がるのではないかと考えた。本研究ではアステラス製薬にて見出した新規 PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 (Fig. 3) を用いて、PI3K δ 選択的阻害剤の *in vitro* における T 細胞および B 細胞への作用、*in vivo* 抗体産生における作用、マウスループス腎炎モデルを用いたループス腎炎に対する作用を評価し、PI3K δ 選択的阻害剤の SLE 治療薬としての可能性について検証した。

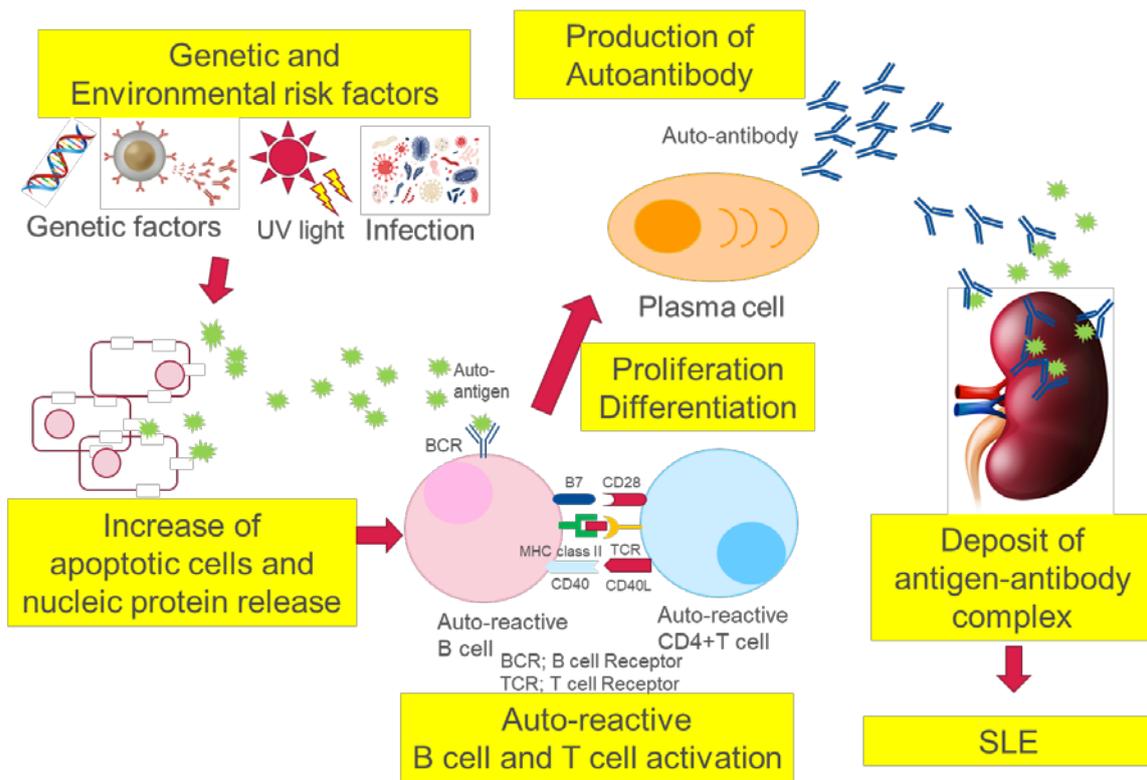


Fig. 1. Pathogenesis of SLE

This Figure is adapted from Ref.[4]and edited.

Table 1. Classification and function of PI3K

PI3K			
Class	Class I	Class II	Class III
Subclass	Class IA (α , β , δ) Class IB (γ)	C2 α , C2 β , C2 γ	Vps34
Major function	Cell survival Cell cycle Glucose metabolism Protein synthesis Migration	Unknown	Vesicular traffic

This table is adapted from Ref. [21] and edited.

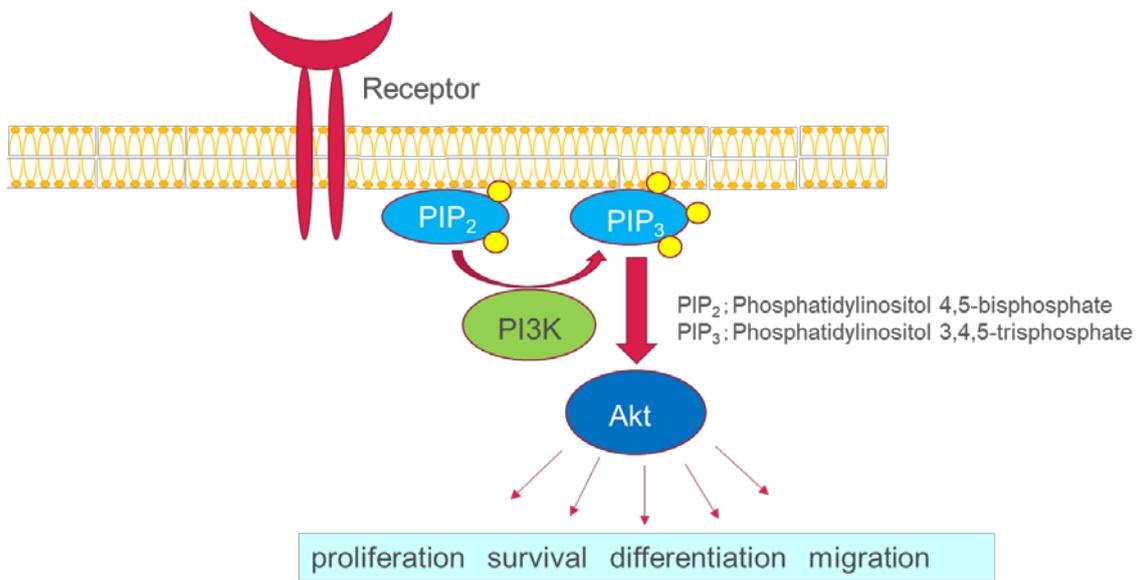


Fig. 2. Function of Class I PI3K

This figure is adapted from Ref. [22] and edited.

Table 2. Distribution and function of Class I PI3K isoform

Class I PI3K				
Subclass	Class IA			Class IB
Isoform	PI3K α	PI3K β	PI3K δ	PI3K γ
Catalytic subunit	p110 α	p110 β	p110 δ	p110 γ
Regulatory subunit	p85	p85	p85	p110 p87
Distribution	Ubiquitous	Ubiquitous	Lymphocyte	Lymphocyte
Major function	Cell proliferation Insulin signaling	Platelet agglutination	T/B cells proliferation activation	Innate immune cells migration

This table is adapted from Ref. [23] [18] [17] and edited.

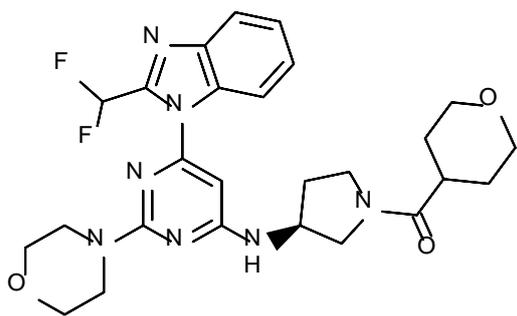


Fig. 3. Chemical structure of AS2819899

第 1 章 ; PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 の *in vitro* プロファイリング

1 緒言

PI3K 経路は、がん組織において活性化されており、Class I PI3K により生成される PIP₃ は Akt や、Rapamycin の標的である mTOR (Mammalian target of rapamycin) を活性化し、発がんを促進するため、PI3K 阻害剤はこれまでがんの治療薬として注目されてきた[16]。初期の PI3K 阻害剤である LY294002 および Wortmannin は Class I PI3K の 4 つのアイソフォーム全てを阻害する pan-PI3K 阻害剤であるが (Table. 3) [24]、薬効が弱く、毒性が強かったため臨床試験の実施に至らなかった[16]。2006 年に ZSTK474 が報告されると PI3K 阻害剤のがん治療薬としての開発競争が激化し、現在も、複数の化合物が臨床試験を実施中である[25]。ZSTK474 は pan-PI3K 阻害剤であり (Table. 3)、*in vivo* ヒトがん細胞移植マウスモデルにおいて顕著な毒性なく、抗腫瘍作用を示した[26]。ZSTK474 は固形がんを適応症とし、第 1/2 相試験を実施したが、未だ上市には至っていない。

PI3K 阻害剤として最初に FDA により承認されたのは、Idelalisib である。Idelalisib は PI3K δ 選択的阻害剤であり (Table. 3)、再発性慢性リンパ性白血病に薬効を示す[27]。Idelalisib が上市に成功した理由として、PI3K δ を選択的に阻害することにより、副作用を減弱し、一方でリンパ球特異的な増殖および活性化抑制作用を実現できたことが考えられる。

PI3K δ 選択的阻害剤による、T 細胞、B 細胞などのリンパ球の抑制作用は、免疫

の異常活性化や病原性自己抗体産生の抑制につながるため、血液がんの治療としてだけでなく、自己免疫疾患の治療薬として役立つ可能性がある。

アステラス製薬 (株) では B 細胞活性化を特異的に抑制する化合物の創出を目的とし、新規化合物の探索研究を実施し、新規 PI3K δ 選択的抑制剤である AS2819899 を見出した。本章では、AS2819899 について PI3K 酵素阻害活性とアイソフォーム選択性を確認した。

また、PI3K δ は B 細胞受容体 (B cell antigen receptor; BCR) および T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) の下流に存在し、細胞内シグナル伝達に寄与しているため (Fig. 4)、。B 細胞、T 細胞に対する作用についても検証した。

B 細胞は、抗原提示細胞 (Antigen presenting cell; APC) としての役割も持ち、BCR に結合した抗原を取り込み、MHC class II と共に細胞表面に提示する[28]。提示された抗原と MHC class II は、ヘルパーT 細胞の TCR により認識され、T 細胞によるサイトカイン刺激などを受けて、B 細胞が活性化し、活抗体産生細胞へと分化する。よって、MHC class II 発現は抗体産生細胞への分化に重要であると考えられる。本章では、抗 IgM による BCR 刺激後の、MHC class II 発現に対する作用について調べた。また、T 細胞への作用として、TCR 刺激による、T 細胞増殖を評価した。

2 材料と方法

2.1 被験化合物

AS2819899、[(3*S*)-3-({6-[2-(difluoromethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]-2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl}amino)pyrrolidin-1-yl](oxan-4-yl)methanone は、アステラス製薬(株)にて合成した。AS2819899をdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、試験に使用した。細胞アッセイにおける、反応系の最終DMSO濃度は、0.1% とした。

2.2 PI3K に対する阻害

AS2819899 の酵素阻害活性について、Class I PI3K については、PI3 Kinase 4-Step Assay Reagent kit (Merck Millipore, MA, USA) を用いて測定した。

Class II PI3K については、PI3K-Kinase (Class II) HTRF Assay 1-plate kit (Merck Millipore) を用いて測定した。

各組み換え Class I PI3K アイソフォーム (α , β , γ , δ) および Class II PI3K アイソフォーム (C2 α , C2 β , C2 γ) は Merck Millipore から、アデノシン三リン酸 (ATP) は、シグマアルドリッチ (MO, USA) からそれぞれ購入した。

ヒト Class I PI3K アイソフォーム (α , β , γ , δ) およびマウス PI3K δ については、以下のような方法で測定した。AS2819899、ATP、PIP₂ および各種組換え PI3K を 384 ウェルプレートに添加し、室温で 30 分間インキュベートした。キット付属の Stop Solution と Detection Mix を添加し、室温で 3 時間インキュベートした。

産生された PIP₃ 量を反映する均一時間分解蛍光 (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence: HTRF) シグナルを Artemis K-101 マルチプレートリーダー (古野電気株式会社、兵庫) を使用して測定した。

PIP₃ の産生量に基づく、競合阻害非線形回帰モデルから阻害定数 (K_i) を SAS ソフトウェア (SAS Institute, NC, USA) を用いて算出した。実験はヒト Class I PI3K については 4 試行、マウス PI3K δ については 3 試行実施し、各実験の K_i 値の幾何平均と 95%信頼区間を算出した。

ヒト Class II PI3K アイソフォーム (C2 α , C2 β , C2 γ) については、以下のように測定した。AS2819899、ATP、Phosphatidylinositol および各種組換え PI3K を 384 ウェルプレートに添加し、室温で 30 分間インキュベートした。キット付属の Stop Solution と Detection Mix を添加し、室温で 3 時間インキュベートした。産生された Phosphatidylinositol 3-monophosphate 量を反映する HTRF シグナルを、Artemis K-101 マルチプレートリーダー (古野電気株式会社) で測定した。

酵素非添加ウェルの阻害率を 100%、酵素添加下で溶媒のみを添加したウェルの阻害率を 0%とし、阻害率を算出した。阻害率について、Sigmoid-E_{max} non-linear regression analysis により、Half maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀) 値を算出した。被験物質の最大濃度での抑制率が 50%未満であった場合、被験物質の最大濃度を表記した。

2.3 PI3K 以外のチロシンキナーゼおよびセリン/スレオニンキナーゼに対する 阻害

AS2819899 の PI3K 以外のチロシンキナーゼおよびセリン/スレオニンキナーゼ 28 種類に対する阻害活性は、Carna Biosciences (兵庫) に委託し、Mobility Shift Assay を使用して測定した。

2.4 各種レセプター・イオンチャネル・トランスポーターに対する結合活性

AS2819899 の各種レセプター・イオンチャネル・トランスポーターに対する結合活性については、積水メディカル (茨城) に委託し、特異的なリガンドに対する結合の阻害を測定した。

2.5 ヒト B 細胞における Major Histocompatibility Complex (MHC) class II 発現 抑制

本検討は、アステラス製薬 (株) におけるヒト組織研究倫理審査委員会にて承認を受けた上で実施した (承認番号 ; S111120#)。社内ボランティア採血制度において採取した健常人末梢血を、10%非働化ウシ血清 (Fetal calf serum; FCS)、10 mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 55 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地にて 3 倍に希釈した。各種濃度の AS2819899 の存在下または非存在下にて、最終濃度 30 μ g/ml ヤギ由来 F(ab')₂ 抗ヒト IgM

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) で刺激し、37°C、5% CO₂ の条件下で 22 時間培養した。刺激後の末梢血を、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識マウス由来抗 Human Leukocyte Antigen (HLA) -DP, DQ, DR 抗体 (BD Biosciences, CA, USA) および Allophycocyanin (APC) 標識マウス由来抗ヒト CD20 抗体 (BD Biosciences) で染色した。染色後、塩化アンモニウムを主成分とする試薬で溶血し、0.5% ホルムアルデヒド溶液にて固定した。

B 細胞上の MHC class II 発現を、APC (CD20) 陽性細胞中の、FITC (MHC クラス II) の Geometric mean fluorescent intensity (Geo MFI) と定義して、フローサイトメトリー (Fluorescence-activated cell sorting; FACS) にて測定した。

AS2819899 非存在下での IgM 刺激なしの Geo MFI を 100% 阻害、IgM 刺激ありの Geo MFI を 0% 阻害とし、阻害率を算出した。阻害率について Sigmoid-E_{max} non-linear regression analysis により IC₅₀ 値を算出した。実験は 3 試行実施し、IC₅₀ 値の幾何平均と 95% 信頼区間を算出した。

2.6 マウス B 細胞における MHC class II 発現抑制

18 週齢の NZB/W F1 マウス (日本エスエルシー株式会社、静岡) より採取した血液を、10 mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 55 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地にて 10 倍に希釈した。各種濃度の AS2819899 の存在下または非存在下にて、最終濃度 65 μg/ml ヤギ由来 F(ab')₂ 抗

マウス IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で刺激し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 時間培養した。刺激後の血液を、Phycoerythrin (PE) 標識ラット由来抗 CD45R / B220 抗体 (BD Biosciences) および FITC 標識抗マウス I-A/I-E 抗体 (BD Biosciences) で染色した。30 分染色後、塩化アンモニウムを主成分とする試薬で溶血し、0.5% ホルムアルデヒド溶液にて固定した。

B 細胞上の MHC class II 発現を、PE (CD45R / B220) 陽性細胞中の、FITC (I-A/I-E) の Geo MFI と定義して、FACS にて測定した。

AS2819899 非存在下、溶媒のみ添加の IgM 刺激なしの Geo MFI を 100% 阻害、IgM 刺激ありの Geo MFI を 0% 阻害とし、阻害率を算出した。阻害率について Sigmoid-E_{max} non-linear regression analysis を用いて IC₅₀ 値を算出した。実験は 4 試行実施し、各実験の IC₅₀ 値の幾何平均と 95%信頼区間を算出した。

アステラス製薬株式会社つくば研究センターは、AAALAC インターナショナル (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) の認定を受けており、動物実験はアステラス製薬株式会社の動物実験委員会により審査・承認を得た上で実施した (動物実験承認番号; D-T14081)。

2.7 抗 CD3/28 刺激ヒト T 細胞増殖抑制

抗ヒト CD3 抗体 (BD Biosciences) を 96 ウェルプレート (Corning, NY, USA) に 0.15 µg/well の濃度で添加し、4°Cで一晩固相化した。プレートは細胞を播種する

前に Phosphate Buffered Saline (PBS) にて数回洗浄した。購入ヒト pan-T 細胞 (AllCells, CA, USA) を販売元の手順書に従い解凍した。

1×10^5 cells/well の細胞数で、ペニシリン/ストレプトマイシン、10% 非働化 FCS を含む RPMI1640 培地に懸濁した細胞を、抗 CD3 抗体を固相化したプレートに播種し、各濃度の AS2819899 存在下で最終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$ の抗 CD28 抗体 (BD Biosciences) を添加することで刺激した。プレートを 3 日間 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した。培養後、CellTiter-Glo[®] (Promega, WI, USA) により、ATP 濃度 (細胞数) を反映する発光強度を、マルチモードプレートリーダー EnVision (パーキンエルマー・ジャパン、神奈川県) を用いて測定した。

AS2819899 非存在下での刺激なしの平均発光強度を 100% 阻害、刺激ありの平均発光強度を 0% 阻害とし、阻害率を算出した。阻害率について Sigmoid- E_{max} non-linear regression analysis を用いて IC_{50} 値を算出した。実験は 3 試行実施し、各実験の IC_{50} 値の幾何平均と 95% 信頼区間を算出した。

3 結果

AS2819899 は *in vitro* PI3K 酵素阻害アッセイにおいて、ヒト PI3K α 、 β 、 δ 、 γ についてそれぞれ 37 nM、110 nM、0.29 nM、32 nM の K_i 値を示し、PI3K δ の抑制は、他 Class I PI3K アイソフォームと 100 倍以上の選択性を示した (Table 4)。また、マウス PI3K δ の K_i 値は、0.36 nM であり、ヒト PI3K δ と同等であった。加え

てヒト Class II PI3K アイソフォームの酵素阻害作用の IC₅₀ は PI3KC2 α 、C2 β 、C2 γ についてそれぞれ、>10 μ M、0.98 μ M、0.82 μ M であり、PI3K δ 阻害作用と比較して弱く、AS2819899 は、Class II PI3K アイソフォームに対しても高い選択性があることが示された (Table 5)。さらに 28 種類の PI3K 以外のチロシンキナーゼおよびセリン/スレオニンキナーゼに対する酵素阻害作用を評価したが、10 μ M の濃度において、評価した全てのキナーゼで、阻害作用は認められなかった (Table 6)。また、各種レセプター・イオンチャネル・トランスポーターに対する AS2819899 の結合活性は、10 μ M の濃度において、ほぼ全てで、10%以下であった (Table 7)。これらの結果から AS2819899 は PI3K δ を選択的に阻害する化合物であることが示された。

PI3K δ は主にリンパ球系細胞に発現していることから、AS2819899 の B 細胞および T 細胞への作用を確認した。

まず、B 細胞に対する作用として、抗 IgM 抗体による BCR 刺激後の MHC class II 発現について作用を確認した。AS2819899 は健常人の末梢血 B 細胞において、抗 IgM 刺激 MHC class II 発現を低濃度から抑制し、IC₅₀ は 1.8 nM であった (Fig. 5A)。またマウス末梢血を用いた同様の実験においても、AS2819899 は同等の濃度 (IC₅₀ ; 4.3 nM) で抑制がみられたことから (Fig. 5B)、B 細胞阻害において、マウスによる実験でヒトでの薬効を推察できると考えられた。

次に、T 細胞に対する作用について確認した。健常人由来 T 細胞を、TCR 複合

体である CD3 と T 細胞共刺激系である CD28 を刺激した際の増殖について評価した。AS2819899 は濃度依存的な T 細胞増殖抑制作用を示し IC₅₀ は 55.1 nM であった (Fig. 6)。

以上のことから、AS2819899 は、BCR および TCR 刺激を阻害することで、B 細胞および T 細胞の活性化、ひいては増殖抑制作用があることを明らかにした。

4 考察

AS2819899 は、上市されている PI3K δ 選択的阻害剤である Idelalisib と同等の PI3K δ 阻害活性を示した (Table 3, Table 4)。一方で Idelalisib と比較し、PI3K γ 阻害作用に対してより高い選択性があることが明らかになった (Table 3, Table 4)。

PI3K γ のみ、または PI3K δ と PI3K γ の両方を阻害する薬物 (PI3K δ/γ 阻害剤) について、マウスを用いたループス腎炎モデルの報告がある[29-31]。例えば、PI3K δ/γ 阻害剤である IPI-145 は NZBW/ F1 マウスループス腎炎モデルにおいて、抗 dsDNA 抗体価を抑制し、腎機能を改善することが示されており、PI3K δ/γ 阻害剤の SLE 治療薬としての有効性が示唆されている[31]。一方で PI3K δ/γ 欠損マウスは、脾臓やリンパ節において強いリンパ球減少がみられるが、粘膜組織への T 細胞および好酸球の浸潤、IgE レベルの上昇など Th2 応答を引き起こすことが報告されており、PI3K δ と PI3K γ の両方を抑制することは、過剰な Th2 応答につながる可能性がある[32]。加えて、PI3K δ のみを阻害する阻害剤であっても、マウス

モデルにおいて、ループス腎炎に対する有効性が示されていることから[33, 34]、PI3K δ 選択的であることは、PI3K δ/γ 阻害と比較して、毒性懸念の少ない SLE の治療薬の創出につながるのではないかと考えた。

本研究の目的は PI3K δ の選択的阻害剤の SLE 治療薬としての可能性を検証することであり、本章で実施した酵素アッセイにおいて、AS2819899 が上市されている化合物よりもさらに PI3K δ 選択的な阻害作用を示したことから、AS2819899 は、検証実験を行うのに適切な化合物であると考えられた。

AS2819899 は健常人の末梢血 B 細胞における、抗 IgM 刺激 MHC class II 発現を低濃度から抑制し、IC₅₀は 1.8 nM であった。更に我々は、MHC class II 発現と同等の濃度において、AS2819899 が anti-IgM 刺激 B 細胞増殖を抑制することを確認している (データ未発表)。pan-PI3K 阻害剤である LY294002 (Table 3) は、*in vitro* において BCR 刺激誘発の MHC class II 発現を抑制することが報告されており[28]、MHC class II 発現に対する PI3K の関与が示されている。本章において、PI3K δ 選択的阻害剤である AS2819899 が抑制作用を示したことから、BCR 刺激における MHC class II 発現には PI3K δ の寄与が大きいことが考えられた。

また、AS2819899 の抗 CD3/28 刺激に対する T 細胞増殖抑制の IC₅₀は 55.1 nM であった。PI3K δ は、触媒サブユニットである p110 δ と、調節ユニットである p85 からなるヘテロダイマーであるが (Table 2)、触媒サブユニットである p110 δ を欠損したマウスでは Wild type のマウスと比較して、B 細胞の増殖が抑制され、T

細胞についても B 細胞と比較すると弱いですが、増殖が抑制されることが報告されている[20]。本研究において確認された AS2819899 の B 細胞の活性化および T 細胞の増殖への抑制作用は、p110 δ 欠損マウスでみられた結果と同様に、PI3K δ が BCR および TCR を介した活性化および増殖に重要な役割を果たしていることに起因すると考えられた。

Table 3. Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) Class I PI3K inhibitors

	IC ₅₀ (nM) Human			
	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ
Idelalisib ^{※1}	2.5	820	565	89
ZSTK474 ^{※2}	4.6	16	44	49
LY294002 ^{※2}	1600	550	11000	12000

※1; IC₅₀ is adapted from Ref. [27].

