

令和元年12月19日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09905

研究課題名(和文) シェーグレン症候群の病態に關与するイオンチャンネルの網羅的解析と治療標的の探索

研究課題名(英文) Exploration of therapeutic targets which are involved in the pathogenesis of Sjogren's syndrome aiming at ion channels.

研究代表者

吉本 桂子 (Yoshimoto, Keiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：20383292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはシェーグレン症候群の病態に關与しているB細胞活性化因子(BAFF)がその受容体(BR3)と結合しイオンチャンネルを介した経路で単球やB細胞を活性化することを見出し、イオンチャンネルを同定しこの機序を阻害する化合物を得た。当該化合物はin vitroで患者単球上のイオンチャンネルを介して単球でのBAFF-BR3シグナルを阻害することによりB細胞の活性化を抑制し、自己免疫疾患モデルマウスでの自己抗体産生を抑制し、病態を軽減することが明らかとなった。さらに当該化合物の構造類似体はin vitroにおけるBAFFによる単球やB細胞の活性化に対してより強い抑制作用を有する知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は免疫難病であるシェーグレン症候群(SS)の患者単球の異常活性化機構と病態への關与を明らかにするものである。具体的には患者末梢血単球で発現が亢進しているイオンチャンネル同定し、これを介したシグナルとBAFFシグナルの關与を明らかにした。さらに研究代表者らはこの機構を阻害する作用を有する独自の化合物を得て、SSモデル動物での薬効薬理試験を実施し、有効性を検証することに成功した。本研究はSSの発症メカニズムを明らかにするという点で学術的に有意義であるばかりでなく、きわめて独創性の高い治療標的を見出すことにつながり、SSの新規な治療法の開発という点においても有用である。

研究成果の概要(英文)：BAFF and its receptor (BR3) are involved in the pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS). We demonstrated that the expression levels of BR3 and a voltage-gated sodium channel in SS monocytes were significantly higher than those of healthy controls and that elevation was correlated with serum IgG level of the patients. In addition, we have successfully discovered a low molecular weight compound which has inhibitory activities against both BAFF signaling pathways and a sodium channel. In this study, we tested the effects of this compound on production of autoantibodies and inflammatory cytokines by using autoimmune model mice. As a results, we found that this compound inhibited production of anti-dsDNA antibody and inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-10. Moreover, this compound also suppressed infiltration of B cells into the organs, such as lachrymal glands and kidney. Notably, we have found a novel compound which is expected more efficacy on the suppression of B cell function.

研究分野：免疫学

キーワード：シェーグレン症候群 BAFF BAFF受容体 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は国により難病指定された自己免疫疾患である。本邦では約 10 万人の患者がいるとされているが、確定診断に至っていないケースを含めると患者数はさらに多数であると推測される。SS の主な症状は唾液腺や涙腺など外分泌腺の障害が原因となる慢性唾液腺炎や乾燥性角結膜炎などであり、これらに加えて関節炎などの炎症や、原発性胆汁性肝硬変症、非ホジキンリンパ腫など多彩な症状が出現する場合もある。このような症状は患者の QOL を著しく害するが、病態形成機序が未だに不明であるため、著効を示す治療薬が存在せず、その開発が強く求められており、SS はアンメット・メディカルニーズの一つである。これまでの研究から、SS 患者の B 細胞の機能異常が組織で起こる種々の炎症反応の原因の一つと考えられている。実際 SS 患者では、血中 IgG 値が上昇すること、特に種々の自己抗体 (抗核抗体、リウマトイド因子など) が増加することが知られている。さらに近年では、B 細胞の活性化に強く関わる他の免疫担当細胞 (濾胞性 T 細胞、単球) の異常も報告されており、このような免疫機構の異常を制御できれば新規治療法の開発につながる可能性がある。研究代表者らはこれまでの研究で、(1) BAFF が単球を活性化して IL-6 産生を促進すること、(2) BAFF 刺激した SS 単球は正常単球に比べて大量の IL-6 を産生すること、(3) SS 患者の末梢単球では BAFF 受容体 (BR3) が異常に高発現しており、これが BAFF に対する SS 単球の異常応答の原因と考えられること、SS 患者では、単球の BR3 陽性率が血清 IgG 量と正の相関を示すこと等を明らかにした。SS 患者の症状の一つに高 IgG 血症があることから、異常単球による B 細胞の異常な活性化が SS の病態形成に極めて重要である可能性がある。これらの結果より、BAFF 刺激を加えた単球による IL-6 産生を阻害することが SS の治療につながる可能性があると考えた。

