

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461483

研究課題名(和文) シェーグレン症候群治療薬の標的探索

研究課題名(英文) Discovery of therapeutic targets for Sjogren's syndrome

研究代表者

吉本 桂子 (Yoshimoto, Keiko)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20383292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシェーグレン症候群(SS)の病態に深く関与している患者末梢血単球でのBAFFシグナル伝達経路の解析と、既承認薬のリポジショニングによるBAFFシグナル伝達阻害物質の探索を試みた。その結果、SS患者末梢血単球ではIKKaやIKKbのリン酸化が亢進していること、単球からのBAFFによるIL-6産生がNF-kB阻害剤で強く抑制されることを見出した。また複数の既承認薬がBAFFにより刺激されたSS患者末梢血単球からのIL-6産生を抑制することも見出した。今後これらの薬剤のBAFFシグナル経路への影響と治療薬への展開の可能性を検討する。

研究成果の概要(英文)：Our in vitro experiments have shown that elevated expression level of BAFF (B cell activating factor) receptor, BR3, is associated with the pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS). These results suggest that inhibitors against BAFF signaling pathways through BR3 may be drug candidates for SS. In this study, we tried to identify the molecules involved in the pathways in SS monocytes, and performed drug repositioning to search for BAFF signaling inhibitors. As a result, we found that IKKa and IKKb, which are involved in NF-kB pathway, were highly phosphorylated in SS monocytes, and that NF-kB inhibitors strongly suppressed IL-6 production by BAFF-stimulated monocytes. In addition, we discovered several approved drugs inhibited IL-6 production by BAFF-stimulated monocytes. Based on these results, we will further investigate molecular mechanisms of action of these drugs as BAFF signaling inhibitors to develop novel therapies for SS.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：シェーグレン症候群 BAFF シグナル伝達経路

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究で、SS 患者の末梢血から調製した単球では B 細胞活性化因子 (BAFF) の受容体の発現量及び BAFF シグナルの伝達経路に異常があることを世界で初めて見出した。しかし、SS 単球における BAFF シグナルの伝達経路の詳細は未解明のままである。このことより単球において BAFF シグナルを阻害することで単球の活性化を抑制することが可能であると考えられ、BAFF シグナル阻害剤が SS 治療薬の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では単球由来細胞株および末梢血単球を用い、細胞レベルでの BAFF の異常なシグナル伝達を特異的に阻害する化合物を探索し、これが作用する分子を明らかにし、治療薬開発への橋渡しとなることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた BAFF シグナル抑制剤の探索

BAFF により誘導された IL-6 を指標にして抑制的に作用する薬剤を網羅的に探索する。具体的には IFN 刺激した THP-1 細胞に BAFF 存在下で化合物ライブラリーより入手した薬剤を添加して培養し、培養上清中に産生された IL-6 を ELISA 法を用いて定量する方法を用いる。薬剤を加えない場合と比較して IL-6 産生量が 60%以上低下した化合物を選択する。

(2) ヒット化合物の細胞毒性の検討

BAFF により誘導された IL-6 産生の抑制作用に対する化合物の濃度依存性、細胞毒性などの検討をする。具体的には THP-1 細胞をヒット化合物存在下で培養し、細胞増殖に対する影響を XTT assay を用いて検定する。

(3) BAFF シグナル抑制剤のヒト末梢血単球における影響の検討

具体的には THP-1 細胞を用いて選抜された化合物の pSS および健康人末梢血単球にたいする BAFF 誘導 IL-6 産生に対する影響を検討する。CD14 抗体が吸着したマイクロビーズを用いて末梢血より単球を単離し、BAFF 存在下で化合物と共に培養し、培養上清中の細胞から産生された IL-6 量を ELISA 法で定量する。

(4) 末梢血単球における BAFF シグナル経路の探索

pSS 患者末梢血単球を BAFF 存在下で NF- κ B 阻害剤、PI3kinase 阻害剤、シクロスポリンなどのシグナル阻害剤を添加し培養し、単球より産生された IL-6 産生に対する影響を ELISA 法を用いて検討する。またシグナル経路に存在する分子に対して、BAFF による活性化を検討するため、BAFF 刺激末梢血単球を用いてウェスタンブロットティングなどでリン酸化蛋白質の検出を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた BAFF シグナル抑制剤の探索

これまでの研究で BAFF による単球からの IL-6 産生亢進が明らかとなっているが、ヒト単球由来細胞株である THP-1 を用いて単球における BAFF シグナル抑制剤の探索を施行した。THP-1 細胞は IFN 刺激後に BAFF を作用させることで IL-6 産生が誘導される性質を有している。対象薬剤は既承認薬および市販の化合物ライブラリーより選抜した。合計約 250 種類の医薬品および化合物の検定を施行した結果、図 1 に示すように強い抑制作用を示す薬剤および化合物を複数見出した (薬剤名および化合物名は知財確保のため匿名表示)。

