

リンパ球の循環動態を制御する新規免疫調節薬の創製

小宮 貴樹
奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

目次

第一章 緒言.....	4
1-1. 本研究の背景	
1-2. 本研究の目的	
1-3. 参考文献	
第二章 CCR4 阻害薬.....	9
2-1. 序論	
2-2. 材料と方法	
2-3. 結果	
2-4. 小括	
2-5. 参考文献	
第三章 S1P 受容体作動薬.....	37
3-1. 序論	
3-2. 材料と方法	
3-3. 結果	
3-4. 小括	
3-5. 参考文献	
第四章 結語.....	68
謝辞.....	70
研究業績リスト.....	71

略語表

略語	名称
BALF	気管支肺胞洗浄液
cAMP	環状アデノシン 1 リン酸
CCL17	CC chemokine ligand 17, CC ケモカインリガンド 17
CCL22	CC chemokine ligand 22, CC ケモカインリガンド 22
CCR4	CC chemokine receptor 4, CC ケモカイン受容体 4
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, 生細胞蛍光染色色素
CHO 細胞	チャイニーズハムスター卵巣細胞
CIA	コラーゲン誘導関節炎
CXCL10	CXC chemokine ligand 10, CXC ケモカインリガンド 10
CXCR3	CXC chemokine receptor 3, CXC ケモカイン受容体 3
EAE	実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC ₅₀	50%効果濃度
ELISA	酵素免疫測定法
FCA	フロイント完全アジュバンド
GPCR	G 蛋白質共役型受容体
IC ₅₀	50%阻害濃度
IFA	フロイント不完全アジュバンド
MBP	ミエリン塩基性蛋白質
MOG	ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質
MS	多発性硬化症
OVA	卵白アルブミン
PBMC	末梢血単核球細胞
PTX	百日咳毒素
S1P	スフィンゴシン 1-リン酸
S1P 受容体	S1P (スフィンゴシン 1-リン酸) 受容体
Th1/Th2 細胞	T helper type 1/ T helper type 2 細胞
Th17 細胞	T helper type 17 細胞
Treg	Regulatory T cell, 制御性 T 細胞

第一章 緒言

1-1. 本研究の背景

自己免疫疾患は、本来、生体にとって異物（抗原）であるものに対して働く免疫系が自己の細胞や組織に反応してしまい、それを攻撃する抗体を作り出してしまう疾患群である。自己の細胞や組織を異物と誤認識する機序は不明であるが、自己か異物かの判断は主に T 細胞が担っている¹。自己免疫疾患は誤認識される標的細胞や組織により病態が異なる。例えば、中枢神経の髄鞘の蛋白質が異物と誤認されると、髄鞘が攻撃を受けて破壊され、多発性硬化症という疾患が発症する。一般に、自己免疫疾患は全身に影響が及ぶ全身性自己免疫疾患と、特定の臓器だけが影響を受ける臓器特異的自己免疫疾患に分けられる。全身性自己免疫疾患には、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどがあり、臓器特異的疾患には、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、尋常性乾癬、強皮症、重症筋無力症などがある（図 1）。高齢化や社会環境の変化に伴い、自己免疫疾患は増加傾向にあり、例えば、本邦で特定疾患に指定されている全身性エリテマトーデス、多発性硬化症及び潰瘍性大腸炎の特定疾患患者として認定されている数は、調査が開始された 1974 年にはそれぞれ 5,072, 1,544, 0 人であったが、2012 年には 60,122, 17,073, 143,733 人に増加している（図 2）。また、米国では少なくとも 1,470～2,350 万人が自己免疫疾患に罹患しており、その数は増加しているとの報告がある²。

自己免疫疾患の病因については解明されていないところが多い。関節リウマチでは、1990 年代に炎症性サイトカインである $\text{TNF}\alpha$ に対する抗体医薬が開発され、強力な抗炎症作用と骨破壊抑制作用を有することが明らかとなった。また、その他の薬物療法として、免疫系を抑制する薬剤（カルシニューリン阻害剤や代謝拮抗剤）や炎症を抑制するステロイド剤が使用されている（表 1）。しかし、これらの薬剤は非特異的に免疫系を抑制するために重篤な感染症や悪性新生物の拡大を抑制出来なくなる。更に、高血糖、高血圧、及び腎臓や肝臓の機能障害などの副作用も報告されている。そのため、治療薬として病態特異的に作用し副作用の少ない免疫調節薬の登場が切望されている。

血液

全身性エリテマトーデス
再生不良性貧血



胃腸管

クローン病
潰瘍性大腸炎
セリアック病



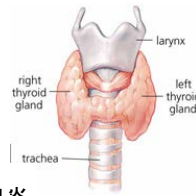
神経

末梢神経障害
糖尿病性神経障害



甲状腺

慢性甲状腺炎
バセドウ病



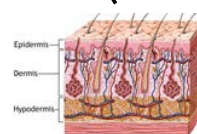
肺

喘息
ウェゲナー肉芽腫症



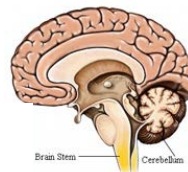
皮膚

乾癬, 湿疹
強皮症, 尋常性白斑



脳

多発性硬化症
ギラン・バレー症候群
重症筋無力症
自閉症



骨・関節

関節リウマチ
強直性脊椎炎
リウマチ性多発筋痛症



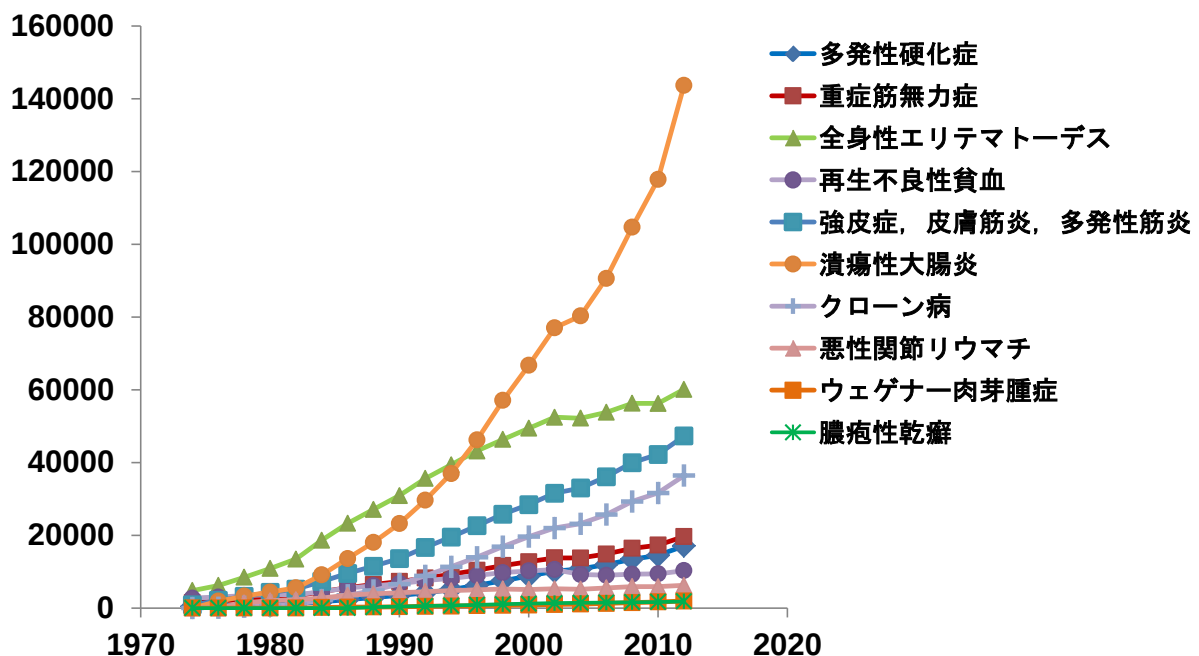
筋肉

多発性筋炎
皮膚筋炎
線維筋痛症



自己免疫疾患

図1 多種多様な自己免疫疾患



難病情報センター情報改変

図2 特定免疫疾患の医療受給者証交付件数

1974年から2012年までの代表的な自己免疫疾患の認定者数の推移を表している。

表 1 既存の自己免疫疾患治療薬

種類	薬剤	有効性／安全性	主な副作用
ステロイド剤	プレドニゾロン，メチルプレドニゾロン	高／低	感染症，糖尿病，骨粗鬆症
代謝拮抗剤	メトトレキサート，アザチオプリン，ミゾリビン，ミコフェノール酸モフェチル，レフルノミド，ラパマイシン	中程度～高／低	肝障害，骨髄抑制，間質性肺炎，感染症
カルシニューリン阻害剤	シクロスポリン，タクロリムス	高／低	腎障害，肝障害，感染症
サイトカイン阻害剤	インフリキシマブ，エタネルセプト，アダリツマブ，アクテムラ，トファシチニブ	非常に高／低	感染症，結核，アナフィラキシーショック

1-2. 本研究の目的

自己免疫疾患において，病変臓器には T 細胞，B 細胞，マクロファージなどの免疫細胞が浸潤しており，その結果，病変部において強い免疫及び炎症反応が誘導される．主に T 細胞と B 細胞から成るリンパ球の血管から病変部への浸潤はセレクチン，ケモカイン，及びインテグリンによって制御されている（図 3）．また，リンパ球は血管とリンパ管の二つの脈管系を交通路として生体内を移動している³．リンパ球は，リンパ節やパイエル板などの二次リンパ組織に血行性に移動し，二次リンパ組織から移出する際には，輸出リンパ管から移動しリンパ管を経て再び血液に戻る循環を繰り返す³．2002 年，二次リンパ組織からのリンパ球の移出には生理活性脂質であるスフィンゴシン-1 リン酸（S1P）が重要な役割を担っていることが明らかとなった（図 3）⁴．私は，特定のリンパ球の循環動態を制御する薬剤が異常な免疫のみを抑える新規の免疫調節薬になり得るのではないかと考え，リンパ球の循環動態システムに注目した．そして，リンパ球の体内循環過程の中でケモカイン／ケモカイン受容体及び S1P／S1P 受容体に着目し，特に CC ケモカイン受容体 4（CCR4）の阻害薬と S1P 受容体 1（S1P₁）作動薬の創製を目指した．CCR4 阻害薬は病態特異的な T 細胞サブセットである Th2 細胞の病変部への浸潤を阻害することで，また，S1P₁ 作動薬はリンパ球の病変部への浸潤を阻害することで共に安全性が高く，有効性に優れた薬剤になることが期待される．ケモカイン受容体及び S1P 受容体は G 蛋白共役型受容体（GPCR）であ

