

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0200

研究課題名（和文）Ras阻害剤による自己免疫性肝疾患治療法の確立

研究課題名（英文）Development of Ras Inhibitory Therapy for Autoimmune Liver Diseases

研究代表者

中川 良（Ryo, Nakagawa）

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：60594596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 18ヶ月

研究成果の概要（和文）：原発性胆汁性胆管炎（PBC）の病態解明のためハンブルク大学との共同研究をおこなった。PBCの末梢血内CD4+T細胞ではN-Ras分子が高発現し、Th1サイトカインの産生が亢進していることを明らかにした。N-RasはTh1サイトカインのメインレギュレーターの一つである。その制御により、PBCの免疫環境を改善できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

N-RasがPBCのT細胞で特異的に発現する事を示した。PBCはCD4+T細胞の分泌するTh1サイトカインにより病態が誘導されることが知られており、N-Rasはそのメインレギュレーターである。その制御によりPBCのTh1優位環境を改善し病態そのものを根治させることができる可能性がある。本研究により難病であるPBCの克服への新たな展望が開けた。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the pathogenesis of primary biliary cholangitis (PBC), we conducted a collaborative study with the University of Hamburg and found that CD4+ T cells in the peripheral blood of PBC express high levels of N-Ras molecules and produce increased amounts of Th1 cytokines. One of the We showed that its regulation can improve the immune environment of PBC.

研究分野：肝臓学

キーワード：原発性胆汁性胆管炎

1. 研究開始当初の背景

慢性進行性肝炎は様々な原因により肝障害が継続し肝硬変に至る疾患群である。その 80-90% はウイルス性肝炎が占めている。近年、核酸医薬の登場によりウイルス性肝炎の大部分を占める C 型慢性肝炎の治療が可能となった。一方、自己免疫性肝疾患についてはほとんど治療開発が行われていない。自己免疫性肝疾患は難治性希少疾患でその全てが難病指定を受ける。原発性胆汁性胆管炎 (PBC)、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性硬化性胆管炎 (PSC) がある。その治療は PBC ではウルソデオキシコール酸、AIH は副腎皮質ステロイドが用いられるが、PSC には治療法はない。また、PBC と AIH では治療不応例が 30% ほど存在するがこれに対する治療法は存在しない。そのため、治療困難症例は肝硬変へと至り肝移植が皮値用となる。しかし、移植後に免疫抑制療法下にあっても、自己免疫性肝疾患が再燃する症例もある。また、経過が良好な症例でも経過観察のための肝生検の病理像では炎症像や線維化が進行していることも明らかとなりつつある。これは、既存治療が自己免疫性肝疾患の根本的な治療になっていないことを示している。特に免疫抑制剤が使用される移植後に再発があることは、既存の免疫抑制剤では自己免疫性肝疾患の治療が行えないことを示す。そのため、自己免疫性肝疾患ではその病態解明に基づいた新たな治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

申請者は東京大学医科学研究所との共同研究による基課題の遂行により PBC の CD4⁺T 細胞内の microRNA が T cell receptor (TCR) signaling pathway を制御していることを示し、特に miR-425 は Ras 分子制御を介して IL-2 と IFN- γ 産生を制御することを明らかにした。そして、Ras 阻害剤が CD4⁺T 細胞の IL-2 と IFN- γ の産生を抑制し、PBC の治療法となり得ることを示した。近年の研究から自己免疫性肝疾患の病態形成への CD4⁺T 細胞とその分泌する炎症性サイトカインの関わり示されてきた。そして、世界的に CD4⁺T 細胞とサイトカイン制御による治療の必要性が説かれてきている。**申請者らの報告により Ras 阻害剤は自己免疫性肝疾患の CD4⁺T 細胞制御に最も効果的な薬剤である可能性が示された。**そして、国際共同研究により、Ras 阻害剤による自己免疫性肝疾患への治療応用への解析を加速させるため本研究を申請する。

3. 研究の方法

①Ras 分子の発現異常が病態形成に関連する自己免疫性肝疾患の抽出: 基研究により PBC では Ras 分子の高発現がその病態形成に強く関わることを明らかとした。しかし、AIH と PSC では十分な検証が行えていない。その理由は希少疾患のため解析に耐えられる症例数の確保が困難なためである。また、Ras 分子の治療標的としての妥当性を示すために、その変動の普遍性を示す必要がある。そのため、国際共同研究により症例数の増強と、人種の異なるコホートでの解析を行う必要がある。共同研究施設の AW Lohse 教授は欧州肝臓学会における自己免疫性肝疾患の重鎮で、その臨床から研究までをリードする存在であり、広く欧州で臨床検体を収集する基盤とその解析するための研究施設を有している。特に Lohse 教授らは自己免疫性肝疾患の免疫細胞における Single cell RNA sequence を予定している。本研究を介しその研究チームに加わることで、円滑な欧州での症例数確保が行えると共に、基研究より詳細な解析データを得ることができる。