※2; IC₅₀ is adapted from Ref. [35].

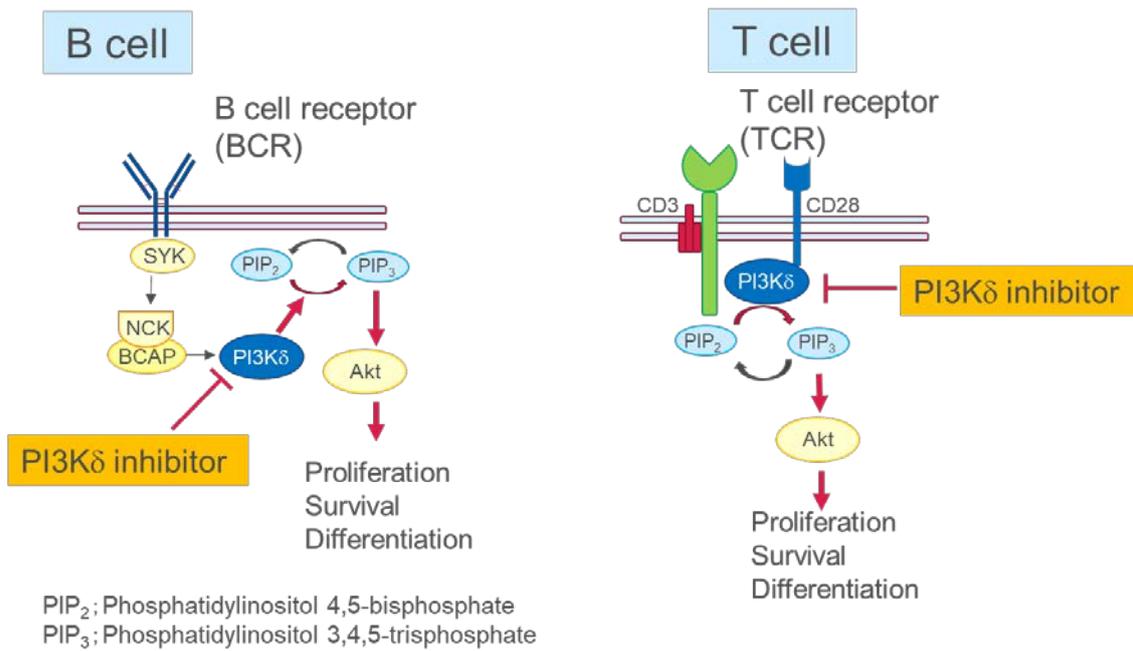


Fig. 4. Functions of PI3K δ downstream of B cell receptor and T cell receptor

This figure is adapted from Ref. [36, 37] and edited.

Table 4. Inhibition Constants (Ki) of AS2819899 on human and murine Class I PI3K isoforms

PI3Ks	Human*				Mouse**
	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
Ki (nM)	0.29	37	110	32	0.36
(95% confidence interval)	(0.23–0.36)	(23–58)	(54–220)	(18–57)	(0.23–0.56)

*Each value represents the geometric mean and 95% confidence interval of 4 separate experiments performed in duplicate.

**Each value represents the geometric mean and 95% confidence interval of 3 separate experiments performed in duplicate.

Table 5. Inhibitory effect of AS2819899 on human Class II PI3K isoforms

	PI3KC2 α	PI3KC2 β	PI3KC2 γ
IC ₅₀ (μ M)	>10	0.98	0.82

Data are expressed as the mean of duplicate wells.

Table 6. Inhibition of Tyrosine and Serine/threonine kinases by AS2819899

Tyrosine kinases	%inhibition by 10 μM of AS2819899	%inhibition by 10 μM of positive control	Positive Control
ABL	0.1	101.5	Staurosporine
AXL	0.4	103.2	Staurosporine
BMX	-3.6	95.2	Staurosporine
BTK	-8.5	100.0	Staurosporine
EGFR	-3.3	101.8	Staurosporine
EPHA2	-2.0	97.2	Staurosporine
FAK	-9.1	102.6	Staurosporine
FLT3	0.4	103.1	Staurosporine
FMS	-7.6	99.6	Staurosporine
HER2	-3.7	97.8	Staurosporine
ITK	-4.6	102.1	Staurosporine
KDR	-3.2	102.7	Staurosporine
LCK	-2.1	102.6	Staurosporine
PDGFR α	-1.7	104.3	Staurosporine
PDGFR β	-5.4	102.6	Staurosporine
TRKA	-3.2	102.4	Staurosporine

Serine/threonine kinases	%inhibition by 10 μM of AS2819899	%inhibition by 10 μM of positive control	Positive Control
AKT1	-4.8	102.3	Staurosporine
AurC	-6.3	102.4	Staurosporine
CDK2/CycA2	-1.8	102.4	Staurosporine
CK1δ	0.6	98.7	5-Iodotubercidin
Erk5	-6.2	96.3	Staurosporine
GSK3β	-2.3	101.4	Staurosporine
IKKβ	-5.3	93.9	Staurosporine
JNK1	-2.2	71.4	JNK Inhibitor II
NEK2	-1.6	67.9	Staurosporine
p38β	-4.3	102.2	SB202190
p70S6K	-8.1	103.0	Staurosporine
PIM1	1.3	100.7	Staurosporine

Table 7. Inhibitory effect of AS2819899 on radioligand binding to various receptors, ion channels and transporters

Assay name	Inhibition (%)		
	AS2819899	Positive substance	
Adenosine A1 (Rat)	11.73	100.00	(DPCPX)
α 1-Adrenergic (Non-selective) (Rat)	6.89	100.00	(Prazosin)
α 2-Adrenergic (Non-selective) (Rat)	22.78	98.69	(Yohimbine)
β -Adrenergic (Non-selective) (Rat)	6.44	100.00	((\pm)-Propranolol)
Angiotensin AT1 (Human)	1.35	98.73	(Angiotensin II)
Angiotensin AT2 (Mouse)	17.60	100.00	(Angiotensin II)
Bradykinin B2 (Human)	0.26	99.61	(HOE140)
Ca Channel (Type L, Dihydropyridine) (Rat)	2.19	100.00	(Nitrendipine)
Ca Channel (Type N) (Rat)	1.12	100.00	(ω -Conotoxin GVIA)
CCK A (Human)	0.00	95.95	(CCK-8)
CCK B (Human)	0.00	100.00	(CCK-8)
CRF1 (Human)	0.00	100.00	(Urocortin human)
Dopamine D1 (Rat)	0.50	100.00	(R(+)-SCH-23390)
Dopamine D2 Short (Human)	5.81	100.00	((+)-Butaclamol)
Dopamine Transporter (Human)	0.03	99.54	(GBR12909)
Estrogen (Rat)	0.00	100.00	(β -Estradiol)
Endothelin ETA (Human)	0.00	100.00	(Endothelin-1)
Endothelin ETB (Human)	0.66	99.00	(Endothelin-1)
GABA A (Agonist Site) (Rat)	5.84	98.42	(Muscimol)
GABA A (BZ Central) (Rat)	1.16	100.00	(Diazepam)
GABA B (Rat)	0.00	99.87	(GABA)
Glutamate (AMPA) (Rat)	12.05	100.00	((S)-AMPA)
Glutamate (Kainate) (Rat)	4.68	100.00	(Kainic acid)
Glutamate (NMDA Agonist Site) (Rat)	0.00	99.98	(L-Glutamic acid)
Glutamate (NMDA Glycine Site) (Rat)	3.83	98.55	(MDL105,519)
Glycine (Strychnine-sensitive) (Rat)	5.41	100.00	(Strychnine)
Histamine H1 (Central) (Guinea pig)	0.00	100.00	(Pyrilamine)
Histamine H2 (Rat)	3.25	98.34	(Cimetidine)
Histamine H3 (Rat)	8.88	97.37	((R)(-)- α -Methylhistamine)

Assay name	Inhibition (%)		
	AS2819899	Positive substance	
K Channel KATP (Rat)	11.48	97.41	(Glybenclamide)
K Channel SkCa (Rat)	12.85	100.00	(Apamin)
Leukotriene B ₄ (Guinea pig)	7.95	100.00	(Leukotriene B ₄)
Leukotriene D ₄ (Guinea pig)	13.72	99.92	(Leukotriene D ₄)
Melatonin MT1 (Human)	9.18	100.00	(Melatonin)
Muscarinic (Non-selective) (Rat)	1.27	100.00	(Atropine)
Muscarinic M1 (Human)	5.12	100.00	(Atropine)
Muscarinic M2 (Human)	0.00	100.00	(Atropine)
Na Channel Site 2 (Rat)	38.11	100.00	(Dibucaine)
Neurokinin NK1 (Human)	7.96	100.00	(L-703,606)
Neurokinin NK2 (Human)	21.46	99.61	(Neurokinin A)
Neurokinin NK3 (Human)	28.07	100.00	(Senktide)
Norepinephrine Transporter (Human)	1.99	98.48	(Desipramine)
Nicotinic (Ni Neuronal) (Rat)	2.60	100.00	((±)-Nicotine)
Opiate (Non-selective) (Rat)	0.59	97.27	(Naloxone)
Opiate μ (Human)	0.00	100.00	(DAMGO)
Oxytocin (Rat)	0.70	100.00	(Oxytocin)
PAF (Rabbit)	19.48	98.10	(PAF)
Serotonin 5HT1 (Non-selective) (Rat)	8.08	100.00	(Serotonin)
Serotonin 5HT2B (Human)	8.97	100.00	(Serotonin)
Serotonin Transporter (Human)	0.00	99.21	(Imipramine)
Sigma (Non-selective) (Guinea pig)	2.61	100.00	(Haloperidol)
Testosterone (Human)	0.00	99.24	(Testosterone)
Vasopressin V1 (Rat)	17.54	93.23	([Arg ⁸]-Vasopressin)
VIP 1 (Human)	0.00	98.91	(VIP)

Test substance concentration: 10 μM; positive substance concentration: 1 μM for leukotriene B₄, leukotriene D₄ and VIP, or 10 μM for the others.

Data are expressed as the mean values of duplicate samples.

The inhibition rate was calculated as “100 – binding ratio”.

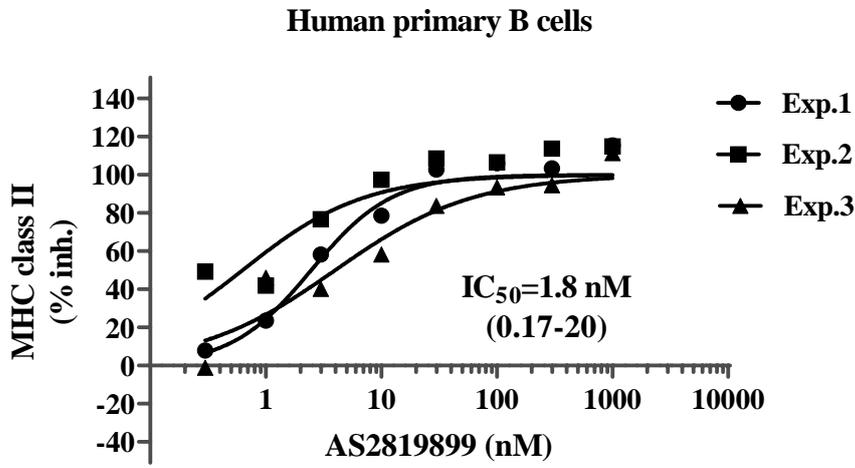
Binding ratio: $[(B - N)/(B_0 - N)] \times 100$ (%)

B: Bound radioactivity in the presence of test substance (individual value)

B₀: Total bound radioactivity in the absence of test substance (mean value)

N: Non-specific bound radioactivity (mean value)

(A)



(B)

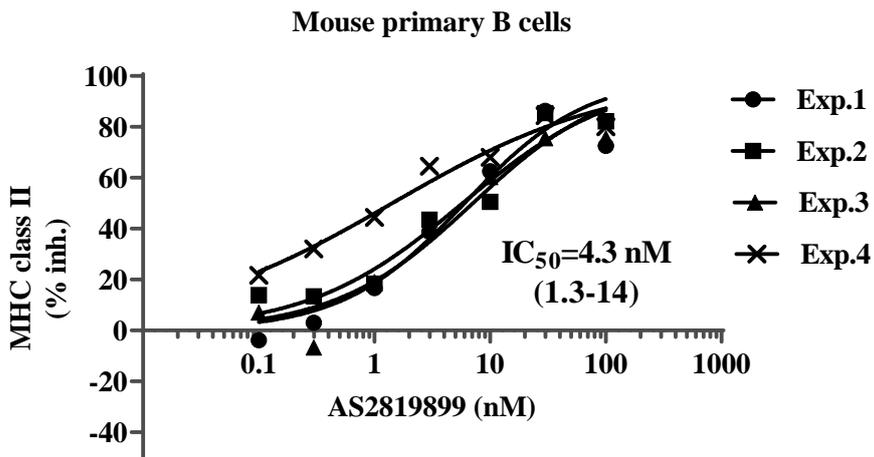


Fig. 5. Inhibitory effect of AS2819899 on anti-IgM antibody-induced upregulation of major histocompatibility complex (MHC) class II on human and mouse primary B cells.

(A) MHC class II on human primary B Cell.

Human peripheral blood samples were cultured with AS2819899 and stimulated with goat F(ab')₂ anti-human IgM. After incubation for 22 h, the geometric mean fluorescence intensity (Geo MFI) for the expression of HLA-DP, DQ, DR on CD20-positive-gated lymphocytes was determined using flow cytometry. The inhibition rate of Geo MFI and the IC₅₀ of the inhibition rate were calculated. Three independent experiments were performed in duplicate. The geometric mean with 95% confidence interval (CI) of IC₅₀ in three independent experiments was calculated. Values in parentheses represent 95% CI.

(B) MHC class II on mouse primary B Cell.

Mouse peripheral blood samples were cultured with AS2819899 and stimulated with goat F(ab')₂ anti-mouse IgM. After incubation for 4 h, the Geo MFI for the expression of MHC class II on CD45R/B220-positive-gated lymphocytes was determined using flow cytometry. The inhibition rate of Geo MFI and the IC₅₀ of the inhibition rate was calculated. Four independent experiments were performed in duplicate. The geometric mean with 95% CI of IC₅₀ in four independent experiments was calculated. Values in parentheses represent 95% CI.

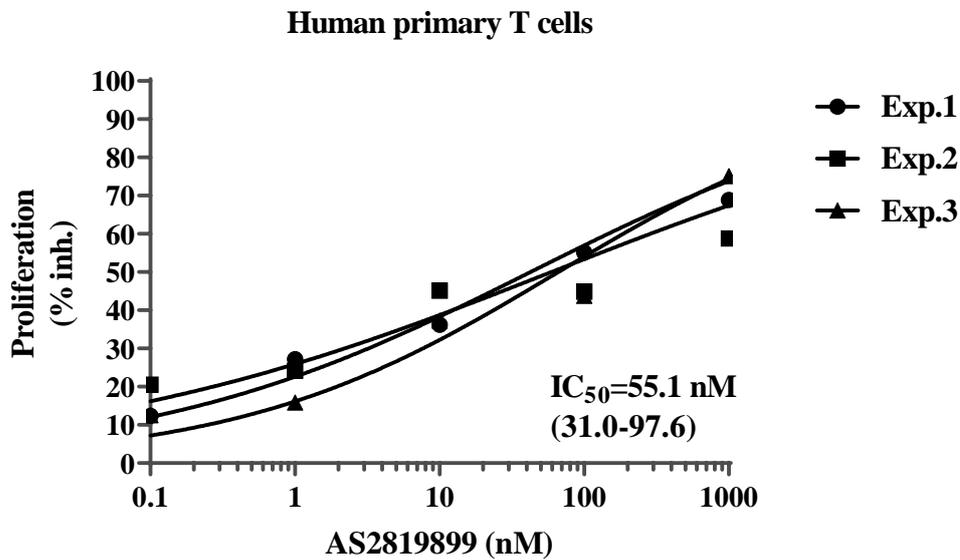


Fig. 6. Inhibitory effect of AS2819899 on anti-CD3/CD28 antibody-induced human T cell proliferation.

Human peripheral T cells were cultured with AS2819899 and stimulated with anti-CD3/CD28. After incubation for 72 h, cell proliferation was examined using a luminescent cell viability assay. The inhibition rate of cell viability and the IC_{50} of the inhibition rate were calculated. The geometric mean with 95% confidence interval (CI) of IC_{50} in three independent experiments was calculated. Values in parentheses represent 95% CI.

第 2 章 ; PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 の抗体産生に対する作用

1 緒言

SLE の病態には自己抗体の関与が強く示唆されており、自己抗体は SLE の診断や疾患活動性のモニターに使用されている[1]。SLE の重症患者や再発患者では、自己抗体の一つである抗 dsDNA 抗体価が高値となる[38]。さらに dsDNA 抗体はループス腎炎の患者において 40~90%で陽性になり、疾患活動性との関連性が示されている[39]。これらのことから、自己抗体の産生抑制が、SLE の治療につながると思われる。

第 1 章において、PI3K δ 選択的阻害剤である AS2819899 は、*in vitro* において BCR および TCR 刺激を阻害することで、B 細胞の MHC class II 発現および T 細胞の増殖を抑制した。B 細胞は、MHC class II を介して、ヘルパー T 細胞による補助を受け、抗体産生細胞に分化することから、AS2819899 による B 細胞の MHC class II 発現の抑制や T 細胞の増殖抑制は、抗体産生の抑制作用につながると思われる。そこで、本章では、T 細胞非依存的抗原および T 細胞依存的抗原によるマウス抗体産生モデルを用いて AS2819899 の抗体産生に対する作用を評価した。

T 細胞非依存的抗体産生モデルとして、Trinitrophenylated aminoethylcarboxymethyl-Ficoll (TNP-Ficoll) を免疫するモデルを実施した。抗原刺激後の抗体産生において、通常 B 細胞は、活性化ヘルパー T 細胞の補助を必

要とするが、一部の抗原では T 細胞の補助を必要とせず抗体を産生することが知られている。このような抗原を胸腺非依存的抗原 (Thymus-independent antigen, TI 抗原) と呼ぶ [40]。TI 抗原は、さらに BCR 非特異的に作用する TI-1 抗原と、BCR 特異的に作用する TI-2 抗原に分類され、TI-1 抗原には lipopolysaccharide (LPS) や、細菌由来の DNA が、TI-2 抗原は細菌の細胞壁成分である多糖類などが分類される [40]。今回試験に用いた TNP-Ficoll は TI-2 抗原として実験に広く使用されており、免疫により、B 細胞のクラススイッチを伴わないため、抗 TNP IgM 抗体価を測定することで抗体産生に対する影響を確認した。

次に、T 細胞依存抗原である Dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin (DNP-KLH) をマウスに 2 回免疫するリコール応答抗体産生モデルを実施した。

T 細胞依存的抗体産生において、B 細胞は初回の抗原刺激を受け、MHC class II により抗原を提示し、同じ抗原を認識する T 細胞との相互作用 (T-B 細胞間相互作用) を経て活性化される。活性化された B 細胞は、2 次リンパ組織において、胚中心 (Germinal Center; GC) を形成し、抗原に対してより親和性の高い抗体を産生する細胞へと分化し (親和性成熟; Affinity maturation)、さらに抗体の定常領域が IgM から IgG に変換される (クラススイッチ; Class-switch)。さらに一部の細胞は抗体産生細胞である形質細胞へ分化し大量の抗体を産生するが、一部はメモリー B 細胞として 2 次リンパ組織に存在し、抗原を記憶している。再度抗原に感作されると、メモリー B 細胞は MHC class II を介する T 細胞刺激やサイト

カインの刺激を受けて、初回感作時よりも迅速に形質細胞へと分化する（リコール応答; Memory recall response) (Fig.7)。本章では、DNP-KLH を 2 回免疫し、2 回目の免疫後から AS2819899 を投与することで、リコール応答による抗体産生への作用について確認した。被験化合物として、AS2819899 に加え、ミコフェノール酸モフェチル (Mycophenolate mofetil; MMF) を投与した。MMF は、臓器移植およびループス腎炎の治療薬として使用されている免疫抑制剤であり、DNA 合成阻害により、T 細胞および B 細胞の増殖を抑制する[41]。

SLE 治療における MMF のヒト有効血中濃度に対応するマウスの投与量は 25 mg/kg と考えられるため[42]、その周辺濃度で投与し、AS2819899 との作用を比較した。

2 材料と方法

2.1 被験化合物

AS2819899-CL (AS2819899 塩酸塩) および MMF は、アステラス製薬 (株) にて合成した。AS2819899-CL および MMF を 0.5% メチルセルロース (Methyl cellulose; MC) 溶液に溶解し、試験に使用した。AS2819899 の投与用量はフリー体として換算し、表記した。

2.2 マウス TNP-Ficoll 誘発 T 細胞非依存的抗体産生モデル

雌性 BALB/c AnNCrIcrlj マウスは、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県) より購入した。7 週齢の BALB/c AnNCrIcrlj マウスに TNP-Ficoll (Biosearch Technologies, CA, USA) を 100 µg/ml の濃度になるよう生理食塩水に溶解し、200 µl/mouse で腹腔内投与することで免疫を実施した。群構成は、対照群、AS2819899 投与群 (0.3、1、3、10 mg/kg) の 5 群 (n=4) とした。AS2819899 投与群には、TNP-Ficoll 免疫当日から 3 日後まで、各用量の AS2819899 を 1 日 2 回経口投与した。対照群には溶媒 (0.5% MC 水溶液) を投与した。TNP-Ficoll 免疫 4 日後に、マウスから採血し、血漿中の抗 TNP IgM 抗体濃度を Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法により測定した。ELISA 法の検量線には、別途 TNP-Ficoll を免疫したマウスから採取したサンプルを、100 U/ml と定義し、使用した (動物実験承認番号: C-T12263)。

2.3 マウス DNP-KLH 誘発 T 細胞依存的リコール応答抗体産生モデル

雌性 BALB/c AnNCrIcrlj マウスは、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県) より購入した。生理食塩水に、1 mg/ml の濃度になるよう溶解した DNP-KLH (コスモ・バイオ、東京) と、10 mg/ml の濃度になるように溶解した Alum アジュバント (コスモ・バイオ) とを、冷却下で等量混合し 30 分間混和した。6 週齢の雌性 BALB/c AnNCrIcrlj マウスに、200 µl/mouse で腹腔内投与し、初回

免疫を行なった。初回免疫から 19 日後に、ELISA 法により血漿中の抗 DNP IgG レベルを測定し、抗 DNP IgG レベルが均等になるようにマウスを各群に群分けした。群構成は、対照群、AS2819899 投与群 (1、3、10 mg/kg)、MMF 20-50 mg/kg (投与開始日～投与 10 日目までは 20 mg/kg, 投与 11 日目～投与 14 日目までは 50 mg/kg) の 5 群 (n=7-8) とした。初回免疫から 21 日目に DNP-KLH を 500 μ g/ml の濃度で生理食塩水に溶解し、アジュバントの併用無しで 200 μ l/mouse で腹腔内投与することにより 2 回目の免疫を行った。2 回目の免疫の日から 2 週間、対照群には溶媒 (0.5% MC 水溶液) を 1 日 1 回、AS2819899 投与群には各濃度の AS2819899 を 1 日 2 回、MMF 投与群には MMF を 1 日 1 回経口投与した。初回免疫から、19、25、28 および 35 日目に、マウスから血液を採取し、血漿中抗 DNP IgG 濃度を ELISA 法によって測定した。ELISA 法のスタンダードは、別試験から採血した血漿を 100 U/ml と定義し使用した。初回免疫から 19 日目の抗体価を 21 日目と同じと仮定し、この値を基準値として、初回免疫から 25、28 および 35 日目の基準値からの上昇分を、血漿中抗 DNP IgG 濃度-時間曲線下面積 (Area Under the Curve; AUC) として算出した (動物実験承認番号: D-T12366)。