る．医薬品全体の少なくとも 30% は GPCR を標的としており⁵，GPCR は低分子化合物によって制御できる可能性が高いと考えられる（図 4）．

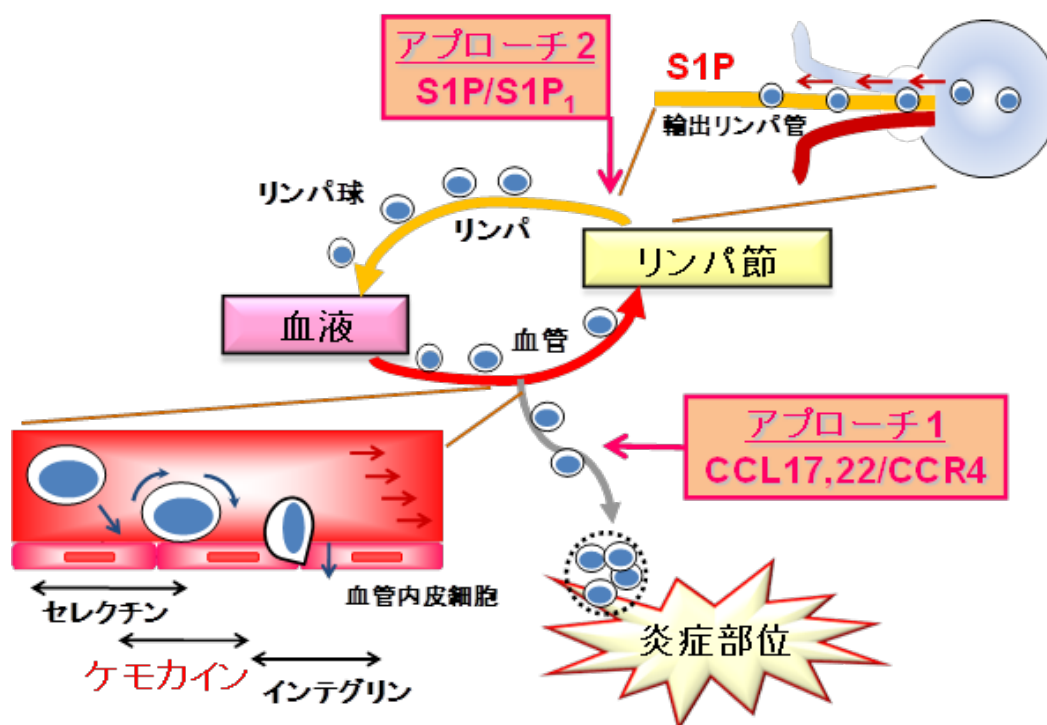


図 3 リンパ球の体内循環とリンパ球の循環動態を制御するアプローチ

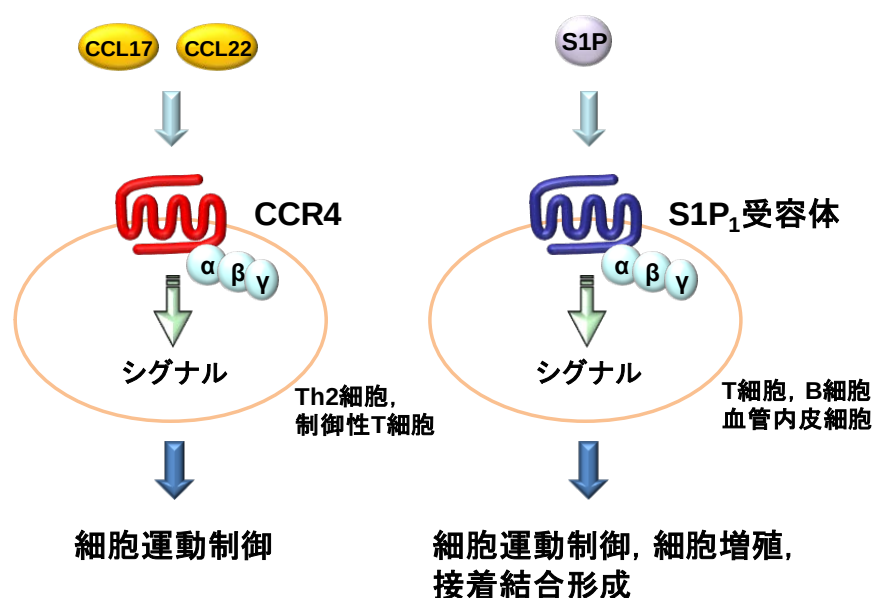


図 4 CCR4 及び S1P₁ 受容体

CCR4 及び S1P₁ 受容体は GPCR であり，CCR4 は CCL17 及び CCL22，S1P₁ は S1P をリガンドとし，G 蛋白質と呼ばれる三量体蛋白質を介してシグナル伝達が行われる．

1-3. 参考文献

1. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis - the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942-55 (2006).
2. National Institutes of Health. Progress in Autoimmune Diseases Research (2005).
3. Girard JP, Moussion C, Forster R. HEVs, lymphocytes and homeostatic immune cell trafficking in lympho nodes. *Nat Rev Immunol* 12, 762-773 (2012).
4. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-49 (2002).
5. Kontoyianni M, Liu Z. Structure-based design in the GPCR target space. *Curr Med Chem* 19, 544-56 (2012).

Th2 細胞には数種類のケモカイン受容体が発現しているが、これまで Th2 細胞遊走の重要な因子として CCR4 の役割に関する研究が中心に行われてきた。CCR4 は抗原特異的な Th2 細胞の炎症組織への浸潤に関与しており^{9~11}、喘息患者では、気道に CCR4 陽性 T 細胞が優先的に浸潤しており IL-4 や IL-5 などの Th2 型サイトカイン産生に関与する^{12, 13}。また、CCR4 のリガンドである CCL17 及び CCL22 の産生が喘息患者の肺で亢進していることが報告されている^{14~16}。一方、CCR4 遺伝子欠損マウスや薬理学的に CCR4 を阻害したマウスの研究ではいくつかの相反する結果が得られており、アレルギー性炎症における CCR4 の関与については意見が分かれている^{17~22}。最近の生体内における T 細胞遊走の役割に関する研究では、抗原特異的 T 細胞上でのケモカイン受容体の発現は、抗原チャレンジ後の急性と慢性期で変動することが示されている^{23, 24}。T 細胞遊走には病態ステージで多数のケモカインやケモカイン受容体が関与しており、各受容体の役割は炎症組織や病態のステージに依存して変化すると考えられる。

私は新規の CCR4 阻害薬である E0001-163 を同定し、その薬理学的作用を検討した。上記したように、マウスを用いた CCR4 阻害薬の研究では相反する結果が報告されており、CCR4 陽性 T 細胞の浸潤を CCR4 阻害薬によって抑制できるかは不明である。そこで、CCR4 を介した T 細胞遊走に対する CCR4 阻害薬の *in vivo* での阻害作用を検討するため、私は CCR4 リガンドを投与することでリンパ球浸潤を観察できるマウスモデルを構築した。これは、CCL22 過剰発現細胞をマウスの背部に作製したエアーパーチ内に投与することで持続的に CCL22 を産生させ、同組織にマウス Th2 細胞を浸潤させる実験系である。また、病態時での T 細胞浸潤に対する CCR4 阻害薬の抑制作用について検討するため、卵白アルブミン (OVA) 特異的な抗原を発現した DO11.10 Th2 細胞をマウスに移入し、OVA を吸入惹起することで肺胞洗浄液中に移入 Th2 細胞及び好酸球を浸潤させる抗原惹起の Th2 細胞浸潤系を構築した。更に、マウスにおける Th2 細胞の遊走阻害作用の検討だけでなく、ヒトの Th2 細胞を作製し CCR4 発現と T 細胞遊走反応との関係、及び E0001-163 の遊走阻害作用についても検討した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. E0001-163

E0001-163, 6-ブロモ-2-((3-(2-ジメチルアミノエチルオキシ)-4-メトキシフェニル)メチルオキシ)-3-(4-メチルフェニルスルホニルアミノ)ピラジンは小野薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) で合成された²⁵.

2-2-2. 実験動物

雄性 BALB/cAnNCrj マウス及び雄性 DBA/2NCrj マウスは日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から入手した. また, 雄性 BALB/c-TgN (DO11.10) マウスは The Jackson Laboratory (Maine, USA) から入手した. 動物を用いた試験は, 小野薬品工業株式会社 研究本部 「動物実験に関する規程」を遵守して試験を実施した.

2-2-3. CCL22 刺激による CCR4 発現細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

ヒト CCR4 発現 CHO 細胞を用い, ヒト CCR4 受容体に対する CCL22 (終濃度 10 nM) を用いて Fura2 法により細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した. すなわち, 測定の 48 時間前に細胞を 1 ウェルあたり 1.5×10^4 cells/100 μ L の濃度で 96 穴プレートに播種した. 測定当日, 5 μ M Fura 2-AM を含む培地に置換し遮光下 37°C で 1 時間静置することにより Fura 2 を細胞内に取り込ませた. その後, 20 mM/L Hepes (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 含有 Hanks 溶液 (Life Technologies) で二回洗浄し, Spectrofluorometer (FDSS-6000, 浜松ホトニクス株式会社) を用いて OD340nm/OD380nm の変化を測定した. 測定開始 30 秒後に化合物を, 化合物添加 3 分後にリガンドを加え, その後 4 分間の細胞内 Ca^{2+} 濃度をモニターし, vehicle 添加群の Ca^{2+} 濃度変化に対する各化合物の抑制率ならびに IC_{50} 値を算出した.

2-2-4. 競合結合実験

CCRF-CEM 細胞株 (ATCC, Virginia, USA) を, 20 mM Hepes 及び 1 % ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を含む RPMI-1640 (Life Technologies) 培地にて 96 穴プレートに 1 ウェルあたり 5×10^5 個になるように播き込んだ.

[¹²⁵I]-CCL17 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) 及び様々な濃度の E0001-163 を添加して, 4°C で 1 時間放置した. 反応後, セルハーベスターを用いて 0.5% polyethyleneimine で前処置した GF/B filter plate に細胞を吸着させた. 更に, 反応プレートに 200 μ L PBS を添加して同様に GF/B filter plate に吸着させ, この操作を 3 回行ってフリーのラベル体を除去した. その後, 1 穴あたり 50 μ L Microscint-20 を添加して TopCount 383 にて測定した (全ての試薬及び機器は Perkin

Elmer Life and Analytical Sciences より購入)。トータル結合量の測定のために vehicle として 1%DMSO 溶液を添加した。また、非特異的な結合量の測定のため、cold competition としてラベル体の 1000 倍量の非ラベル体 CCL17(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) を添加した。

2-2-5. ヒト末梢血からの Th1 及び Th2 細胞の調製

本実験は、小野薬品工業株式会社研究本部「ヒト組織を用いた研究」倫理規程を遵守して実施した。インフォームドコンセントにより協力を得た 2 名の健康人ボランティアから血液を入手した。Lympho-prep 密度勾配遠心分離 (Accu-Prep, Oslo, Norway) によって血液から末梢血単核球細胞 (PBMC) を単離し、更に CD4 Subset Column (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて CD4 陽性 T 細胞を調製した。この CD4 陽性 T 細胞を (Day0), $2 \mu\text{g/mL}$ 抗 CD3 抗体 (OKT3; Janssen Pharmaceuticals, Titusville, NJ, USA) で前処置した 24 穴プレートに培養培地 (10% ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich), 2-メルカプトエタノール, ペニシリン-ストレプトマイシン, 10 mM Hepes, 0.1mM MEM non-essential amino acid solution 及び 1 mM MEM sodium pyruvate を含んだ RPMI1640 (FBS 以外の試薬は Life Technologies より購入)) にて 1 ウェルあたり 2×10^5 個になるように播き込み, $1 \mu\text{g/mL}$ 抗 CD28 抗体及び 4 ng/mL IL-2 を加えて 5 日間培養した。この際, Th1 細胞に分化誘導する場合には 5 ng/mL IL-12 と $1 \mu\text{g/mL}$ 抗 IL-4 抗体, また, Th2 細胞に分化誘導する場合は 5 ng/mL IL-4 と $1 \mu\text{g/mL}$ 抗 IFN- γ 抗体を添加した (全ての蛋白及び抗体は BD Biosciences, San Jose, CA, USA から購入)。5 日後 (Day5), 活性化状態の Th1 及び Th2 細胞を回収し, 1 ng/mL IL-2 (BD Biosciences) 存在下で 4 日間培養した。その後, 休止期の Th1 及び Th2 細胞 (Day9) を OKT-3 にて前処置したプレートに播いて再刺激を 5 日間行った。この時, 上記した濃度のサイトカインと抗体に加え, 二回目以降の刺激時には細胞のアポトーシスを抑制するため $1 \mu\text{g/mL}$ 抗 CD95L 抗体 (BD Biosciences) も添加した。5 日後 (Day14) に細胞を回収し, 再び 1 ng/mL IL-2 存在下で 7 日間培養した。この方法を用い, 活性化及び休止期状態の Th1 及び Th2 細胞を 3 サイクルにわたり継代培養した。

