

平成30年6月28日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19575

研究課題名(和文) 関節リウマチに対する次世代免疫治療カルシウム阻害薬の有用性に関する検討

研究課題名(英文) The efficacy of calcium release-activated calcium channel inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis

研究代表者

劉爽(Liu, Shuang)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60403812

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)：本研究は、関節リウマチ(RA)の新規免疫抑制剤の開発を目指して、ストア作動性カルシウムチャネル(CRAC)の阻害薬(低分子化合物(YM-58483)、抗体製剤、核酸製剤)を患者由来免疫細胞や患者関節組織が移植されたヒト型RAモデルに投与し、T細胞やB細胞における免疫抑制効果や、破骨細胞における溶骨効果の抑制などの免疫抑制効果が確認できた。本研究結果により、CRAC阻害剤は、多標的の新規免疫抑制薬として、RAの治療アプローチに期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the inhibitors of calcium release-activated calcium channel (CRAC), including small molecular compound YM-58483, neutralizing antibody, and shor-harpin RNA, were used to investigate the feasibility in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). The efficacy of CRAC inhibitors was demonstrated according to the results of this study. The CRAC inhibitors are expected as a group of new globe immunosuppressants.

研究分野：薬理学

キーワード：カルシウムチャネル阻害剤 免疫抑制剤 関節リウマチ 抗体製剤 核酸製剤 Short-hairpin RNA

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、全身の関節の慢性炎症と進行性関節破壊をきたす原因不明の自己免疫疾患であり、病因や病態の解明が進んでいる。本研究は、ストア作動性  $Ca^{2+}$  チャネル (CRAC) 阻害薬を新たな分子標的薬の有力候補として取り上げていた。CRAC は免疫細胞膜に局在する  $Ca^{2+}$  流入を制御する膜チャネルタンパク質である。ヒトでは、CRAC は主に免疫担当細胞や血管内皮細胞を始めとする非興奮性細胞に発現しており、これらの細胞の活性化、誘導分化など基本的な細胞機能において重要な役割を果たしている。申請者はその発見者である Jean-Pierre Kinet 教授 (米国、ハーバード大・病理) の元に留学し、ヒト免疫細胞 (T 細胞、B 細胞、マクロファージなど) における CRAC の機能解析や制御について基礎的な研究を経験があり、リウマチ疾患における CRAC の関与に関する臨床研究を行ってきた。収集症例数 100 人を超える全例調査を施行し、変形性関節症 (非免疫的病因) 患者由来の T 細胞と比べ、RA 患者由来 T 細胞では、CRAC 発現が増加しており、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入がより増加していることが明らかになった。核酸製剤 (shRNA) を活動型 RA 患者由来 T 細胞に投与することにより、RA 病態と関連する炎症因子の異常遊離を抑えることができた。臨床研究の結果により、CRAC 調節機構の異常は、細胞の増殖及び機能に影響を及ぼし、T 細胞が原因と考えられる免疫反応の亢進と RA 病態の増悪の要因になる可能性が非常に高いことを示している。基礎研究では、コラーゲン誘導性関節リウマチモデル (CIA) マウスに CRAC 抑制剤 (低分子製剤、核酸製剤) を投与し、症状スコアと画像分析の結果により、炎症の進展、関節の破壊、骨吸収が有意に抑えられていることが明らかになった。本研究は、これらの臨床及び基礎研究の結果に基づき、関節リウマチの治療応用を目的として、CRAC を新たな標的分子として取り上げ、自己免疫亢進と骨関節破壊の抑制効果について検証する目的で研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

目標に基づいた治療 (Treat to Target) という関節リウマチ (RA) の基本治療原則に基づき、本研究は、CRAC 阻害薬を新たな分子標的薬の有力候補として取り上げる。RA 由来免疫担当細胞において、CRAC 阻害薬 (申請者が独自で作製した特異的抗体製剤を含む) を RA 患者由来免疫担当細胞 (in vitro) およびヒト化動物 RA モデル (in vivo) に投与することにより、炎症抑制作用と関節 (骨) 破壊の抑制作用を主な評価項目とし、CRAC 阻害薬の薬理効果を検証する。臨床エビデンスを取得しながら、RA を始めとする自己免