2.4 統計解析

統計解析は、Graph Pad Prism (Graph Pad Software) を用いて行い、図中のデータ

は $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ で示した。対照群との統計的有意差は **Dunnett's multiple comparison test** により解析し、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

ただし、マウス **DNP-KLH** 誘発 T 細胞依存的リコール応答抗体産生モデルにおいて、対照群と **MMF** 投与群との検定については、**Student's t-test** により解析し、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

3 結果

3.1 マウス **TNP-Ficoll** 誘発 T 細胞非依存的抗体産生モデル

マウスに **TNP-Ficoll** を 1 回免疫し、感作した日から **AS2819899** を 0.3、1、3 および 10 mg/kg の投与量で 1 日 2 回投与し、4 日後の抗 **TNP IgM** を測定したところ、0.3 mg/kg 以上の高用量の投与群において、抗 **TNP IgM** 抗体価が有意に抑制された (**Fig. 8**)。溶媒投与対照群に対する抑制率は、0.3、1、3 および 10 mg/kg 投与群において、それぞれ 38.1、43.7、70.0 および 87.8%であった。この結果から、**AS2819899** は T 細胞非依存的抗体産生を投与用量依存的に抑制することが示された。

3.2 マウス **DNP-KLH** 誘発 T 細胞依存的リコール応答抗体産生モデル

DNP-KLH を 21 日の間隔をあけて 2 回免疫した。2 回目の免疫後、経時的に採血し、血漿中の抗 **DNP IgG** 抗体価を測定した。対照群では、初回免疫から 25 日目

の採血で、抗 DNP IgG 抗体価の上昇が確認され、最終採血日の 35 日目まで抗体価の上昇が維持されていた (Fig. 9A)。AS2819899 (1, 3, 10 mg/kg) を 2 回目の免疫日から 35 日目まで 1 日 2 回投与したところ、評価した全ての用量で、血漿中の抗 DNP IgG 抗体価の抑制が確認された (Fig. 9B)。1、3、および 10 mg 投与群の、対照群に対する抑制率はそれぞれ、55.9、65.1 および 78.8%であった。一方で、MMF の 20-50 mg/kg での抗体価の抑制率は、25.4%であり、有意な抑制ではなかった。MMF は作用機序から、T 細胞および B 細胞の増殖を抑制すると考えられるが、20-50 mg/kg において有意な抗体価の抑制はみられず、抗体産生抑制作用は AS2819899 の方が強いことが示された。

以上の結果より、PI3K δ 選択的阻害剤である AS2819899 は、B 細胞のリコール応答抗体産生を抑制し、その作用は MMF と比較して強いことが示された。

4 考察

AS2819899 は胸腺非依存的抗原である TNP-Ficoll による抗体産生を抑制した。胸腺非依存的抗原は B 細胞のうち、主に腸管や腹腔に多く存在する B1 細胞や、脾臓の辺縁帯 (Marginal Zone; MZ) B 細胞に認識され、抗原特異的抗体が産生される[43, 44]。PI3K δ の触媒サブユニットである p110 δ 欠損マウスでは、腹腔の B1 細胞や MZ B 細胞が減少し、さらに TNP-Ficoll 刺激による抗 TNP IgM 抗体産生が抑制されることが報告されている[20, 45]。本試験における抗体産生抑制も

AS2819899 による PI3K δ 阻害により、B1 細胞や MZ B 細胞が減少したことに起因する可能性が示唆された。

次に T 細胞依存的抗原である DNP-KLH によるリコール応答抗体産生試験を実施し、AS2819899 の 1 mg/kg 以上の投与群で抗 DNP 抗体価の抑制が確認された。

メモリーB 細胞の活性化は脾臓やリンパ節などの 2 次リンパ組織の胚中心 (Germinal Center; GC) で行われる。PI3K δ の触媒サブユニットである p110 δ 欠損マウスでは、DNP-KLH 刺激後の GC の形成が抑制され、抗原特異的抗体産生が抑制されることが報告されている[20, 45]。本試験においても、AS2819899 により、T 細胞の増殖、および B 細胞の MHC class II 発現が抑制されたことで GC の形成が抑制され、その結果、抗体産生が抑制されたものと考えられた。

SLE 治療において、病態の再発を抑えることは非常に重要である。SLE の再発は、メモリーB 細胞の活性化 (リコール応答) と関連する。Cyclophosphamide が無効であった SLE 患者を対象にした、Rituximab (抗 CD20 抗体) の臨床試験において、Rituximab が有効であった患者を、再発時期を指標に 2 つのグループに分けて解析した。Rituximab の投薬から 6~12 ヶ月以内に再発したグループ (早期再発群)、と 12 ヶ月以降の再発のグループ (再発遅延群) を比較すると、早期再発群ではメモリーB 細胞 (CD19⁺ CD27⁺⁺ CD38⁻) の除去が不十分であったことが示されている[46]。この結果は、SLE の再発にメモリーB 細胞の制御が重要であることを示唆している。また抗 BAFF/BLys モノクローナル抗体である

Belimumab は SLE 患者を対象にした第 2 相試験において、血清学的 SLE に一定の薬効を示したが、一方で再発率を改善せず、投与開始一年後の末梢血の解析において、ナイーブ B 細胞数を減少させているものの、メモリー B 細胞数を減少させなかった[14]。加えて抗 BAFF 抗体はハプテン NP を多価に結合したニワトリガンマグロブリン (NP-Chicken Gamma Globulin; NP-CGG) 誘発のマウスリコール応答抗体産生モデルにおいて、リコール応答による抗体産生を抑制しない[47]。これらの結果は Belimumab の B 細胞リコール応答による作用が不十分であることが、Belimumab の SLE 再発抑制への作用が弱いことの一因であることを示唆している。

一方、我々は以前の報告で、別の PI3K δ 選択的阻害剤 AS2541019 が DNP-KLH 誘発のラット抗体産生モデルにおいて、リコール応答による抗体産生を抑制することを確認している[48]。さらに、本章において、AS2819899 がリコール応答の抗体産生を抑制したことで、PI3K δ 選択的阻害が B 細胞リコール応答に対する抗体産生を抑制することが示された。この結果から、PI3K δ 選択的阻害剤が、B 細胞リコール応答を抑制することで、SLE の再発抑制に効果を示す可能性が考えられた。

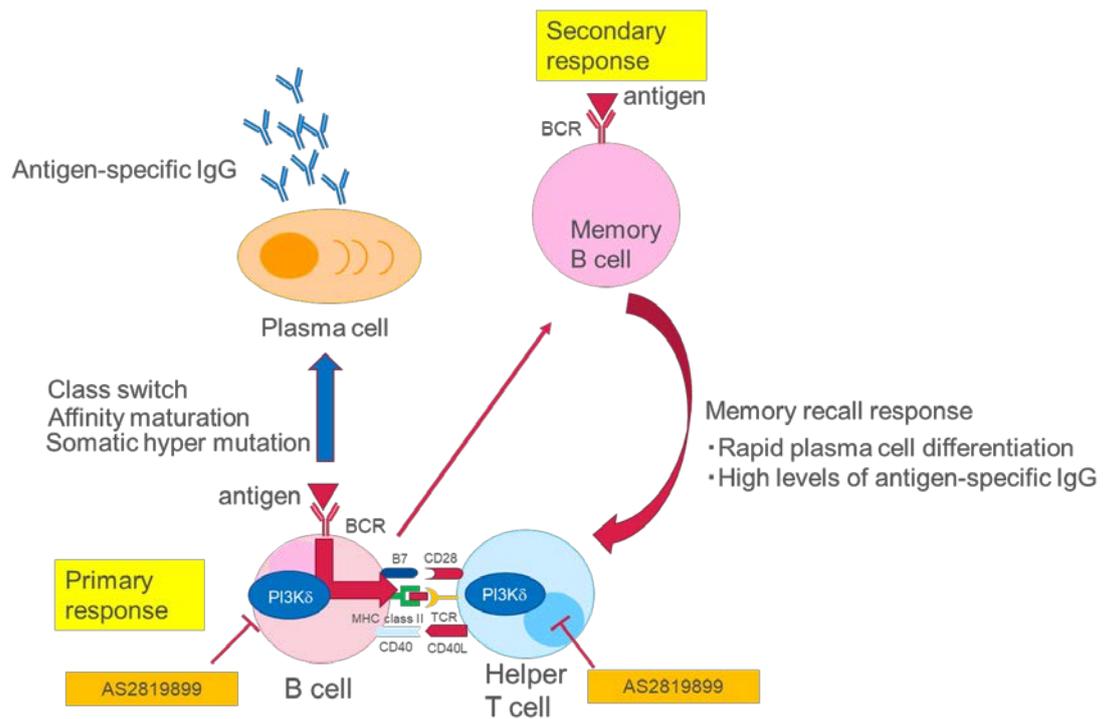


Fig. 7. T cell-dependent memory recall response in secondary lymphoid organ

(A)

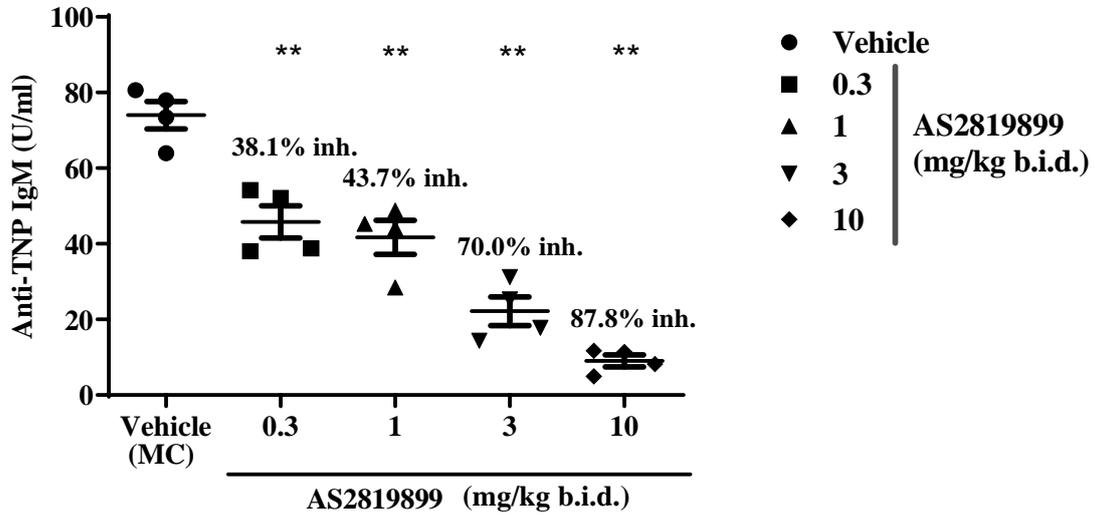
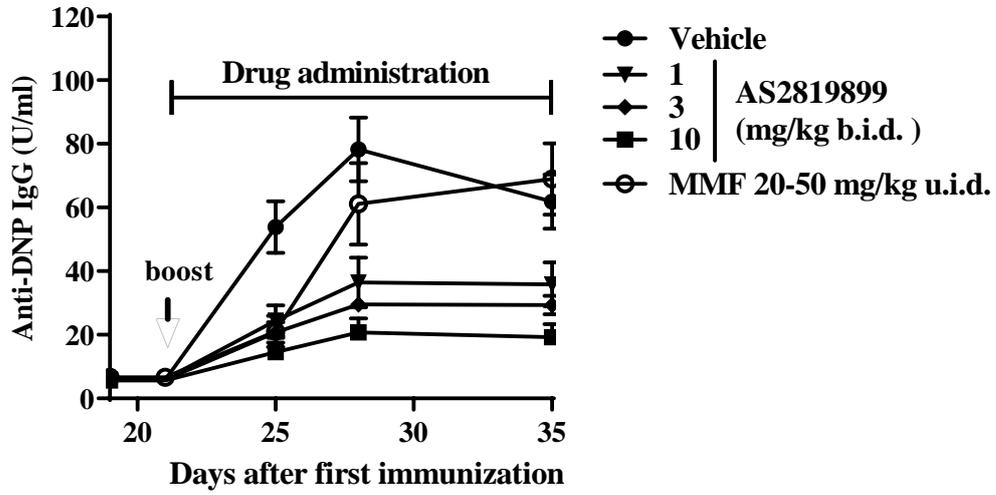


Fig. 8. Inhibitory effect of AS2819899 on TNP-Ficoll-induced antibody production in mice

BALB/c mice were sensitized with TNP-Ficoll on day 0. AS2819899 at the indicated doses was administered from day 0 to day 3. Blood was collected and plasma anti-TNP IgM titers were measured on day 4. Each symbol indicates individual data (n=4). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M. in each group. **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Dunnett's multiple comparisons test.

Inh.; Inhibition, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)

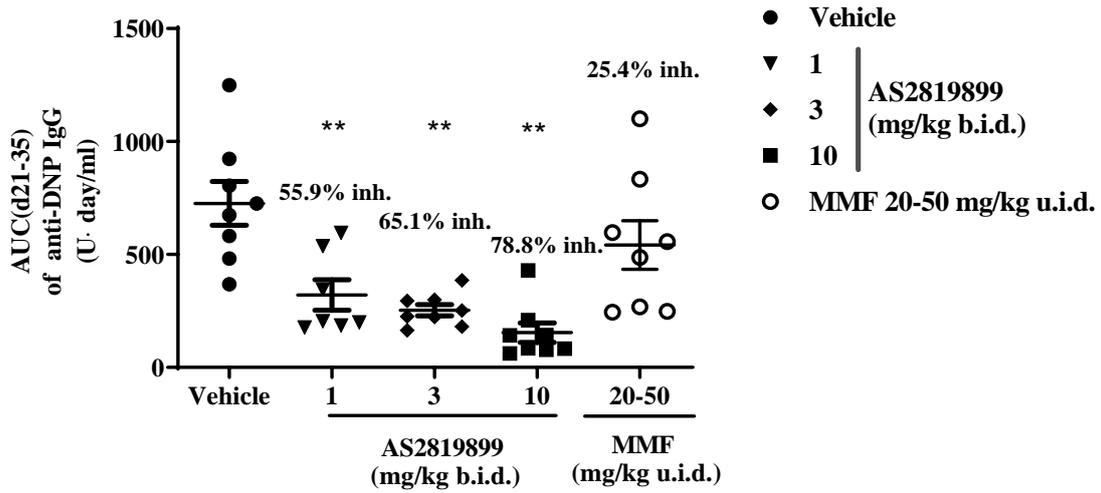


Fig. 9. Inhibitory effect of AS2819899 on DNP-KLH-induced memory-recall antibody production in mice

BALB/c mice were sensitized with DNP-KLH on day 0 and day 21. AS2819899 at the indicated doses was administered from day 21 to day 34. MMF was administered at 20 mg/kg from day 21 to day 30, 50 mg/kg from day 31 to day 34. Blood was collected and plasma anti-DNP IgG titers were measured on days 19, 25, 28 and 35.

(A) Time course of anti-DNP antibody titer after the secondary immunization.

Values are mean \pm S.E.M. (AS2819899 1 mg/kg group; n=7, Other groups; n=8).

(B) The AUC (d21-35) of anti-DNP IgG.

The value on day 19 was extrapolated as the value on day 21 and defined as the basal value. The increase from the basal value on days 25, 28, and 35 after day 21 was calculated as the AUC. Each symbol indicates individual data (AS2819899 1 mg/kg group; n=7, Other groups; n=8). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M. in each group.

AS2819899 treated groups; **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using

Dunnett's multiple comparisons test.

Inh.; Inhibition, u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

第3章 ; AS2819899 のマウス自然発症ループス腎炎モデルにおける評価

1 緒言

第1章および第2章において、PI3K δ 選択的阻害剤である AS2819899 が B 細胞の活性化および抗体産生を抑制することが明らかとなった。SLE は B 細胞の異常活性化や、抗 dsDNA 抗体を含む自己抗体の産生が発症の主要因と考えられているため[1]、PI3K δ 選択的阻害剤は SLE の新規治療オプションとして期待される。

SLE は、遺伝的および環境的な様々な要因が合わさり発症する自己免疫疾患であり、その病因や治療法に関する研究には、動物モデルでの評価が重要である[49, 50]。本章では、マウスを用いた自然発症ループス腎炎モデルを用いて AS2819899 の薬効を評価し、PI3K δ 選択的阻害剤の SLE 治療薬としての可能性について検証した。ループス腎炎は SLE に起因して発症する糸球体腎炎である。自己抗体と抗原の複合体が糸球体に沈着し、炎症を惹起することで病態を発症する[51]。臨床症状として、血漿中の腎機能マーカーの悪化や、タンパク尿がみられる[51]。診断は腎生検による病理評価により行われ、症状が進むと糸球体の硬化がみられる[52]。

ループス腎炎を自然発症する動物として、NZB/W F1 マウスと MRL/lpr マウスが広く使用されている。NZB/W F1 マウスはリンパ節腫脹、脾腫、抗 dsDNA 抗体

価の上昇、抗原抗体複合体に起因する糸球体腎炎を発症する。原因遺伝子として複数の遺伝子の報告があるが、それぞれの遺伝子と病態との関連性については未だ議論の余地が残る[49, 50]。NZB/W F1 マウスの病態は、SLE の病態と同様に雌性に発症し、子宮を摘出することで、病態の発症が遅れ、自己抗体の産生も減弱することから、病態の発症にエストロゲンの関与があることが示唆されている[49, 50]。

一方、MRL/lpr マウスでは、アポトーシスを誘発する Fas 遺伝子に変異が生じており、自己反応性細胞もアポトーシスを逃れるため、自己抗体が産生される。病態としてリンパ球増多や、著しいリンパ節の肥大、糸球体腎炎、一部の動物では関節炎を発症する[49, 50]。加えて、この系統では皮膚および神経系の症状も発症することが知られている[53]。MRL/lpr にみられる重度のリンパ節の腫脹と脾腫は、FAS 遺伝子変異による、CD4⁺ CD8⁻ CD3⁺ B220⁺ T 細胞 (ダブルネガティブ T 細胞) の異常増殖に起因していることが分かっている[49, 50]。これらのことから、MRL/lpr マウスは、NZB/W F1 マウスと比較し、T 細胞の異常増殖によって、多臓器における重篤な症状が発症する系統であるといえる。一方で MRL/lpr マウスにおける、これら病態の発症にはヒト SLE と異なり、性差は認められない[49, 50]。さらにヒト SLE において病態の発症要因が FAS 遺伝子異常によることはまれである[54]。

以上のことから、我々は MRL/lpr マウスと比較し、NZB/W F1 マウスにおける

ループス腎炎の発症がヒト SLE の病態により近いと考え、NZB/W F1 マウスループス腎炎モデルを選択し、AS2819899 を評価した。

これまでに PI3K δ 選択的阻害剤のマウス SLE 病態モデルにおける報告はいくつかあるものの、MRL/lpr マウスモデルや、IFN- α などで人為的に腎炎を誘導したモデルであり[33, 34]、NZB/W F1 マウスを用いた自然発症モデルの報告はない。我々は PI3K δ 選択的阻害剤を NZB/W F1 マウスの自然発症のループス腎炎において初めて評価し、比較的低用量まで投与することで、臨床応用への可能性を検証した。

MMF は、ループス腎炎の治療薬として使用されている免疫抑制剤である。本試験においては、AS2819899 の薬効を既存治療薬と比較する目的で MMF を投与した。SLE 治療における MMF のヒト有効血中濃度に対応するマウスの投与量として 25 mg/kg 群を設定し[42]、さらに、より高用量である 100 mg/kg 投与群を設定した。

前臨床研究における Pharmacokinetic- Pharmacodynamic (PK/PD) 解析は、主効果、副作用および化合物の血中薬物濃度とバイオマーカーとの相関を明らかにし、薬効面、安全性面において臨床試験の推進につながる。PI3K δ 選択的阻害剤の臨床応用をより具体化するため、PD マーカーについても検討した。第 1 章において、AS2819899 は B 細胞の抗 IgM 刺激における MHC class II 発現を *in vitro* で抑制したことから、MHC class II 発現を *in vivo* 試験においても PD マーカーとして使用できる

のではないかと考え検証を行った。

2 材料と方法

2.1 被験化合物

AS2819899-CLおよびMMFは、アステラス製薬 (株) にて合成した。AS2819899-CLおよびMMFを、0.5% MC水溶液に溶解または懸濁し、試験に使用した。AS2819899の用量はフリー体として換算し表記した。

2.2 NZB/W F1 マウス自然発症ループス腎炎モデル

雌性NZB/W F1マウスは日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入した。19週齢時に、抗dsDNA抗体価と体重を指標に群分けした。群構成は、対照群 (溶媒投与群)、AS2819899投与群 (0.01、0.1、0.25、0.5、1および5 mg/kg)、MMF投与群 (25および100 mg/kg) の9群 (n=10) とした。19週齢時点からAS2819899投与群には1日2回、MMF投与群には1日1回、被験化合物を経口投与した。対照群には、溶媒 (0.5% MC水溶液) を1日1回経口投与した。本試験における投与量は、1回あたりの投与量で表記した。

19、28、32、34、36、38および40週齢で尿検体を採取し、尿タンパク (Urinary Protein; UPro) と尿クレアチニン (Urinary Creatinine; UCre) を測定した。UProはプロテインアッセイCBB溶液 (ナカライテスク、京都) を用いて、UCreはAqua-auto CRE

reagents (カイノス、東京) を用いて測定した。UProのUCreに対する割合 (UPro/UCre) を算出し、タンパク尿の指標とした。

19、24、28、32、34、36 および 40 週齢に末梢血を採取し、ELISA 法により抗 dsDNA 抗体価を測定した。ELISA 法の検量線用サンプルとして、別途、未処置の NZB/W F1 マウスから採血した血漿を準備し、その抗 dsDNA 抗体価を 10 U/ml と定義し、使用した。

血漿尿素窒素値 (Plasma blood urea nitrogen; pBUN) および血漿クレアチニン値 (Plasma Creatinine; pCre) は富士ドライケムシステム (富士フィルム、東京) を用いて測定した。試験の最終観察日は 40 週齢とした。ただし、それ以前であっても、強い腎不全がある場合 (pBUN > 140 mg/dl) は、実験動物倫理の観点から、動物を安楽死させた。生存率、UPro/UCre、pCre、pBUN、血液細胞数測定、血漿中サイトカイン値および病理組織解析における糸球体硬化スコアについては、解析に途中安楽死動物も含めた。

最終観察日において、麻酔下で動物を全採血した後、腎臓および脾臓を採取した。腎臓は、10%ホルムアルデヒドにより固定したのち、パラフィン包埋、薄層切片を行い、Periodic Acid Schiff (PAS) 染色および Periodic Acid-Methenamine silver (PAM) 染色を施し、病理組織検査に供した。各個体について、下記の基準に基づいた「糸球体硬化指数」を算出した。

糸球体硬化指数

- 0 : 明らかな硬化はみられない
- 1 : ごく一部の糸球体に分節性硬化 (Segmental sclerosis) がみられる
- 2 : 半数以上の糸球体に分節性硬化 (Segmental sclerosis) がみられる
- 3 : 全節性硬化 (Global sclerosis) が散見される
- 4 : 半数以上の糸球体に全節性硬化 (Global sclerosis) がみられる