2-2-6. ヒト Th1 及び Th2 細胞におけるケモカイン受容体の発現解析

CD4 陽性 T 細胞の調製日 (Day0), 及び Th1/Th2 細胞への分化誘導後, Day5, 9, 14, 17, 21, 24 及び 29 での CD4 陽性細胞における CCR4 の発現強度を経時的に測定した。各測定日の細胞を回収し, 抗ヒト CD4 抗体, 抗ヒト CCR4 抗体, 抗ヒト CXCR3 抗体 (全ての試薬は BD Biosciences より購入) を添加し, 氷中で 30 分間反応させた。PBS にて 1 回洗浄した後, フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD Biosciences) に

て解析を行った。CD4 陽性 T 細胞における CCR4 の相対的発現レベルは、各抗体で染色した際の蛍光強度の中央値から isotype control の中央値を引いて算出した。各サンプルは 15,000 以上のイベント数を測定した。

2-2-7. マウス脾臓からの Th1 及び Th2 細胞の調製

BALB/c マウスの脾臓から、マウス CD4 subset enrichment column (R&D) を用いて CD4 陽性 T 細胞を調製した。5 μ g/mL 抗マウス TCR β 抗体を前処置した 24 穴プレートに 1 ウェル当たり CD4 陽性 T 細胞を $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$ 細胞を播き、2-2-5 で使用した培養培地を用いて 37°C で 2 日間培養した。この時、Th1 に分化誘導を行う場合は 20 ng/mL マウス IL-12 (BD Biosciences), 2.5 μ g/mL 抗マウス IL-4 抗体 (BD Biosciences), 1.0 μ g/mL 抗マウス CD28 抗体 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, USA) を添加し、Th2 に分化誘導を行う場合は 20 ng/mL マウス IL-4 (BD Biosciences), 2.5 μ g/mL 抗マウス IL-12 抗体 (BD Biosciences), 1.0 μ g/mL 抗マウス CD28 抗体をそれぞれ添加した。刺激 2 日間後に細胞 (Day2) を回収し、その後、2 ng/mL マウス IL-2 (BD Biosciences) 存在下で 3 日間培養して休止期 T 細胞 (Day5) を誘導し、*In vitro* での細胞遊走評価及び *in vivo* での CCL22 刺激 Th2 遊走モデルでの実験に用いた。

Th1 及び Th2 細胞への分化状態を解析するため、Th1/Th2 細胞へ分化誘導した細胞をマウス TCR β 抗体にて前処置した 24 穴プレートで細胞内蛋白質輸送阻害薬であるモネンシン (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 存在下で 6 時間培養した。4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、0.5% Triton X-100 で透過処理をしてブロッキングを行った。その後、抗 IL-4 抗体及び抗 IFN- γ 抗体 (共に BD Biosciences) にて染色操作を行い、細胞内 IL-4 と IFN- γ 発現細胞数をフローサイトメトリーにて測定した。

抗原惹起の気道炎症モデルでは、OVA 特異的な TCR を過剰発現させたトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスを用いた。DO11.10 マウスの脾臓からマウス CD4 subset enrichment column を用いて CD4 陽性 T 細胞を調製した。また、feeder 細胞として DO11.10 マウスのバックグラウンドである BALB/c マウスから脾細胞を調製し、マイトマイシン C (Sigma-Aldrich) にて処理を行った。これらの細胞を 24 穴プレートに 1 ウェルあたり CD4 陽性 T 細胞を 5.0×10^5 細胞、feeder 細胞を 5.0×10^5 細胞それぞれ播き、OVA ペプチド 323-339 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) を終濃度 1 μ g/mL となるように添加し、37°C で 3 日間培養した。この時、Th2 に分化誘導するため 20 ng/mL マウス IL-4, 2.5 μ g/mL 抗マウス IL-12 抗体を添加した。3 日後に細胞を回収し、2 ng/mL マウス IL-2 存在下で更に 3 日間培養して休止期 Th2 細胞を作製し、移入細胞として使用した。

2-2-8. *in vitro* 細胞遊走実験

ヒトあるいはマウス T 細胞を用いた細胞遊走評価は、3 μ m ポアサイズの 24 穴トランスウェル (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) を用いた。ヒト CCL17 (hCCL17), hCCL22, hCXCL10, マウス CCL1 (mCCL1), mCCL11, mCCL17, mCCL22 又は mCXCL12 (ヒトケモカインは Peprotech, マウスケモカインは R&D Systems よりそれぞれ購入) は、0.6 mL の 5% FBS を含む RPMI1640 培地で希釈してトランスウェルの下室に添加した。上室には $2 \sim 4 \times 10^5$ 細胞懸濁液を加え、37°C で 1.5 時間反応させた。E0001-163 を評価する場合、反応開始時に上下両室に化合物を添加した。反応後、下室に移動した細胞を回収し、フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD Biosciences) により細胞数を測定した。

Chemotactic Index は、ケモカインによって遊走した細胞数を自然落下した細胞数で割ることで算出した。また、E0001-163 の遊走阻害率は、以下の式より算出した。

$$\text{遊走阻害率 (\%)} = (1 - ((\text{化合物処置による細胞数} - \text{自然落下の細胞数}) / (\text{ケモカインによる細胞数} - \text{自然落下の細胞数}))) \times 100$$

2-2-9. E0001-163 のマウス動態試験

20% 可溶化溶媒 (ソルトール : プロピレングリコール = 7:3) 水溶液で E0001-163 を溶解させた。BALB/c マウスに単回経口投与 0.5, 2, 6 及び 24 時間後にマウス腹部大静脈より血液を採取した。E0001-163 の血漿中濃度は高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (Agilent 1100; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) によって測定した。

2-2-10. マウス CCL22 発現細胞の調製

マウス CCL22 全長 cDNA を含んだ pUCSR-FLAG ベクター (小野薬品工業) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてヒト胎児由来腎臓細胞 293T 細胞 (293T cells; ATCC) に一過性に強制発現させた。マウス CCL22 の全長 cDNA (Accession no. NM_002990) は BALB/c マウスの脾臓よりクローニングし、マウス CCL22 全長 cDNA を含まないベクター (mock) をコントロールとして用いた。

2-2-11. マウスエアースポーチ内の CCL22 濃度の測定

CCL22-又は mock-293 T 細胞をエアースポーチ内に投与してから、6, 14, 24 時間後にエアースポーチ内の滲出液をそれぞれ回収し、遠心分離後に上清を採取して ELISA 法により定量した。上清は抗 FLAG-M2 抗体で前処置したプレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。次に、ビオチン標識された抗マウス CCL22 抗体を加えて 37°C で 1

時間反応させた後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを加えて再び37°Cで1時間反応させた。ペルオキシダーゼ用のELISA発色基質としてTMBを用いた。

2-2-12. CCL22 惹起によるマウス Th2 細胞浸潤モデル

DBA/2 マウス (CD5.1 アロ抗原) の背部に 2.5 mL の空気を皮下に注入し、3 日後にも同カ所に 2.5 mL の空気を入れてエアースポーチを作製した。2 度目の空気注入から 3 日後に E0001-163 3, 10, 30 mg/kg 又は 20% 可溶化溶媒 (ソルトール: プロピレングリコール=7:3) 水溶液を DBA/2 マウスに経口投与し、0.5 時間後に CCL22-293T 又は mock-293T 細胞をマウスあたり 1×10^7 細胞をエアースポーチ内へ皮下投与した。更に、1 時間後に *in vitro* で分化誘導した BALB/c マウス (CD5.2 アロ抗原) 由来の Th2 細胞 2×10^7 個を DBA/2 マウスへ尾静脈内投与した。Th2 細胞を投与して 23 時間後に 2.5 mL の PBS でエアースポーチ内を洗浄し、滲出液を回収した。細胞懸濁液は、抗マウス CD16/32 抗体 (2.4G2; BD Biosciences) で前処置して非特異的な免疫グロブリンの結合を阻害した後、FITC 標識の抗 CD5.2 抗体 (Immunotech, Marseille, France) 及び PE 標識の抗マウス CD4 抗体 (BD Biosciences) にて染色した。洗浄操作後、フローサイトメトリーにて CD5.2 陽性 CD4 陽性 T 細胞を測定することで、エアースポーチ内に浸潤したドナー由来 Th2 細胞数を算出した。

2-2-13. 抗原惹起によるマウス Th2 細胞浸潤モデル

2-2-7 で作製した DO11.10 マウス由来の 5.0×10^6 Th2 細胞を BALB/c マウスに尾静脈内投与した (Day0)。移入翌日から 5%OVA (Sigma-Aldrich) の吸入を開始し、7 日間連日 20 分間吸入させた (Day1~7)。コントロール群は Th2 細胞を移入し、PBS を吸入させた。E0001-163 10, 30 mg/kg 又は 20% 可溶化溶媒 (ソルトール: プロピレングリコール=7:3) 水溶液を OVA 吸入の 30 分前に経口投与した。Day 8 に BALB/c マウスから気管支肺胞洗浄液及び肺を回収した。気管支肺胞洗浄はマウスの気管に 1 mL の PBS を注入した。気管支肺胞洗浄液中の細胞は、抗マウス CD16/32 抗体で Fc ブロックを行った後、OVA 特異的 T 細胞抗体である FITC 標識 KJ1-26 (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA, USA) 及び PE 標識の抗マウス CD4 抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて OVA 特異的 T 細胞数を測定した。気管支肺胞洗浄液中の好酸球数は、多項目自動血球計数 (SF-3000; Sysmex Corporation, Kobe, Japan) を用いて測定した。気管支肺胞洗浄液及び肺での IL-4, CCL17, 及び CCL22 産生量は ELISA 法により測定した。

2-2-14. 統計解析

統計解析は、SAS System Release 9.2 TS2M3 (SAS Institute Japan Inc.) 及び EXSAS Version. 7.7.1 (CAC EXICARE Corporation)を用いて行った。有意差検定は、2 群間の比較は t 検定、多群間比較の場合は Dunnett を用いた。両側検定とし、有意水準は 5%とした。

2-3. 結果

2-3-1. CCR4 阻害薬 E0001-163 の同定

ケモカイン受容体は GPCR であり、リガンドが結合すると細胞内にシグナルが伝わり、共に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する²。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを利用して、CCR4 過剰発現細胞を用いて CCR4 阻害化合物を探索した。CCL22 添加によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を指標に小野薬品工業株式会社の化合物ライブラリを評価し、ヒット化合物として R2055-200 を取得した (図 2)。同系において、R2055-200 の IC_{50} 値は $1.7 \mu\text{M}$ であった。同化合物の構造を基に周辺化合物の合成及び評価を行い、強力な CCR4 阻害活性を示す置換基を探索した。その後、適した置換基の組み合わせを行うことで阻害活性が向上した E0001-163 を取得した。E0001-163 は CCR4 に対して $0.056 \mu\text{M}$ の阻害活性を示し、R2055-200 に比べて 30 倍以上阻害活性が向上した (図 2)。また、CCR4 のもう一つのリガンドである CCL17 のラベル体を用い、CCR4 を発現している T 細胞株 CCRF-CEM への CCL17 結合に対する E0001-163 の阻害作用を評価した。その結果、E0001-163 は CCL17 の結合を濃度依存的に阻害し、 IC_{50} 値は 21 nM であった (図 3)。