そこでヒト単球系培養細胞株である THP-1 を使用して、BAFF 刺激による IL-6 産生を阻害する物質を既承認薬ライブラリーの中からドラッグ・リポジショニングによって探索したところ、いくつかの医薬品に活性が認められた。興味深いことに、それらのうちいくつかは、ある種のイオンチャンネル阻害活性を作用機序としていた。さらにこれらの医薬品は単球と B 細胞の共培養による IgG 産生亢進も抑制することが判明した。自己免疫疾患の病態形成にイオンチャンネルが関与している可能性は示唆されているものの、その詳細は不明な点が多い。これらの知見に基づき研究代表者らは、SS の病態形成において BAFF シグナルとイオンチャンネル由来のシグナルが単球からの IL-6 産生に関与し、BAFF による B 細胞自身の活性化と相俟って、最終的に B 細胞が異常に活性化され、IgG 産生が亢進するという仮説を立てた (図 1)。

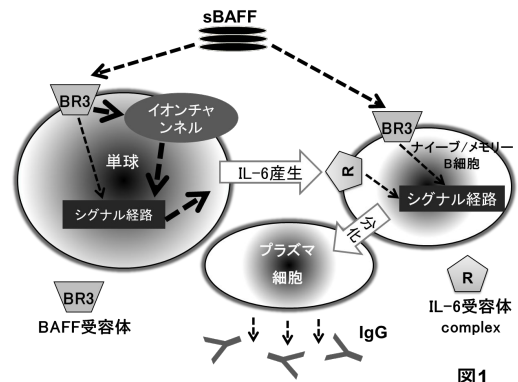


図 1

2. 研究の目的

本研究の第一義的な目的は、SS 単球の異常活性化に関与するイオンチャンネルを同定することである。このようなイオンチャンネルに対する阻害剤が IgG 産生も抑制すれば、直ちに SS 治療薬の候補になり得る。一方で、これらの阻害剤が未知の標的に作用して BAFF シグナルを阻害する可能性もある。そこでイオンチャンネル阻害活性と SS 単球の異常活性化抑制作用が相関するかについても検討する。また BAFF シグナルを阻害するイオンチャンネル阻害剤の既存薬の SS への適応拡大を目指して、モデル動物を用いた薬効試験を実施し、SS 治療薬への開発の可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、単球の異常活性化を抑制する化合物を医薬品リポジショニングにより網羅的に探索する。特にイオンチャンネル阻害薬について検討し、ヒットした医薬品の作用メカニズムを分子レベルで網羅的に解析する。具体的にはヒト単球細胞株 THP-1 を用いて BAFF 刺激による IL-6 産生の抑制効果を検討する。さらに B 細胞からの IgG 産生抑制効果を検討するため、BAFF 刺激を加えたヒト末梢血単球と B 細胞を阻害剤存在下で培養し、阻害剤の効果を検討する。また当該阻害剤を用いて SS モデル動物 (NOD マウス、MRL/lpr マウス、NZBWF1 マウス) を用いた自己抗体産生抑制効果を検討する薬効薬理試験および病理解析等を行うことにより、動物レベルでの Proof of concept を取得する。

4. 研究成果

本研究では、シェーグレン症候群 (SS) の病態に深く関わる B 細胞活性化因子 (BAFF) がその受容体 (BR3) と結合しイオンチャンネルを介した経路で単球や B 細胞を活性化し、病態形成に関与することを見出し、この機序を阻害する既承認医薬品および研究グループ独自の化合物を得ることに成功した。具体的には下記の項目について明らかにした。

