

平成30年 6月18日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19596

研究課題名(和文) 自然免疫受容体TLR7の活性阻害に基づく新規SLE治療薬の創出

研究課題名(英文) The development of therapeutic agents for SLE based on inhibition of innate immune receptor TLR7

研究代表者

岡本 直樹 (OKAMOTO, Naoki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・研究員

研究者番号：80727488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、指定難病である全身性エリテマトーデス(SLE)の治療薬開発を目指し、TLR7選択的な低分子阻害剤であるCB-7の有効性評価を行った。CB-7はマウス及びヒトの免疫細胞において明確なTLR7阻害効果を示した。一方、SLEモデルマウスにおける有効性は低く、その原因としてCB-7の体内動態・代謝安定性に問題があることがわかった。この問題を解決するために、誘導体合成を行った。その結果、CB-7よりも高い活性を有する複数の誘導体が得られ、構造活性相関も明らかとなった。既に構造生物学を基盤とした最適化合成に着手している。今後、より活性が高く体内動態・代謝安定性に優れた化合物の創出が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effectiveness of CB-7, a selective small molecule inhibitor of TLR7, aiming at developing therapeutic agents for systemic lupus erythematosus (SLE). CB-7 showed inhibitory activities against TLR7 in murine and human immune cells. However, the effectiveness of CB-7 in SLE model mice was not proven, and we found that CB-7 has problems in pharmacokinetics and metabolic stability. In order to solve these problems, CB-7 derivatives were synthesized. Several derivatives showed higher inhibitory activities than CB-7, and the structure-activity relationship on TLR7 inhibition was also revealed. We have already undertaken further synthesis of derivatives based on structural biology to optimize the biological activity. This will allow us to obtain a more potent TLR7 inhibitor with high metabolic stability.

研究分野：免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス 自然免疫 TLR7 天然薬物 創薬

1. 研究開始当初の背景

指定難病である全身性エリテマトーデス (SLE) の患者数は国内においても増加傾向にあり (平成 25 年度の特患医療受給者証交付件数は 61,528 件) その薬物治療は依然としてステロイド剤に依存しているため、ステロイド剤の長期使用による副作用が大きな問題となっている。従って、疾患関連分子を選択的に標的とした副作用の少ない治療薬の開発が求められている。これまで、SLE 治療薬として承認されている抗体医薬は B 細胞を不活性化するベリムブ (抗 BAFF 抗体) のみであるが (国内では第 Ⅲ 相試験中) 一部の患者にしか有効性を示さない。現在、IFN- γ やその受容体に対する抗体を用いた臨床試験が進められており、有効性評価において良好な結果が得られているが、低頻度ながら複数の有害事象の発生が報告されている。また、抗体医薬は定期的・長期的な注射投与が必要であり、患者に与える身体的・経済的な負担が大きい。

マクロファージや樹状細胞等の自然免疫細胞には、Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる病原体センサーが発現している。病原体の構成成分を認識した TLR は、炎症性サイトカイン等の産生を誘導することで、感染防御反応を引き起こす。近年、ウイルス由来の 1 本鎖 RNA を認識する TLR7 が、自己由来の核酸を誤って認識することによって、自己免疫疾患の発症・増悪に関与することが明らかにされている。実際に、TLR7 シグナルが異常活性化する複数のモデルマウスでは、ヒトの SLE に類似した炎症病態が観察されることが報告されている (*Immunol. Res.*, 53:58-77, 2012)。特に、TLR7 を高発現する形質細胞様樹状細胞から産生される IFN- γ が、B 細胞の自己抗体産生を促進する等、獲得免疫系を活性化することで病態形成に重要な役割を担うことが知られている。TLR7 は細胞内のエンドソームに発現することから、抗体医薬の活用は困難なことが予想される。また、オリゴヌクレオチドを基にした TLR7 阻害剤が報告されているが、実用化には至っていない (*J. Immunol.*, 191:3240-3253, 2013)。

2. 研究の目的

研究代表者は、TLR7 の異常活性化は SLE 治療戦略における重要な標的であると考え、その活性化を阻害するには、低分子化合物が有用であるとの着想に至った。そこで、マウス TLR7 を発現するレポーター細胞を用いて、TLR7 の活性化を阻害する低分子化合物を探索した。その結果、マメ科植物由来のシクロバクチオール類化合物の一つ「CB-7」が、TLR7 リガンド刺激による NF- κ B の活性化を完全に阻害することを見出した ($IC_{50} = 8.4 \mu\text{M}$)。本研究では、SLE において異常活性化する TLR7 を標的とすることで、CB-7 を活用した新規 SLE 治療薬の創出を目指し、CB-7 の薬理作用を動物レベル及び細胞レベルで解析するとともに、CB-7 の作用機序を解明すること