疫疾患の治療において、CRAC 阻害薬の有効性を実証することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、CRAC 阻害薬の有用性を検証するため、ヒト (患者、及び健常者) 由来の末梢血を用い、RA 発症に関わる T、B 細胞、ならびに破骨細胞を採取 (誘導) した。培養実験系において、CRAC 阻害薬を投与し、細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルを調節することにより、RA 病態に関連する評価項目をもって CRAC 阻害薬の薬理作用を解析した。さらに、患者由来滑膜組織や末梢血細胞を免疫不全 (SCID) マウスに移植することにより、in vivo ヒト RA 研究モデルを用いて、CRAC 阻害薬の薬理作用を検証した。

## 4. 研究成果

本研究に用いる CRAC 阻害薬は低分子化合物 (YM-58483)、核酸製剤 (レンチウイルス誘導性剤) および抗ヒト CRACM1 - IgG とする。本研究の収集症例数: 全血 (30 例: 健常人 10 例、RA 患者 20 例)、関節滑膜組織、及び関節液: RA 患者 11 例)。

(1). 患者由来 T 細胞において、CRAC チャネル機能阻害により、炎症性サイトカインの遊離が抑えられ、細胞増殖が抑制されたことが確認した。YM-58483、CRACM1-shRNA、CRACM1-IgG を用いて、pan T 細胞を処理し、濃度 反応を解析した結果、炎症性サイトカインが有意抑えられ、炎症抑制性サイトカイン (IL-10) の遊離が増加したことが分かった。しかし、高濃度阻害剤による CRAC 機能の高度阻害により、炎症抑制性サイトカイン (IL-10) の遊離まで抑えられたことが明らかになった。

(2). 患者由来末梢血単核球を用いた機能解析結果により、B 細胞から分泌される免疫グロブリン (IgG と IgM) の産生量が CRAC 阻害剤により、濃度依存的に抑制されたことが分かった。CRAC 阻害剤によるリウマトイド因子 (RF) の産生阻害も確認できた。

(3). ヒト破骨細胞を誘導分化し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを活性化マーカーとして検出した結果により、CRAC 阻害剤を投与することにより、破骨細胞多核化の誘導が阻害された。骨切片を用いた溶骨作用の解析において、CRAC 阻害剤は破骨細胞の溶骨作用を止めたことが分かった。

(4). In vivo 研究において、RA 患者末梢血由来細胞・血清、及び関節滑膜組織を免疫不全 (SCID) マウスに移植し、ヒト化 RA モデルを作成した。この異種移植モデルにおいて、ヒト T 細胞、B 細胞、単核細胞、骨髓細胞、

造血幹細胞の生存が確認され、マウス血中において、ヒト RF、IL-6、MCP-1 が検出できた。移植された関節軟骨・骨に、炎症細胞浸潤された滑膜の侵入・破壊が認められた。

(5). 皮下植入ポンプを用いて、CRAC 阻害剤を長期（1 か月）持続投与することにより、異種移植モデルにおける末梢血中 RF、IL-6、及び MCP-1 の発現量が抑えられ、滑膜により軟骨・骨への侵入・破壊が抑制されたことが確認できた。CRAC 阻害剤を投与することにより、RA の病態が改善された。

(6). CRAC 阻害剤を生体に投与することにより、糖耐能の異常が確認され、高血糖を誘発する恐れがあることも分かった。今後、CRAC 阻害剤誘発性高血糖症の発症機序を解明した上、CRAC 阻害剤の安全評価を行う予定です。

以上の研究結果により、RA において、CRAC 阻害剤の免疫抑制効果や軟骨・骨破壊阻止効果などが確認された。今後、生体投与の安全評価を行った上、臨床応用の可能性についてさらに検討して行きたいと考える。

#### 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 9 件)

1. Zoledronate modulates intracellular vesicle trafficking in mast cells via disturbing the interaction of myosinVa/Rab3a and syntaxin4/VAMP7.

Liu S, Sahid M.N.A, Takemasa E, Maeyama K, Mogi M.

**Biochem Pharmacol** 2018 (in press) 査読有

2. Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycosomes.