(1) 全血を用いた FACS 解析により健康人単球と比較して pSS 患者単球上に有意に発現が亢進し

ているイオンチャンネルを見出した (図2)。

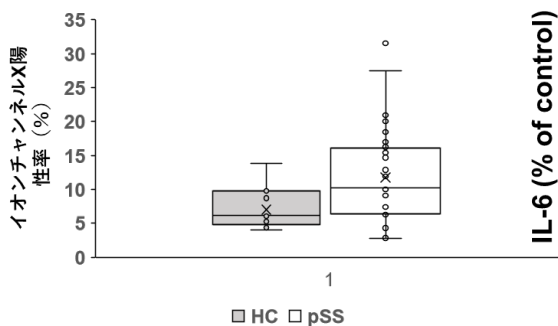


図2：末梢血単球中のイオンチャンネルX発現陽性率

により誘導される IL-6 産生に対し、抑制作用を示すイオンチャンネル阻害作用を有する既承認医薬品と研究グループが独自に所有する化合物を数種 (A~D) 見出した (図3)。

(3) これらの医薬品や化合物が *in vitro* 評価系を用いて患者末梢血単球を介して B 細胞の活性化を抑制することを見出した (図4)。具体的には BAFF により刺激を受けた単球と B 細胞の共培養による IgG 産生に対し、抑制作用を示した。

(4) 自己抗体産生モデルである MRL/lpr マウスを用いて、所有する当該化合物の薬効試験を実施した。具体的には投与開始時 9 週齢のマウスに 0.2 および 1mg/kg の当該化合物を週 3 回で 32 週間腹腔内投与を実施した。この結果、所有する化合物が脾臓

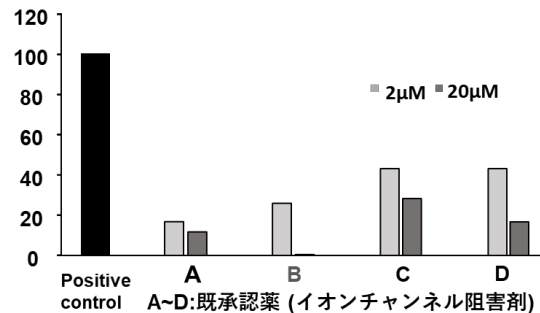


図3：THP-1からのBAFF誘導IL-6産生に対する阻害作用

(2) ヒト単球系細胞株 THP-1 を用いた BAFF

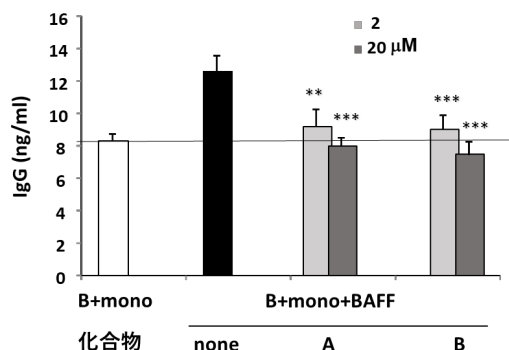


図4：BAFF刺激単球とB細胞の共培養によるIgG産生への抑制効果

B 細胞を減少させ、涙腺や腎臓などの組織への B 細胞浸潤を抑制することを見出した (図5)。

(5) 構造変換により得られたいくつかの構造類似体のうち化合物 C は *in vitro* における BAFF による単球からの IL-6 産生促進作用や BAFF 刺激単球と B 細胞の共培養による IgG 産生および *in vitro* での B 細胞分化評価系に対してより強い抑制作用を有することが明らかになった (図6、図7)。

