

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15827

研究課題名（和文）原発性胆汁性胆管炎への臨床応用を目指したRas阻害剤のスクリーニング

研究課題名（英文）Screening of Ras inhibitors for clinical application in primary cholangitis

研究代表者

中川 良（Nakagawa, Ryo）

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は原発性胆汁性胆管炎（PBC）の免疫動態を分子生物学的手法により解析してきた。これにより、PBCではN-Ras発現亢進を伴うT細胞の活性化と、IFN- $\gamma$ を中心としたTh1サイトカイン産生が亢進することが示された。そして、N-RasがPBCの免疫制御分子になりえることが示された。しかし、PBCとN-Ras発現の病態関連において、その普遍性と特異性の解析が不十分であった。そのため、PBCのN-Ras発現の再現確認を行った。また、PBCの治療候補薬剤の選出のため、Ras阻害剤のTh1サイトカイン産生への抑制能を比較した。これにより、PBCの病態の一端を明らかにし、新規治療法への基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難病であるPBCの病態の一端を解明し、それに基づいた新たな治療法を提唱した。PBCは自己免疫性疾患にも胆汁うっ滞を改善させるための治療が存在しない。本研究によりRas阻害剤を用いることでPBCの免疫治療が開発できる可能性を示す事ができた。これにより従来の治療法に抵抗性を示す症例に対して、治療アプローチをすることが可能となる。また、免疫動態を正常化させることで、PBCを寛解させる事ができる可能性もある。そのため、本研究の社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：We have been analyzing the immunokinetics of primary biliary cholangitis (PBC) using molecular biological techniques. We have shown that PBC is associated with increased T cell activation and Th1 cytokine production, mainly IFN- $\gamma$ , accompanied by increased N-Ras expression. And it was shown that N-Ras could be an immunoregulatory molecule for PBCs. However, the universality and specificity of the pathological relationship between PBC and N-Ras expression have not been fully analyzed. Therefore, we confirmed the reproducibility of N-Ras expression in PBCs. In addition, we compared the inhibitory effect of Ras inhibitors on Th1 cytokine production in order to select candidate drugs for the treatment of PBC. This study clarified a part of the pathogenesis of PBC and established the basis for a new therapeutic approach.

研究分野：自己免疫性肝疾患

キーワード：T細胞 N-Ras 免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性胆管炎 (PBC) は原因不明の自己免疫機序による慢性進行性肝疾患で未治療の場合は肝硬変に至る。中高年女性に好発し、本邦での推定患者数は 6 万人とされる。治療には胆汁うっ滞改善のためウルソデオキシコール酸 (UDCA) が用いられるが、30% 程の症例で治療抵抗性を示す。治療抵抗性を示した症例では 2nd line となる有効な治療法は無く、高率に肝硬変に至り肝移植が必要となる。そのため、PBC には新たな治療法の必要性がある。しかし、PBC では自己免疫性疾患にも関わらず免疫抑制剤が奏効しない。肝移植後の症例は免疫抑制療法下にある症例でも再燃を示す症例があり、PBC の病態形成には既存の免疫抑制剤が効果を有さないと考えられる。そのため、PBC の免疫療法には病態に則した全く新しい機序の治療が求められている。申請者はこれまでの研究で「Ras 阻害薬による慢性進行性肝炎の新たな治療法と肝発癌抑止法の開発」を行ってきた。そして、Ras 阻害剤による PBC 新規治療法開発の基盤を構築した。申請者は PBC の CD4+T 細胞の microRNA (miRNA) と mRNA 発現を統合的に解析した (Nakagawa et al. J Hepatol 2017, IF=12.486)。これにより、PBC の CD4+T 細胞で Ras ファミリーの一つである N-Ras が高発現し T 細胞受容体 (TCR) シグナルを制御し IL-2 や IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカイン産生を亢進させることを明らかにした。そして、Ras 阻害剤により N-Ras を抑制することで炎症性サイトカイン産生を抑制できることを明らかにした。以前より PBC の CD4+T 細胞には自己反応性 T 細胞が存在することが知られていた。近年、高 IFN- $\gamma$  血症を呈するモデルマウスのメスには PBC 様の胆管炎が誘導され自己抗体も出現すること、そのモデルマウスの CD4+T 細胞を他のモデルマウスに移植することで同様の胆管炎が出現することが示され、PBC の CD4+T 細胞の産生する IFN- $\gamma$  がその病態形成に関わることが明らかとなっている。このことから、申請者は Ras 阻害剤により PBC の CD4+T 細胞の TCR シグナルを抑制し IFN- $\gamma$  産生を抑制することで、PBC の病態形成を効果的に抑制する、病態に即した全く新しい治療法が開発できると考えた。