Suzuki Y, Ogasawara T, Takeda Y, Sawasaki T, Mogi M, Liu S, Maeyama K

**Frontier Pharmacol** 2018 9:38 査読有

3. Inhibition of the mevalonate pathway by simvastatin interferes with mast cell degranulation by disrupting the interaction between Rab27a and double C2 alpha proteins.

Sahid M.N.A, Liu S, Kiyoi T, Maeyama K

**Eur J Pharmacol** 2018 814:255-263 査読有

4. Efficacy of Constant Long-term Delivery of YM-58483 for the Treatment of Rheumatoid Arthritis

Miyoshi M, Liu S, Morizane A, Takemasa E, Suzuki Y, Kiyoi T, Maeyama K

**Eur J Pharmacol**. 2018 824:89-98 査読有

5. Efficiency and Safety of CRAC Inhibitors in Human Rheumatoid Arthritis Xenograft Models.

Liu S, Hasegawa H, Takemasa E, Suzuki Y, Oka K, Kiyoi T, Takeda H, Ogasawara T, Sawasaki T, Yasukawa M, Maeyama K

**J Immunol**. 2017 199:1584-1595 査読有

6. Intra-articular lentivirus-mediated gene therapy targeting CRACM1 for the treatment of collagen-induced arthritis

Liu S, Kiyoi T, Takemasa E, Maeyama K.

**J Pharmacol Sci**. 2017 133:130-138 査読有

7. Gene Therapy for Rheumatoid Arthritis

Liu S, Maeyama K

**Crit Rev Immunol**. 2016 36:149-161 査読有

8. CRACM3 regulates the stability of non-excitabile exocytotic vesicle fusion pores in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner via molecular interaction with syntaxin4

Liu S, Sahid MNA, Takemasa E, Kiyoi T, K, Kuno M, Oshima Y, Maeyama K

**Sci Rep**, 2016, 6:28133 査読有

9. Lentivirus-Mediated Delivery of Short Hairpin RNA Targeting Calcium Release-Activated Calcium Channel 3 as Gene Therapy for Collagen-Induced Arthritis,

Liu S, Kiyoi T, Takemasa E, Maeyama K

**J Immunology** 2015, 194:76-83 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 劉爽、長谷川均、清井武志、前山一隆  
The inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through calcium release-activated calcium channel in the treatment of rheumatoid arthritis

第 90 回日本薬理学会年会  
2017.3 長崎

2. Liu S, Hasegawa H, Takemasa E, Suzuki Y, Oka K, Kiyoi T, Takeda H, Ogasawara T, Sawasaki T, Yasukawa M, Maeyama K

The efficiency of the regulation of Ca<sup>2+</sup> entry through calcium release-activated calcium channel in the treatment of rheumatoid arthritis

American College of Rheumatology Annual

Meeting  
2016.11 Washington D.C (USA)

3. 劉爽、清井武志、前山一隆  
Intra-articular treatment of short  
hairpin RNA targeting calcium  
release-activated  
calcium channel 1 in collagen-induced  
arthritis mice  
第 89 回日本薬理学会年会  
2016.3 横浜

4. Trivadila Trivadila, Muhammad Norrizal  
Abdi Sahid, 劉爽、前山一隆  
Histamine uptake mechanism in mast cells  
via uptake-2 system transporters  
第 89 回日本薬理学会年会  
2016.3 横浜

5. 森實あすか、三好真綾、劉爽、清井武志、  
前山一隆  
The therapeutic effect of YM-58483 on  
collagen-induced arthritis mice  
第 89 回日本薬理学会年会  
2016.3 横浜

6. Muhammad Norrizal Abdi Sahid, Trivadila  
Trivadila, 劉爽、清井武志、前山一隆  
Characterization of receptors responsible  
for basic compound-activation on mast  
cells  
第 89 回日本薬理学会年会  
2016.3 横浜

7. 三好真綾、森實あすか、劉爽、清井武志、  
前山一隆  
YM-58483 の有効投与方法と関節炎治療効果  
の検討  
日本薬学会第 136 年会  
2016.3 横浜

〔図書〕(計 1 件)

1. Liu S  
Rheumatoid Arthritis: Methods and  
Protocols  
Springer (in press)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
劉 爽 (Ryu, Shuan)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60403812