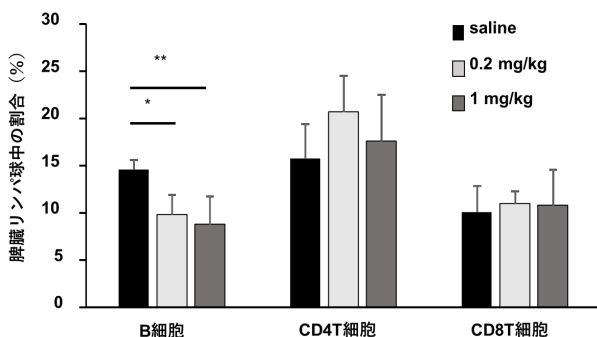


図5：化合物投与マウス脾臓リンパ球中のB、CD4T、CD8T細胞の割合

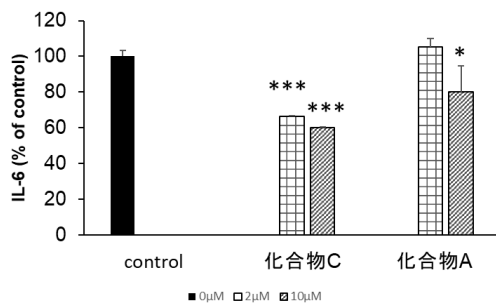


図6：ヒト単球からのBAFFによるIL-6産生に対する抑制効果

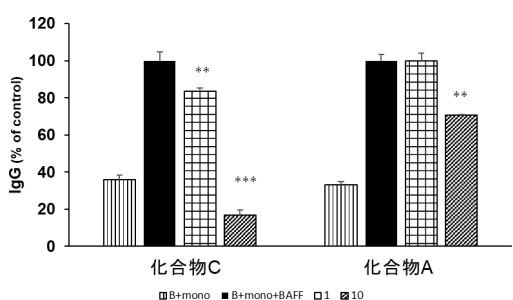


図7：BAFF刺激ヒト単球とB細胞の共培養によるIgG産生に対する抑制効果

(6) 結論：シェーグレン症候群患者末梢血単球ではイオンチャンネルと BAFF 受容体の発現が亢進しており、BAFF により刺激を受けた単球は BAFF シグナル経路とイオンチャンネルを介したシグナル経路を活性化して、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を亢進し、B 細胞の活性化を促進することが明らかとなった。BAFF シグナルとイオンチャンネル機能に対して抑制的に作用する化合物は動物モデルでも B 細胞の活性化を抑制することが明らかとなり、これらの化合物はシェーグレン症候群の治療薬として有望な候補となり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Saito S, Suzuki K, Yoshimoto K, Kaneko Y, Yamaoka K, Shimizu T, Mori, Okamoto S, Kameyama K, Amano K, Tamaru J, Tokuhira M, Takeuchi T. ; Restoration of Decreased

- T Helper 1 and CD8+ T Cell Subsets Is Associated With Regression of Lymphoproliferative Disorders Developed During Methotrexate Treatment. *Frontiers in Immunology*, 査読有, Vol.9, 2018 ; 621. DOI; 10.3389/fimmu.2018.00621
2. Tasaki S, Suzuki K, Kassai Y, Takeshita M, Murota A, Kondo Y, Ando T, Nakayama Y, Okuzono Y, Takiguchi M, Kurisu R, Miyazaki T, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Morita R, Yoshimura A, Toyoshiba H, Takeuchi T. Multi-omics monitoring of drug response in rheumatoid arthritis in pursuit of molecular remission. *Nat Commun*. 査読有, Vol.9 (1), 2018. DOI; 10.1038/s41467-018-05044-4.
 3. Akiyama M, Yasuoka H, Yoshimoto K, Takeuchi T., Interleukin-4 contributes to the shift of balance of IgG subclasses toward IgG4 in IgG4-related disease. *Cytokine*, 査読有, Vol.110, 2018; 416-419, DOI; 10.1016/j.cyto.2018.05.009.
 4. Ishioka-Takei E, Yoshimoto K, Suzuki K, Nishikawa A, Yasuoka H, Yamaoka K, Takeuchi T. Increased proportion of a CD38^{high}IgD⁺ B cell subset in peripheral blood is associated with clinical and immunological features in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*. 査読有, 187:85-91, 2018, DOI; 10.1016/j.clim.2017.10.008.
 5. Akiyama M, Yasuoka H, Yoshimoto K, Takeuchi T. CC-chemokine ligand 18 is a useful biomarker associated with disease activity in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis*. 査読有, 2017 Oct 13. pii: annrheumdis-2017-212110, 2017, DOI; 10.1136/annrheumdis-2017-212110.