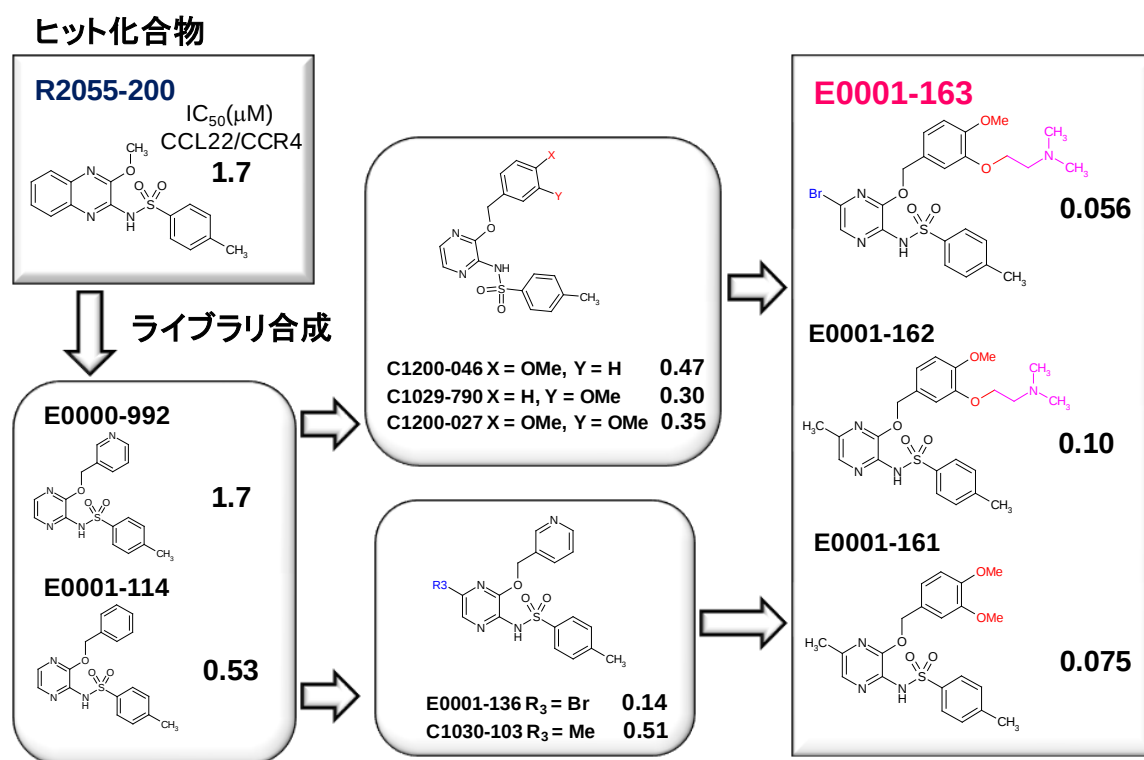


図 2 CCR4 阻害薬 E0001-163 の創製

化合物スクリーニングの結果、ヒット化合物 R2055-200 を取得した。同化合物から合成展開を行って阻害活性が向上した E0001-163 を見出した。それぞれの化合物の数値は Ca^{2+} アッセイでの IC_{50} 値を示している。

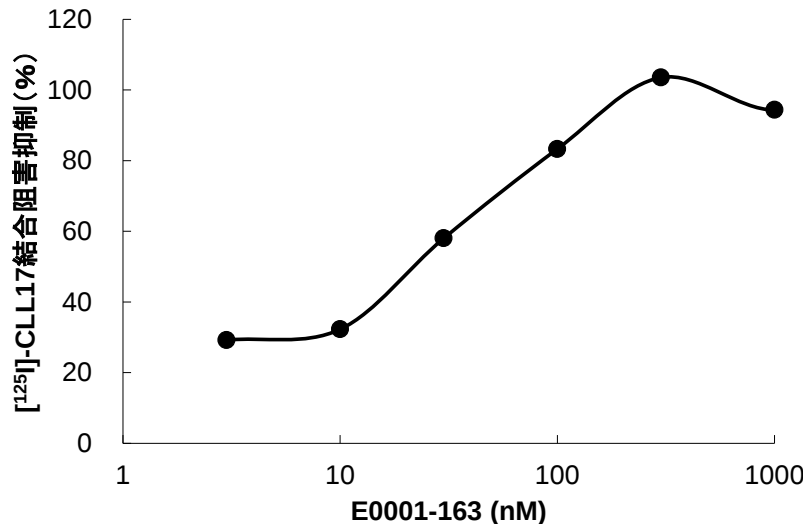


図3 CCRF-CEM細胞への $[^{125}\text{I}]$ -CCL17結合に対するE0001-163の阻害作用
各プロットは平均値を示している (n=2).

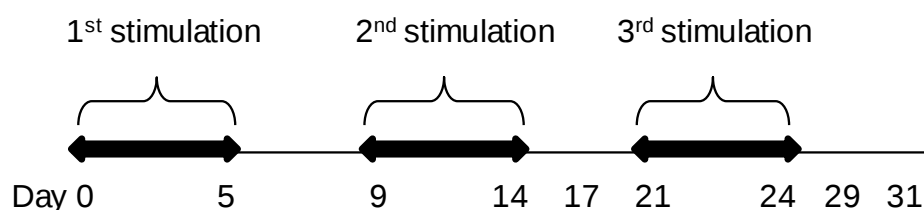
2-3-2. E0001-163はCCR4を介したヒトTh2細胞の遊走を選択的に阻害する

CCR4はリガンドであるCCL17及びCCL22との相互作用によって、アレルギー炎症部位へCCR4陽性T細胞を浸潤させることが報告されている¹⁵。E0001-163がTh2細胞の遊走を阻害するかを検証するため、最初にヒト末梢血単核球細胞(PBMC)からTh2細胞を作製しTh2細胞のCCR4発現とその時のCCR4リガンドに対する遊走反応について検討した。最初に、二名の健常人ボランティアから血液を採取してPBMCからCD4陽性T細胞を調製し、調製日をDay0とした。この時のCD4陽性T細胞中のCCR4陽性の割合を調べた結果、それぞれ21.0%、11.5%に発現しており、他のグループから報告されているものと同様の結果が得られた²⁶。しかし、このCD4陽性T細胞を用いてCCL17あるいはCCL22誘発による*in vitro*遊走実験を行ったが、T細胞は遊走反応を示さなかった²⁵。次に、Th1及びTh2細胞に分化誘導するため、T細胞活性化抗体である抗CD3抗体と抗CD28抗体、及び分化誘導のためのサイトカインと抗体を用いてCD4陽性T細胞を処置した。抗CD3/CD28抗体で3~5日間刺激した活性化T細胞を、その後IL-2存在下で3~7日間培養して休止期T細胞を調製するサイクルを3回繰り返し、Day31まで観察した(図4a)。Th1に分化誘導したCD4細胞ではIFN- γ を、Th2に分化誘導したCD4細胞ではIL-4を優位に産生することが確認された。CCR4の発現を継時的に解析した結果、全てのサイクルにおいて、抗CD3/CD28抗体の刺激を加えた直後の活性化T細胞ではCCR4の発現量は減少し、刺激を除いてIL-2存在下で培養した休止期T細胞ではCCR4の発現が増加するパターンがみられた。

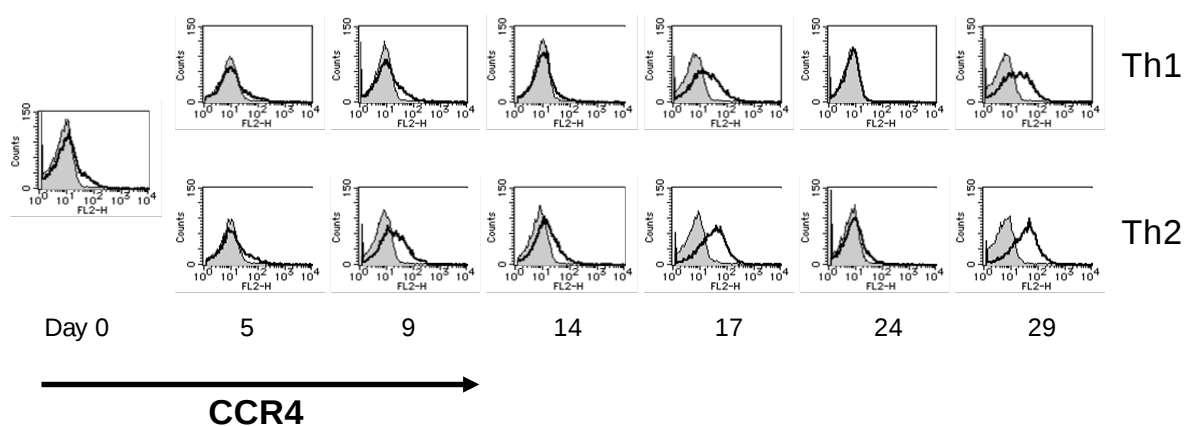
また, Th1 と Th2 に分化誘導した細胞を比べると, Th2 に誘導した細胞の方が CCR4 発現量は増加しており, CCR4 は Th2 優位な受容体であることが分かった (図 4b, 4c). CCL17 及び CCL22 に対する遊走反応は, 刺激を 3~5 日間加えた直後の活性化 T 細胞 (Day 14) は弱かった. しかし, その後 3 日間 IL-2 存在下で培養した休止期 T 細胞 (Day 17) は, CCL17 及び CCL22 に対する高い遊走反応がみられた (図 4d). 同様に 3 サイクル目の休止期 T 細胞 (Day 29-31) を用いた遊走実験でも, Th2 細胞は CCL22 に対して高い遊走反応を示した. 以上の結果から, 抗 CD3/CD28 抗体刺激の入った細胞は CCR4 の発現量が減少し CCR4 リガンドに対して遊走反応を示さないが, その後, 休止期状態で細胞を培養すると CCR4 発現量は増加し遊走反応もみられるようになり, CCR4 発現量と遊走反応には相関があることが分かった.

次に, CCL22 に対する遊走反応の高い Th2 細胞を用いて, E0001-163 の遊走阻害活性を評価した. E0001-163 は, CCL22 誘発の Th2 細胞遊走を濃度依存的に阻害し, IC₅₀ 値は 11.9 nM であった. 一方, Th1 細胞は CXCR3 のリガンドである CXCL10 に対し高い遊走反応を示すが, E0001-163 は 1000 nM でも CXCL10 による Th1 遊走反応を阻害しなかった (図 4e). これらの結果から, E0001-163 は CCR4 を介した遊走反応を選択的に阻害することが示された.