脾臓細胞は、溶血し、白血球の単離を行い、各種標識抗体で染色して、FACSにより解析した。PE 標識抗 CD45R/B220 抗体と APC 標識抗マウス IgG1 抗体で染色し、CD45R/B220 陽性細胞中の IgG1 陽性細胞の割合をクラススイッチ B 細胞と定義し、割合 (%) を算出した。

FITC 標識抗マウス CD19 抗体、PE 標識抗マウス CD38 抗体および Alexa Fluor® 647 標識抗マウス GL7 抗体で染色し、CD19 陽性細胞中の、CD19⁺ CD38^{mid} GL-7^{hi} 細胞を GC B 細胞として割合 (%) を算出した。

各種血球パラメータについては Sysmex XT-2000i (シスメックス、兵庫) を用いて評価した。末梢血における B 細胞数は、FACS によりリンパ球中の B220 陽性細胞率を算出し、Sysmex XT-2000i (シスメックス) により測定したリンパ球数に乘じて値を算出した。

血漿中サイトカイン (IL-10, IL-12) は The Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-Plex

Immunoassay (BIO-RAD, CA, USA) を用いて測定した (動物実験承認番号: D-T13173)。

2.3 PI3K δ 選択的阻害剤の PD 系の確立

雌性 NZB/W F1 マウスを日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入して使用した。

13~15 週齢の NZB/W F1 マウスに、AS2819899 を 0.5、2 および 5 mg/kg の投与量で経口投与し、採血した。採血ポイントは、0.5 および 5 mg/kg 投与群では投与後 0.5、3 および 6 時間後、2 mg/kg 投与後では投与後 0.5、1、2、4、8、16 および 24 時間後とした。動物は各投与量の各ポイントで 5 匹ずつ使用し、1 匹の動物から投与前 (pre-sample) と投与後 (post-sample) の計 2 回採血した。採血した血液の 1/3 を AS2819899 の血中濃度の測定に、2/3 を MHC class II 発現を確認するための FACS 解析に供した。各ポイントにおいて 2-4 匹の溶媒対照動物 (0.5% MC 水溶液を投与) を準備し、各ポイントの MHC class II 発現抑制率の算出に使用した。

FACS 解析サンプルについては下記のように処理した。採取した血液を培地 (10 mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 55 μ M 2-メルカプトエタノール含有 RPMI-1640) で希釈後、48 ウェルプレートに添加し、最終濃度 66.1 μ g/ml となるように、ヤギ由来 F(ab')₂ 抗マウス IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で刺激した。プレートを 37°C、5% CO₂ の条件下で 4 時間培養した。

刺激後の血液を、PE 標識抗 CD45R/B220 抗体 (BD Biosciences) および FITC 標識

抗マウス I-A/I-E 抗体 (BD Biosciences) で染色した。30 分染色後、溶血し、0.5% ホルムアルデヒド水溶液にて固定した。B 細胞上の MHC クラス II 発現は、PE (CD45R/B220) 陽性細胞中の FITC (I-A/I-E) の Geo MFI と定義して、FACS にて測定した。

同一サンプルについて、抗 IgM 刺激したサンプルの Geo MFI から、抗 IgM 刺激していないサンプルの Geo MFI を引いた値を、delta Geo MFI とした。

MHC class II 発現の阻害率 (Inhibition) については次の式に従って計算した。

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - [\text{delta Geo MFI of post-sample}] / [\text{delta Geo MFI of pre-sample}] \times 100$$

AS2819899 の血漿中濃度は、サンプルを徐タンパク操作後、Acquity UPLC[®] system (Waters Corp., MA, USA) および API 4000 LC/MS/MS System with an electrospray ionization source (AB SCIEX, MA, USA) を用いて測定した。検出限界以下であった場合は 0.1 ng/ml として解析した (動物実験承認番号: D-T13130)。

2.4 統計解析

NZB/W F1 マウス自然発症ループス腎炎モデルについて、対照群と AS2819899 投与群、または対照群と MMF 投与群との統計学的有意差を、Graph Pad Prism (Graph Pad Software) を用い、Dunnett's multiple comparison test により解析し、 $P < 0.05$ を有意水準とした。dsDNA 抗体価およびタンパク尿については、測定値

を対数値に変換し、対数値について、Dunnett's multiple comparison test により解析を行った。

脾臓細胞 FACS 解析および血中サイトカイン濃度において、対照群と MMF 100 mg/kg 投与群との検定については、Graph Pad Prism (Graph Pad Software) を用い、Student's t-test により解析し、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

また、腎臓病理の糸球体硬化スコアは、EXAS Ver.10 software (CAC クロア、東京) を用い、Steel multiple comparison test により解析し、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

血漿中化合物濃度と、MHC class II 発現の相関性解析は、Graph Pad Prism (Graph Pad Software) を用いて、Pearson correlation coefficient (r)を算出した。

3 結果

3.1 NZB/W F1 マウス自然発症ループス腎炎モデル

3.1.1 抗 dsDNA 抗体価

抗 dsDNA 抗体価を 19 週齢以降測定した。対照群において、24 週齢以降の観察日には 19 週齢と比較し、上昇が見られた (Fig. 10A)。24 週齢以降の観察日で、AS2819899 の 5 mg/kg 投与群において、抗 dsDNA 抗体価が抑制されており (Fig. 10A)、40 週齢の最終観察日においても、抗 dsDNA 抗体価の、統計学的に有意な抑制が確認された (Fig. 10C)。MMF 投与群では、25 mg/kg、100 mg/kg いずれの

投与群においても試験期間を通して抗体価の抑制は確認されなかった (Fig. 10B, 10C)。以上の結果から、本モデルにおいて、AS2819899 は dsDNA 抗体価を抑制するが、MMF は抗体価を抑制しないことが示された。

3.1.2 タンパク尿および血漿中腎機能マーカー

抗 dsDNA 抗体は直接的または間接的に腎臓の抗原と結合し、組織で炎症反応が促進されることで、腎炎の発症に繋がると考えられている[55]。ループス腎炎では、糸球体への抗原抗体複合体の沈着による糸球体病変を呈し、タンパク尿が観察される[56]。本試験の対照群において、タンパク尿の指標である UPro/UCre の上昇は、dsDNA 抗体価の上昇より遅れて、28 週齢以降に確認され (Fig. 11A)、AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の用量の投与群で有意なタンパク尿の抑制がみられた (Fig. 11C)。

血漿中の腎機能パラメータである、pCre および pBUN の上昇も、最終観察日において、AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の用量の投与群で、対照群と比較して抑制がみられた (Fig. 12A, 12B)。これらの結果から、AS2819899 は、0.5 mg/kg 以上の用量の投与群において、ループス腎炎の自然発症による腎機能の悪化を抑制しうることが示された。

MMF 投与群については、100 mg/kg 投与群において、対照群と比較し、タンパク尿 (Fig. 11B, 11C)、pCre および pBUN (Fig. 12A, 12B)の抑制がみられ、腎機能

の悪化の抑制効果が示された。一方で、25 mg/kg では、そのような作用は確認されなかった (Fig. 11B, 11C, 12A, 12B)。

3.1.3 腎臓の病理組織学的検討

ループス腎炎では、抗原抗体複合体の糸球体への沈着が特徴的な病変であり、臨床診断においても、バイオプシーサンプルを用いた病理検査で、糸球体病変を評価し、診断の基準として用いる。糸球体硬化は、比較的進行したループス腎炎で見られる所見である[57]。本試験において、糸球体の硬化について観察し、スコアリングを実施した。典型的な病理像について、Fig. 13 に示した。

本試験の最終観察日における腎臓の病理学的解析において、対照群では 7/10 例で糸球体硬化が確認された (Fig. 14)。糸球体硬化指数は、AS2819899 の 0.5 mg/kg 投与群で低下傾向にあり、1 および 5 mg/kg では統計学的に有意な低下がみられた (Fig. 14)。この結果により、AS2819899 の投与により、組織学的にも腎病変が改善していることが確認された。MMF 投与群では、100 mg/kg 投与群で糸球体硬化指数の低下がみられたが、25 mg/kg 投与群ではそのような作用は確認されなかった (Fig. 14)。

以上のことから、タンパク尿および血液中腎機能パラメータの改善がみられた群において、実際に腎臓の組織においても、ループス腎炎の自然発症による組織変化が改善されていることが確認された。

3.1.4 生存率

NZB/W F1 マウスでは、腎不全のため、10~12 ヶ月齢で死亡が認められる[49]。本試験においては、動物倫理の観点から、血液中の腎機能パラメータである pBUN を経時的に測定し、pBUN > 140 mg/dl となるマウスについて腎不全と判断し、安楽死を実施した。生存率の算出には、安楽死動物も含め解析した。

対照群においては 32 週齢から、安楽死の基準を満たす動物が認められ、40 週齢までに、半数の動物 (5/10 例) が死亡した (Fig. 15A)。一方で、AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の投与群においては 40 週齢の最終観察日までに、安楽死基準に達した動物は認められなかった (Fig. 15A)。この結果から、AS2819899 の投与により、腎機能の悪化が抑制され、生存率が改善されたことが示された。

MMF 投与群では、25 mg/kg で、40 週齢までに半数 (5/10 例) の動物が安楽死基準に達し、対照群と比較して生存率の改善は認められなかった (Fig. 15B)。一方で、100 mg/kg 投与群では、40 週齢までに安楽死基準に到達した動物はいなかった (Fig. 15B)。

3.1.5 脾臓細胞の FACS 解析

3.1.1 で示された抗 dsDNA 抗体価の抑制は、第 1 章において確認された AS2819899 による B 細胞の活性化抑制作用に起因すると考え、40 週齢における

脾臓 B 細胞を FACS にて解析した。

B 細胞は、T 細胞依存的な抗原刺激により、分化、増殖し、高親和性の IgG 抗体を産生する形質細胞へと分化する。この過程は、脾臓やリンパ節等の 2 次リンパ組織に形成される胚中心 (Germinal Center; GC) で行われる。B 細胞が最初に産生する抗体の定常領域は IgM であるが、ヘルパー T 細胞からの刺激を受けて、IgG へと変換する (クラススイッチ; Class switch)。

本試験においては、脾臓におけるクラススイッチ B 細胞 (IgG 型 BCR を発現する B 細胞) および GC B 細胞の数について、測定した。

クラススイッチ B 細胞は、AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の用量の投与群において対照群と比較して、統計学的に有意な減少が見られた (Fig. 16A)。一方で MMF 投与群においては、減少傾向にはあるものの 100 mg/kg では統計学的に有意な減少は確認できなかった (Fig. 16A)。

GC B 細胞数は、AS2819899 の 0.25 mg/kg 以上の用量の投与群で、対照群と比較して統計学的に有意な減少がみられた (Fig. 16B)。MMF の 100 mg/kg 投与群においても、対照群と比較して有意な減少が確認された (Fig. 16B)。

以上の結果から、AS2819899 は脾臓において、GC B 細胞およびクラススイッチ B 細胞を減少させることが明らかとなった。一方で MMF は GC B 細胞は減少させたものの、クラススイッチ B 細胞については統計学的に有意な抑制は確認できなかった。この結果は、3.1.1 において、AS2819899 は dsDNA 抗体価を抑制し

たが、MMF は抑制していないことの理由の一つであると考えられた。

MMF は B 細胞および T 細胞の増殖を抑制する化合物であり、T-B 相互作用が抑制されたため、GC の形成が阻害され、GC B 細胞が減少した。一方、AS2819899 では、T 細胞および B 細胞の増殖抑制作用に加え、MHC class II 発現についても抑制することで、MMF と比較して強く B 細胞の活性化が抑制され、クラススイッチ B 細胞への分化が抑制されたものと考えられた。

3.1.6 血漿中サイトカイン濃度

ループス腎炎の病態では、病態の悪化に伴い、血漿中サイトカインの変動が見られることが知られている。IL-10 および IL-12 (p40) は、ループス腎炎の疾患活動性が高い患者において、上昇がみられる[58]。末梢血における、これらのサイトカインを測定した。AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の投与群と MMF の 100 mg/kg 投与群において、対照群と比較し、IL-10 および IL-12 (p40) の濃度が低下していた (Fig. 17A, 17B)。これらの結果は、AS2819899 および MMF による腎機能の改善と関連するものと考えられた。

3.1.7 体重および臓器重量

40 週齢における生存動物について、体重、脾臓重量、腎重量 (右腎臓) を測定した。AS2819899 および MMF の全ての投与群において、体重の著しい減少はみられな

かった (Fig. 18A)。

脾臓重量については、AS2819899 の1および 5 mg/kg 投与群、MMF の 100 mg/kg 群で減少傾向が確認されたが (Fig. 18B)、この変化は、主効果 (リンパ球増殖抑制作用) に起因する変化であると考えられた。

腎重量は全ての投与量で著しい増加または、減少はみられなかった (Fig. 18C)。

3.1.8 血球パラメータ解析

解剖時の末梢血について、リンパ球数、B 細胞数、ヘモグロビン量および血小板数を測定した。

AS2819899 の 5 mg/kg 投与群において、リンパ球数と B 細胞数の減少が認められた (Fig. 19A, 19B)。この変化は、脾臓重量と同様に、AS2819899 のリンパ球増殖抑制作用に起因すると考えられた。

ヘモグロビン量について、対照群において、低下した個体がみられたが、AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の用量の投与群、および MMF の 100 mg/kg 群において、そのような個体は確認されなかった (Fig. 19C)。NZB/W F1 マウスでは加齢に伴い貧血が認められるが、これは自己免疫性溶血性貧血による変化ではなく、尿毒症による変化であるとされている[59]。本試験における、ヘモグロビン量の改善も、AS2819899 および MMF の投与により、対照群と比較して腎機能の悪化が抑制されたことにより貧血が抑制されたものと考えられた。

血小板数についても、対照群において、減少が確認された個体が散見された (Fig. 19D)。一方で AS2819899 投与群の 1 mg/kg 以上の高用量および MMF の 100 mg/kg 群ではそのような個体は認められなかった (Fig. 19D)。MRL/lpr マウスや、他 SLE モデルマウスである (NZB×BXS) F1 マウスでは、抗カルジオリピン抗体や抗血小板抗体等の血小板に結合する抗体価の上昇が報告されているが [60, 61]、NZB/W F1 マウスではそのような報告はない。本試験の対照群における血小板の低下は、腎機能悪化による末梢での血小板の消費に起因するのではないかと推察され、腎機能の悪化が抑制された投与群において、血小板減少も抑制されたものと考えられた。

一方で、AS2819899 の 1 および 5 mg において、ヘモグロビン量や血小板数に低下はみられなかった (Fig. 19D)。この結果から、AS2819899 投与による血球系細胞に対する顕著な毒性がないことが示唆された。

3.2 ヒト臨床応用に向けた PI3K δ 選択的阻害剤の PD 系の確立

さらに、これらループス腎炎に関する結果をヒト臨床試験へと繋げるため、PD マーカーを探索した。第 1 章において AS2819899 は *in vitro* において B 細胞の抗 IgM 刺激による、MHC class II 発現を抑制した。本章においては、この指標を *in vivo* 試験において PD マーカーとして使用できるのではないかと考え、化合物の血漿中濃度との相関も含め検証した。AS2819899 を 0.5、2、5 mg/kg で経口投与し、各採血ポイントで採血し、抗 IgM 抗体で刺激し、血中濃度と B 細胞の MHC

class II 発現を測定した。

溶媒対照群の動物について、MHC class II 発現に経時的变化は確認されなかった。

化合物の血漿中濃度は、5 mg/kg 投与群、2 mg/kg 投与群、0.5 mg/kg 群の投与量の順に高かった (Fig. 20A)。血漿中濃度は、全ての投与群において投与後 0.5 時間が最も高く、その後減少していった (Fig. 20A)。AS2819899 の投与によって、抗 IgM 刺激による B 細胞の MHC class II 発現は阻害され、阻害の強さは 5 mg/kg 投与群、2 mg/kg 投与群、0.5 mg/kg 群の順であった (Fig. 20B)。また各投与量で、阻害活性が最も強かったのは、投与後 0.5 時間であり、その後経時的に減弱していった (Fig. 20B)。AS2819899 の血漿中濃度と B 細胞の抗 IgM 刺激 MHC class II 発現には相関が見られ、ピアソンの相関係数は 0.7892 であった (Fig. 20C)。本実験結果から AS2819899 を投与した動物の血液において、化合物の血中濃度と相関する B 細胞の MHC class II 発現阻害が確認された。

以上の結果から、末梢血における B 細胞の MHC Class II 発現は、PD マーカーとなりえることが示された。

4 考察

NZB/W F1 マウスはヒト SLE に類似した病態を自然発症するマウスである。約 20 週齢で抗 dsDNA 抗体価の上昇がみられ、5~6 ヶ月齢において抗原抗体複合体の糸球体への沈着によって腎炎を発症し、腎不全のため 10~12 ヶ月齢で死亡する[49]。腎炎の発症に先立って、dsDNA 抗体価の上昇がみられることから、本モデルにおける腎炎は、dsDNA 抗体の産生に起因することが示唆される。自然発症モデルであるため、評価期間は長いが、SLE の標準治療法であるプレドニゾンと MMF の併用投与が有効性を示すことから、ヒト臨床予測性の高いモデルであると考えられる[56]。本試験において、抗 dsDNA 抗体価を 19 週齢以降測定したが、対照群において、24 週齢以降の観察日で 19 週齢と比較し、抗 dsDNA 抗体価の上昇が見られた (Fig. 10A)。タンパク尿の指標である UPro/UCre の値は 28 週齢以降で上昇が見られた (Fig. 11A)。また、最終観察日において、血液の腎機能パラメータである pCre および pBUN の上昇も確認された (Fig. 12A, 12B)。40 週齢に達する前に、pBUN が安楽死の基準値 (>140 mg/dl) を超えたため、対照群 10 匹のうち 5 匹を安楽死した (Fig. 15)。これら病態の発症について結果は、これまでの NZB/W F1 マウスループス腎炎自然発症モデルの病態発症の報告と大きな相違はなかった[56]。

本試験において、AS2819899 は 0.5 mg/kg からタンパク尿を、1 mg/kg 以上では糸球体病変の悪化をそれぞれ抑制し、0.5 mg/kg 以上の投与群では生存率を改善

した。この結果から、AS2819899 が 0.5 mg/kg という低用量からループス腎炎の悪化を抑制したことが明らかとなった。一方で MMF は、臨床投与量と考えられる 25 mg/kg において、ループス腎炎を抑制せず、さらに高用量の 100 mg/kg でのみ抑制がみられた。抗体産生について、AS2819899 は 5 mg/kg 投与群で dsDNA 抗体価を抑制したが、MMF は 100 mg/kg まで投与しても dsDNA 抗体価を抑制せず、MMF の自己抗体に対する作用は AS2819899 と比較して弱いものと考えられた。AS2819899 の 5 mg/kg 投与群では、脾臓重量、末梢血のリンパ球数および B 細胞数の減少がみられており、抗体価の抑制には強いリンパ球増殖抑制作用が必要であることが示唆された。

MMF はループス腎炎の臨床での治療において、ステロイドや、他免疫抑制剤と併用されることの多い薬剤である。本試験で使用した、NZB/W F1 マウス自然発症ループス腎炎モデルにおいても、プレドニゾロン (1 mg/kg/day) と MMF (17 mg/kg/day) を併用投与した場合、腎機能の改善がみられる[56]。本試験の結果から、AS2819899 はループス腎炎の既存治療薬である MMF と作用機序が異なり、dsDNA 抗体価を抑制することで、単剤でより強い薬効を示すことが明らかとなった。

NZB/W F1 マウスの糸球体腎炎は抗原抗体複合体によって引き起こされるとされており[50]、本試験における AS2819899 の腎機能の改善は dsDNA 抗体の産生抑制に起因することが示唆された。一方で AS2819899 の 0.5 mg/kg 以上の投

与群ではタンパク尿が改善され、1 mg/kg 群では糸球体硬化指数が低下し、腎機能の悪化が抑制されているにもかかわらず、この投与量における dsDNA 抗体価は抑制されていなかった。また、MMF の 100 mg/kg においても、dsDNA 抗体価は抑制されなかったが、腎機能の悪化は抑制された。この結果から、本モデルにおけるループス腎炎の抑制は、単純に dsDNA 抗体価の抑制のみに依存していないことが考えられる。

マウスモデルにおける自己抗体の産生が抑制される用量と、腎機能の悪化が抑制される用量との乖離については、いくつか報告がある。Kahn らは、(NZW × BXSB) F1 ループス腎炎自然発症マウスモデルにおいて、BAFF 阻害剤を評価したところ、BAFF 阻害剤は、自己抗体の一つである抗 Sm/Ribonucleoprotein 抗体価を抑制しなかったにもかかわらず、腎機能を抑制したと報告している[62]。

この結果は、B 細胞の抗体産生以外の作用の抑制により、腎機能が改善したことを示しており、Kahn らは、脾臓 T 細胞の遊走を誘発するケモカインや炎症性サイトカイン産生などの B 細胞のエフェクター機能が BAFF 阻害剤により抑制されたことで、腎機能の悪化が改善されたのではないかと考察している。

PI3K δ 阻害剤を評価した報告についても、同様の報告がある。Haselmayer らは IFN- α 誘発のマウス SLE モデルにおいて、PI3K δ 選択的阻害剤 MSC2360844 は腎不全を抑制したが、dsDNA 抗体価を有意には抑制しなかったとしている[33]。また Winkler らは PI3K δ/γ 阻害剤である IPI-145 が自己抗体価を抑制した

用量よりも、より低用量にて腎機能の悪化を抑制したとしている[31]。彼らはこれらの乖離について、TCR や Toll-like レセプターシグナル等の BCR 以外の PI3K パスウェイの寄与があるのではないかと述べている[31, 33]。

SLE 患者において、GC の過剰活性化がみられることが報告されており、T 細胞と B 細胞の相互作用を阻害することは SLE の治療において、有効であると考えられる[63, 64]。濾胞ヘルパーT 細胞特異的に PI3K δ を欠損させることは、GC B 細胞を減少させ、抗体産生の抑制に繋がることが報告されている[65]。このことは、T 細胞における PI3K δ の作用が、GC の形成に重要な役割を果たしていることを示している。一方で、NZB/W F1 マウスにおいて、T 細胞活性化に重要な B7/CD28 と B 細胞活性化に重要な CD40/gp39 を両方抑制した場合は、B7/CD28 のみを抑制した場合よりも、強く病態の発症を抑制することが報告されている[66]。この結果は、T 細胞と B 細胞を両方抑制することが、NZB/W F1 マウスにおいて、より強い病態の抑制につながることを示唆していると考えられる。実際に、本試験においても、T 細胞と B 細胞の増殖を両方抑制する MMF は 100 mg/kg の投与群で腎機能の悪化を抑制した。第 1 章において AS2819899 は B 細胞の MHC class II 発現を強く抑制し、IC₅₀ は 4.3 nM であった。また同等の濃度で抗 IgM 刺激による B 細胞増殖抑制も我々は確認している。本モデルにおいても、AS28129899 は B 細胞の増殖、活性化を強く抑制し、その結果サイトカイン産生等を含む B 細胞のエフェクター機能が抑制され

たことで、dsDNA 抗体価が抑制されない投与量においても、腎機能の悪化を抑制したことが考えられた。さらに、AS2819899 は、T 細胞増殖を抑制することが第 1 章において示されており、B 細胞と T 細胞の両方が抑制されたことで、GC B 細胞およびクラススイッチ B 細胞が強く抑制され、より強力に腎機能の悪化を抑制した可能性が考えられた。この結果から、AS2819899 は強い B 細胞抑制作用に加え T 細胞抑制作用を併せ持つことで、Rituximab や Belimumab などの B 細胞のみを抑制する薬剤と比較し、単剤で、より強い薬効を発揮できることが示唆された。