 6. Saito S, Suzuki K, Yoshimoto K, Kaneko Y, Matsumoto Y, Yamaoka K, Takeuchi T. A new bioassay for measuring the strength of IL-6/STAT3 signal inhibition by tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 査読有, 2017 Oct 17;19(1):231. 2017, DOI; 10.1186/s13075-017-1434-6.
 7. Tasaki S, Suzuki K, Nishikawa A, Kassai Y, Takiguchi M, Kurisu R, Okuzono Y, Miyazaki T, Takeshita M, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Ikeura K, Tsunoda K, Morita R, Yoshimura A, Toyoshiba H, Takeuchi T. Multiomic disease signatures converge to cytotoxic CD8 T cells in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 査読有, 2017 Aug;76(8):1458-1466, 2017, DOI; 10.1136/annrheumdis-2016-210788.
 8. 吉本桂子、竹内 勤：シェーグレン症候群の病態における BAFF/BAFF 受容体の役割と治療への展開 臨床免疫・アレルギー科 査読無, 67(4):377-382, 2017.
 9. Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, Suzuki K, Yamaoka K, Takeuchi T. CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 査読有, 10;19(1):28, 2017, DOI; 10.1186/s13075-016-1216-6.
 10. Tsukamoto M, Kameda H, Ohshige T, Kaneko Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T. Fc receptor 3B polymorphism is associated with hypersensitivity reactions to adalimumab in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 査読有, 18:1-4.2016, DOI; 10.1080/14397595.2016.
 11. Hayashi S, Suzuki K, Yoshimoto K, Takeshita M, Kurasawa T, Yamaoka K, Takeuchi T. Early Prognostic Factors Associated with the Efficacy of Infliximab Treatment for Patients with Rheumatoid Arthritis with Inadequate Response to Methotrexate. *Rheumatol Ther*. 査読有, 3(1):155-166.2016, DOI; 10.1007/s40744-015-0022-y.
 12. Lu L, Yoshimoto K, Morita A, Kameda H, Takeuchi T. Bendamustine increases interleukin-10 secretion from B cells via p38 MAP kinase activation. *Int Immunopharmacol*. 査読有, 39:273-9.2016, DOI; 10.1016/j.intimp.2016.07.033.
 13. Nishikawa A, Suzuki K, Kassai Y, Gotou Y, Takiguchi M, Miyazaki T, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Morita R, Yoshimura A, Takeuchi T. Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 査読有, 18(1):106. 2016, DOI; 10.1186/s13075-016-1006-1.