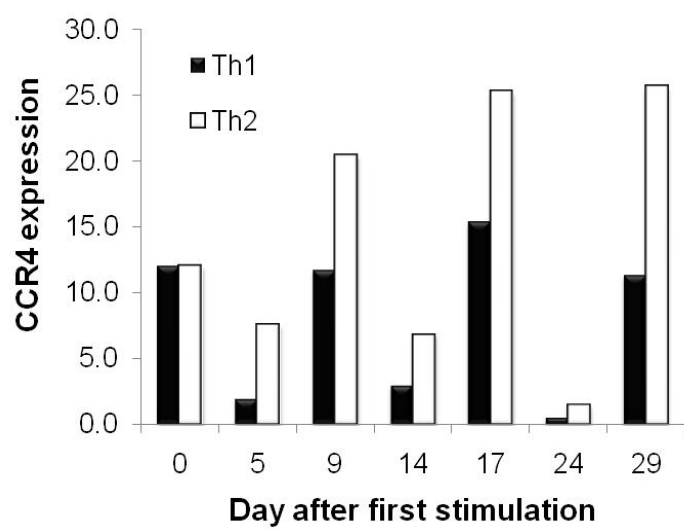
(a)



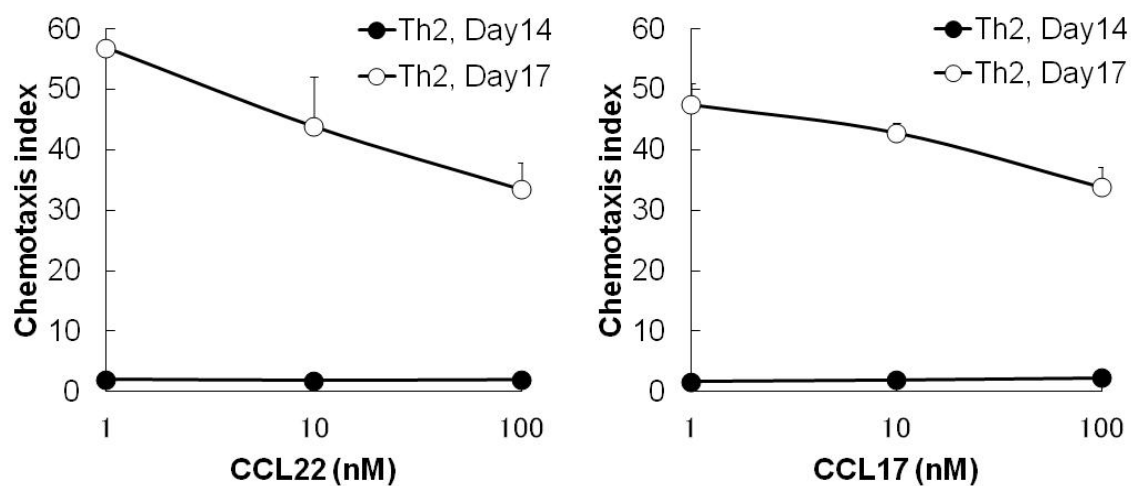
(b)



(c)



(d)



(e)

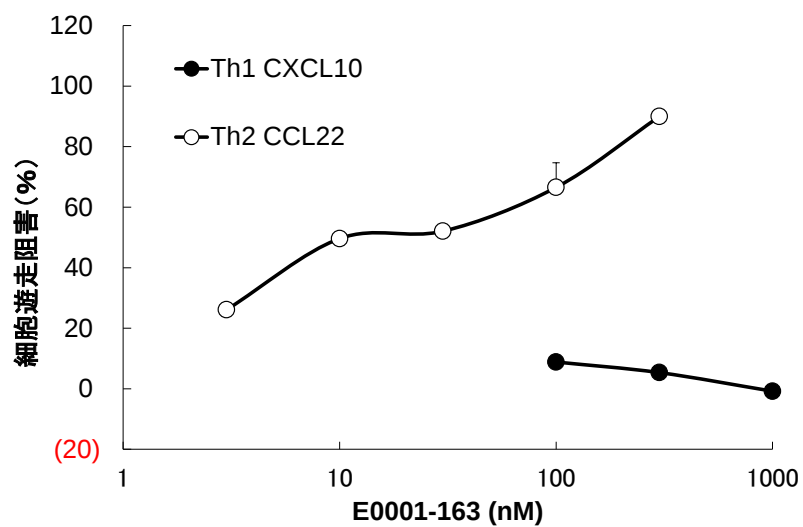


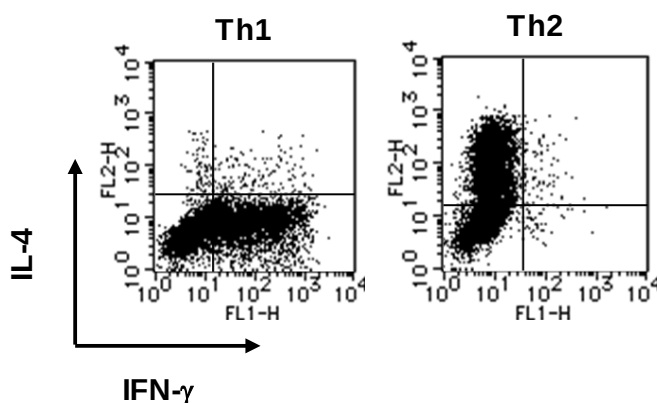
図 4 分化誘導したヒト Th 細胞の CCR4 発現及び遊走活性の解析, Th2 細胞遊走に対する E0001-163 の遊走阻害作用

(a) Th1/Th2 分化誘導のプロトコール. (b) フローサイトメトリーを用いた Th1 及び Th2 細胞の CCR4 発現解析. 細胞は抗 CCR4 抗体 (黒実線), 又は IgG1 コントロール抗体 (灰色塗) で反応させ, CD4 陽性 T 細胞に絞り込んで解析した. データは同様の結果が得られた 2 検体のうちの代表例を示している. (c) Th1 (■) 及び Th2 細胞 (□) の CCR4 発現プロファイル. CCR4 に結合した抗体の蛍光強度の中央値を CCR4 の相対的な発現レベルとして示している. データは同様の結果が得られた 2 検体のうちの代表例を示している. (d) 活性化 Th2 (●, Day14) 及び休止期 Th2 細胞 (○, Day17) を CCL22 又は CCL17 誘発で処置し, 細胞の遊走反応を評価した. 各プロットは, 平均値±標準誤差を示している (n=3). (e) 1 nM CCL22 によって遊走する Th2 細胞 (Day31) に対する E0001-163 (3~300 nM) の阻害作用を 24 穴トランスウェルによって評価した. 選択性評価のため, 1 nM CXCL10 によって遊走する Th1 細胞 (Day31) に対する E0001-163 (100~1000 nM) の阻害作用を評価した. 各プロットは, 平均値±標準誤差を示している (n=3).

2-3-3. E0001-163 は CCR4 を介したマウス Th2 細胞の遊走を阻害する

ケモカイン受容体阻害薬の研究開発において、CCR1, CCR2 及び CCR5 などに対する阻害薬が報告されている。しかし、これら阻害薬の多くはヒト受容体に対して阻害作用を示すものの、げっ歯類の受容体では阻害作用が減弱あるいは消失しているため、げっ歯類を用いた検討が難しく阻害薬の研究開発を困難にしている²。E0001-163 の種差の有無について検討するため、E0001-163 のマウス Th2 細胞の遊走に対する阻害活性を評価した。マウス脾臓から CD4 陽性 T 細胞を調製し、ヒトと同様に Th2 細胞への分化誘導を行った。抗 TCR 抗体刺激下で Th2 に分化誘導した細胞は IL-4 を主に産生し、IFN- γ の産生は僅かであった。一方、Th1 に分化誘導した細胞は IFN- γ を産生し、Th1 及び Th2 への分化誘導が起こっていることを確認した (図 5a)。E0001-163 は CCL22 によって誘導される Th2 細胞の遊走を濃度依存的に抑制し、IC₅₀ 値は 13.4 nM であった (図 5b)。一方、Th2 細胞は CXCR4 のリガンドである CXCL12 に対しては遊走反応を示したが、E0001-163 は CXCL12 誘発の細胞遊走を抑制しなかった。E0001-163 はヒト及びマウスの Th2 細胞の遊走を同程度に抑制し、種差が少ないことが示された。

(a)



(b)

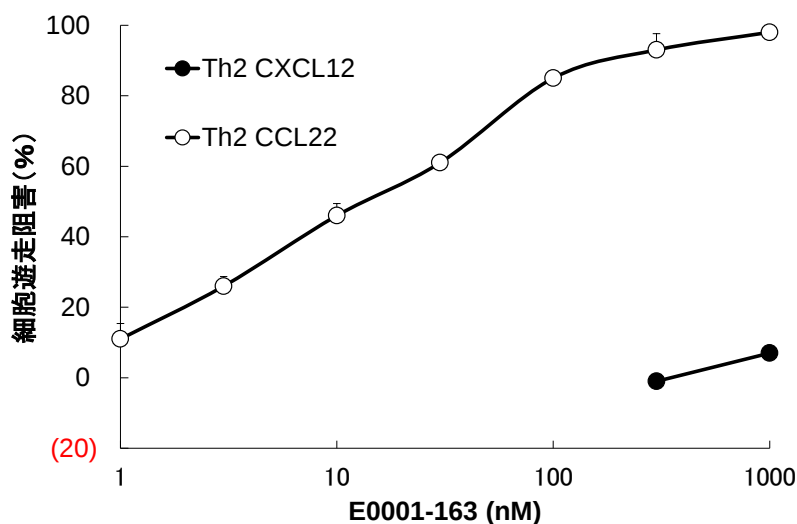


図5 マウス Th2 細胞に対する E0001-163 の遊走阻害作用

(a) マウス Th1 及び Th2 細胞に分化誘導した場合の IL-4, IFN- γ に対する細胞内染色.
(b) 1 nM CCL22 又は 10 nM CXCL12 によって遊走する Th2 細胞に対する E0001-163 (1~1000 nM) の阻害作用を 24 穴トランスウェルを用いて評価した. 各プロットは, 平均値 $\pm$ 標準誤差を示している (n=3).

2-3-4. E0001-163 は経口活性を有する

E0001-163 のマウス血中動態について検討した. 本化合物をマウスに 10 mg/kg 単回経口投与した場合, 良好な血中濃度推移を示し (C_{max} =8977 ng/mL; $T_{1/2}$ =3.2 h; AUC =13349 ng·h/mL), 血漿中濃度は 12 時間以上にわたって *in vitro* で評価したマウス Th2 細胞の遊走阻害作用の IC_{50} 値を上回っていた (図 6). E0001-163 は *in vivo* で CCR4 を阻害した際の妥当性を検証するための薬理学的なツールとして適していると考えられた.

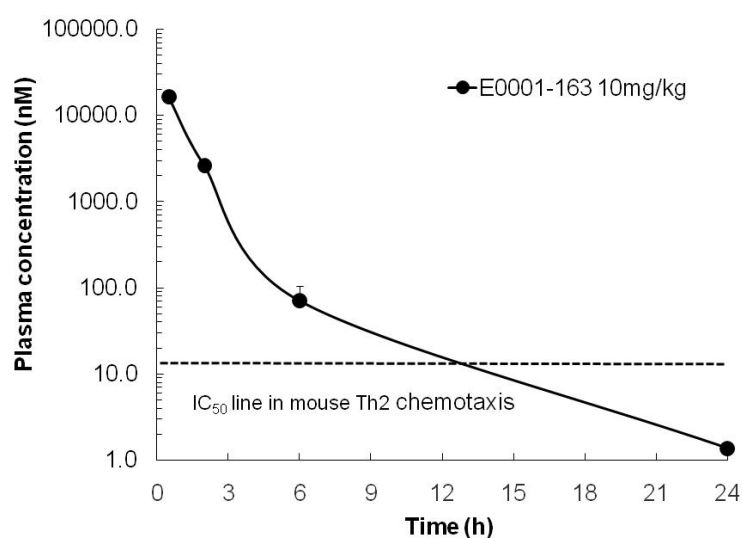
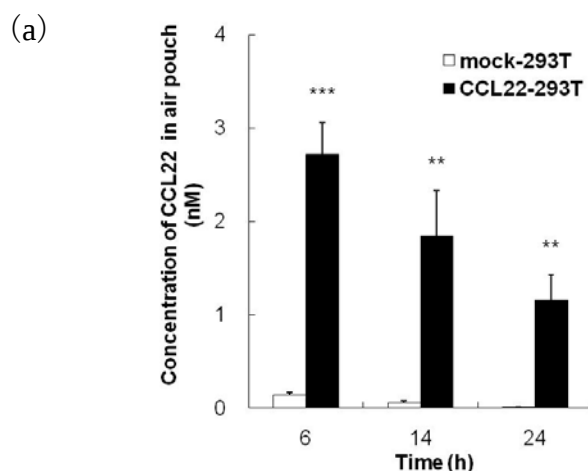


図6 BALB/c マウスに E0001-163 10 mg/kg を単回経口投与した時の血しょう中濃度の推移. 各プロットは, 平均値 $\pm$ 標準誤差を示している (n=3). マウス Th2 細胞における E0001-163 の遊走阻害活性の IC_{50} 値 (13.4 nM) を破線にて示す.