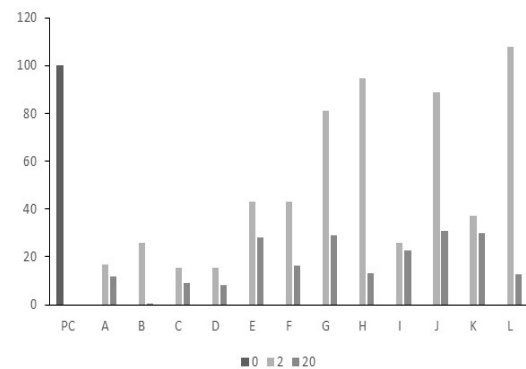


図 1 : THP-1 からの BAFF 誘導 IL-6 産生に対する薬剤の影響

(2) ヒット化合物の毒性試験

得られたヒット化合物の THP-1 細胞に対する毒性試験を細胞増殖試験により施行した。その結果、殆どの化合物において IL-6 産生 50%以上阻害濃度での有意な細胞増殖阻害は認められなかった。

(3) ヒト末梢血単球を用いた BAFF シグナル抑制ヒット化合物の BAFF により誘導される IL-6 に対する阻害作用の検証

THP-1 細胞を用いた検討で細胞毒性を示さない濃度で BAFF による IL-6 産生を抑制した化合物をヒト末梢血単球からの BAFF 誘導 IL-6 産生での効果を検討した。図 2 は THP-1 においても BAFF により誘導される IL-6 産生抑制作用を有した薬剤のヒト末梢血単球からの BAFF 誘導 IL-6 産生に対する効果を示した例である。

これらの結果から THP-1 を用いて探索した BAFF シグナル抑制剤はヒト末梢血単球においても BAFF シグナル抑制作用を有することが明らかとなった。

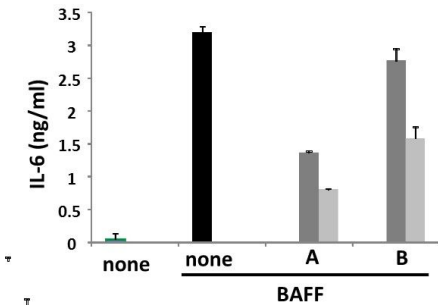


図 2: ヒト末梢血単球からの BAFF による IL-6 産生に対する候補化合物の影響

(4) ヒト末梢血単球における BAFF シグナル経路の探索

本研究は単球における BAFF シグナルに関わる分子の探索が目的であることから、シグナル阻害剤を用いてその標的の解明を試みた。BAFF 存在下でヒト末梢血単球を NF- κ B 阻害剤、PI3kinase 阻害剤、シクロスポリンと共に培養し、産生される IL-6 に対する影響を検討した。

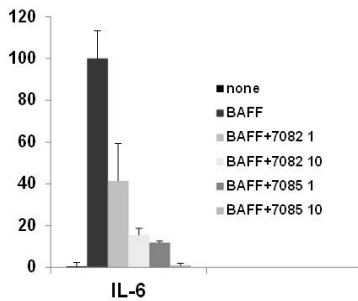


図 3: ヒト末梢血単球からの BAFF による IL-6 産生に対する NF- κ B 阻害剤の影響 (縦軸は% of control)

図 3 に示すようにヒト末梢血単球からの BAFF による IL-6 産生は NF- κ B 阻害剤により強く抑制されることが明らかとなった。一方でサイトカインシグナル経路で広く知られる PI3kinase 阻害剤は BAFF 誘導 IL-6 産生に対し強い阻害作用を示さなかった (図 4)。

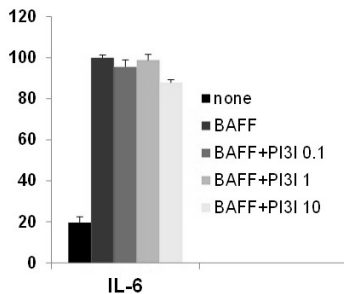


図 4: ヒト末梢血単球からの BAFF による IL-6 産生に対する PI3kinase 阻害剤の影響 (縦軸は% of control)

以上の結果から単球における BAFF シグナル

には NF- κ B 経路が強く関与していることが示唆された。

BAFF は B 細胞活性化因子であり、BAFF シグナルを介し B 細胞を活性化し B 細胞の生存および分化増殖に関与することが知られている。これまで B 細胞における BAFF シグナル経路では NF- κ B 経路の IKKa および IKKb の関与が報告されている。そこで、これらの分子の活性化度を健常人と pSS 患者末梢血単球を用いてウェスタンブロット法にて比較した (図 4)。