〔学会発表〕(計 22 件)

1. Keiko Yoshimoto, Noriyasu Seki, Katsuya Suzuki, Kunio Sugahara, Tsutomu Takeuchi, A Low molecular weight BAFF receptor antagonist inhibits differentiation of human peripheral B cells into plasma blasts/plasma cells in vitro. *Immunology* 2018.
2. Keiko Yoshimoto, Noriyasu Seki, Katsuya Suzuki, Kunio Sugahara, Kenji Chiba, Tsutomu Takeuchi, A low molecular weight BAFF signaling inhibitor, BIK-13, ameliorates B cell activation in vitro and in vivo autoimmune models and consequently suppresses production of IgG and cytokines. *EULAR* 2018, 2018.
3. Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi, Possible involvement of BAFF and matrix metalloproteinase-9 in the activation of monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome. *EULAR* 2018, 2018.
4. 吉本桂子、鈴木勝也、竹内 勤, 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球活性化におけ

- る BAFF と MMP-9 の関与, 第 27 回日本シェーグレン症候群学会 2018.
5. 吉本桂子、鈴木勝也、関 則靖、菅原邦夫、千葉健治、竹内 勤, 2) BAFF シグナルを標的とした低分子化合物を用いたシェーグレン症候群治療薬創製への試み (招待講演), 第 27 回日本シェーグレン症候群学会、2018.
 6. Keiko Yoshimoto, Yumi Ikeda, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi, Localization of the voltage-gated sodium channel 1.7 in peripheral monocytes contributes to activation of BAFF signaling in monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome. ACR/ARP Annual Meeting 2018.
 7. Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Shuntaro Saito, Jun Kikuchi, Tsutomu Takeuchi, Reduced expression of CX3CR1 in peripheral CD14++CD16+ monocytes is a novel feature of patients with systemic lupus erythematosus. ACR/ARP Annual Meeting 2018.
 8. Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Noriyasu Seki, Kunio Sugahara, Kenji Chiba, Tsutomu Takeuchi, A low molecular weight BAFF signaling inhibitor reduces production of autoantibody and suppresses infiltration of B cells into the organs in autoimmune model mice. 第 47 回日本免疫学会、2018.
 9. Yoshimoto K., Suzuki K., Sugahara K., Takeuchi T. Inhibition of BAFF binding to its receptor, BR3, with low molecular weight compounds results in suppression of activation of monocytes and B cells in vitro and in vivo model of autoimmune diseases. IMMUNOLOGY 2017 (Annual Meeting of American Association of Immunologists) (Washington D.C. U.S.A.) 2017.
 10. Yoshimoto K., Suzuki K., Sugahara K., Takeuchi T.: Low molecular weight BAFF signaling inhibitors ameliorate IL-6, IL-10 and IgG production in vitro and in vivo models of autoimmune diseases. EULAR 2017(Madrid, Spain) 2017.
 11. Yoshimoto K., Suzuki K., Takeuchi T.: BAFF exerts indirect stimulation through monocytes to produce IgG by B cells in patients with primary Sjögren's syndrome. EAGOR 2017, Tokyo, 2017.
 12. Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T: Increased expression of BAFF receptor on monocytes is a contributory factor of IgG overproduction in patients with primary Sjögren's syndrome. ICIS 2017 (Kanazawa, Ishikawa) 2017.
 13. Yoshimoto K, Seki N, Suzuki K, Sugahara K, Takeuchi T: Low molecular weight BAFF receptor antagonists restrain infiltration of B cells into organs of autoimmune model mice by suppressing B cell activation. ACR/ARHP Annual Meeting 2017 (San Diego, U.S.A.) 2017.
 14. 吉本桂子、関 則靖、鈴木勝也、菅原邦夫、竹内 勤: BAFF-BAFF 受容体結合阻害作用を有する低分子化合物は形質芽細胞および形質細胞分化を抑制する. 第 26 回日本シェーグレン症候群学会 (東京) 2017.
 15. 吉本桂子、鈴木勝也、関 則靖、菅原邦夫、千葉健治、竹内 勤: B 細胞活性化因子 (BAFF) およびその受容体を標的とした自己免疫疾患治療薬創製の試み. 第 45 回日本臨床免疫学会 専門スタディー シンポジウム (東京) 2017.
 16. Yoshimoto K, Seki N, Suzuki K, Sugahara K, Takeuchi T: BAFF signaling inhibitors ameliorate enhanced production of IL-6 and IL-10 by pSS monocytes and consequently suppress IgG overproduction by affecting differentiation of B cells. 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017.
 17. Yoshimoto K, Ishioka E, Nishikawa A, Suzuki K, Ito T, Sugano T, Yamada H, Okuda A, Okuda H, Ishiwata H, Doi T, Hirokawa T, Takeuchi T: Low molecular weight compounds which inhibit BAFF binding to its receptor, BR3, suppress activation of monocytes. IMMUNOLOGY 2016 (Annual Meeting of American Association of Immunologists) (Seattle, U.S.A.) 2016.
 18. Yoshimoto K, Ishioka E, Nishikawa A, Suzuki K, Takeuchi T: Enhanced expression of BAFF receptor (BR3) on peripheral monocytes contributes production of IgG by B cells through IL-6 signaling in patients with primary Sjögren's syndrome. International Congress of Immunology 2016 (Melbourne, Australia) 2016.
 19. Yoshimoto K, Suzuki K, Sugahara K, Takeuchi T: Low molecular weight-BAFF receptor antagonists are drug candidates for primary Sjögren's syndrome. BATTs meeting, (Oklahoma City, U.S.A.) 2016.
 20. Yoshimoto K, Seki N, Suzuki K, Sugahara K, Takeuchi T: BAFF receptor antagonists suppress differentiation of B cells in vitro and are drug candidates for primary Sjögren's syndrome. ACR 2016 ACR/ARHP Annual Meeting (Washington DC) 2016.
 21. 吉本桂子、石岡江梨子、西川あゆみ、鈴木勝也、菅原邦夫、竹内 勤: シェーグレン症候群治療薬としての BAFF-BAFF 受容体 (BR3) 結合阻害剤の検討. 第 60 回日本リウマチ学会 総会・学術集会、2016.
 22. Yoshimoto K, Suzuki K, Sugahara K, Takeuchi T: Low molecular weight compound BAFF binding inhibitors suppress activation of monocytes through BAFF signaling involved

in NF-kB pathways. 第 45 回日本免疫学会学術集会、2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ピロロピリミジン化合物を有効成分とする炎症性疾患の予防及び/又は治療剤

発明者：吉本 桂子、鈴木 勝也、竹内 勤

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-092068

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

無

6. 研究組織

(1) 研究分担者

無

(2) 研究協力者

無

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。