2-3-5. E0001-163 はマウスで CCL22 誘発の Th2 細胞浸潤を抑制する

E0001-163 が *in vivo* においても Th2 細胞の遊走を阻害できるかを検証するため、CCL22 誘発のマウスエアーポーチへの Th2 細胞浸潤モデルを構築した。集積部位をエアーポーチとしたのは、同部位に刺激物を注入した後で漏出液を容易に回収できるためである²⁷。最初に CCL22 蛋白をエアーポーチ内に注入したが T 細胞の浸潤は観察されなかった²⁵ことから、局所への細胞浸潤は CCL22 の持続的な産生が必要と考え、CCL22 を過剰発現させた 293T 細胞をエアーポーチ内に注入した。CCL22 過剰発現 293T 細胞を注入した結果、6~24 時間で CCL22 が産生され、*in vitro* でマウス Th2 細胞が遊走する濃度を持続的に確保できていることを確認した (図 7a)。更に、BALB/c マウスの脾細胞から *in vitro* で Th2 細胞に分化誘導させて、これを DBA/2 マウスに移入した。ドナー Th2 細胞は、アロ抗原の違いからレシピエント T 細胞とは識別できるようにした。CCL22 過剰 293T 発現細胞をエアーポーチ内に投与した後で Th2 細胞を尾静脈内投与した結果、mock 293T 細胞をエアーポーチ内に投与した時に比べて、Th2 細胞の有意な増加がみられた (図 7b)。E0001-163 3, 10 又は 30 mg/kg を経口投与した結果、E0001-163 は CCL22 によって遊走する Th2 細胞のエアーポーチ内への浸潤を用量依存的に阻害し、3 mg/kg で 60%、10 及び 30 mg/kg でほぼ 100%抑制することが明らかとなった。すなわち、E0001-163 は *in vivo* においても CCL22 によって誘導される Th2 細胞浸潤を抑制する能力を有していることが明らかとなった (図 7b)。



(b)

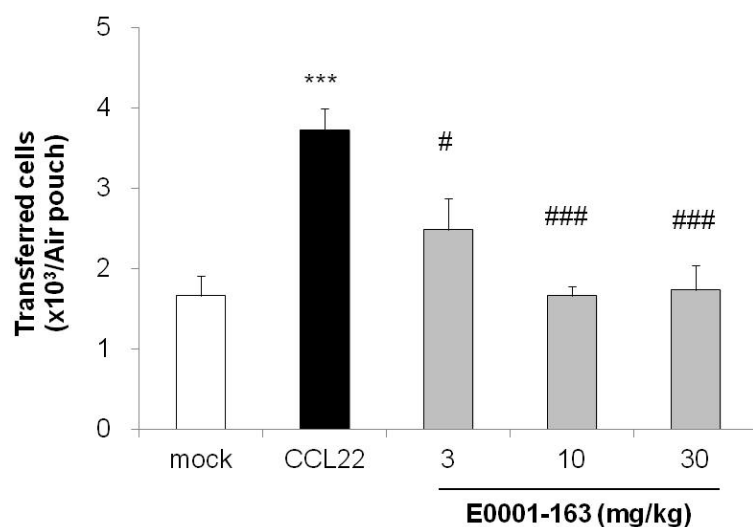


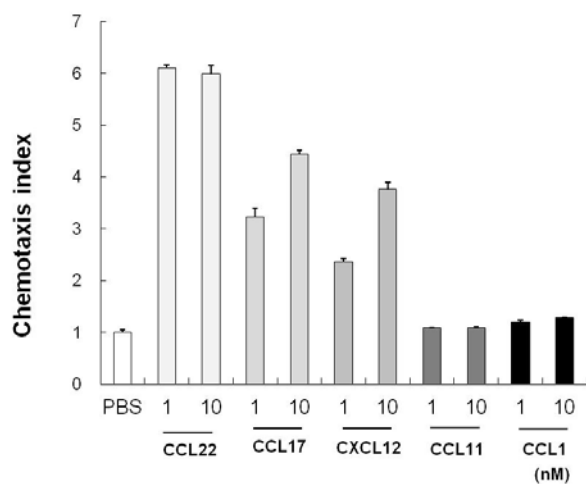
図7 CCL22 誘発マウスエアーポーチへの Th2 細胞浸潤に対する E0001-163 の抑制作用

(a) エアーポーチ内の CCL22 濃度. 1×10^7 個の mock 又は CCL22 発現 293T 細胞をエアーポーチ内に投与し, 投与 6, 14, 24 時間後の CCL22 濃度を測定した. 各棒グラフは, 平均値 $\pm$ 標準誤差を示している ($n=3 \sim 4$). t 検定で mock と CCL22 発現 293T 細胞移入群を比較した. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (b) E0001-163 3, 10, 30 mg/kg 又は可溶化溶媒を DBA/2 マウスに経口投与した. 0.5 時間後に 1×10^7 個の mock 又は CCL22 発現 293T 細胞をエアーポーチ内に投与し, 更に, 1 時間後に BALB/c マウス (CD5.2 アロ抗原) 由来の Th2 細胞を 2×10^7 個の DBA/2 マウス (CD5.1 アロ抗原) に尾静脈内投与した. 23 時間後に 2.5 mL PBS でエアーポーチを洗浄し漏出液を回収した. フローサイトメトリーにて CD4 陽性 T 細胞で CD5.2 アロ抗原が陽性の細胞を測定し, ドナー由来 Th2 細胞数を求めた. 各棒グラフは, 平均値 $\pm$ 標準誤差を示している ($n=5$). Dunnett 検定で E0001-163 投与群と CCL22 発現細胞投与 (コントロール) 群を比較した. #, $P < 0.05$; ###, $P < 0.001$. t 検定で, mock とコントロール群を比較した. ***, $P < 0.001$.

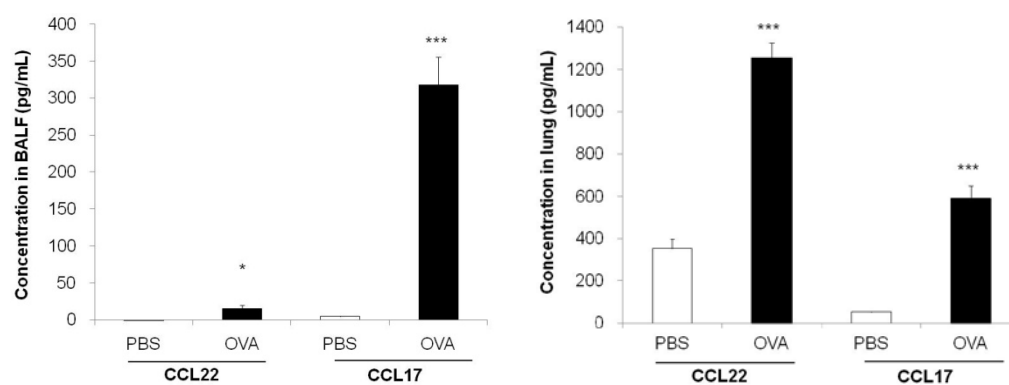
2-3-6. E0001-163 はマウスで抗原惹起による Th2 細胞浸潤を部分的に抑制する

次に、抗原惹起によって起こる T 細胞の組織浸潤に対する E0001-163 の抑制作用を評価するため、抗原惹起によるマウス気道炎症モデルを構築した。これは、OVA 特異的 T 細胞受容体を過剰発現させたトランスジェニックマウス (DO11.10) の T 細胞を用い、同細胞を BALB/c マウスに移入して OVA 吸入によって移入 T 細胞を肺に集積させる評価系である。T 細胞をマイトマイシン C 処理した脾細胞、OVA ペプチド、IL-4 及び抗 IFN- γ 抗体で処置し Th2 細胞に分化誘導した。作製した Th2 細胞の各種ケモカインに対する遊走反応を調べたところ、CCL22 に対して最も高い遊走反応を示し、CCL17 及び CXCR4 のリガンドである CXCL12 にも遊走反応を示した。一方、Th2 細胞は、他の Th2 型ケモカインである CCL1 (CCR8 リガンド)、CCL11 (CCR3 リガンド) には遊走反応を示さなかった (図 8a)。E0001-163 は CXCL12 誘発の Th2 細胞の遊走は阻害しないことを確認している (図 5b)。この Th2 細胞を BALB/c マウスに移入し、移入日を Day0 とした。翌日より 7 日間連続して OVA 吸入を行った。OVA を吸入惹起したマウスは、PBS を吸入させたマウスに比べて気管支肺胞洗浄液及び肺組織で CCL22 及び CCL17 が有意に増加しており、CCR4 陽性 T 細胞の浸潤を誘導していることが推察された (図 8b)。OVA 吸入群では、気管支肺胞洗浄液中に OVA 特異的 T 細胞数が有意に増加した (図 8c)。E0001-163 は、10 又は 30 mg/kg を OVA 吸入前に 1 日 1 回反復経口投与した。その結果、E0001-163 投与群では、気管支肺胞洗浄液中への OVA 特異的 T 細胞の浸潤を抑制する傾向がみられたものの有意な差ではなかった (図 8c)。また、気管支肺胞洗浄液中に好酸球浸潤が顕著にみられ、Th2 優位な応答が誘導されていることを確認した。しかし、E0001-163 は好酸球浸潤に影響を及ぼさなかった (図 8d)。更に、主に T 細胞から産生され则认为される肺及び気管支肺胞洗浄液での IL-4 産生を E0001-163 投与群で抑制する傾向がみられたが、その程度はわずかであった (図 8e)。E0001-163 で有意な Th2 細胞浸潤抑制作用がみられなかったのは、血中暴露量が不十分である可能性が考えられたため、E0001-163 10 又は 30 mg/kg を 1 日 2 回経口投与したが、1 日 1 回と同程度にしか抑制作用を示さなかった²⁵。

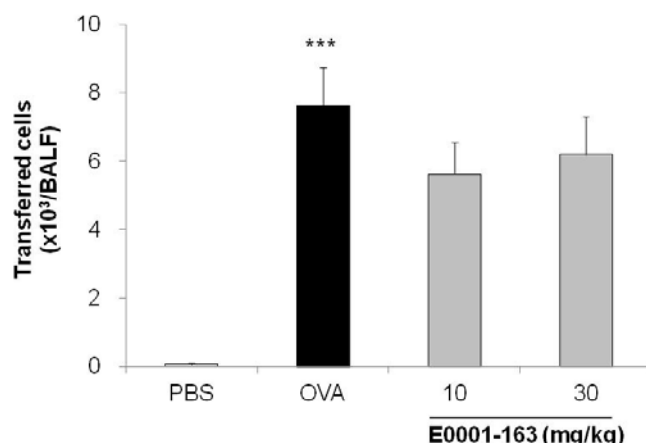
(a)