本試験において、AS2819899 の投与により、体重、腎重量に影響はなく、血中ヘモグロビン量や血小板数の減少も見られなかった。この結果は AS2819899 投与による顕著な毒性がなかったことの一端を示していると考えた。

以上の結果から、AS2819899 は安全性と有効性のバランスのとれたループス腎炎の治療薬になると考えた。

前臨床試験において、PK/PD 解析を実施しておくことは、ヒト投与時の薬効のモニターを可能にし、臨床試験を効率的に安全に進めることにつながる[67]。本章において、AS2819899 を投与した動物から採血した血液を用いて、B 細胞の MHC class II 発現の抑制を確認できることが明らかとなった。

第 1 章で示した通り、AS2819899 は *in vitro* において、ヒト B 細胞においてもマウス B 細胞とほぼ同等の濃度で、抗 IgM 刺激 MHC class II 発現を抑制しており、

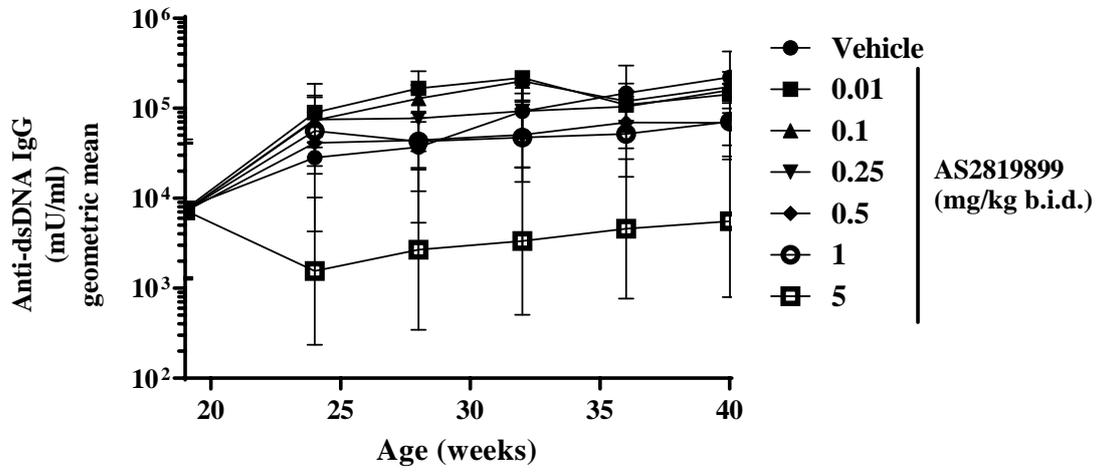
AS2819899 投与後に採血したヒト血液においても、同様の結果を得られることが示唆される。

これらの結果は、末梢血における B 細胞の MHC class II 発現が、臨床試験においても、PD マーカーになりえることを示しており、末梢血を用いて、化合物の薬効をモニターすることで、臨床試験の安全性と効率を上げることができると考えられた。

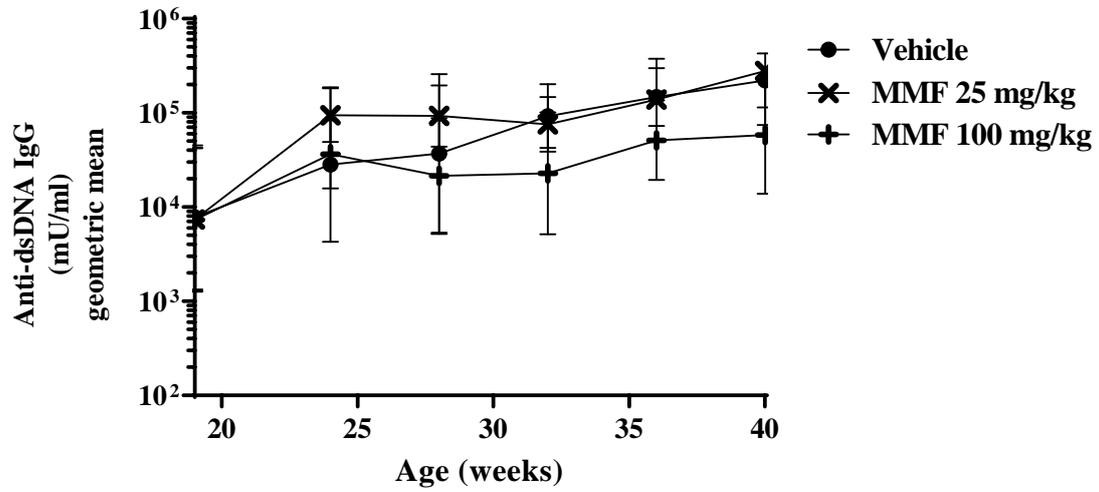
本章において、PI3K δ 選択的阻害剤である AS2819899 が、NZB/W F1 自然発症モデルにおいて有効性を示すことが示された。この結果から、PI3K δ 選択的阻害剤が、ループス腎炎に有効な SLE 治療薬となりえることが示唆された。

また、AS2819899 を投与した動物の血液を用い、末梢血 B 細胞の MHC class II 発現を測定することで、化合物の血中濃度依存的な発現抑制を測定できることを見出した。このことは、PD マーカーとして、末梢血の MHC class II 発現を測定することにより、化合物投与後の薬効をモニターできることを示しており、臨床試験の効率化、安全性の確保に繋がると考えられた。

(A)



(B)



(C)

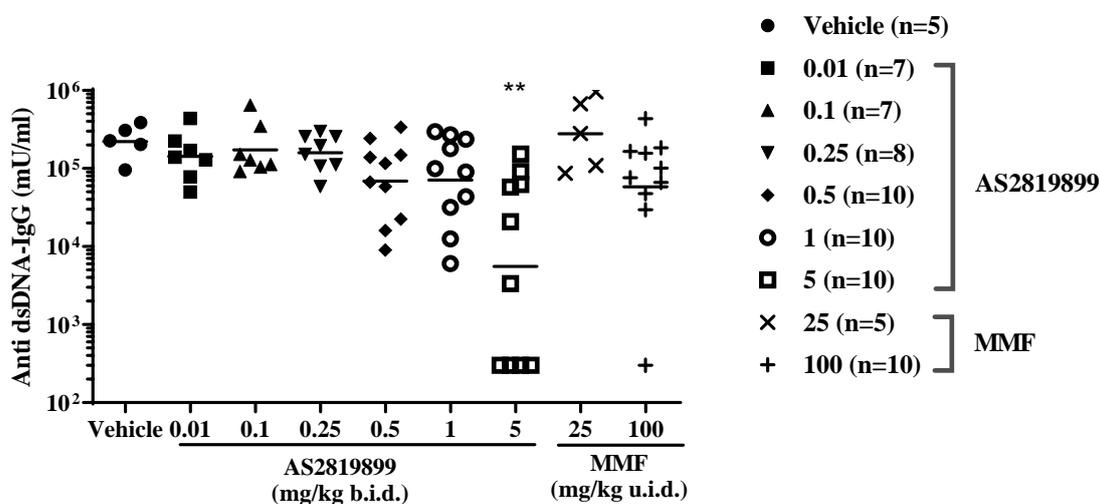


Fig. 10. Anti-dsDNA IgG titer

(A) Time course of the anti-dsDNA IgG titer of AS2819899 treated groups.

(B) Time course of the anti-dsDNA IgG titer of MMF treated groups.

Data are expressed as the geometric mean with 95% CI in each group (n=5-10).

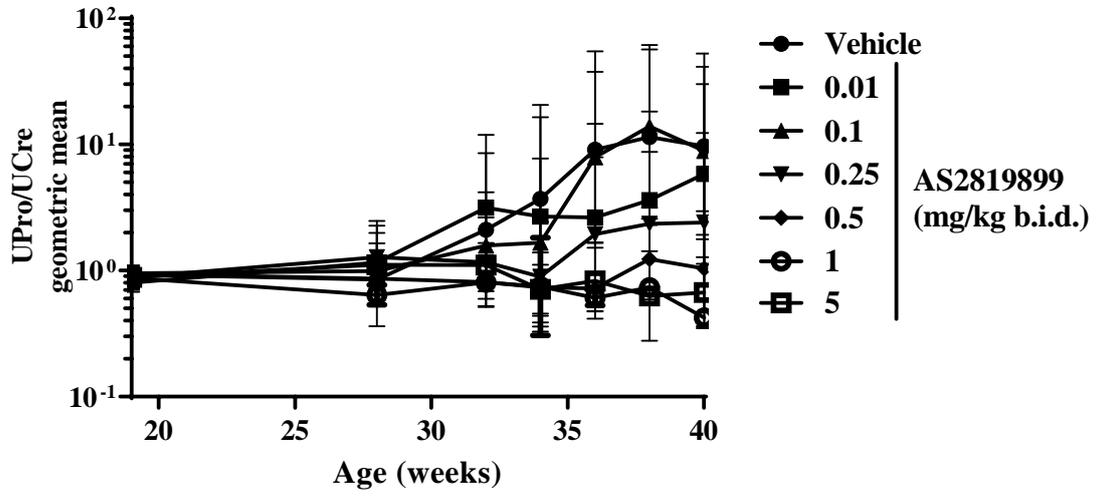
(C) Anti-dsDNA IgG titer at the 40-week endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=5-10, Survival animals only at the 40-week endpoint). Horizontal lines indicate geometric mean.

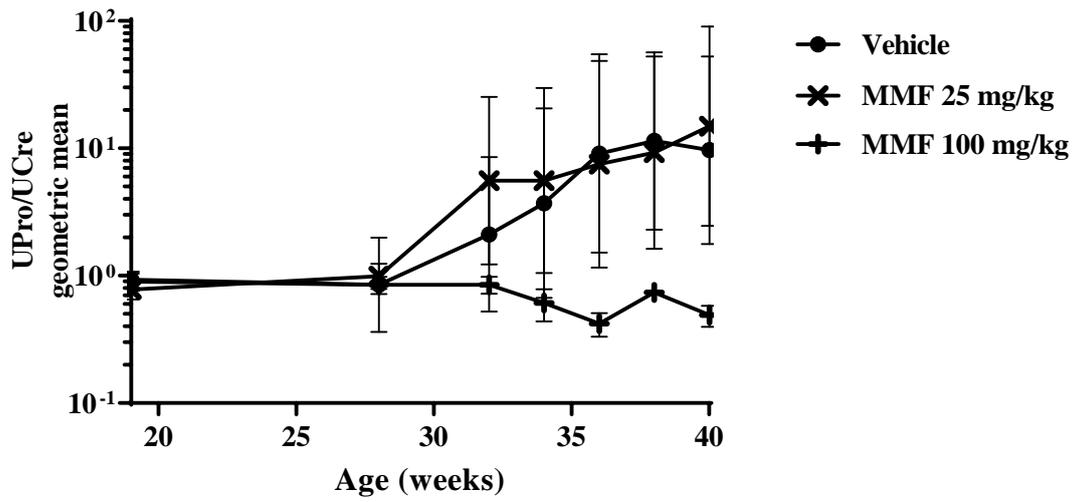
**P<0.01 show significant difference analyzed by logarithmic transformation data followed by Dunnett's multiple comparison test compared with the vehicle-treated group.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)



(C)

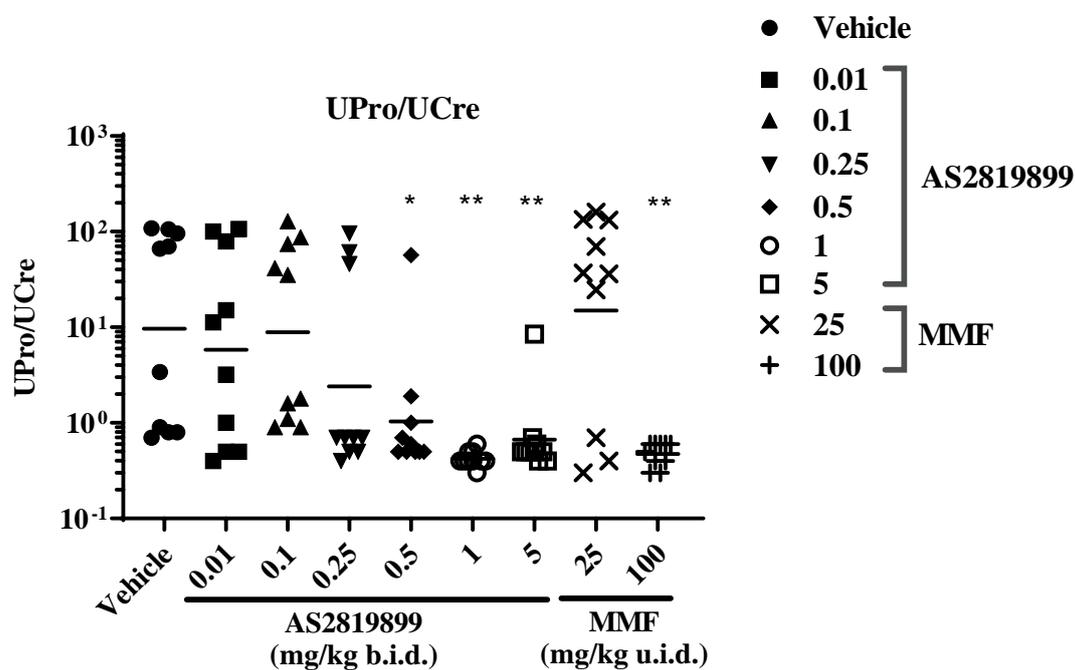


Fig. 11. Urinary protein (UPro) normalized to urinary creatinine (UCre)

(A) Time course of UPro normalized to UCre (UPro/UCre ratio) of AS2819899 treated groups.

Data are expressed as the geometric mean with 95% CI in each group (n=10).

(B) Time course of the UPro/UCre ratio of MMF treated groups.

Data are expressed as the geometric mean with 95% CI in each group (n=10).

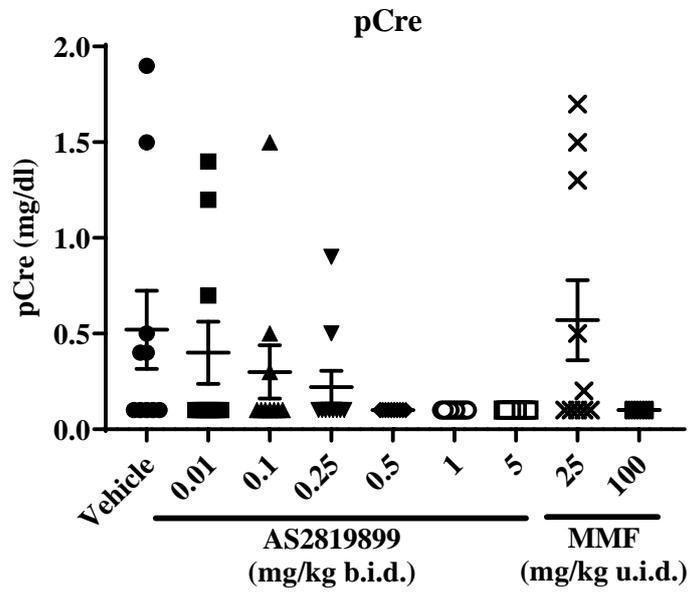
(C) The UPro/UCre ratio for each treatment group at the endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate the geometric mean.

*P<0.05, **P<0.01 show significant difference analyzed by logarithmic transformation data followed by Dunnett's multiple comparison test compared with the vehicle-treated group.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)

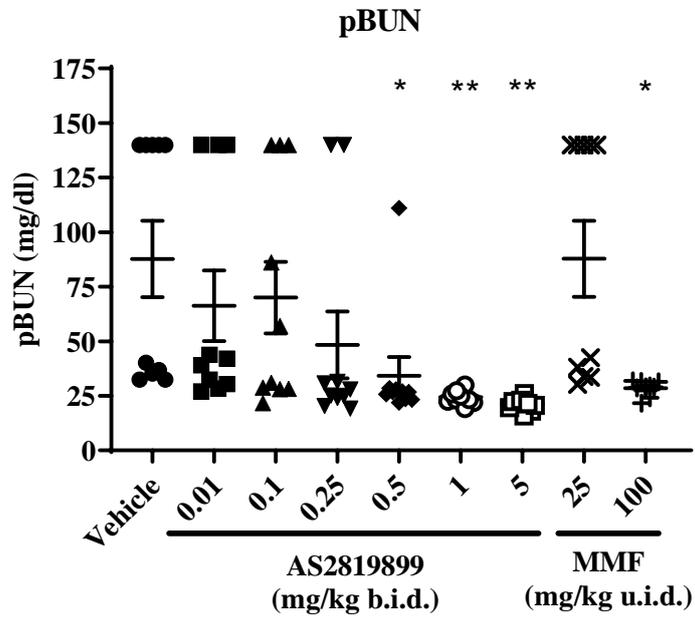


Fig. 12. Plasma renal parameters

(A) Plasma creatinine (pCre) concentration at the endpoint of the study.

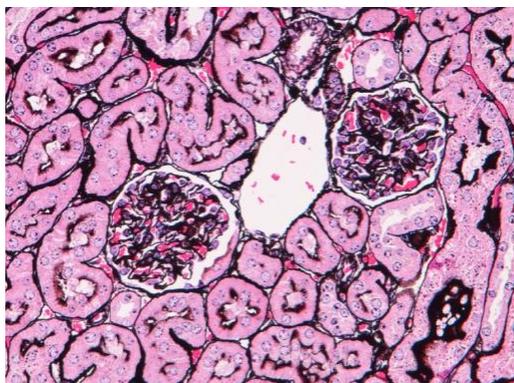
(B) Plasma blood urea nitrogen (pBUN) concentration at the endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

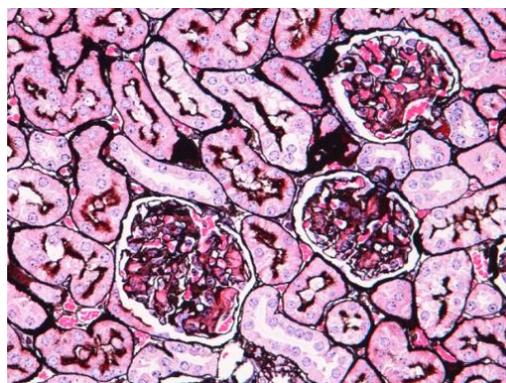
*P<0.05, **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Dunnett's multiple comparisons test.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

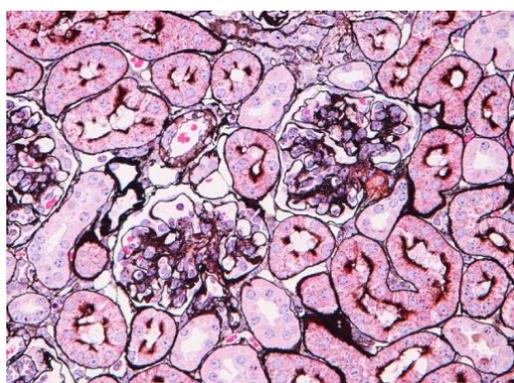
(A)



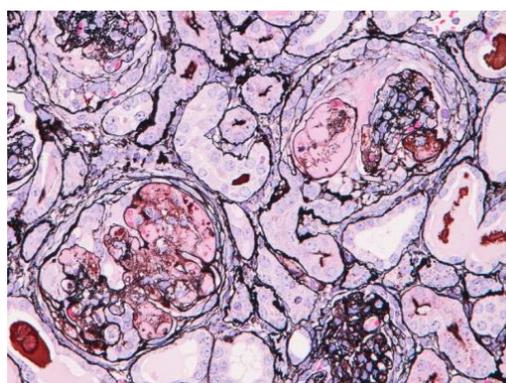
Score 0. AS2819899 1 mg/kg group



Score 2. AS2819899 0.5 mg/kg group

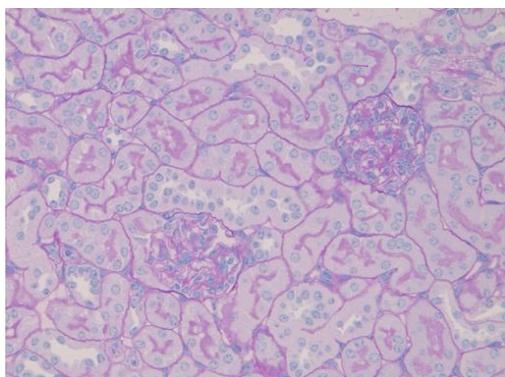


Score 3. AS2819899 0.1 mg/kg group

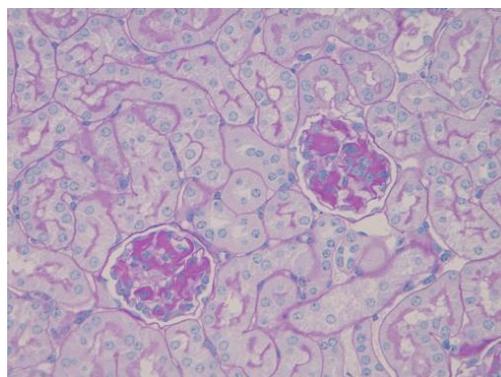


Score 4. MMF 25 mg/kg group

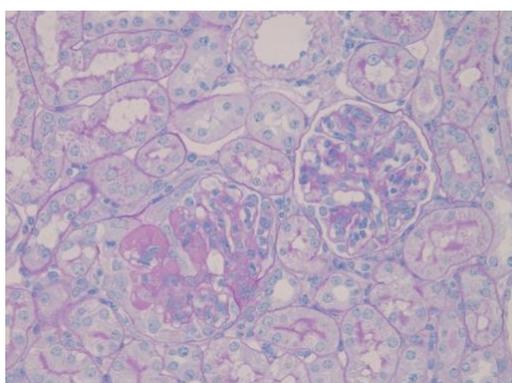
(B)



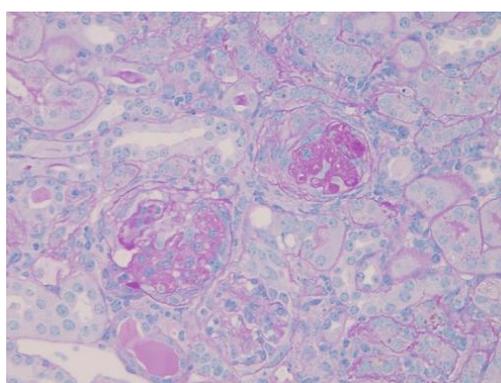
Score 0. AS2819899 1 mg/kg group



Score 2. AS2819899 0.5 mg/kg group



Score 3. AS2819899 0.1 mg/kg group



Score 4. Vehicle-treated group

Fig. 13. Typical microscope image of kidneys at the endpoint of the study

(A) Periodic Acid-Methenamine silver (PAM) staining, x 280.

(B) Periodic Acid Schiff (PAS) staining, x 280.