を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物レベルでの有用性評価:

正常マウスにおける CB-7 の TLR7 阻害効果の検討: 正常マウス (C57BL/6N, 雌) に 3.5 μg の R848 (TLR7 リガンド) を腹腔投与すると、1 時間後に血清 IFN- γ レベルが上昇する。R848 投与の 4 時間前に生理食塩水に懸濁した 500 μg の CB-7 または溶媒 (5% DMSO) を腹腔投与することで、R848 投与による血清 IFN- γ レベルの上昇が抑制されるかどうか検討した ($n = 10$)。

SLE モデルマウスにおける CB-7 の予防効果の検討: 以下の 2 種類のモデルを用いた。

(a) イミキモド塗布モデル

マウスの右耳に 25 mg の 5% イミキモドクリーム (商品名: ベセルナクリーム) を週 3 回 4 週間塗布することにより誘導される SLE 様の病態が、CB-7 の腹腔投与で予防されるかどうか検討した ($n = 5$)。イミキモドクリーム塗布と同時に、生理食塩水で懸濁した 100 μg の CB-7 または溶媒のみ (2.5% DMSO) を腹腔投与し、4 週間後及び 8 週間後に、脾腫、血清抗 dsDNA 抗体価、脾臓における炎症性細胞の割合を解析した。

(b) *Unc93b1*^{D34A/D34A} 変異モデル

発症前 (8 週齢) の *Unc93b1*^{D34A/D34A} 変異マウスに、生理食塩水で懸濁した 500 μg の CB-7 ($n = 8$) または溶媒 (5% DMSO) ($n = 7$) を週 3 回、8 週間腹腔投与した。次に、CB-7 は難水溶性化合物であるため、生理食塩水に懸濁しての腹腔投与は生体利用率が低いと考えた。そこで、8 週齢の *Unc93b1*^{D34A/D34A} 変異マウスに、オリーブ油で懸濁した 1.0 mg の CB-7 ($n = 10$) または溶媒 (10% DMSO) ($n = 10$) を連日、8 週間経口投与した。投与期間終了後、未処置の野生型マウス ($n = 8$) も含めて全てのマウスを安楽死させ、疾患活動性 (脾腫、血小板数、血清抗 dsDNA 抗体価、血清 AST レベル、血清 ALT レベル、血清クレアチニンレベル、血清尿素窒素レベル、脾臓またはリンパ節における炎症性細胞の割合) を評価した。

体内動態解析: 正常マウス (C57BL/6N, 雌) にオリーブ油で懸濁した 1.0 mg の CB-7 を経口投与し、経時的に採血した。血漿中に含まれる CB-7 を LC/MS/MS を利用して定量化した。

代謝安定性評価:

肝ミクロソーム・サイトゾルと CB-7 を 30 分間または 2 時間インキュベートし、LC/MS を利用して代謝産物の組成及び割合を解析した。

(2) 細胞レベルでの有効性評価:

正常マウスまたは SLE モデルマウス由来の免疫細胞 (骨髄由来のマクロファージ及び樹状細胞)、健常人または SLE 患者由来の免疫細胞 (末梢血単核球及び樹状細胞) を用いて、TLR7 リガンド刺激による IL-6 及び IFN- γ の産生が、CB-7 の前処理で抑制されるかどうか検討した。

(3) 作用機序の解明：

TLR7 細胞外ドメインの精製蛋白質を用いて、CB-7 と TLR7 との相互作用解析を等温滴定カロリメトリー法または表面プラズモン共鳴法を利用して行った。

CB-7 と TLR7 結晶構造とのドッキングシミュレーションを各種ソフトウェアを利用して行った。

(4) 誘導体合成及び構造活性相関の解明：

CB-7 よりも活性が高く、動物レベルで有効性を示す阻害剤を開発するために、誘導体合成を外部企業 (Albany Molecular Research, Inc., 米国) に委託した。全ての誘導体の活性評価を行うことで、TLR7 阻害作用における化合物の構造活性相関を考察した。

4. 研究成果

(1) 動物レベルでの有用性評価：

正常マウスにおける CB-7 の TLR7 阻害効果の検討：正常マウスにおいて、R848 投与により上昇する血清 IFN- γ レベルは、CB-7 の前処置で抑制される傾向を示した ($p = 0.053$ で有意差なし)。

SLE モデルマウスにおける CB-7 の予防効果の検討：以下の 2 種類のモデルを用いた。

(a) イミキモド塗布モデル

CB-7 の投与を開始してから 4 週間後に血清中の抗 dsDNA 抗体価を調べたところ、CB-7 投与群では溶媒投与群に比べて抗体価が低い傾向を示した ($p = 0.079$ で有意差なし)。しかし、処置から 8 週間後に表現型を解析したところ、脾腫、血清抗 dsDNA 抗体価、脾細胞における活性化 B 細胞 (CD69 陽性 B220 陽性細胞) 及び活性化 T 細胞 (CD69 陽性 CD3 陽性細胞) の割合は、CB-7 投与群と溶媒投与群で差は認められなかった。