②Ras 阻害剤のスクリーニング: CD4⁺T 細胞抑制能を有する Ras 阻害剤の小規模スクリーニングを行い 3 種類の治療候補薬剤を選出した。CD4⁺T 細胞は TCR 活性化により IL-2 を産生する。そのため、IL-2 を測定することで TCR 活性を測定できる。スクリーニングには T 細胞系培養細胞に IL-2 のプロモーター領域を組み込んだ Luciferase reporter vector を導入しレポーター細胞を樹立した。レポーター細胞に TCR 刺激を加えルシフェラーゼ活性を測定することで TCR 活性を定量的に測定で知る。このレポーター細胞に 10 μ M の濃度で 14 種類の薬剤を添加し TCR 活性の抑制能を検証した。そして、5 種の薬剤が naïve 検体と比し 20% 以上のルシフェラーゼ活性を抑制した。次いで ELISA 法により培養細胞の IL-2 産生への抑制能を検証した。そして Lonafarnib、Compactine、Lovastatin の 3 種類の薬剤は naïve 検体と比し IL-2 を 30% 以上抑制した。この 3 種薬剤は全て Ras 阻害剤であり、臨床応用も成されている。特に **Lonafarnib は最も IL-2 産生を抑制し(約 55%)、ヒト血中濃度については実験系に近い 5 μ M 程度の濃度であり、Lonafarnib は最も PBC への治療応用への可能性が高い薬剤であると考え**る。そのため、Lonafarnib の生体に対する免疫抑制能と細胞毒性の評価を行う必要がある。そのため、今後は単離した患者 CD4⁺T 細胞に Ras 阻害剤を添加する extra vitro 解析とモデルマウスを用いた検証を行うことを計画する。本共同研究により欧州での患者検体での extra vitro 解析を平行して行える。また、Lohse 教授の人脈により適正なモデルマウスを入手することができる。そのため、本計画は Lohse 教授との国際共同研究により大きく推進できると考える。

4. 研究成果

①Ras 分子の発現異常が病態形成に関連する自己免疫性肝疾患の抽出: フローサイトメトリーを用い、PBC13 症例と健常人 14 症例、PSC17 症例の N-Ras 発現を比較した。これにより N-Ras は PBC で他の二群と比して特異的に高発現を示した (Tukey の検定;

P<0.05)。次いで定量的リアルタイム PCR を用いた検証では、PBC において N-Ras 及び Th1 サイトカインは他の二群と比較して特異的に発現亢進を示していた。

②Ras 阻害剤のスクリーニング

T 細胞活性を評価するレポーター細胞を、T 細胞系培養細胞とルシフェラーゼアッセイを用いて構築した。これは T 細胞の活性化により細胞内のルシフェラーゼ酵素が上昇するよう設計され、ルシフェラーゼ発光を測定することで容易に T 細胞の活性度を評価できるレポーター細胞である。このルシフェラーゼ発光は Th1 サイトカイン産生と相関することを確認してある。これを用い Ras 阻害剤のスクリーニングを行った。Ras 合成を阻害する化合物としてスタチン系薬剤（9 種）と、膜アンカーを阻害する化合物としてファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（2 種）をレポーター細胞に添加し、発光強度をランキング化した。その上位 5 種の候補薬剤は培養細胞の IL-2 産生を抑制し、さらにその上位 3 種のうち 2 種はヒト T 細胞の IL-2 と IFN- γ 産生を抑制した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ryo Nakagawa Ryosuke Muroyama Chisato Saeki Tsunekazu Oikawa Yoshimi Kaise Kazuhiko Koike Jun Arai Masanori Nakano Yasuo Matsubara Keiko Takano Yoshihiro Hirata Masayuki Saruta Mikio Zeniya Naoya Kato	4. 巻 -
2. 論文標題 CD4+ T cells from patients with primary biliary cholangitis show T cell activation and differentially expressed T cell receptor repertoires	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13318	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川良
2. 発表標題 N-Rasを標的としたPBC治療法の開発
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川良、銭谷幹男、加藤直也
2. 発表標題 CD4 陽性 T 細胞を標的とした Ras 阻害剤による原発性胆汁性胆管炎の新規治療法開発
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川良、銭谷幹男、加藤直也
2. 発表標題 原発性胆汁性胆管炎の Ras 阻害剤による IFN γ 抑制療法の開発
3. 学会等名 第54回肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	アンスガー ローゼ (Ansgar Lohse)	ハンブルク・エッペンドルフ大学医療センター・Center for Internal Medicine・professor	

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		
ドイツ連邦共和国	University	Medical Center Hamburg-Eppendorf	