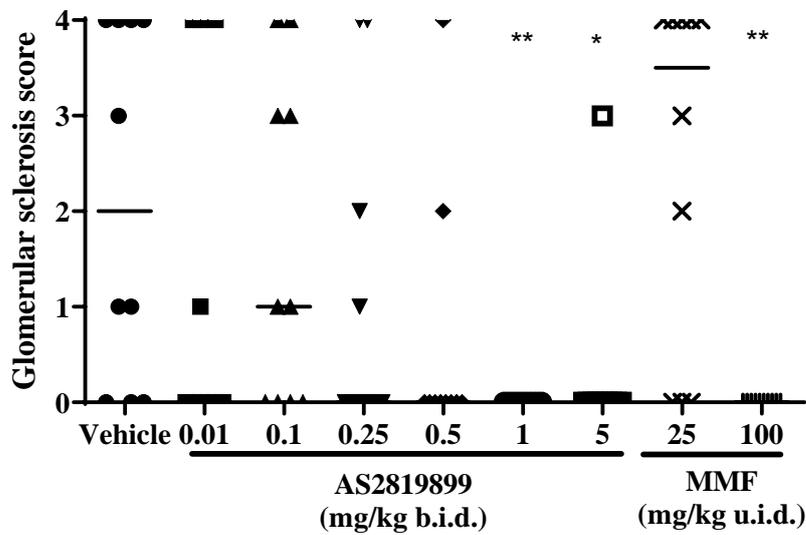


Fig. 14. Glomerular sclerosis score in the pathological kidney examination at the endpoint of the study

The glomerular sclerosis score was classified according to the following scale:

0, absent

1, segmental sclerosis in < 50% of glomeruli

2, segmental sclerosis in \geq 50% of glomeruli

3, global sclerosis in < 50% of glomeruli

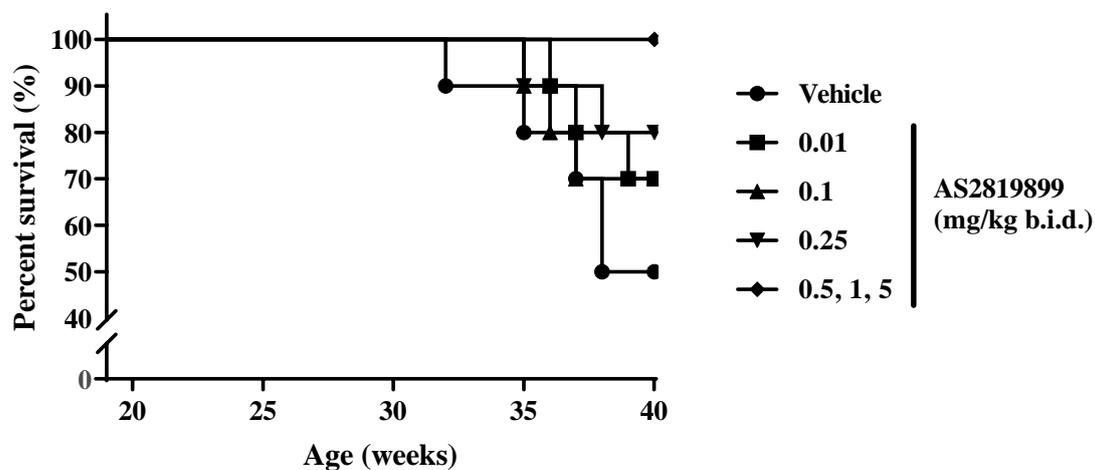
4, global sclerosis in \geq 50% of glomeruli

Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate median.

*P<0.05, **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Steel multiple comparison test.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)

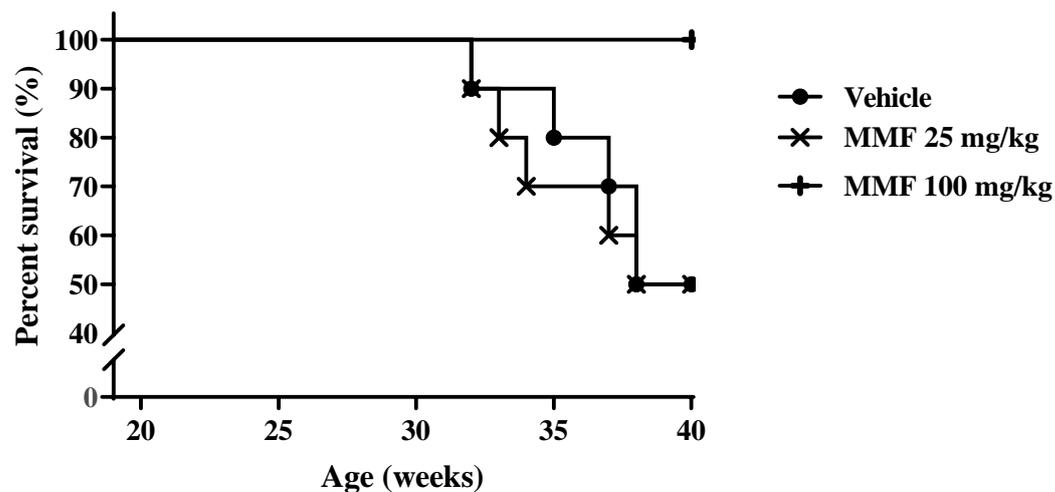


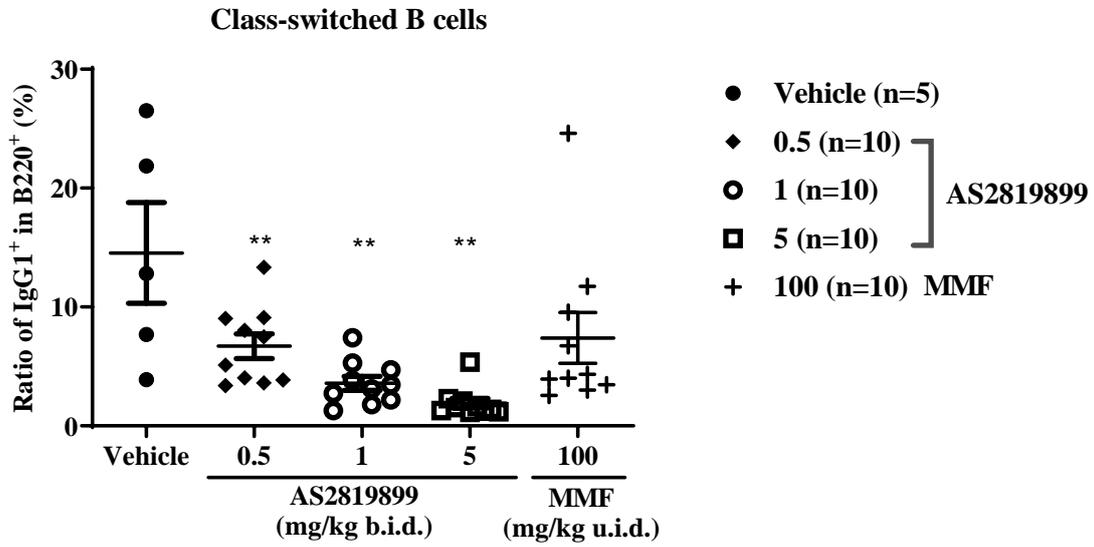
Fig. 15. Mouse survival rate (percent)

(A) Mouse survival rate (percent) of AS2819899 treated groups (n=10).

(B) Mouse survival rate (percent) of MMF treated groups (n=10).

b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)

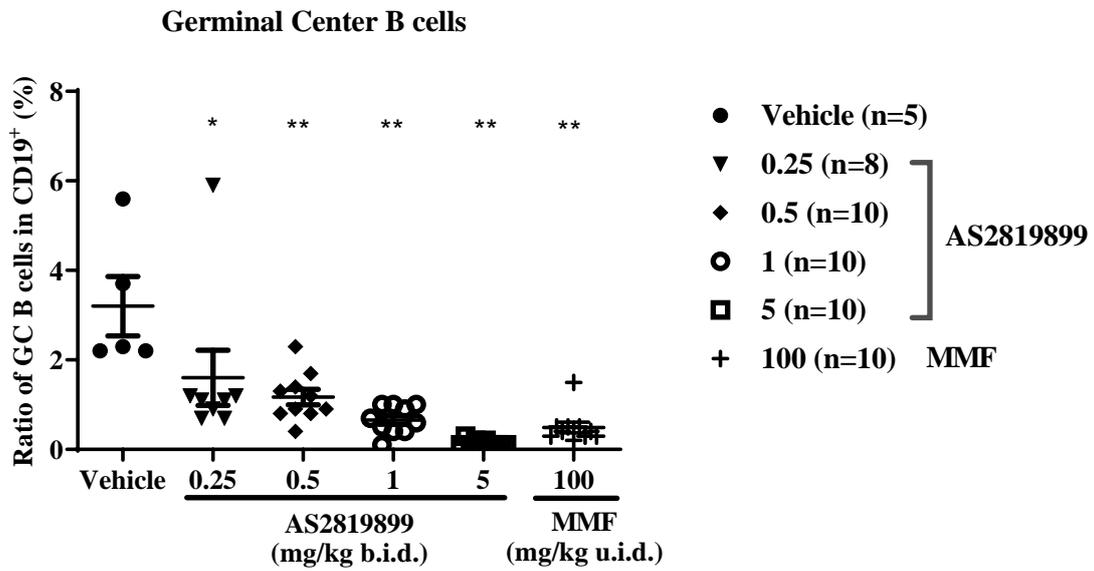


Fig. 16. FACS analysis of splenic B cells at the 40-week endpoint of the study

(A) Class-switched B cells in spleen.

Class-switched B cells were defined as IgG1⁺ in B220⁺.

(B) Germinal center B cells in spleen.

Germinal center B cells were defined as CD19⁺, CD38^{mid} and GL-7^{hi} splenic B cells.

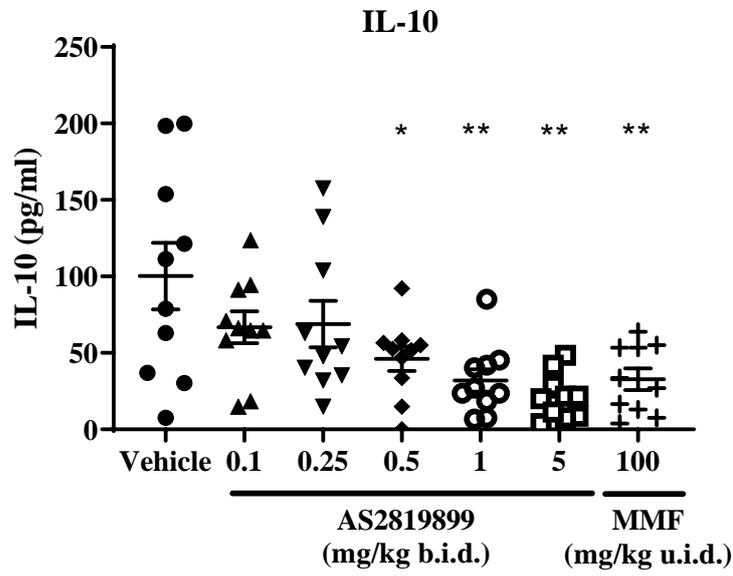
Each symbol indicates individual data (n=5-10. Survival animals only at the 40-week endpoint.). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

AS2819899 treated groups; *P<0.05, **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Dunnett's multiple comparisons test.

MMF treated group; **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Student's t-test.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)

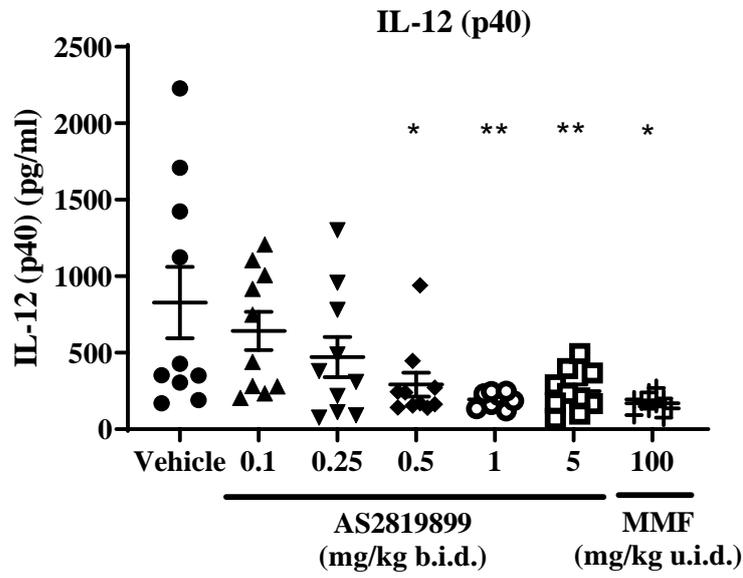


Fig. 17. Plasma cytokine levels at the endpoint of the study

(A) IL-10 levels in plasma.

(B) IL-12 (p40) levels in plasma.

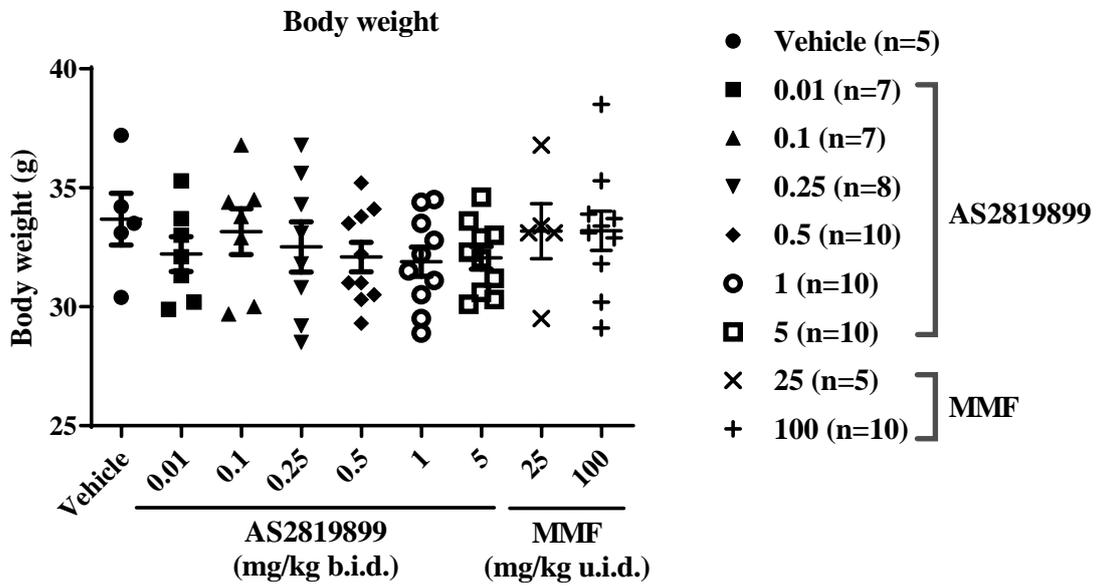
Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

AS2819899 treated groups; *P<0.05, **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Dunnett's multiple comparisons test.

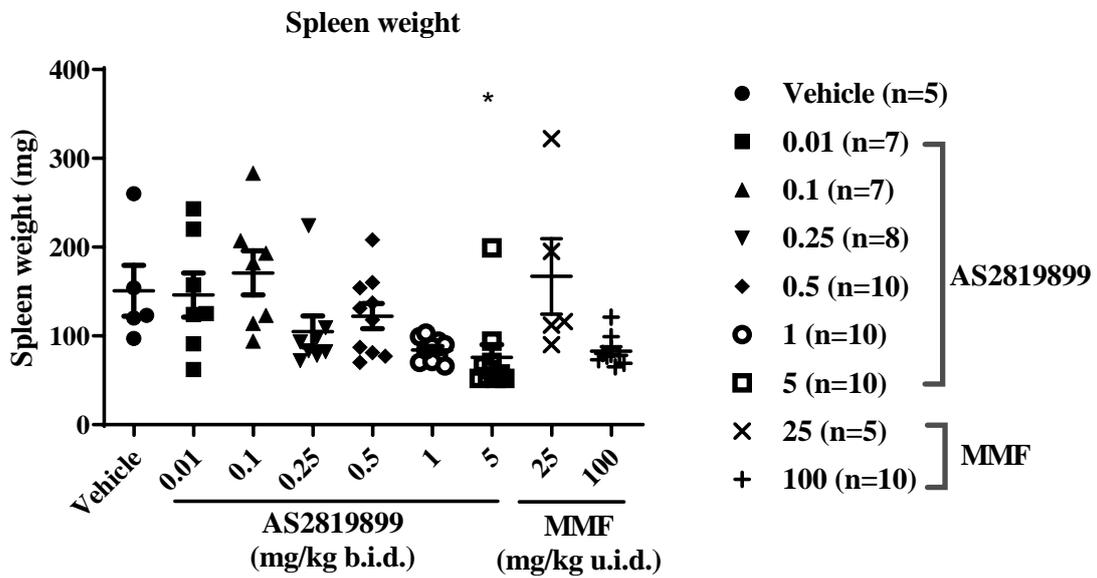
MMF treated group; *P<0.05, **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Student's t-test.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)



(C)

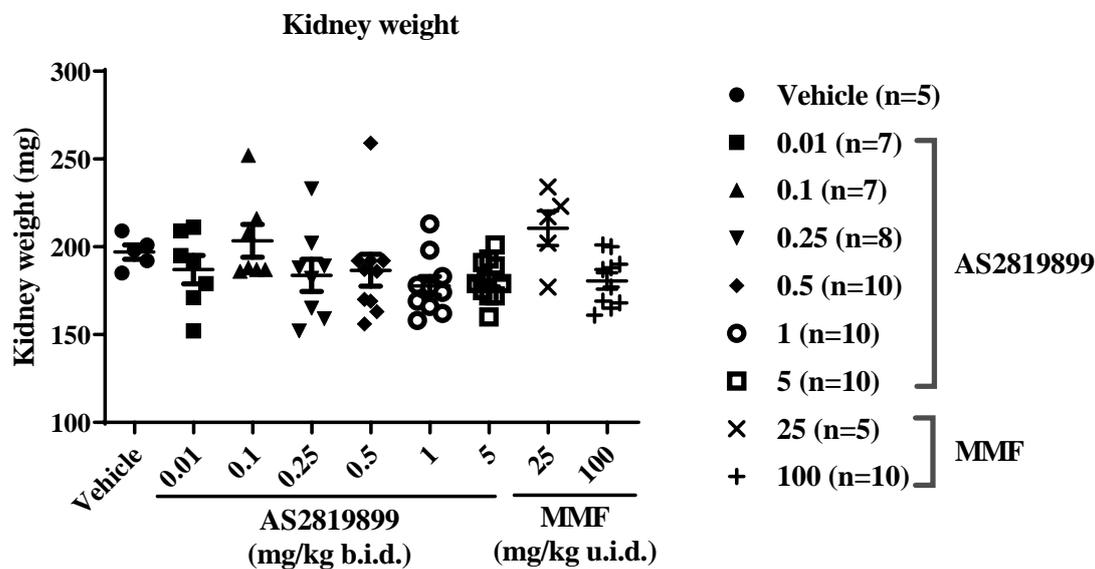


Fig. 18. Body weight and organ weight at the 40-week endpoint of the study

(A) Body weight.

(B) Spleen weight.

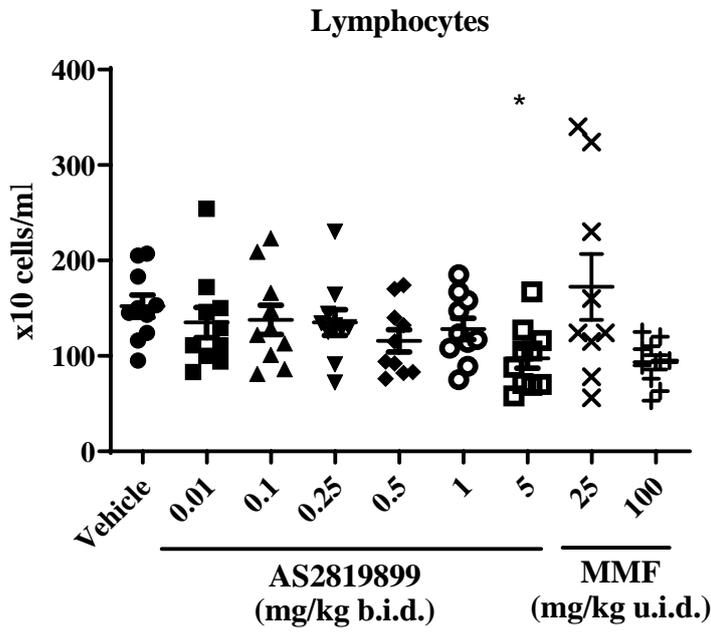
(C) Kidney weight (Right Kidney).

Each symbol indicates individual data (n=5-10. Survival animals only at the 40-week endpoint.). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

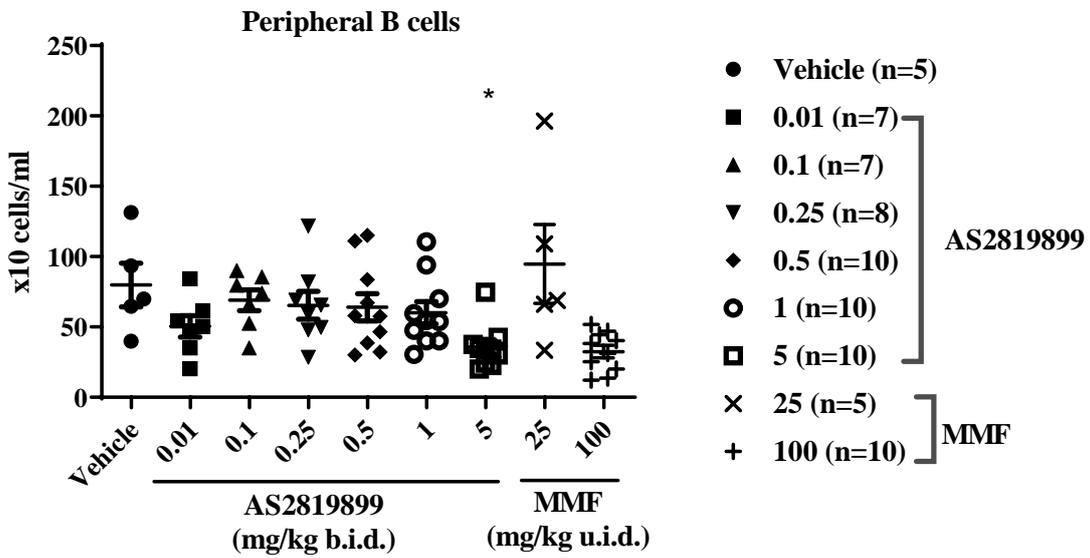
*P<0.05 compared with the vehicle-treated group using Dunnett's multiple comparisons test.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

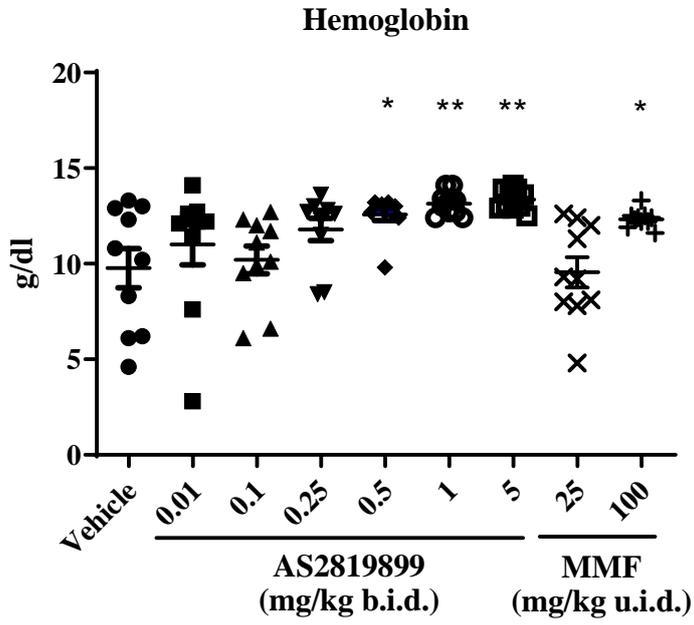
(A)



(B)



(C)



(D)

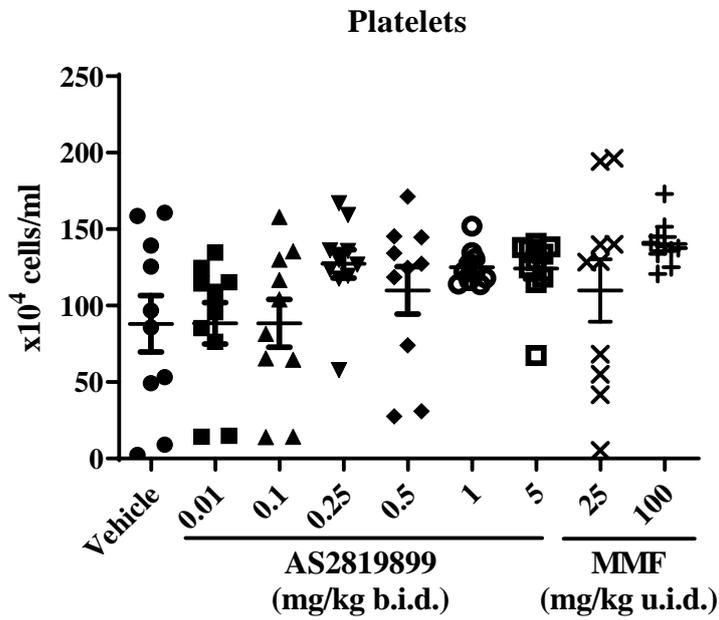


Fig. 19. Hematological analysis

(A) Peripheral blood lymphocytes at the endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

(B) Peripheral blood B cells at the 40-week endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=5-10. Survival animals only at the 40-week endpoint.). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

(C) Peripheral blood hemoglobin at the endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

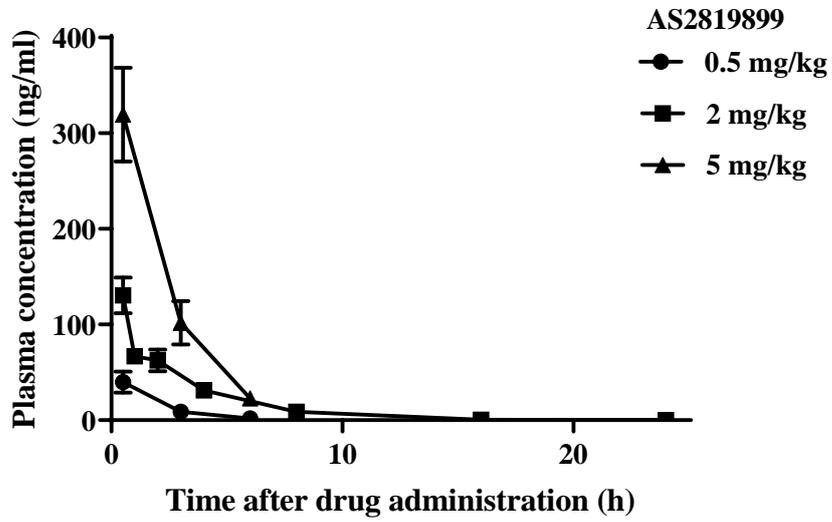
(D) Peripheral blood platelets at the endpoint of the study.

