

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07124

研究課題名（和文）TLR7の活性化を選択的に阻害する革新的な自己免疫病治療薬の創製

研究課題名（英文）Development of novel autoimmune therapeutics that selectively inhibit TLR7 activation

研究代表者

長井 良憲（NAGAI, Yoshinori）

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：30431761

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウス樹状細胞を用いて、2つの新規合成誘導体がmicroRNA刺激によるTLR7活性化を抑制することを確認した。また、これらの誘導体が健康人樹状細胞及びSLE患者単核球におけるTLR7活性化を抑制することも確認した。また、クライオ電顕及び分子動力学シミュレーションにより、合成誘導体B2-24-4-5AがTLR7二量体化構造と安定的に結合することを明らかにした。さらに、SLEモデルマウスNZB/WF1マウスへの合成誘導体B2-24-4投与が血清抗Sm抗体価や糸球体腎炎、尿タンパク量を有意に改善すること、またB2-24-4-5A投与がマウスの生存率を大幅に改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、合成誘導体B2-24-4及びB2-24-4-5Aが内因性リガンドによるTLR7活性化を阻害することを明らかにするとともに、SLEモデルマウスにおいて顕著な抗SLE作用を示すことを明らかにした。また、クライオ電顕とMDシミュレーションの解析から、B2-24-4-5AのTLR7阻害機序の一端を明らかにすることができた。今後は、開発化合物として絞り込んだB2-24-4-5Aを用いて安全性試験/毒性試験を実施後、ヒト臨床試験を開始する予定である。更なる研究の推進により、革新的なSLE治療薬の開発に繋がり、近い将来SLE診療に大きなインパクト・貢献をもたらすことが期待できる

研究成果の概要（英文）：Using mouse dendritic cells, we confirmed that two newly synthesized derivatives inhibit microRNA-stimulated TLR7 activation. We also confirmed that these derivatives inhibit TLR7 activation in human dendritic cells from healthy donors and mononuclear cells from SLE patients. Cryo-EM analysis and molecular dynamics simulations revealed that the synthetic derivative B2-24-4-5A stably binds to the TLR7 dimerization structure. Furthermore, we found that administration of the synthetic derivative B2-24-4 to NZB/WF1 mice significantly improved serum anti-Sm antibody titer, glomerulonephritis, and urinary protein levels, and that administration of B2-24-4-5A significantly improved mouse survival rate.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 Toll-like receptor 全身性エリテマトーデス 低分子化合物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫病の全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus : SLE) は厚生労働省の指定難病の一つであり、これまでに承認された治療薬は少なく、医療ニーズが存在する重要な疾患である。これまでに抗炎症剤、ステロイド剤、免疫抑制剤、抗マラリア剤、一部の抗体医薬が病態寛解維持のために使用されてきたが、不十分な治療効果、副作用の発現と高額な医療費が問題であり、新しいタイプの SLE 治療薬の開発が求められている。

近年、SLE 治療の標的分子として、自然免疫系の核酸センサーである Toll-like receptor 7 (Toll 様受容体 7 : TLR7) が脚光を浴びている。死細胞や組織障害に由来する microRNA 等の自己 RNA の過剰な蓄積が、形質細胞様樹状細胞に高発現する TLR7 の異常活性化とそれに続く多量の型インターフェロン (IFN) の産生及び自己抗体の産生を誘導することから、TLR7 が SLE の発症や増悪に極めて重要な役割を果たすことが明らかにされている。一方、TLR7 は細胞内のエンドソームに発現するため、抗体が到達しにくく、抗体医薬の開発は不相当と考えられている。

そこで研究代表者は、TLR7 の異常活性化阻害には低分子化合物が有用であると着想した。約 1,600 種類の天然薬物・化合物をスクリーニングした結果、TLR7 選択的な阻害作用を持つ世界で初めての低分子化合物としてシクロバクチオール化合物 (コードネーム : CB-7) を見だし、知的財産を確保した (特願 2015-184215、PCT/JP2016/077496)。CB-7 をリード化合物とした最適化合成を、日本医療研究開発機構 (AMED) の産学連携医療イノベーション創出プログラム (課題 ID:17938337) にて実施した結果 (H29.10~H31.3) CB-7 よりも強い TLR7 阻害活性をもつ誘導体を 16 個合成することに成功し、最も強い活性をもつ新規誘導体の TLR7 阻害活性は、リード化合物の約 30 倍と飛躍的に向上した。しかし、当該誘導体が強い TLR7 阻害活性を示す分子機序及び動物レベルでの有効性、ヒト TLR7 に対する阻害効果は全く未解決であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、TLR7 の活性化を選択的且つ強力に阻害する低分子化合物の分子機序を解明し、アンメットメディカルニーズが高い SLE に対する革新的な治療薬シーズを確立することを目的とした。具体的には以下の 3 項目について研究計画を進めた。

- 1) 新規合成誘導体による TLR7 活性化選択的阻害作用の分子機序の解明
- 2) 新規合成誘導体によるヒト TLR7 活性化阻害の検証
- 3) SLE モデルマウスにおける新規合成誘導体の有効性評価の検証

