

氏名(本籍)	金子(小林) 洋子(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第439号
学位授与年月日	令和3年10月25日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 村上 賢 (副査) 佐原 弘 益 折戸 謙 介

論文内容の要旨

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 K_i 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 IC_{50} 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。健常人の末梢血 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、 IC_{50} 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、健常人由来 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 IC_{50} 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。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) は、皮膚、関節、中枢神経など、多臓器病変を呈し、またループス腎炎の発症を特徴とし、寛解と再発を繰り返す自己免疫疾患である。この病気の主な原因は、自己反応性の T 細胞や B 細胞の活性化、抗 double stranded DNA (dsDNA) 抗体などの自己抗体の産生である。SLE の治療薬としては、これまでのステロイドや免疫抑制薬に加えて、近年、B 細胞による自己抗体産生の抑制を標的としたモノクローナル抗体薬も開発されているが、前者ではさまざまな副作用が、後者ではループス腎炎が改善されず、また再発防止抑制が弱いといった問題がある。SLE 発症の要因である、抗原刺激的なリンパ球の活性化や増殖には、その細胞内情報伝達因子としてホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase; PI3K) δ が働く。PI3K は細胞膜の内側に存在する脂質キナーゼであり、複数のアイソフォームが知られているが、そのうちの PI3K δ は主にリンパ球系細胞に発現し、その受容体下流に存在して抗原依存的な細胞の機能発現 (抗体産生など) に関与している。

そこで申請者は、この PI3K δ に着目し、これを特異的に阻害することにより再発がなく有効な SLE 治療薬の創出を発想した。本論文では、申請者が所属する製薬企業において開発した新規 PI3K δ 選択的阻害剤 AS2819899 (AS) を用いて、新規 SLE 治療薬としての可能性を *in vitro* および *in vivo* での実験を通して解析した。

論文は 3 章から構成されている。第 1 章では、*in vitro* PI3K δ 阻害アッセイなどを用いて、まず AS が PI3K δ を選択的に強く阻害する化合物であることを確認した。次に、抗 IgM 抗体による B 細胞受容体刺激に対する B 細胞の MHC class II 発現を調べ、また抗 CD3/28 抗体刺激による T 細胞増殖アッセイを実施し、AS は B 細胞の活性化および T 細胞の増殖に対して強い抑制作用があることを *in vitro* で示した。第 2 章では、T 細胞非依存的および依存的抗原による 2 つの *in vivo* 抗体産生モデルを用い

て AS を評価した。T 細胞非依存的抗原による抗体産生抑制だけでなく、T 細胞依存的抗原を 2 回免疫したりリコール応答抗体産生モデルでも AS の強い抗体産生抑制効果が認められ、PI3K δ 選択的阻害剤 AS が SLE の再発抑制へ有効であることを示唆した。第 3 章では、抗 dsDNA 抗体の自己抗体を産生してループス腎炎を自然発症する NZB/W F1 マウスモデルを用いて PI3K δ 選択的阻害剤 AS を評価した。血漿中腎機能マーカーの測定や病理学的検査などを通して AS は腎炎の発症を有意に抑制した。また、抗 dsDNA 抗体や炎症性サイトカイン産生の抑制も示し、AS がループス腎炎の発症を抑制することを *in vivo* で示した。

本研究の成果は、PI3K δ 選択的阻害剤が SLE のループス腎炎を抑制し、再発抑制にも効果がある新規治療薬の可能性を示すものであり、基礎生物学、獣医学、医学分野に貢献する有用な知見である。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の発症メカニズムに関与する細胞内情報伝達因子 PI3K δ に注目して、新規に開発した PI3K δ の選択的阻害剤である AS2819899 (AS) の新たな SLE 治療薬としての可能性を *in vitro* および *in vivo* の実験を通して、検証しようとした内容であり、明確なテーマが設定され、調査項目が整理されて示されている。

2) 研究の背景

SLE はループス腎炎の発症を特徴とし、再発を繰り返す自己免疫疾患である。SLE の発症には、T、B リンパ球の活性化や増殖、抗 dsDNA 自己抗体の産生が関与しており、これまでの治療薬はステロイドや免疫抑制薬に依存してきた。しかし、ループス腎炎や再発を抑制する効果は弱い。T 細胞や B 細胞には膜脂質キナーゼとして PI3K δ が存在しており、これが細胞機能の活性化や抗体産生に大きく関与している。そこで、申請者は PI3K δ の選択的阻害剤が SLE の有効な新規治療薬となるのではないかと発想し、本研究に至った。先行研究の知見を整理し、自分の研究内容と関連づけて解析に取り組んでいる。

3) 研究の方法

対象化合物 (PI3K δ 選択的阻害剤 AS) の生化学的なアッセイによる評価、リンパ球細胞を使った増殖や細胞膜上の発現抗原の測定、マウスでの抗原刺激による抗体産生に対する作用の評価、マウス自然発症ループス腎炎モデルでの病態評価など、研究の目的に相応しい *in vitro* および *in vivo* での解析を実施して、研究内容を深化させている。

4) 研究の結果

第 1 章では、新規 PI3K δ 選択的阻害剤の化合物としての *in vitro* プロファイリングを示した。第 2

章では、*in vivo* 抗体産生モデルを用いて AS の強い抗体産生抑制効果を示唆した。第 3 章では、SLE に特徴的なループス腎炎を自然発症する NZB/W F1 マウスモデルを用いて AS がループス腎炎の発症を有意に抑制することを示した。いずれも十分なデータをまとめて解析している。

5) 考察と結論

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通して、既存の治療薬との比較を考察し、新規 PI3K δ 選択的阻害剤である AS は、再発抑制作用があり、ループス腎炎にも有効な新規の SLE 治療薬の候補となると結論付けた。研究結果から明らかになったことを踏まえ、仮説との整合性を含め論理的に説明できている。

6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上及び基礎医学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。