Each symbol indicates individual data (n=10). Horizontal lines indicate mean \pm S.E.M.

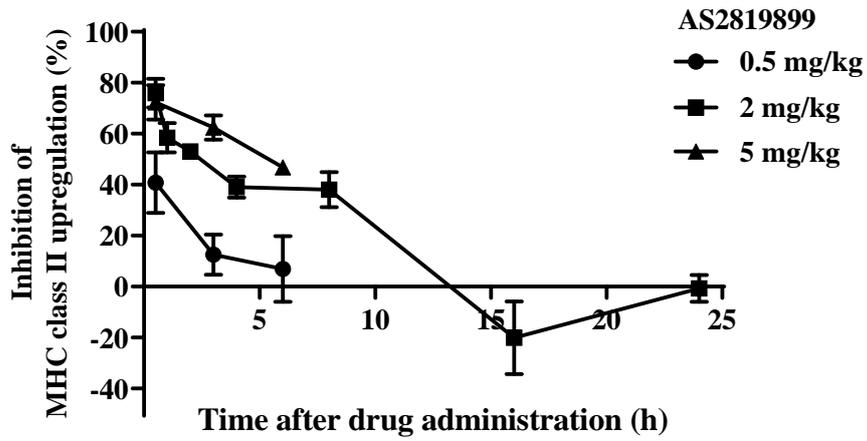
*P<0.05, **P<0.01 compared with the vehicle-treated group using Dunnett's multiple comparisons test.

u.i.d.; Once daily administration, b.i.d.; Twice daily administration

(A)



(B)



(C)

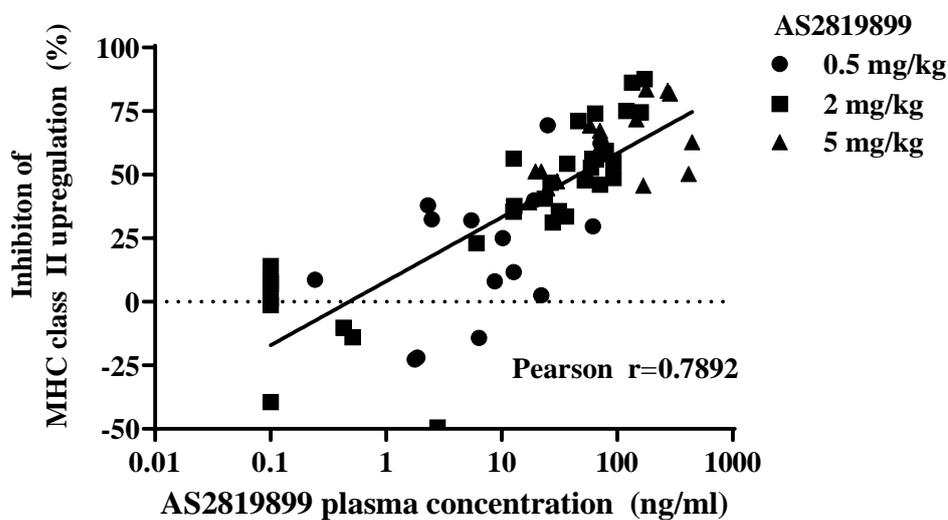


Fig. 20. AS2819899 suppression of the PD marker in mice and the PK/PD relationship

(A) Time course of the plasma AS2819899 concentration in NZB/W F1 mice after AS2819899 administration.

Data are expressed as mean \pm S.E.M. at each point (n=5).

(B) Time course of the inhibition rate of anti-IgM-induced MHC class II upregulation in NZB/W F1 mice after AS2819899 administration.

Data are expressed as mean \pm S.E.M. at each point (n=4-5).

(C) Relationship between the inhibition rate of MHC class II upregulation and the plasma concentration in AS2819899-treated mice.

Pearson correlation coefficient (r) was calculated (p<0.01).

総括および結論

本研究では、PI3K δ 阻害剤の SLE 治療薬としての可能性を明らかにする目的で、*in vitro* における T 細胞および B 細胞に対する作用、*in vivo* 抗体産生モデル、マウスループス腎炎モデルを用いた評価を実施した。

第 1 章では、評価に使用した PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 について、キナーゼアッセイによる酵素阻害作用、T 細胞および B 細胞に対する作用について検討した。PI3K 各アイソフォームに対するキナーゼアッセイの結果から、AS2819899 は、PI3K δ を選択的に抑制する化合物であることが示された。また、AS2819899 は T 細胞の抗 CD3/CD28 刺激に対する増殖および、B 細胞の抗 IgM 刺激に対する MHC class II 発現を抑制することが示された。

第 2 章では、PI3K δ 選択的阻害剤の抗体産生への作用を明らかにする目的で、マウスを用いた T 細胞非依存的および T 細胞依存的な抗原刺激による 2 つの抗体産生モデルにおいて、AS2819899 を評価した。

AS2819899 は、T 細胞非依存的抗原による抗体産生を抑制した。さらに、AS2819899 は T 細胞依存的抗原によるリコール応答の抗体産生についても抑制したことから、PI3K δ 選択的阻害剤は、SLE 治療において、病態の再発の抑制作用を示す可能性が示唆された。

第3章では、PI3K δ 選択的阻害剤のSLEにおけるループス腎炎に対する有効性を検証する目的で、NZB/W F1 マウスを用いた自然発症ループス腎炎モデルにおいてAS2819899を評価した。

AS2819899は、タンパク尿を抑制し、腎臓の病理組織解析においても糸球体硬化スコアを改善し、ループス腎炎の自然発症による腎機能の悪化を抑制した。また、生存率も改善した。この結果から、PI3K δ 選択的阻害剤がループス腎炎に有効性を示し、生存率を改善できることが示唆された。加えてAS2819899は、脾臓におけるクラススイッチB細胞およびGC B細胞を減少させ、自己抗体であるdsDNA抗体価を抑制した。この結果から、PI3K δ 選択的阻害剤が、B細胞を強く抑制し、抗体産生を抑制することで腎機能の悪化を抑制したことが示唆された。一方でAS2819899の投与による腎機能の改善は、抗体産生を抑制する用量より低用量で見られることが明らかとなり、PI3K δ 選択的阻害剤は、抗体産生抑制だけでなく、サイトカイン産生などのB細胞のエフェクター機能、T細胞の増殖などを併せて抑制することで、ループス腎炎に有効性を示していることが示唆された。

さらに、AS2819899投与により、血球パラメータおよび体重など一般状態に変化は認められず、本試験内においてAS2819899投与に関連する安全性の懸念は

認められなかった。これらの結果から、PI3K δ 阻害剤が安全性と有効性のバランスのとれた SLE の治療オプションになりえると考えられた。

加えて AS2819899 を投与したマウスの血液を用いて、AS2819899 の血中濃度と
相関する、末梢血 B 細胞の MHC class II 発現の抑制を確認することができた。

この結果から、B 細胞の MHC class II 発現を、PI3K δ 阻害剤の臨床試験の PD
マーカーとして使用できる可能性が示された。この PD マーカーを用いて、薬
効を経時的モニターすることは、臨床試験をより効率的に安全に実施すること
に繋がると考えられた。

本研究を総括すると、PI3K δ 選択的阻害剤が、T 細胞、B 細胞の増殖および活性
化を抑制し、リコール応答も含め抗体産生を抑制することが示された。また、
SLE の主症状であるループス腎炎を発症するマウスモデルにおいて、ループス
腎炎を抑制した。その際に、体重、血液パラメータ等について、PI3K δ 選択的
阻害剤投与による顕著な変化はみられず、安全性の懸念は少ないものと推察さ
れた。本試験の結果から、PI3K δ 選択的阻害剤は副作用の懸念が少なく、再発
予防も含めた SLE 治療薬候補となりえることが示された。

出典

本論文の一部は以下に公表した。

[68] Y. Kaneko, H. Fukahori, K. Yamagami, T. Kawashima, M. Ito, M. Akamatsu, T. Marui, K. Kato, F. Takahashi, T. Morokata, Effects of AS2819899, a novel selective PI3K δ inhibitor, in a NZB/W F1 mouse lupus-like nephritis model, *International immunopharmacology* 87 (2020) 106764.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106764>

謝辞

本研究の論文の作成に際し、多大なご指導とご助言を賜りました

麻布大学獣医学部 分子生物学研究室 村上 賢教授、

麻布大学獣医学部 基礎教育研究室 (生物学) 佐原 弘益教授、

麻布大学獣医学部 生理学第二研究室 折戸 謙介教授

に深く謝辞を表します。

最後に、本研究を実施するにあたり多大なるご協力を頂きましたアステラス製

薬株式会社の上司、同僚に深く感謝申し上げます。

引用文献

- [1] A. Fava, M. Petri, Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management, *Journal of autoimmunity* 96 (2019) 1-13.
- [2] K.H. Costenbader, A. Desai, G.S. Alarcon, L.T. Hiraki, T. Shaykevich, M.A. Brookhart, E. Massarotti, B. Lu, D.H. Solomon, W.C. Winkelmayr, Trends in the incidence, demographics, and outcomes of end-stage renal disease due to lupus nephritis in the US from 1995 to 2006, *Arthritis and rheumatism* 63(6) (2011) 1681-8.
- [3] R. Marone, V. Cmiljanovic, B. Giese, M.P. Wymann, Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy, *Biochimica et biophysica acta* 1784(1) (2008) 159-85.
- [4] A.A. Justiz Vaillant, A. Goyal, P. Bansal, M. Varacallo, *Systemic Lupus Erythematosus*, StatPearls, StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2021.
- [5] J. Golbus, W.J. McCune, Lupus nephritis. Classification, prognosis, immunopathogenesis, and treatment, *Rheumatic diseases clinics of North America* 20(1) (1994) 213-42.
- [6] F.A. Houssiau, C. Vasconcelos, D. D'Cruz, G.D. Sebastiani, R. Garrido Ed Ede, M.G. Danieli, D. Abramovicz, D. Blockmans, A. Mathieu, H. Direskeneli, M. Galeazzi, A. Gul, Y. Levy, P. Petera, R. Popovic, R. Petrovic, R.A. Sinico, R. Cattaneo, J. Font, G. Depresseux, J.P. Cosyns, R. Cervera, Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide, *Arthritis and rheumatism* 46(8) (2002) 2121-31.
- [7] M. Mosca, C. Tani, L. Carli, S. Bombardieri, Glucocorticoids in systemic lupus erythematosus, *Clinical and experimental rheumatology* 29(5 Suppl 68) (2011) S126-9.
- [8] C. Diaz-Lagares, S. Croca, S. Sangle, E.M. Vital, F. Catapano, A. Martinez-Berriotxo, F. Garcia-Hernandez, J.L. Callejas-Rubio, J. Rascon, D. D'Cruz, D. Jayne, G. Ruiz-

Irastorza, P. Emery, D. Isenberg, M. Ramos-Casals, M.A. Khamashta, Efficacy of rituximab in 164 patients with biopsy-proven lupus nephritis: pooled data from European cohorts, *Autoimmunity reviews* 11(5) (2012) 357-64.

[9] T.Y. Lu, K.P. Ng, G. Cambridge, M.J. Leandro, J.C. Edwards, M. Ehrenstein, D.A. Isenberg, A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at University College London Hospital: the first fifty patients, *Arthritis and rheumatism* 61(4) (2009) 482-7.

[10] R.J. Looney, J. Anolik, I. Sanz, A perspective on B-cell-targeting therapy for SLE, *Modern rheumatology* 20(1) (2010) 1-10.

[11] M.A. Dooley, F. Houssiau, C. Aranow, D.P. D'Cruz, A. Askanase, D.A. Roth, Z.J. Zhong, S. Cooper, W.W. Freimuth, E.M. Ginzler, Effect of belimumab treatment on renal outcomes: results from the phase 3 belimumab clinical trials in patients with SLE, *Lupus* 22(1) (2013) 63-72.

[12] R. Furie, M. Petri, O. Zamani, R. Cervera, D.J. Wallace, D. Tegzova, J. Sanchez-Guerrero, A. Schwarting, J.T. Merrill, W.W. Chatham, W. Stohl, E.M. Ginzler, D.R. Hough, Z.J. Zhong, W. Freimuth, R.F. van Vollenhoven, A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis and rheumatism* 63(12) (2011) 3918-30.

[13] S.V. Navarra, R.M. Guzman, A.E. Gallacher, S. Hall, R.A. Levy, R.E. Jimenez, E.K. Li, M. Thomas, H.Y. Kim, M.G. Leon, C. Tanasescu, E. Nasonov, J.L. Lan, L. Pineda, Z.J. Zhong, W. Freimuth, M.A. Petri, Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet (London, England)* 377(9767) (2011) 721-31.

[14] D.J. Wallace, W. Stohl, R.A. Furie, J.R. Lisse, J.D. McKay, J.T. Merrill, M.A. Petri,

E.M. Ginzler, W.W. Chatham, W.J. McCune, V. Fernandez, M.R. Chevrier, Z.J. Zhong, W.W. Freimuth, A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus, *Arthritis and rheumatism* 61(9) (2009) 1168-78.

[15] 直. 田村, リウマチ性疾患における PI3 キナーゼに関する最近の知見, *日本臨床免疫学会会誌* 35(1) (2012) 8-13.

[16] W. Zhao, Y. Qiu, D. Kong, Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy, *Acta pharmaceutica Sinica. B* 7(1) (2017) 27-37.

[17] Z.A. Knight, B. Gonzalez, M.E. Feldman, E.R. Zunder, D.D. Goldenberg, O. Williams, R. Loewith, D. Stokoe, A. Balla, B. Toth, T. Balla, W.A. Weiss, R.L. Williams, K.M. Shokat, A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling, *Cell* 125(4) (2006) 733-47.

[18] S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder, I. Goncalves, W.S. Nesbitt, C.L. Yap, C.E. Wright, V. Kenche, K.E. Anderson, S.M. Dopheide, Y. Yuan, S.A. Sturgeon, H. Prabakaran, P.E. Thompson, G.D. Smith, P.R. Shepherd, N. Daniele, S. Kulkarni, B. Abbott, D. Saylik, C. Jones, L. Lu, S. Giuliano, S.C. Hughan, J.A. Angus, A.D. Robertson, H.H. Salem, PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy, *Nature medicine* 11(5) (2005) 507-14.

[19] S. Koyasu, The role of PI3K in immune cells, *Nature immunology* 4(4) (2003) 313-9.

[20] S.T. Jou, N. Carpino, Y. Takahashi, R. Piekorz, J.R. Chao, N. Carpino, D. Wang, J.N. Ihle, Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex, *Molecular and cellular biology* 22(24) (2002) 8580-91.

[21] P.T. Hawkins, L.R. Stephens, PI3K signalling in inflammation, *Biochimica et*

biophysica acta 1851(6) (2015) 882-97.

[22] N. Tamura, K. Haruta, [Therapeutic potential of phosphoinositide 3-kinase inhibitors in rheumatoid arthritis], *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai kaishi = Japanese journal of clinical immunology* 30(5) (2007) 369-74.

[23] A. Hervieu, S. Kermorgant, The Role of PI3K in Met Driven Cancer: A Recap, *Frontiers in molecular biosciences* 5 (2018) 86.

[24] G. Powis, R. Bonjouklian, M.M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W.F. Matter, J. Dodge, G. Grindey, et al., Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, *Cancer research* 54(9) (1994) 2419-23.

[25] J. Yang, J. Nie, X. Ma, Y. Wei, Y. Peng, X. Wei, Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials, *Molecular cancer* 18(1) (2019) 26.

[26] S. Yaguchi, Y. Fukui, I. Koshimizu, H. Yoshimi, T. Matsuno, H. Gouda, S. Hirono, K. Yamazaki, T. Yamori, Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, *Journal of the National Cancer Institute* 98(8) (2006) 545-56.

[27] B.J. Lannutti, S.A. Meadows, S.E. Herman, A. Kashishian, B. Steiner, A.J. Johnson, J.C. Byrd, J.W. Tyner, M.M. Loriaux, M. Deininger, B.J. Druker, K.D. Puri, R.G. Ulrich, N.A. Giese, CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability, *Blood* 117(2) (2011) 591-4.

[28] S. Marshall-Clarke, L. Tasker, M.P. Heaton, R.M. Parkhouse, A differential requirement for phosphoinositide 3-kinase reveals two pathways for inducible upregulation of major histocompatibility complex class II molecules and CD86 expression by murine B lymphocytes, *Immunology* 109(1) (2003) 102-8.

[29] K. Liu, E.K. Wakeland, Delineation of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus by using murine models, *Advances in experimental medicine and biology*

490 (2001) 1-6.

[30] D.F. Barber, A. Bartolome, C. Hernandez, J.M. Flores, C. Redondo, C. Fernandez-Arias, M. Camps, T. Ruckle, M.K. Schwarz, S. Rodriguez, A.C. Martinez, D. Balomenos, C. Rommel, A.C. Carrera, PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus, *Nature medicine* 11(9) (2005) 933-5.

[31] D.G. Winkler, K.L. Faia, J.P. DiNitto, J.A. Ali, K.F. White, E.E. Brophy, M.M. Pink, J.L. Proctor, J. Lussier, C.M. Martin, J.G. Hoyt, B. Tillotson, E.L. Murphy, A.R. Lim, B.D. Thomas, J.R. Macdougall, P. Ren, Y. Liu, L.S. Li, K.A. Jessen, C.C. Fritz, J.L. Dunbar, J.R. Porter, C. Rommel, V.J. Palombella, P.S. Changelian, J.L. Kutok, PI3K-delta and PI3K-gamma inhibition by IPI-145 abrogates immune responses and suppresses activity in autoimmune and inflammatory disease models, *Chemistry & biology* 20(11) (2013) 1364-74.

[32] H. Ji, F. Rintelen, C. Waltzinger, D. Bertschy Meier, A. Bilancio, W. Pearce, E. Hirsch, M.P. Wymann, T. Ruckle, M. Camps, B. Vanhaesebroeck, K. Okkenhaug, C. Rommel, Inactivation of PI3Kgamma and PI3Kdelta distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation, *Blood* 110(8) (2007) 2940-7.

[33] P. Haselmayer, M. Camps, M. Muzerelle, S. El Bawab, C. Waltzinger, L. Bruns, N. Abla, M.A. Polokoff, C. Jond-Necand, M. Gaudet, A. Benoit, D. Bertschy Meier, C. Martin, D. Gretener, M.S. Lombardi, R. Grenningloh, C. Ladel, J.S. Petersen, P. Gaillard, H. Ji, Characterization of Novel PI3Kdelta Inhibitors as Potential Therapeutics for SLE and Lupus Nephritis in Pre-Clinical Studies, *Front Immunol* 5 (2014) 233.

[34] A. Suarez-Fueyo, J.M. Rojas, A.E. Cariaga, E. Garcia, B.H. Steiner, D.F. Barber, K.D. Puri, A.C. Carrera, Inhibition of PI3Kdelta reduces kidney infiltration by macrophages and ameliorates systemic lupus in the mouse, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193(2) (2014) 544-54.

- [35] D. Kong, T. Yamori, ZSTK474 is an ATP-competitive inhibitor of class I phosphatidylinositol 3 kinase isoforms, *Cancer Sci* 98(10) (2007) 1638-42.
- [36] G. Pongas, B.D. Cheson, PI3K signaling pathway in normal B cells and indolent B-cell malignancies, *Seminars in oncology* 43(6) (2016) 647-654.
- [37] N. Srivastava, R. Sudan, W.G. Kerr, Role of inositol poly-phosphatases and their targets in T cell biology, *Front Immunol* 4 (2013) 288.
- [38] N. Pan, I. Amigues, S. Lyman, R. Duculan, F. Aziz, M.K. Crow, K.A. Kirou, A surge in anti-dsDNA titer predicts a severe lupus flare within six months, *Lupus* 23(3) (2014) 293-8.
- [39] S.D. Marks, K. Tullus, Autoantibodies in systemic lupus erythematosus, *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 27(10) (2012) 1855-68.
- [40] S.N. Goud, N. Muthusamy, B. Subbarao, Differential responses of B cells from the spleen and lymph node to TNP-Ficoll, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 140(9) (1988) 2925-30.
- [41] A.C. Allison, E.M. Eugui, Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action, *Immunopharmacology* 47(2-3) (2000) 85-118.
- [42] L. Arnaud, N. Zahr, N. Costedoat-Chalumeau, Z. Amoura, The importance of assessing medication exposure to the definition of refractory disease in systemic lupus erythematosus, *Autoimmunity reviews* 10(11) (2011) 674-8.
- [43] A.F. Cunningham, A. Flores-Langarica, S. Bobat, C.C. Dominguez Medina, C.N. Cook, E.A. Ross, C. Lopez-Macias, I.R. Henderson, B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination, *Front Immunol* 5 (2014) 535.
- [44] G. Magri, M. Miyajima, S. Bascones, A. Mortha, I. Puga, L. Cassis, C.M. Barra, L. Comerma, A. Chudnovskiy, M. Gentile, D. Llige, M. Cols, S. Serrano, J.I. Aróstegui, M. Juan, J. Yagüe, M. Merad, S. Fagarasan, A. Cerutti, Innate lymphoid cells integrate

stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells, *Nature immunology* 15(4) (2014) 354-364.