### 3. 研究の方法

(1) 新規合成誘導体による TLR7 活性化選択的阻害作用の分子機序の解明 : TLR7 と合成誘導体 (コードネーム : B2-24-4、B2-24-4-5A) との結合について、カロリメトリー法及びクライオ電顕、分子動力学的 (MD) シミュレーションを用いて検証した。TLR7 精製蛋白は研究協力者の大戸 (東大薬) により供与され、カロリメトリー法とクライオ電顕の解析は大戸により実施された。MD シミュレーションは研究協力者の広川 (産総研) が実施した。MD シミュレーションは、大戸が解明したブタ TLR7 と B2-24-4-5A とのクライオ電顕の解析結果を参考に実施した。

(2) 新規合成誘導体によるヒト TLR7 活性化阻害の検証 : SLE 患者より末梢血単核球 (PBMC) を、健康人末梢血より形質細胞様樹状細胞 (pDC) を単離し、これらの細胞における TLR7 活性化を B2-24-4 及び B2-24-4-5A が阻害することを ELISA 法やリアルタイム PCR 法で検証した。型 IFN の産生及び発現を活性化の指標とした。SLE 患者末梢血は研究分担者である多喜及び篠田 (富山大) より供与され、本学で PBMC を単離し、培養を行った。pDC はセルソーターを用いて単離された。

(3) SLE モデルマウスにおける新規合成誘導体の有効性評価の検証 : 古典的な SLE モデルマウスであり、TLR7 依存的に SLE 症状を呈することが示されている NZB/WF1 マウスを用いて、合成誘導体の有効性を評価した。B2-24-4 または B2-24-4-5A を NZB/WF1 マウスに経口投与し、血清抗二本鎖 DNA 抗体価や糸球体腎炎の改善効果を ELISA 法や病理組織切片、尿タンパクの測定等を用いて解析し、さらに生存率に与える影響を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 新規合成誘導体による TLR7 活性化選択的阻害作用の分子機序の解明 : TLR7 と B2-24-4 または B2-24-4-5A との結合について、カロリメトリー法を用いて検証した。しかし、いずれの場合も熱産生が観察されず、両者の相互作用に関するデータを得ることができなかった。そこで、代謝安定性が良好であった B2-24-4-5A を用いて、ブタ TLR7 との結合をクライオ電顕を用いて検証した。その結果、B2-24-4-5A は TLR7 二量体と 2 か所で結合し、その部位は既報の化合物 Cpd7 の結合位置と類似していた (Nat Commun 11, Article number 5204, 2020)。さらに MD シミュレーションを用いて解析した結果、B2-24-4-5A は TLR7 二量体化構造と安定的に結合することが示唆された。一方、TLR7 単量体とは結合が解離する傾向を確認した。

(2)新規合成誘導体によるヒト TLR7 活性化阻害の検証：SLE 患者末梢血より PBMC を単離し、合成 TLR7 リガンド gardiquimod による IL-6 産生を合成誘導体が抑制するかどうか検討した。その結果、B2-24-4 及び B2-24-4-5A が濃度依存的に IL-6 産生を抑制することを確認した。また、内因性 TLR7 リガンド候補である microRNA の一つ miR574 を合成し、合成誘導体が miR574 による TLR7 活性化を阻害するかどうか、SLE 患者 PBMC 及び健常人 pDC を用いて解析した。その結果、B2-24-4 及び B2-24-4-5A が miR574 刺激による SLE 患者 PBMC の TNF- $\alpha$  発現誘導及び健常人 pDC の IFN- $\gamma$  産生を抑制することを明らかにした。