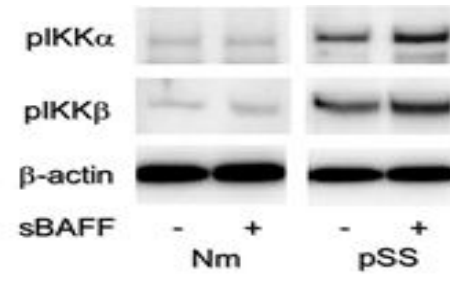


図 5: 末梢血単球における IKKa および IKKb 分子のリン酸化

これらの結果より pSS 患者末梢血単球では NF- κ B 経路のうち IKKa および IKKb の活性化が亢進していることが示唆された。

(5) 考察と今後の展望

本研究により末梢血単球における BAFF シグナルを抑制する薬剤の探索と BAFF シグナルに関与する分子が明らかとなった。詳細な機序が不明である点は存在するが、単球における BAFF シグナルは図 5 に示すような機序が推察できる。

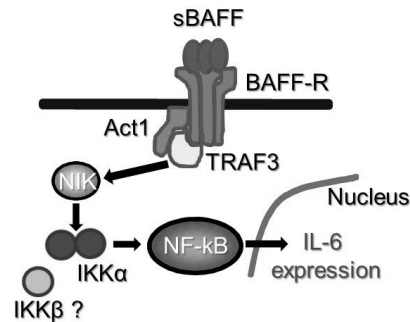


図 6: 単球における BAFF シグナル

これまでにこのような報告は未だなく、今後は本研究にて選抜された既承認薬の BAFF シグナル分子への影響について詳細な検討を行っていく。その結果は迅速な pSS 治療薬の創製に寄与すると考えられる。

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 5 件)

- (1) Yoshimoto K. シェーグレン症候群～病態形成機序解明の試み～、Allergology and Immunology、査読無、22(12), 2015, 70-77.
- (2) Takeshita M., Suzuki K., Kikuchi J., Izumi K., Kurasawa T., Yoshimoto K., Amano K. and Takeuchi T. Infliximab and etanercept have distinct actions but similar effects on cytokine profiles in rheumatoid arthritis. Cytokine, 査読有, 75(2), 2015, 222-227. doi: 10.1016/j.cyto.2015.04.011.
- (3) Kikuchi J., Hashizume M., Kaneko Y., Yoshimoto K., Nishina N., Takeuchi T. Peripheral blood CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response. 査読有, 2015, Jan 21;17:10. doi: 10.1186/s13075-015-0526-4.
- (4) Yoshimoto K., Kurasawa T., Suzuki K. and Takeuchi T. Involvement of aEb7 (CD103) in the pathogenesis of autoimmune diseases. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 査読無、37(3), 2014, 171-175.
- (5) Nishina N., Kikuchi J., Hashizume M., Yoshimoto K., Kameda H. and Takeuchi T. Baseline levels of soluble interleukin-6 receptor predict clinical remission in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: implications for molecular targeted therapy. Ann Rheum Dis, 査読有、73, 2014, 945-947. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204137.
- [学会発表](計 20 件)
- (1) Yoshimoto K., Kurasawa T., Suzuki K. and Takeuchi T. CD103 overexpression induces abnormal activation of CD4+ T cells via BAFF signaling pathways. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会、2015.11.20. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- (2) Yoshimoto K., Ishioka E., Nishikawa A., Suzuki K. and Takeuchi T. Pyrrolopyrimidine derivatives that inhibit BAFF binding to its receptor, BR3, decrease IgG production by B cells in vitro and in vivo model of autoimmune diseases. ACR Annual Meeting 2015, 2015.11.09. San Francisco (USA)
- (3) 吉本桂子、石岡江梨子、西川あゆみ、鈴木勝也、竹内 勤 一次性シェーグレン症候群 (pSS) 患者末梢血単球における BAFF 受容体 (BR3) 発現亢進は IL-6 を開
- 始て B 細胞の機能異常を誘導する 第 43 回日本臨床免疫学会、2015.10.23. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- (4) 吉本桂子、石岡江梨子、西川あゆみ、鈴木勝也、竹内 勤 BAFF 受容体 (BR3) を標的としたシェーグレン症候群治療薬の探索 第 24 回日本シェーグレン症候群学会、2015.09.19. 京王プラザホテル (東京都新宿区)
- (5) 吉本桂子、石岡江梨子、西川あゆみ、鈴木勝也、竹内 勤 シェーグレン症候群患者末梢血単球上の BAFF 受容体 (BR3) 発現亢進による単球の機能異常が寄与する B 細胞からの IgG 産生促進機序の解明、第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2015.07.18、東京工業大学 (東京都目黒区)
- (6) Yoshimoto K., Ishioka E., Nishikawa A., Suzuki K. and Takeuchi T. BAFF-stimulated monocytes accelerates IgG production by B cells in patients with primary Sjogren's syndrome. 13th International Symposium on Sjogren's syndrome, 2015.05.21, Bergen (Norway)
- (7) Yoshimoto K., Kurasawa T., Suzuki K. and Takeuchi T. Signal transduction via CD103 and BAFF-receptor cooperatively play a role in the abnormal activation of T cells. Immunology 2015, 2015.05.09 New Orleans (USA)
- (8) 吉本桂子 単球と B 細胞に焦点をあてたシェーグレン症候群根治療法開発への挑戦、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015.04.23、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- (9) Yoshimoto K., Kojima M., Ogata H., Ishioka E., Nishikawa A., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF induces production of IL-6 and matrix metalloproteinase-9 by peripheral monocytes of patients with primary Sjogren's syndrome through multiple signaling pathways. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014.12.12、国立京都国際会館 (京都府京都市)
- (10) Yoshimoto K., Ishioka E., Suzuki K., Ito T., Sugano T., Okuda A., Ishiwata H., Doi T., Hirokawa T. and Takeuchi T. Pyrrolopyrimidine derivatives that inhibit binding of BAFF to its receptor, BR3, are drug candidates for primary Sjogren's syndrome. ACR Annual Meeting 2014, 2014.11.16, Boston (USA)
- (11) 吉本桂子、竹内 勤 シェーグレン症候群患者末梢血単球上の BAFF 受容体発現亢進が関与する病態形成機序の検討、第 23 回日本シェーグレン症候群学会、2014.09.13、ホテルニュー長崎 (長崎県