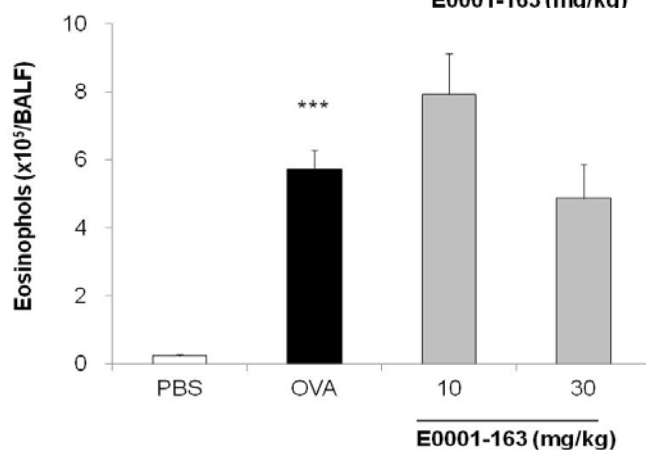
(b)



(c)



(d)



(e)

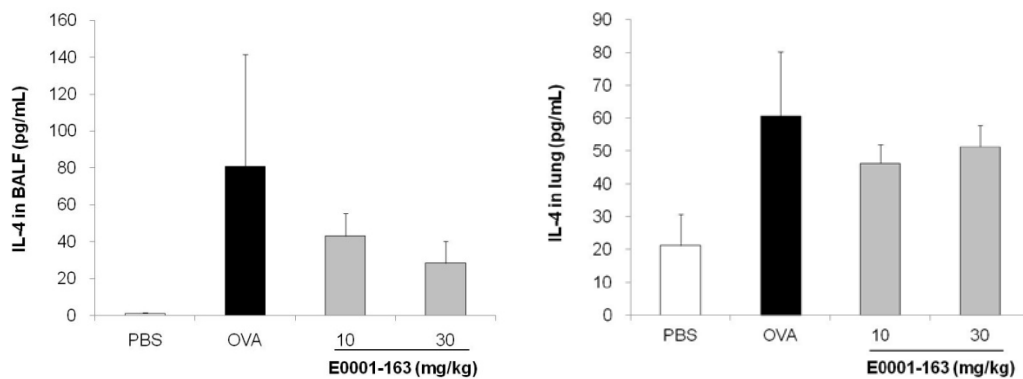


図8 Th2細胞移入による抗原惹起マウスモデルでのTh2細胞浸潤に対するE0001-163の抑制作用

(a) 分化Th2細胞の*in vitro*での遊走反応. 評価には, 1又は10 nMのCCL22, CCL17, CXCL12, CCL11, CCL1を用いた. 各棒グラフは, 平均値±標準誤差を示している (n=3).

(b) 抗原惹起による肺でのCCL22及びCCL17の濃度. BALB/cマウスに 5×10^6 個のDO11.10マウス由来のTh2細胞を移入した. 翌日から, BALB/cマウスへの5%OVA吸入惹起を開始し, 7日間連続して吸入させた. コントロール群のマウスにはDO11.10マウス由来のTh2細胞を移入し, OVAの代わりにPBSを吸入させた. 最終吸入日の翌日に気管支肺胞洗浄を実施し, 気管支肺胞洗浄液及び肺組織中のCCL22及びCCL17濃度を測定した. 各棒グラフは, 平均値±標準誤差を示している (n=5). t検定にて, PBSとOVA吸入群の有意差を検定した. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. (c) 気管支肺胞洗浄液中の移入T細胞数. (d) 気管支肺胞洗浄液中の好酸球数. (e) 肺胞洗浄液及び肺組織中のIL-4産生量. E0001-163 10, 30 mg/kg又は可溶化溶媒をOVA吸入前に反復経口投与した. 各棒グラフは, 平均値±標準誤差を示している (n=8~9). t検定にてPBSとOVA吸入群の有意差を検定した. ***, $P < 0.001$.

2-4. 小括

ケモカインとその受容体は様々な炎症疾患病態に関与しており、新規免疫調節薬の有望な標的候補群と考えられている。特に CCR4 は、その発現が喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症疾患の疾患活動性と相関すること^{28, 29}、及び CCR4 のリガンドである CCL22 と CCL17 が喘息患者の気管支肺胞洗浄液中で産生が亢進していることから^{14~16}、CCR4 阻害薬はアレルギー性炎症疾患の新規薬剤候補として注目されている。一方、これまでの論文報告の中には、アレルギー疾患における CCR4 の関与は低いとする論文も報告されており、例えば、Chvatchko 氏らは、OVA 惹起の喘息モデルにおいて CCR4 欠損マウスと野生型マウスで肺への免疫細胞の浸潤と気道抵抗値の上昇に差がみられなかったことを報告している¹⁷。また、Conroy 氏らは、モルモット喘息モデルにおいて抗 CCR4 抗体を投与しても T 細胞浸潤を殆ど抑制できないことを報告しており¹⁸、アレルギー性炎症疾患における CCR4 の役割は明確ではない。

私は、CCL22 によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を指標に CCR4 阻害化合物を探索し、E0001-163 を見出した (図 2)。そして、アレルギー性炎症病態における CCR4 の役割を検証するため、*in vitro* 及び *in vivo* における E0001-163 の薬理学的作用について検討した。*In vitro* において、E0001-163 はヒト及びマウスの Th2 分化細胞の CCL22 刺激による遊走を抑制し、 IC_{50} 値はそれぞれ 11.9 nM, 13.4 nM であった。一方、E0001-163 は T 細胞の CXCL10 (CXCR3 リガンド) や CXCL12 (CXCR4 リガンド) 刺激による遊走を抑制せず、E0001-163 は CCR4 を介した T 細胞遊走を選択的に抑制することが分かった。

ヒト血液から CD4 陽性 T 細胞を単離し、CCR4 の発現率を調べた結果、CD4 陽性 T 細胞の 20%程度に CCR4 が発現しており、これは他グループの報告と同様の結果であった^{8, 26}。そして、*in vitro* での Th2 細胞への分化誘導条件において、抗 CD3 抗体刺激後の活性化 Th2 細胞では CCR4 発現が低下し、刺激を除去し IL-2 存在下で細胞増殖が亢進している休止期 Th2 細胞では CCR4 発現が増加することが分かった (図 4c)。更に、活性化 Th2 細胞は CCL22 や CCL17 刺激に対して遊走反応を示さないが、休止期 Th2 細胞は劇的に遊走するようになった (図 4d)。すなわち、CCR4 の発現増加に伴い Th2 細胞は CCL22/CCL17 に対して高い遊走反応を示すことが分かった。このことは、*in vitro* の分化誘導条件ではあるが、休止期状態の T 細胞はケモカイン受容体の発現増加に伴い、Th1 あるいは Th2 型ケモカインに対して高反応性になることを示している。更に、Th2 細胞よりも遊走反応は劇的ではないものの、Th1 細胞も CCL22 や CCL17 刺激に対して遊走した²⁵。このことは、CCR4 は Th2 細胞優位であるものの、Th2 細胞集団に特異的ではないことを示唆している。

T細胞を介した炎症機序はヒト喘息及びアレルギー性炎症疾患の動物モデルにおいて検証され、Th2細胞がヒト喘息の病態において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている³⁰。しかし、最近の知見では、Th2だけでなくTh1、Th17及びTreg細胞といったその他のサブセットも病態に関わっていると考えられている³¹。マウス疾患モデルにおいて、CCR4の重要度を検証するために多くの試験が行われてきたが、上述の通り、統一した結果は得られていない。その矛盾の潜在的な原因は、動物疾患モデルでの疾患関連T細胞の不均一性にあるのかもしれない。また、T細胞遊走には複数のケモカイン受容体に関わっており³²、CCR4を阻害してもその他のケモカイン受容体によって補われている可能性がある。更に、CCR4はTreg細胞にも発現していることが報告されており^{33, 34}、CCR4阻害はTreg細胞を阻害することでアレルギー性炎症を悪化させることも考えられる。そして、これらのCCR4阻害による矛盾した結果は、既存のCCR4阻害薬が*in vivo*においてTh2細胞の遊走を抑制する能力を有しているのかといった疑問を生じさせる。そこで、私は*in vivo*でのE0001-163のTh2細胞浸潤に対する抑制作用について検証するため、CCL22刺激によってTh2細胞を遊走させる独自のマウスモデル系を構築した。CCL22蛋白をマウスのエアーポーチや気管支内に投与してもレシピエント及びドナーのT細胞は組織に集積することにはなかった²⁵。そこで、T細胞を集積させるためにはCCL22を持続的に産生させる必要があるとの仮説を立て、CCL22を過剰発現させた293T細胞をマウスのエアーポーチ内に投与することで、*in vitro*でTh2細胞が遊走するのに十分なCCL22濃度をエアーポーチ内で持続させることに成功した(図7a)。CCL22発現293T細胞をエアーポーチ内に投与することで、mock 293T細胞に比べてエアーポーチ内への移入Th2細胞の浸潤増加が確認された(図7b)。そして、E0001-163はエアーポーチ内へのCCL22によって誘導されるTh2細胞の浸潤を用量依存的に阻害し、10 mg/kg以上の経口投与によってほぼ完全にTh2細胞の浸潤を阻害した(図7b)。このことから、E0001-163は*in vivo*においてCCR4/CCL22を介したTh2細胞の浸潤を阻害する能力があることが明らかとなった。

次に、病態時の組織へのT細胞浸潤に対するE0001-163の抑制作用を検討するため、マウスにOVA特異的なTh2細胞を移入しOVAを吸入惹起させるアレルギー性気道炎症モデルを作製した。本評価系は、T細胞によって誘導される好酸球浸潤などの気道炎症を評価する際に汎用されるモデルである^{19, 23}。PBSを吸入させたコントロール群に比べてOVAを吸入惹起した群では、気管支肺胞洗浄液と肺組織においてCCL22とCCL17の有意な産生増加がみられ(図8b)、CCR4を介したT細胞浸潤を誘導していることが示唆された。CCR4リガンドの産生は、ドナーマウス由来の細胞によると考えており、マウスでのアレルギー反応を誘導する実験においてCCL22及びCCL17は

それぞれ肺胞マクロファージ、気管支上皮細胞から産生されることが報告されている^{35, 36}。本モデルにおいて、E0001-163 はマウスエアポーチモデルにおいて Th2 細胞浸潤を完全に抑制した 10 及び 30 mg/kg の用量を 1 日 1 回経口投与した。E0001-163 投与群では、気管支肺胞洗浄液中の OVA 特異的な T 細胞数は対照群に比べて 20% 程度抑制した (図 8c)。一方、E0001-163 投与では気管支肺胞洗浄液中への好酸球の浸潤に影響はなかった (図 8d)。この結果は、E0001-163 によって Th2 細胞の浸潤を若干抑制した程度では、気道内腔への好酸球やその他の炎症細胞の浸潤を、気管支肺胞洗浄液中の結果と同様に阻害できないことを示唆している。Kaminuma らのグループは、CCR4 阻害薬である Compound 22 を 100 mg/kg の用量で 1 日 2 回皮下投与することで、本モデルと同様の OVA 吸入マウスモデルにおいて、肺への Th2 細胞と好酸球の浸潤を有意に抑制したことを報告している¹⁹。本モデルにおいて Th2 細胞浸潤を部分的にしか抑制できなかったのは E0001-163 の血中暴露量が不十分であった可能性も考慮し、10 及び 30 mg/kg を 1 日 2 回経口投与したが、Th2 細胞浸潤の抑制作用は E0001-163 の 1 日 1 回経口投与の場合と同程度であった。私と Kaminuma 氏らのグループの実験結果の違いの理由は不明であるが、実験条件の違いに因るものかもしれない。また、Mikhak 氏らのグループも、同様の抗原惹起の系において、OVA を吸入惹起すると CCR4 欠損マウス由来の抗原特異的 Th2 細胞及び好酸球の肺胞洗浄液中への浸潤がそれぞれ 50, 53% 阻害されたことを報告している²³。Mikhak 氏らの実験では、マウスに OVA を 3 日間連続吸入させた後、最終吸入の 24 時間後の肺胞洗浄液中の T 細胞浸潤数を評価している。一方、私はマウスに OVA を 7 日間連続吸入させ、最終吸入の 24 時間後の T 細胞浸潤数を評価した。CCR4 は主に急性期の肺への T 細胞浸潤に関与しており、慢性期においてはその役割は弱いのもかもしれない。また、Th2 細胞には CCR4 の他、CCR3 も発現しているとの報告がある⁷ことから、私は OVA 惹起のマウス Th2 細胞浸潤モデルで既存の CCR3 阻害薬³⁷を 30 mg/kg の用量で 1 日 2 回反復経口投与した。その結果、CCR3 阻害薬は E0001-163 と同程度にしか Th2 細胞浸潤を抑制しなかった²⁵。このことは、T 細胞の遊走には複数のケモカイン/ケモカイン受容体に関与しており、OVA 惹起による気道炎症の条件下では CCR3 と共に CCR4 は Th2 細胞浸潤に部分的に関与していることを示唆している。