(3)SLE モデルマウスにおける新規合成誘導体の有効性評価の検証：NZB/WF1 マウス腎臓の病理組織学的評価を行うために、まず予備的な検討を行った。野生型 C57BL/6 マウス及び高齡 NZB/WF1 マウス (40 週齡) より腎臓を採取し、PAS 染色及び IgG 蛍光染色を実施した。その結果、高齡 NZB/WF1 マウスの腎臓において、糸球体における管内増殖やワイヤーループ病変などのループス腎炎に特徴的な病理学的変化や糸球体における IgG の沈着が認められた。一方、C57BL/6 マウスの腎臓ではこれらの所見を認めなかった。そこで、B2-24-4 の薬効を評価するために、20 週齡の NZB/WF1 マウスに B2-24-4 を 10 mg/kg で連日経口投与し、15 週間後に腎臓及び血清、尿を採取し解析した。溶媒 (生理食塩水) 投与群と比べて、B2-24-4 投与群では血清抗 Sm 抗体価や糸球体腎炎、尿タンパク量が有意に改善した。次に、B2-24-4-5A の生存率に与える影響を評価した。20 週齡の NZB/WF1 マウスに B2-24-4-5A または対照薬としてヒドロキシクロロキンを 10 mg/kg で 24 週間連日経口投与した。その結果、24 週間後の生存率は溶媒 (生理食塩水) 投与群では 10%、ヒドロキシクロロキン投与群では 35%であったが、B2-24-4-5A 投与群では 85%と大幅に改善した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Masashi, Kaizawa Taro, Yoda Taiki, Oyama Takuro, Asakura Reina, Matsumoto Shun, Nagai Yoshinori, Watanabe Yasuharu, Watanabe Shiro, Kobayashi Hiroshi, Kawaguchi Kosuke, Yamamoto Seiji, Shimozawa Nobuyuki, So Takanori, Imanaka Tsuneo	4. 巻 N.A.
2. 論文標題 Bone marrow transplantation into Abcd1 deficient mice: Distribution of donor derived cells and biological characterization of the brain of the recipient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Yasuharu, Nagai Yoshinori, Honda Hiroe, Okamoto Naoki, Yanagibashi Tsutomu, Ogasawara Masaru, Yamamoto Seiji, Imamura Ryu, Takasaki Ichiro, Hara Hiromitsu, Sasahara Masakiyo, Arita Makoto, Hida Shigeaki, Taniguchi Shun'ichiro, Suda Takashi, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 11821 ~ 11835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900477RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisaka Shiho, Usui Isao, Nawaz Allah, Igarashi Yoshiko, Okabe Keisuke, Furusawa Yukihiro, Watanabe Shiro, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Watanabe Yoshiyuki, Nagai Yoshinori, Yagi Kunimasa, Nakagawa Takashi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of Akkermansia muciniphila and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62506-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 長井良憲、渡邊康春、高津聖志	4. 巻 72
2. 論文標題 IL-1による脂肪組織の炎症における好中球の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara Masaru, Yamasaki-Yashiki Shino, Hamada Masahiro, Yamaguchi-Miyamoto Tomomi, Kawasuji Toru, Honda Hiroe, Yanagibashi Tsutomu, Ikutani Masashi, Watanabe Yasuharu, Fujimoto Ryota, Matsunaga Takayuki, Nakajima Noriyuki, Nagai Yoshinori, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Betulin Attenuates TGF- 1- and PGE<sub>2</sub>-Mediated Inhibition of NK Cell Activity to Suppress Tumor Progression and Metastasis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 339 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Riko, Furusawa Yukihiro, Honda Hiroe, Watanabe Yasuharu, Fujisaka Shiho, Nishikawa Miyu, Ikushiro Shinichi, Kurihara Shin, Tabuchi Yoshiaki, Tobe Kazuyuki, Takatsu Kiyoshi, Nagai Yoshinori	4. 巻 66
2. 論文標題 Isoliquiritigenin Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome by Modifying Gut Bacteria Composition in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 2101119 ~ 2101119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.202101119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊康春、長井良憲、高津聖志
2. 発表標題 TLRのアダプター分子TRIFを介した摂食調節異常・視床下部炎症の解析
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長井良憲、渡邊康春、高津聖志
2. 発表標題 内臓脂肪組織炎症における好中球と脂肪細胞とのクロストーク
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長井良憲
2. 発表標題 TLR7を標的にしたSLE治療薬の開発
3. 学会等名 BioJapan2019 医療分野研究成果展開事業 産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-M/MS) 第2回成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Yanagibashi, M. Ikutani, Y. Nagai, K. Takatsu
2. 発表標題 Vitamin A-dependent IL-33 production maintains IL-5-producing ILC2s in the large intestine
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Riko Ishibash, Yukihiro Furusawa, Hiroe Honda, Yoshinori Nagai
2. 発表標題 A licorice-derived ingredient ameliorates metabolic syndrome through the alteration of gut microbiota
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kasai Kaichi, Yuki Tada, Yukihiro Furusawa, Koichi Tsuneyama, Yoshinori Nagai
2. 発表標題 Analysis of gut microbiota and intestinal immune cells in a newly established dietary model of non-alcoholic steatohepatitis, "3-F mice"
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Tada, Kaichi Kasai, Koichi Tsuneyama, Yoshinori Nagai
2. 発表標題 Analysis of liver macrophage subsets during the development of a newly established dietary model of non-alcoholic steatohepatitis, "3-F mice"
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋璃子, 古澤之裕, 本田裕恵, 渡邊康春, 藤坂志帆, 戸邊一之, 高津聖志, 栗原新, 田淵圭章, 長井良憲
2. 発表標題 イソクイリチゲニンによる腸内細菌叢の変動を介したメタボリックシンドロームの改善
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葛西海智, 古澤之裕, 多田有希, 五十嵐直哉, 渡辺志朗, 市村-清水真祐子, 常山幸一, 長井良憲
2. 発表標題 線維化亢進非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス "3-Fマウス" における腸内細菌叢及び胆汁酸組成の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山県立大学工学部医薬品工学科 バイオ医薬品工学講座 長井研究室  
<https://www.pu-toyama.ac.jp/PH/nagai/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	多喜 博文  (TAKI Hirofumi)  (10240780)	富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授    (13201)	
研究分担者	篠田 晃一郎  (SHINODA Koichiro)  (40377312)	富山大学・学術研究部医学系・講師    (13201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大戸 梅治  (OUTO Umeharu)		
研究協力者	広川 貴次  (HIROKAWA Takatsugu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関