- 長崎市)
- (12) 吉本桂子、石岡江梨子、西川あゆみ、鈴木勝也、安倍 達、竹内 勤 一次性シェーグレン症候群患者末梢単球機能異常の抗体産生への関与、第 35 回日本再生・炎症学会、2014.07.02、万国津梁館（沖縄県那覇市）
- (13) Yoshimoto K., Ishioka E., Nishikawa A., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF-induced IL-6 signaling plays a pivotal role in interaction between monocytes and B cells that accelerate IgG overproduction in patients with primary Sjogren's syndrome. EULAR 2014, 2014.06.12, Paris (France)
- (14) Yoshimoto K., Kojima M., Ogata H., Ishioka E., Nishikawa A., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF induces IL-6 production by monocytes through a BAFF receptor and promotes IgG production by B cells in patients with primary Sjogren's syndrome. Immunology 2014, 2014.05.04, Pittsburgh (USA)
- (15) Yoshimoto K., Ishioka E., Nishikawa A., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF activates monocytes to produce IL-6 through BAFF receptor (BR3) for IgG production from peripheral B cells in patients with primary Sjogren's syndrome. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.04.25 東京グランドプリンスホテル新高輪（東京都千代田区）
- (16) Yoshimoto K., Tanaka M., Kojima M., Ogata H., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF induces production of matrix metalloproteinase-9 by peripheral monocytes in patients with primary Sjogren's syndrome. ACR annual Meeting 2013, 2013.10.29, San Diego (USA)
- (17) Yoshimoto K., Tanaka M., Kojima M., Ogata H., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. Increased expression of BAFF receptor on monocytes is a contributory factor of hypergammaglobulinemia in patients with primary Sjogren's syndrome. ACR annual Meeting 2013, 2013.10.29, San Diego (USA)
- (18) Yoshimoto K., Tanaka M., Kojima M., Ogata H., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF enhances the production of matrix metalloproteinase-9 by peripheral monocytes of patients with primary Sjogren's syndrome through

signaling pathways that involve NF-kB and PI3 kinase. 12th International Symposium on Sjogren's syndrome, 2013.10.11, ホテルオークラ京都（京都府京都市）

- (19) Yoshimoto K., Tanaka M., Kojima M., Ogata H., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. BAFF induces IL-6 production in human monocytes through signaling pathways that involve NF-kB and PI3 kinase. International Congress of Immunology 2013, 2013.08.24, Milano (Italy)
- (20) Yoshimoto K., Tanaka M., Kojima M., Ogata H., Suzuki K., Kameda H., Abe T. and Takeuchi T. NF-kB is involved in abnormal BAFF signaling in peripheral monocytes of patients with primary Sjogren's syndrome. Immunology 2013, 2013.05.06, Honolulu (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：炎症性疾患の予防及び/又は治療剤
発明者：竹内 勤、吉本桂子
権利者：慶應義塾大学 田辺三菱製薬
種類：用途
番号：PCT/JP2014/076820
出願年月日：2014.10.07
国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
吉本 桂子 (Yoshimoto Keiko)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：20383292