## 2. 研究の目的

本申請では PBC 治療に有用な Ras 阻害剤候補を選出し、臨床応用への基盤を作ることを目指す。申請者はこれまでの研究により Ras 阻害剤スクリーニング系を開発し、小規模スクリーニングによりサイトカイン産生抑制能を有する Ras 阻害剤を選出している。この Ras 阻害剤は近年に臨床応用されたもので、未だ炎症性サイトカイン産生抑制能の評価は報告されていない。このように既に申請者は臨床応用への可能性を有する新規 PBC 治療薬の候補を得ている。そのため、PBC 治療候補薬としての適正を評価することで、実臨床への応用に向けた準備ができると考える。また、Ras 阻害剤には抗癌剤として開発され、有害事象は認めないものの抗腫瘍効果が得られず、第 III 相試験で開発が中断された薬剤が多くある。これは腫瘍での Ras は恒常的に活性化する変異型 Ras であるためにファルネシル化阻害作用を有する Ras 阻害剤では腫瘍抑制効果を得られなかったためである。しかし、PBC の N-Ras は変異型ではなく、Ras 阻害剤での治療目的も異なる。そのため、抗腫瘍効果が得られずで開発が中止された Ras 阻害剤の新たな用途として PBC 治療への適正を検討する。これにより、臨床試験により人体への安全が確認されている薬剤で、新規 PBC 治療薬の選出を行う。Ras 阻害剤の自己免疫性疾患への応用は未だ報告は無く、開発中止となった Ras 阻害剤の新たな用途を提示することができる。また、多くの候補薬剤から PBC 治療薬を選出することができる。

## 3. 研究の方法

**1. PBC での N-Ras 発現解析:** フローサイトメトリーにより PBC の CD4+T 細胞における N-Ras の発現解析を行う。対象は PBC 症例とコントロールとして健常人と原発性硬化性胆管炎 (PSC) 患者とした。対象より得られた末梢血単核球を蛍光色素抗体を用いて CD3、CD4、CD8 の表面マーカーを標識する。その後、4%パラホルムアルデヒドにより固定化したのちに、サポニンを用いて N-Ras 抗体及び蛍光標識用の二次抗体を浸透させ細胞内の N-Ras を標識する。その後、フローサイトメーターを用いてその蛍光度を比較する。次いで得られた末梢血単核球を用い、その N-Ras 発現と Th1 サイトカイン発現を定量的リアルタイム PCR により解析した。