[45] E. Clayton, G. Bardi, S.E. Bell, D. Chantry, C.P. Downes, A. Gray, L.A. Humphries, D. Rawlings, H. Reynolds, E. Vigorito, M. Turner, A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation, *The Journal of experimental medicine* 196(6) (2002) 753-63.

[46] E.M. Vital, S. Dass, M.H. Buch, K. Henshaw, C.T. Pease, M.F. Martin, F. Ponchel, A.C. Rawstron, P. Emery, B cell biomarkers of rituximab responses in systemic lupus erythematosus, *Arthritis and rheumatism* 63(10) (2011) 3038-47.

[47] J.L. Scholz, J.E. Crowley, M.M. Tomayko, N. Steinel, P.J. O'Neill, W.J. Quinn, 3rd, R. Goenka, J.P. Miller, Y.H. Cho, V. Long, C. Ward, T.S. Migone, M.J. Shlomchik, M.P. Cancro, BlyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(40) (2008) 15517-22.

[48] T. Marui, H. Fukahori, M. Ito, Y. Kaneko, M. Maeda, S. Tsujimoto, T. Morokata, The PI3Kdelta selective inhibitor AS2541019 suppresses donor-specific antibody production in rat cardiac and non-human primate renal allotransplant models, *International immunopharmacology* 75 (2019) 105756.

[49] D. Perry, A. Sang, Y. Yin, Y.Y. Zheng, L. Morel, Murine models of systemic lupus erythematosus, *J Biomed Biotechnol* 2011 (2011) 271694.

[50] T. Celhar, A.M. Fairhurst, Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories, *Rheumatology (Oxford, England)* 56(suppl_1) (2017) i88-i99.

[51] A.T. Borchers, N. Leibushor, S.M. Naguwa, G.S. Cheema, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, Lupus nephritis: a critical review, *Autoimmunity reviews* 12(2) (2012) 174-94.

- [52] J.J. Weening, V.D. D'Agati, M.M. Schwartz, S.V. Seshan, C.E. Alpers, G.B. Appel, J.E. Balow, J.A. Bruijn, T. Cook, F. Ferrario, A.B. Fogo, E.M. Ginzler, L. Hebert, G. Hill, P. Hill, J.C. Jennette, N.C. Kong, P. Lesavre, M. Lockshin, L.M. Looi, H. Makino, L.A. Moura, M. Nagata, The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited, *Kidney international* 65(2) (2004) 521-30.
- [53] S.A. Chalmers, J. Wen, J. Doerner, A. Stock, C.M. Cuda, H.M. Makinde, H. Perlman, T. Bosanac, D. Webb, G. Nabozny, J.S. Fine, E. Klein, M. Ramanujam, C. Putterman, Highly selective inhibition of Bruton's tyrosine kinase attenuates skin and brain disease in murine lupus, 20(1) (2018) 10.
- [54] 清. 小林, アポトーシスと内科疾患 自己免疫とアポトーシス, *日本内科学会雑誌* 86(9) (1997) 1588-1592.
- [55] X. Wang, Y. Xia, Anti-double Stranded DNA Antibodies: Origin, Pathogenicity, and Targeted Therapies, *Front Immunol* 10 (2019) 1667.
- [56] S.W. Lee, B.S. Kim, Comparison of therapeutic efficacy between bortezomib and combination treatment of prednisolone and mycophenolate mofetil on nephritis in NZB/WF1 mice, *Clinical and experimental rheumatology* 28(3) (2010) 393-6.
- [57] K. Giannakakis, T. Faraggiana, Histopathology of lupus nephritis, *Clinical reviews in allergy & immunology* 40(3) (2011) 170-80.
- [58] K.F. Koenig, I. Groeschl, S.S. Pesickova, V. Tesar, U. Eisenberger, M. Trendelenburg, Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis, *Cytokine* 60(2) (2012) 410-6.
- [59] 白井俊一, モデルマウス系を通してみた全身性エリテマトーデス(SLE), *順天堂医学* 27(4) (1981) 412-415.
- [60] 雄. 斎川, 正. 藤森, 浩. 河野, 他, SLE に合併する血小板減少症の機序の解析, *順天堂医学* 39(2) (1993) 225-234.

- [61] A.E. Gharavi, R.C. Mellors, K.B. Elkon, IgG anti-cardiolipin antibodies in murine lupus, *Clinical and experimental immunology* 78(2) (1989) 233-8.
- [62] P. Kahn, M. Ramanujam, R. Bethunaickan, W. Huang, H. Tao, M.P. Madaio, S.M. Factor, A. Davidson, Prevention of murine antiphospholipid syndrome by BAFF blockade, *Arthritis and rheumatism* 58(9) (2008) 2824-34.
- [63] M.J. Shlomchik, J.E. Craft, M.J. Mamula, From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease, *Nature reviews. Immunology* 1(2) (2001) 147-53.
- [64] T. Dörner, C. Giesecke, P.E. Lipsky, Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE, *Arthritis research & therapy* 13(5) (2011) 243.
- [65] J. Rolf, S.E. Bell, D. Kovesdi, M.L. Janas, D.R. Soond, L.M. Webb, S. Santinelli, T. Saunders, B. Hebeis, N. Killeen, K. Okkenhaug, M. Turner, Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185(7) (2010) 4042-52.
- [66] D.I. Daikh, B.K. Finck, P.S. Linsley, D. Hollenbaugh, D. Wofsy, Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159(7) (1997) 3104-8.
- [67] T. Bueters, B.A. Ploeger, S.A. Visser, The virtue of translational PKPD modeling in drug discovery: selecting the right clinical candidate while sparing animal lives, *Drug discovery today* 18(17-18) (2013) 853-62.
- [68] Y. Kaneko, H. Fukahori, K. Yamagami, T. Kawashima, M. Ito, M. Akamatsu, T. Marui, K. Kato, F. Takahashi, T. Morokata, Effects of AS2819899, a novel selective PI3K δ inhibitor, in a NZB/W F1 mouse lupus-like nephritis model, *International immunopharmacology* 87 (2020) 106764.

要旨 (和文)

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) は、皮膚、関節、腎臓、肺、中枢神経に及ぶ多臓器病変を呈する自己免疫疾患である。SLE の病態は寛解と再発を繰り返す。患者の約半数はループス腎炎を発症し、そのコントロールは予後に影響する。発症の背景には、自己反応性の B 細胞の活性化や、抗 double stranded DNA (dsDNA) 抗体に代表される自己抗体の産生がある。

SLE の治療は、これまで長い間、ステロイド薬や免疫抑制薬に依存してきた。しかしこれらの薬剤は長期使用において様々な副作用が問題となっている。

近年、自己抗体産生抑制を目的とした B 細胞の抑制が SLE の新しい創薬標的として注目されている。例えば B 細胞特異的表面タンパクである CD20 を認識するモノクローナル抗体 Rituximab は、SLE を適応症としたアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) の承認は未だ得られていないが、小規模臨床試験において、SLE 患者に対する有効性が確認されている。加えて抗 BAFF/BLys モノクローナル抗体である Belimumab は、標準治療薬抵抗性の SLE を適応として、2011 年、FDA の承認を受けた。一方で、Belimumab は、SLE の疾患活動性を表す SELENA-SLEDAI スコアを改善したが、ループス腎炎に対する作用が比較的弱く、SLE の再発予防についても有効性が十分とは言えない。そのため今後、ループス腎炎を改善し、再発を抑制できる治療薬の開発が望まれている。我々は、B 細胞の活性化、増殖抑制による自己抗体の産生抑制が、ループ

ス腎炎の改善や再発の抑制につながると考え、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase; PI3K) δ に着目した研究を行った。

PI3K は細胞膜の内側に存在する脂質キナーゼであり Class I~III に分類される。

PI3K δ は、Class I PI3K のアイソフォームの一つである。Class I PI3K には、PI3K α 、

PI3K β 、PI3K δ 、PI3K γ の 4 つのアイソフォームが存在し、細胞の分化、増殖、接

着等に寄与している。PI3K α および PI3K β はユビキタスに細胞に発現しているの

に対し、PI3K δ および PI3K γ は主にリンパ球系の細胞に発現しているため、阻害

によりリンパ球系細胞特異的な増殖および活性化抑制が期待される。B 細胞に

おいて、PI3K δ は B 細胞受容体 (B cell Receptor; BCR) の下流に、PI3K γ は G タン

パク質共役受容体の下流にそれぞれ存在しており、抗原依存的な B 細胞の機能

に重要な役割を果たしているのは、PI3K δ である。そこで我々は、PI3K δ を選択

的に阻害することが、BCR シグナルの抑制、ひいては自己抗体の産生の抑制に

つながり、有効性と安全性のバランスのとれた SLE 治療薬の創出につながると

考えた。

本研究において我々は、新規 PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 (AS) を用いて、

PI3K δ 選択的阻害剤の SLE 治療薬としての可能性について検討した。

第 1 章 ; PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 (AS) の *in vitro* プロファイリング

第 1 章では本試験で評価に用いた AS の *in vitro* プロファイルについて検証した。

AS は *in vitro* PI3K δ 阻害アッセイにおいて、0.29 nM の Ki 値を示し、他 Class I PI3K アイソフォームと 100 倍以上の選択性を示した。加えて Class II PI3K アイソフォームの酵素阻害作用の IC₅₀ 値は約 1 μ M 以上であり、PI3K δ 阻害作用と比較して弱いことが示された。さらに PI3K 以外のチロシン/セリン・スレオニンキナーゼ 28 種類について、10 μ M の濃度において阻害作用は認められなかった。以上のことから AS は PI3K δ を選択的に阻害する化合物であることが確認された。

次に、AS の B 細胞及び T 細胞への作用を *in vitro* で確認した。Major Histocompatibility Complex (MHC) class II は B 細胞において、抗原と BCR の結合により発現が亢進するため、B 細胞活性化マーカーとして用いられる。健康人の末梢血 B 細胞において、AS は、抗 IgM 抗体による BCR 刺激に対する MHC class II 発現を抑制し、IC₅₀ 値は 1.8 nM であった。また、T 細胞の増殖への作用を調べるため、健康人由来 T 細胞を用い、抗 CD3/28 抗体刺激による増殖アッセイを実施した。AS は T 細胞増殖抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は 55.1 nM であった。

第 2 章 ; PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 (AS) の抗体産生に対する作用

第 1 章において、PI3K δ 選択的阻害剤である AS は、B 細胞の MHC Class II 発現を抑制した。MHC Class II 発現は、T 細胞の活性化や、サイトカイン産生などを誘発し、抗体産生細胞の増殖へとつながるため、AS を 2 つの *in vivo* 抗体産生モ

デルにて評価した。まず、T細胞非依存的抗原である Trinitrophenylated aminoethylcarboxymethyl-Ficoll を用いたマウス抗体産生モデルにて、AS を評価したところ、AS は 0.3 mg/kg 以上の投与量で抗体産生を抑制した。

次に、T細胞依存的抗原である Dinitrophenylated Keyhole Limpet Hemocyanin を 2 回免疫することによるリコール応答抗体産生モデルにて AS を評価した。AS は 2 回目の免疫時からの投与によって、1 mg/kg 以上の投与量で抗体産生を抑制した。この結果から、AS が B 細胞のリコール応答についても抑制作用を示すことが明らかになった。リコール応答による抗体産生は、SLE の再発に関連すると考えられるため、PI3K δ 選択的阻害剤は SLE の再発の抑制に有効性を示すことが示唆された。

第 3 章 ; AS2819899 (AS) のマウス自然発症ループス腎炎モデルにおける評価

第 2 章において、AS は抗体産生を抑制した。SLE は抗 dsDNA 抗体などの自己抗体の産生が病態発症のメカニズムと考えられるため、AS が SLE の治療薬候補となり得ると考え、マウス自然発症ループス腎炎モデルを用いて評価した。

NZB/W F1 マウスは、ループス腎炎に類似した病態を自然発症するマウスである。

SLE の標準治療法であるプレドニゾロンとミコフェノール酸モフェチルの併用投与がこのマウスに対して有効性を示すことから、本モデルはヒト臨床予測性の高いモデルであると考えられる。これまでに PI3K δ 選択的阻害剤のマウス SLE

病態モデルにおける報告はいくつかあるが、MRL/lpr マウスモデルや、IFN- α などで人為的に腎炎を誘導したモデルであり、NZB/W F1 マウスを用いた自然発症モデルの報告はない。今回、我々は PI3K δ 選択的阻害剤を、初めて本モデルにおいて評価し、比較的低用量まで投与することで臨床応用への可能性を検証した。AS は 0.5 mg/kg からタンパク尿を抑制し、腎臓の病理検査においても 1 mg/kg から糸球体硬化スコアを改善した。投与溶媒投与群では、40 週齢までに 50%が腎機能低下による瀕死屠殺のクライテリアに至ったのに対し、AS の 0.5 mg/kg 以上の投与群では、このクライテリアに至った動物はいなかった。これらの結果から、AS がループス腎炎の発症を抑制し、死亡率を改善することが示された。

一方で抗 dsDNA 抗体価の抑制は 5 mg/kg で確認され、腎機能の改善は、より低濃度からみられたことから、本モデルにおける腎機能の改善は、単に抗 dsDNA 抗体価の抑制に依存していないことが示唆された。B 細胞は抗体産生以外にも、サイトカインの産生等エフェクター細胞としての機能を担っており、AS によるそのような作用の抑制が腎機能の改善に寄与していることが考えられた。加えて、第 1 章で示された通り AS は、T 細胞の増殖抑制作用も有することから、T 細胞の増殖抑制があることが、ループス腎炎に対する強い有効性に繋がっている可能性が示唆された。また、AS の投与により、体重や血液パラメータの顕著な変化はみられず、AS の投与による毒性の懸念は低いものと推察された。

前臨床研究における PK (Pharmacokinetics) /PD (Pharmacodynamics) 解析は、化合

物投与後の動態や有効性のモニターを可能にし、臨床試験の推進につながると考えられる。第 1 章で AS は抗 IgM 刺激による B 細胞上の MHC class II 発現を *in vitro* で抑制したため、この指標を PD マーカーとして使用できるのではないかと考え、検証した。マウスに AS を投与し、経時的に採取した血液を *ex vivo* において、抗 IgM 抗体で刺激し、B 細胞上の MHC class II 発現を測定した。その結果、AS の投与により、B 細胞の MHC class II 発現の抑制が確認され、抑制作用は化合物の血中濃度と相関していた。以上の結果から末梢血 B 細胞 MHC class II 発現は PD マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

総括

新規 PI3K δ 選択的阻害剤である AS は、抗体産生抑制作用を有し、マウス自然発症ループス腎炎モデルにおいて、ループス腎炎の発症を抑制した。この結果から、PI3K δ 選択的阻害剤は、ループス腎炎にも有効な SLE 治療薬の候補になることが示唆された。加えて、マウスを用いた抗体産生モデルにおいて、AS がリコール応答による抗体産生を抑制したことから、PI3K δ 選択的阻害剤は、SLE の再発抑制に効果を示す可能性が示唆された。また末梢血における B 細胞上の MHC class II 発現を確認することで、化合物投与後の薬効のモニターが可能であることを見出し、この指標を PD マーカーとして用いることは、臨床試験の効率化、安全性の確保に繋がると考えられた。

要旨 (英文)

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic systemic autoimmune disease which causes dysfunction of multiple organ systems with a relapsing-remitting course. About fifty percent of SLE patients develop lupus nephritis (LN), which affects the prognosis of SLE. In particular, autoreactive B cell activation and anti-double stranded DNA (dsDNA) antibodies play a crucial role in the development of LN.

For many years, therapies for SLE have been based on broad-spectrum immunosuppression, including corticosteroids and immunosuppressants, which often induce moderate to severe side-effects upon long-term use. In recent years, therapeutic methods which suppress B cells have attracted attention as potential treatments for SLE. Rituximab, which targets the B cell surface protein CD20, has been reported to show efficacy for SLE in minor clinical studies. However, rituximab has not been approved for SLE by the Food and Drug Administration (FDA). Belimumab, a human monoclonal antibody to B-cell activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS), was approved by the FDA for the treatment of SLE in 2011. Belimumab shows significant therapeutic effects in the treatment of active autoantibody-positive SLE patients who do not respond to conventional therapies. However, the effects of belimumab are considered modest, especially in LN. In addition, belimumab reduces SLE disease activity but not

flares. Therefore, additional effective therapies for SLE which can lead to improving LN and reducing flares are worth exploring.

Here, we hypothesized that suppression of activating B cells and autoantibody production would lead to an improvement of lupus nephritis and suppression of flare, and conducted a study focusing on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) δ . The PI3Ks are the lipid kinases involved in intracellular signal transduction. The PI3Ks are divided into three classes, Class I – III. PI3K δ is one of the Class I PI3K isoforms. Class I PI3K contributes to cell differentiation, proliferation and adhesion, and is classified into four isoforms: PI3K α , PI3K β , PI3K δ , and PI3K γ . While PI3K α and β are ubiquitously expressed, PI3K δ and γ are mainly expressed in lymphocytes. Inhibition of PI3K δ and γ is expected to suppress lymphoid cell-specific proliferation and activation. In B cells, PI3K δ is activated by B cell receptor (BCR) stimulation, while PI3K γ is activated by G protein-coupled receptors. PI3K δ plays an important role in antigen-dependent B cell activation. Therefore, we hypothesized that PI3K δ -selective inhibition may be a promising treatment option for SLE in terms of balancing efficacy and safety. In this study, we investigated the potential of PI3K δ selective inhibitors as therapeutic agents for SLE using the novel PI3K δ selective inhibitor AS2819899 (AS).

Chapter 1: *In vitro* profiling of the PI3K δ selective inhibitor AS2819899

In this chapter, we examined the *in vitro* profile of AS2819899 (AS). AS inhibited the activity of human Class I PI3K enzymes. The K_i value of AS for PI3K δ was 0.29 nM, which was about 100 times more potent than that for the other Class I PI3K isoforms. In contrast, the IC_{50} of AS for inhibition of Class II PI3K isoforms was about 1 μ M or more, which was weaker than the PI3K δ inhibitory effect. Further, kinase panel assays against 28 serine/threonine and tyrosine kinases other than PI3K revealed that AS had no inhibitory activity for any of these kinases at 10 μ M. These results show that AS is a potent and selective inhibitor of PI3K δ . Since PI3K δ is mainly expressed in lymphoid cells, the effect of AS on B cells and T cells was confirmed *in vitro*. Major Histocompatibility Complex (MHC) class II is expressed on the surface of B cells, and its expression level is upregulated by B-cell activation via BCR crosslinking *in vitro*. Therefore, the expression level of MHC class II can be used as a biomarker of B-cell activation. We investigated the effect of AS in anti-IgM antibody-induced upregulation of MHC class II in human and murine B cells. AS suppressed the expression level of MHC class II in a concentration-dependent manner, with an IC_{50} value of 1.8 nM on human B cells.

To examine whether AS inhibits T cell proliferation, we examined the effect of AS on anti-CD3/CD28 antibody-induced proliferation of human peripheral blood-derived T

cells *in vitro*. AS suppressed anti-CD3/CD28 antibody-induced proliferation of human T cells with an IC₅₀ value of 55.1 nM.

Chapter 2: Effect of the PI3K δ selective inhibitor AS2819899 on antibody production

In Chapter 1, the PI3K δ selective inhibitor AS2819899 (AS) suppressed MHC class II expression in B cells. Since MHC class II expression induces T cell activation and cytokine production, leading to proliferation of antibody-producing cells, we examined AS in two antibody production mouse models *in vivo*. For T-cell-independent antibody production, we examined the effect of AS in the Trinitrophenylated aminoethylcarboxymethyl-Ficoll (TNP-Ficoll) -induced antibody production mouse model. Four days after immunization with TNP-Ficoll, groups treated with AS above 0.3 mg/kg b.i.d. showed significant suppression of anti-TNP IgM production compared to the vehicle-treated group.

For memory recall reaction in T-cell-dependent antibody production, we examined the effects of AS in the Dinitrophenylated Keyhole Limpet Hemocyanin (DNP-KLH) -induced antibody production mouse model. Treatment with AS above 1 mg/kg significantly suppressed the AUC of anti-DNP-IgG in a dose-dependent manner. These results suggest that AS suppresses T cell-dependent memory recall antibody production.

Given that memory recall response is considered to be involved in the flare of SLE, these findings indicate that PI3K δ -selective inhibitors might be effective in suppressing SLE flare.

Chapter 3: Effect of AS2819899 in a NZB/W F1 mouse lupus-like nephritis model

In Chapter 2, AS2819899 (AS) suppressed antibody production. Since the production of autoantibodies such as anti-dsDNA antibodies is considered to be the mechanism of pathogenesis in SLE, AS is considered to be a potential therapeutic drug candidate for SLE. We evaluated AS in a NZB/W F1 mouse lupus-like nephritis model. NZB/W F1 mice develop lupus-like phenotypes that resemble SLE in humans. Treatment with prednisolone plus mycophenolate mofetil (standard therapy for SLE) is efficacious in this mouse model. These findings suggest that the NZB/W F1 mouse model has high clinical predictability. A few reports have evaluated PI3K δ -selective inhibitors in several SLE models. However, these reports are about MRL/lpr mouse model and artificially IFN- α accelerate mouse model, no reports have evaluated PI3K δ -selective inhibitors in a spontaneous NZB/W F1 mouse model. Therefore, we evaluated the effect of AS in a NZB/W F1 mouse model at various doses to predict its efficacy in clinical settings. Treatment with AS at more than 0.5 mg/kg ameliorated proteinuria excretion, and at more than 1 mg/kg improved the glomerular sclerosis score in histopathological examination

of the kidney. No animals treated with more than 0.5 mg/kg of AS met the cessation criteria regarding kidney failure. These results suggest that AS has a strong suppressive effect against lupus-like nephritis, resulting in an improved survival rate in this model. On the other hand, suppression of anti-dsDNA antibody titer was confirmed only at 5 mg/kg, while improvement of renal function was observed from a lower dose. These results suggest that the AS-mediated improvement in renal dysfunction may not be completely due to a reduction in anti-dsDNA IgG production. Since B cells play a role as effector cells, such as in cytokine production, the suppression of such function by AS may contribute to the improvement of renal function. In addition, as shown in Chapter 1, AS inhibited anti-CD3/28 antibody-induced human T cell proliferation; this effect may also contribute to the strong efficacy of AS for lupus nephritis.

In this study, no significant changes were observed in body weight or blood cell parameters due to the administration of AS. These results suggest that there is little cause for concern about toxicity due to the administration of AS.

PK (Pharmacokinetics) / PD (Pharmacodynamics) analysis in preclinical studies enables monitoring of kinetics and efficacy after compound administration, which in turn facilitates the conduct of clinical trials. As noted in Chapter 1, AS suppressed anti-IgM induced MHC class II expression on B cells *in vitro*. We considered that this response could be used as a PD marker. Mice were administered AS, and blood was collected and

stimulated *ex vivo* with anti-IgM Ab. MHC class II expression was then detected on B cells, indicating that the administration of AS suppressed the expression of MHC class II in B cells. Further, this inhibitory effect was correlated with the blood concentration of AS. These results suggest that B cell MHC class II expression may be used as a PD marker.

Conclusion

The novel PI3K δ selective inhibitor AS2819899 inhibited antibody production and improved lupus nephritis in a mouse spontaneous lupus nephritis model. These results indicate that PI3K δ -selective inhibitors are candidates for effective SLE treatments for lupus nephritis. In addition, AS2819899 suppressed antibody production in a mouse memory recall antibody production model, suggesting that PI3K δ -selective inhibitors may be effective in suppressing the flare of SLE. We also found that AS suppressed the expression of MHC class II in peripheral blood B cells in a blood concentration-dependent manner, suggesting that the expression of MHC class II on B cells in peripheral blood can be used as a PD marker for PI3K δ inhibitors. Use of this PD marker will improve the efficiency and safety of clinical trials.