(b) *Unc93b*^{D34A/D34A} 変異モデル

CB-7 の腹腔投与を開始してから 8 週間後において、未処置の野生型マウスに比べて、*Unc93b*^{D34A/D34A} 変異マウスの溶媒投与群では血小板数の減少が認められた。一方、CB-7 投与群では 1 匹のみ野生型と同等の血小板数を維持したが、溶媒投与群との有意な差は認められなかった。また、血清抗 dsDNA 抗体価、脾腫または脾細胞における各種免疫細胞の組成に関しては、CB-7 投与群と溶媒投与群で差は認められなかった。また、CB-7 の経口投与を開始してから 8 週間後において、CB-7 投与群では 1 匹のみ野生型と同等の血小板数を維持したが、溶媒投与群との有意な差は認められなかった。脾腫に関しては CB-7 投与群と溶媒投与群で差は認められなかった。一方、未処置の野生型マウスに比べて、*Unc93b*^{D34A/D34A} 変異マウスの溶媒投与群では、脾細胞中のナイーブ T 細胞の減少やメモリー T 細胞の増多またはリンパ節中の IFN- γ 産生細胞及び IL-17 産生細胞の増多を認めたが、CB-7 投与群ではこれらの表現型に改善傾向を示した。また、*Unc93b*^{D34A/D34A} 変異マウスの溶媒投与群では、投与前に比べて投与後では

血清抗 dsDNA 抗体価が増加したが、CB-7 投与群ではその増加が抑えられる傾向を示した。ただし、これらの指標に関して、CB-7 投与群と溶媒投与群との間に有意な差は認められなかった。

体内動態解析：上記の通り、動物レベルにおける CB-7 の有効性はほとんど認められなかったため、経口投与後の CB-7 の血中濃度変化を LC/MS/MS を利用して測定した。その結果、血中濃度が最大となる投与後 1 時間においても、CB-7 の血中濃度は約 1.0 μM であり、 IC_{50} 値 (8.4 μM) には達していなかった。また、投与後 4 時間で CB-7 は血中からほとんど消失していた。

代謝安定性評価：肝ミクロソーム・サイトゾルを用いて CB-7 の代謝安定性を検討したところ、2 時間の反応で CB-7 の 85% が修飾されていた。従って、今後、動物レベルで有効性を示す化合物を得るためには、TLR7 阻害活性を高めるだけでなく、薬物動態・代謝安定性に優れた誘導体を創出する必要があることがわかった。

(2) 細胞レベルでの有効性評価：

正常マウスまたは SLE モデルマウス由来の免疫細胞 (マクロファージ及び樹状細胞)：

(a) 正常マウス

骨髄由来のマクロファージ及び樹状細胞において、CB-7 は R848 刺激による IL-6 の産生をほぼ完全に抑制した。また、他の TLR のリガンドに対する抑制効果はほとんど認められなかったことから、CB-7 は TLR7 選択的な阻害剤であることが示唆された。

(b) SLE モデル (*Unc93b*^{D34A/D34A} 変異モデル) マウス

骨髄由来の形質細胞様樹状細胞において、CB-7 は TLR7 リガンドである ssPoly U 刺激による IFN- γ の産生を完全に抑制した。

健康人または SLE 患者由来の免疫細胞 (末梢血単核球及び樹状細胞)：

(a) 健康人

健康人末梢血から単離した形質細胞様樹状細胞を用いて、CB-7 の TLR7 阻害効果を検討した ($n = 6$)。その結果、CB-7 は TLR7 リガンドであるロキソリピンの刺激による IFN- γ の産生をほぼ完全に抑制した。

(b) SLE 患者

SLE 患者 ($n = 31$) または対照として関節リウマチ患者 ($n = 27$) の血液から調製した末梢血単核球を用いて、CB-7 の TLR7 阻害効果を検討した。その結果、CB-7 は TLR7 リガンドであるガーディキモド及び CL264 の刺激による IL-6 の産生をほぼ完全に抑制した。また、SLE 患者由来末梢血単核球における TLR7、IFN- γ 及び Mx1 遺伝子の発現量は、関節リウマチ患者のものに比べて有意に高かった。これらの遺伝子発現量と SLE の疾患活動性 (血清 C3/C4 補体価、血清抗 dsDNA 抗体価、血小板数等) との間に相関性は認められなかった。今後、疾患活動性が高い未治療の SLE 患者由来の末梢血単核球を用いて同様の解析を行