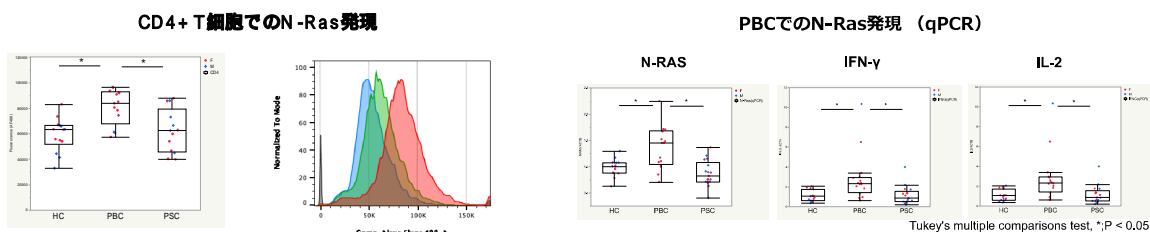
**2. サイトカイン産生能を有する Ras 阻害剤のスクリーニング:** PBC 治療に適した Ras 阻害剤の候補を選別するためにハイスループットスクリーニング手法を行う。申請者は以前からの研究で PBC の CD4+T 細胞では TCR シグナルの活性化、N-Ras 高発現、IL-2 と IFN- $\gamma$  の炎症性サイトカインの高発現を認め、これらは 1 つのパスウェイとして連動することを明らかにした。そのため、TCR シグナルの活性化指標となる IL-2 を標的としてスクリーニング系を構築した。IL-2 のプロモーター領域 500bp をルシフェレースプラスミドベクターにクローニングした。それを T 細胞系培養細胞である Jurkat 細胞に遺伝子導入し、薬剤セレクションにより安定細胞株化し TCR 活性化指標となるレポーター細胞とした。これに TCR 刺激を加えると TCR シグナルの活性化による炎症性サイトカイン産生に比例しルシフェレースが産生される。Ras 阻害剤存在下でレポーター細胞に TCR 刺激を加えそのルシフェレースを測定することで、Ras 阻害剤の TCR シグナルと

サイトカイン産生の抑制能を評価することができる。本解析は 96-well プレートでのスモールスケールでの解析に耐えうる。そのため、多数の薬剤の評価を行うことが可能である。レポーター細胞でのスクリーニングの後に Jurkat 細胞とヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞を用いて、実際の TCR シグナル活性とサイトカイン産生の抑制能の評価を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) N-Ras は Th1 サイトカインと共に PBC で特異的に高発現する

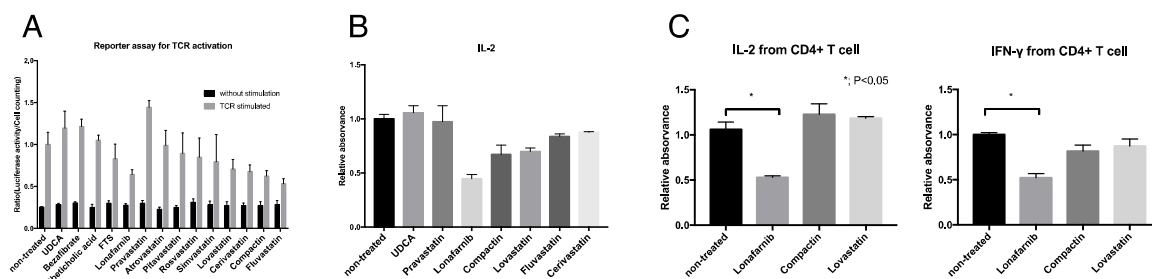
フローサイトメトリーを用い、PBC13 症例と健常人 14 症例、PSC17 症例の N-Ras 発現を比較した。これにより N-Ras は PBC で他の二群と比して特異的に高発現を示した (Tukey の検定;  $P < 0.05$ )。次いで定量的リアルタイム PCR を用いた検証では、PBC において N-Ras 及び Th1 サイトカインは他の二群と比較して特異的に発現亢進を示していた。



##### (2) Ras 阻害薬による抗炎症作用の検証

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 0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 Nakagawa Ryo, Muroyama Ryosuke, Saeki Chisato, Oikawa Tsunekazu, Kaise Yoshimi, Koike Kazuhiko, Arai Jun, Nakano Masanori, Matsubara Yasuo, Takano Keiko, Hirata Yoshihiro, Saruta Masayuki, Zeniya Mikio, Kato Naoya	4. 巻 なし
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 なし
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 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 -

〔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- 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------