い、外来通院患者または健康人と比較する。

(3) 作用機序の解明：

表面プラズモン共鳴法を利用した相互作用解析の結果、CB-7 は TLR7 細胞外ドメインに結合することが示された。ドッキングシミュレーションの結果、CB-7 は TLR7 のリガンド結合部位近傍に結合しうることが示唆された。現在、R848 存在下及び非存在下での TLR7/CB-7 複合体の X 線結晶構造解析を進めている。

(4) 誘導体合成及び構造活性相関の解明：

メディシナルケミストリーによる誘導体合成により、中間体を含めて 91 種類の化合物の合成に成功した。活性評価の結果、その内 6 個の化合物に CB-7 よりも高い TLR7 阻害活性があることを見出した(最小の IC₅₀ 値は 2.4 μM)。また、全ての誘導体の活性評価とドッキングシミュレーションの結果を相互に参照することで、構造活性相関を明らかにした。現在、最適化合成を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Okamoto N, Mizote K, Honda H, Saeki A, Watanabe Y, Yamaguchi-Miyamoto T, Fukui R, Tanimura N, Motoi Y, Akashi-Takamura S, Kato T, Fujishita S, Kimura T, Ohto U, Shimizu T, Hirokawa T, Miyake K, Fukase K, Fujimoto Y, Nagai Y, Takatsu K. Funiculosin Variants and Phosphorylated Derivatives Promote Innate Immune Responses via the Toll-like Receptor 4/Myeloid Differentiation Factor-2 Complex. *J. Biol. Chem.*, 2017, **293**(37): 15378-15394. doi: 10.1074/jbc.M117.791780. 査読有り.

[学会発表](計9件)

本田 裕恵, 渡邊 康春, 長井 良憲, 松永 孝之, 岡本 直樹, 平井 嘉勝, 高津 聖志. 糖尿病モデルマウスの内臓脂肪組織に対するイソリクイリチゲニンの抗炎症・抗線維化作用の解析. 日本薬学会第 138 回年会. (2018 年 3 月 26 日, 金沢駅にてなしドーム 地下イベント広場)

Nagai Y, Okamoto N, Takatsu K. Funiculosin variants and their synthetic derivatives are novel agonists for murine and human TLR4/MD-2 complex: Potential reagents for developing vaccine adjuvants. Basel Life 2017. (12 September 2017, Basel, Switzerland)

岡本 直樹. 新規 TLR リガンドを活用し

た自然免疫増強剤及び炎症抑制剤の開発. 北陸ライフサイエンスクラスター成果報告会ポスターセッション. (2017 年 7 月 31 日, ホテル日航金沢)

岡本 直樹. 新規 TLR リガンドを活用した自然免疫増強剤及び炎症抑制剤の開発. 北陸ライフサイエンスクラスター推進協議会ポスターセッション. (2017 年 2 月 15 日, 金沢都ホテル)

Okamoto N, Honda H, Nagai Y, Takatsu K. Agonistic effects of synthetic derivatives of funiculosin on mouse/human TLR4/MD-2. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. (5 December 2016, Okinawa Convention Center)

高津 聖志, 長井 良憲, 岡本 直樹. 免疫難病の治療を目指した天然薬物シースによる創薬開発. 北陸技術交流テクノフェア 2016. (2016 年 10 月 20 日, 福井県産業会館)

岡本 直樹. 土壌菌由来フニコロシン類縁体が自然免疫受容体 TLR4 を活性化するメカニズムの解明. Toyama Science GALA 2016. (2016 年 9 月 30 日, 富山大学)

本田 裕恵, 渡邊 康春, 長井 良憲, 松永 孝之, 岡本 直樹, 平井 嘉勝, 高津 聖志. 甘草成分イソリクイリチゲニンは内臓脂肪組織の炎症・線維化を抑制する. 日本生薬学会第 63 回年会. (2016 年 9 月 25 日, 富山国際会議場)

岡本 直樹. Toll 様受容体 7 を標的とした自己免疫病治療薬の創薬研究. 第 43 回研究会フォーラム富山「創薬」. (2016 年 5 月 12 日, ホテルグランテラス富山)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: トール様受容体 7 または トール様受容体 9 の活性化阻害剤

発明者: 高津 聖志, 長井 良憲, 岡本 直樹, 小林 雄一, 藤下 繁人

権利者: 国立大学法人富山大学, 国立大学法人東京工業大学, テイカ製薬株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/077496

出願年月日: 平成 28 年 9 月 17 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 直樹 (OKAMOTO, Naoki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・研究員

研究者番号: 80727488

(2)研究協力者

多喜 博文 (TAKI, Hirofumi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号：10240780

伊藤 量基 (ITO, Tomoki)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70434826

大戸 梅治 (OHTO, Umeharu)
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：90451856