以上、E0001-163 は経口投与可能な CCR4 阻害薬であり、CCR4 を介した T 細胞遊走を抑制した。また、マウスのエアポーチモデルにおいて、E0001-163 は CCL22 によってエアポーチ内へ浸潤する Th2 細胞を用量依存的に抑制した。一方、OVA 惹起によるマウス気道炎症モデルにおいては、Th2 細胞の浸潤を 20% 程度しか阻害せず、同病態条件下では CCR4 は Th2 細胞浸潤に部分的にしか関与していないことが示唆された。これまで、アレルギー性疾患で T 細胞浸潤における CCR4 の寄与度は高いとす

る報告^{13, 28, 29}はあるが，それを検証するには，臨床で E0001-163 のように *in vivo* でも作用する CCR4 阻害薬を用い，CCR4 陽性 T 細胞の浸潤を抑制することで治療効果を発揮できるかを確かめる必要がある．

2-5. 参考文献

1. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 28, 445-89 (2010).
2. Islam A, Luster A. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18, 705-15 (2012).
3. Jiang S, Dong C. A complex issue on CD4⁺ T-cell subsets. *Immunol Rev.* 252, 5-11 (2013).
4. Andrew DP, Ruffing N, Kim CH et al. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol* 166, 103-11 (2001).
5. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187,129-34 (1998).
6. Kim CH, Nagata K, Butcher EC. Dendritic cells support sequential reprogramming of chemoattractant receptor profiles during naive to effector T cell differentiation. *J Immunol* 171, 152-8 (2003).
7. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-83 (1998).
8. Wang C, Kang SG, Lee J et al. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2, 173-83 (2009).
9. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400, 776-80 (1999).
10. Nouri-Aria KT, Wilson D, Francis JN et al. CCR4 in human allergen-induced late responses in the skin and lung. *Eur J Immunol* 32, 1933-8 (2002).
11. Zheng X, Nakamura K, Furukawa H et al. Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis. *J Dermatol* 30, 26-32 (2003).

12. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M et al. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 107, 1357-64 (2001).
13. Vijayanand P, Durkin K, Hartmann G et al. Chemokine Receptor 4 Plays a Key Role in T Cell Recruitment into the Airways of Asthmatic Patients. *J Immunol* 184, 4568–74 (2010).
14. Pilette C, Francis JN, Till SJ et al. CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur Respir J* 23, 876-84 (2004).
15. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M et al. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 165, 2205-13 (2000).
16. Ying S, O'Connor B, Ratoff J et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 181, 2790-8 (2008).
17. Chvatchko Y, Hoogewerf A, Meyer A et al. A Key Role for CC Chemokine Receptor 4 in Lipopolysaccharide-induced Endotoxic Shock. *J Exp Med* 191, 1755–1763 (2000).
18. Conroy DM, Jopling LA, Lloyd CM et al. CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *J Leukoc Biol* 74, 558-63 (2003).
19. Kaminuma O, Ohtomo T, Mori A et al. Selective down-regulation of Th2 cell-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4. *Clin Exp Allergy* 42, 315-25 (2012).
20. Othy S, Topçu S, Kaveri SV et al. Effect of CC chemokine receptor 4 antagonism on the evolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E2412-3 (2012).
21. Purandare AV, Wan H, Somerville JE et al. Core exploration in optimization of chemokine receptor CCR4 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 679-82 (2007).

22. Sato T, Komai M, Iwase M et al. Inhibitory effect of the new orally active CCR4 antagonist K327 on CCR4+CD4+ T cell migration into the lung of mice with ovalbumin-induced lung allergic inflammation. *Pharmacology* 84, 171-82 (2009).
23. Mikhak Z, Fukui M, Farsidjani A et al. Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123, 67-73 (2009).
24. Oyoshi MK, Elkhail A, Scott JE et al. Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. *J Clin Invest* 121, 2210-20 (2011).
25. Komiya T, Sugiyama T, Takeda K et al. Suppressive effects of a novel CC chemokine receptor 4 antagonist on Th2 cell trafficking in ligand- and antigen-induced mouse models. *Eur J Pharmacol* 720, 335-43 (2013).
26. Imai T, Nagira M, Takagi S et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11, 81-8 (2005).
27. Sedgwick AD, Sin YM, Edwards JC et al. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *J Pathol* 141, 483-95 (1983).
28. Hartl D, Griesse M, Nicolai T et al. Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *J Allergy Clin Immunol* 15, 728-36 (2005).
29. Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T et al. CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117, 188-96 (2001).
30. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* 10, 838-48 (2010).
31. Robinson DS. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 126, 1081-91 (2010).

32. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2, 95-101 (2001).
33. Faustino L, Da Fonseca DM, Takenaka MC et al. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. *J Immunol* 190, 2614-21 (2013).
34. Iellem A, Mariani M, Lang R et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194, 847-53 (2001).
35. Gonzalo JA, Pan Y, Lloyd CM et al. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 163, 403-11 (1999).
36. Kawasaki S, Takizawa H, Yoneyama H et al. Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 166, 2055-62 (2001).
37. De Lucca GV, Kim UT, Vargo BJ et al. Discovery of CC chemokine receptor-3 (CCR3) antagonists with picomolar potency. *J Med Chem* 48, 2194-211 (2005).

第三章 S1P 受容体作動薬

3-1. 序論

近年, S1P₁ 受容体欠損マウスを用いた解析と S1P 受容体作動薬の作用機序の解明により, リンパ球の二次リンパ組織からの移出に S1P/S1P₁ 受容体が重要な役割を果たしていることが明らかとなった^{1, 2}. S1P は, 血漿中に多量に存在する (100~400 nM) 脂質メディエーターであり, S1P の濃度勾配によりリンパ球は二次リンパ組織から血液へ再循環する^{3, 4}.

S1P 受容体は S1P₁~S1P₅ 受容体の 5 つのサブタイプが知られている. FTY720 (フィンゴリモド) はファーストインクラスの S1P 受容体作動薬であり, 多発性硬化症 (MS) 患者を対象とした臨床試験において有効性が確認され^{5, 6}, 2010 年に再発寛解型 MS の再発予防薬として承認を取得した. MS は脱髄と神経変性によって中枢神経系が障害を受ける慢性の自己免疫疾患である. MS の病因は複雑であるが, 神経軸索を取り巻く髄鞘を認識する自己反応性 T 細胞の活性化が病因の初期イベントと考えられており, 髄鞘が脱髄消失した病変部ではリンパ球が浸潤し中枢神経系を障害する^{7, 8}. フィンゴリモドは生体内でスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化体となり, S1P₂ を除く 4 つの S1P 受容体と結合し⁹, 末梢血リンパ球減少作用を示す^{10, 11}. フィンゴリモドの治療効果は S1P₁ を介していると考えられており, 一方, フィンゴリモドの副作用として知られる除脈などは S1P₃ 作動活性を介していることがげっ歯類を用いた動物実験の結果から示されている^{12, 13}.

私は, CCR4 に次ぐ二番目の標的として S1P 受容体に着目し, S1P₁ 受容体を活性化させることでリンパ球の循環動態を制御し, 更に S1P₃ 作動活性を回避することでフィンゴリモドよりも安全性の高い薬剤を創製できると考えた. 同コンセプトに基づいて S1P 受容体作動薬を探索した結果^{14, 15}, フィンゴリモドよりも S1P 受容体に対する選択的を高めた ONO-4641 を創製した¹⁶. ONO-4641 は経口活性を有し, フィンゴリモドと異なり未変化体で活性を示す化合物であった. 現在, ONO-4641 は MS を対象に臨床試験を実施している. 本研究では, ONO-4641 の生体内のリンパ球循環動態を制御する作用機序について検討すると共に, 多発性硬化症や関節リウマチの動物疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルやコラーゲン惹起関節炎 (CIA) モデルで ONO-4641 の有効性を評価し, 自己免疫疾患治療薬としての可能性を検証した.

3-2. 材料と方法

3-2-1. ONO-4641 とその他の化合物

ONO-4641 は小野薬品工業株式会社で合成された^{14~16}. S1P と SEW2871 は Alexis (San Diego, CA, USA) と Merck KGaA (Darmstadt, Germany) よりそれぞれ入手した. プレドニゾロンは Sigma-Aldrich, Inc より入手した.

3-2-2. S1P 受容体発現細胞株

ヒト S1P₁, ヒト S1P₂, ヒト S1P₃, ヒト S1P₄, ヒト S1P₅ 及びラット S1P₁ 受容体の各安定発現細胞は, 各全長 cDNA を含んだ pIRESneo-Myc ベクターを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて CHO-K1 細胞に導入し作製した. mock/CHO-K1 細胞は CHO-K1 細胞を宿主とし発現ベクターを安定導入させた.

3-2-3. 実験動物

雌性 LEW/CrlCrlj 系ラットは日本チャールス・リバー株式会社より入手した. 雌性 non-obese diabetic (NOD) /ShiJcl マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) より入手した. 動物を用いた試験は, 小野薬品工業株式会社 研究本部 「動物実験に関する規程」を遵守して試験を実施した.

3-2-4. 競合結合実験

ヒト S1P₁, ヒト S1P₂, ヒト S1P₃, ヒト S1P₄, ヒト S1P₅ 及びラット S1P₁ の各安定発現細胞から調製した膜画分を用い, 各受容体への [³³P]-S1P (American Radiolabeled Chemicals, St Louis, MO, USA) の特異的結合に対する ONO-4641 の競合結合実験を行った. 96 ウェルプレート (AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan) に, 全結合群では媒体を, 非特異的結合群では過剰量の S1P (Merck, NJ, USA) を, 被験物質群では各濃度の ONO-4641 を, 対照物質群では各濃度の S1P をそれぞれ添加した後, [³³P]-S1P 及び膜画分をそれぞれ加えた. プレート室温で 60 分間インキュベーションした後, セルハーベスター (PerkinElmer, UniFilter96 ハーベスター) を用いてグラスファイバーフィルター上に膜画分を回収し, 膜画分に結合した放射活性を測定した. 全結合群における [³³P]-S1P の特異的結合量に対する被験物質及び対照物質の各濃度での特異的結合量の相対値から, [³³P]-S1P の特異的結合を 50% 置換する被験物質及び対照物質の濃度 (IC₅₀ 値, nM) を求めた後, それらの阻害定数 (K_i 値) を計算した.

3-2-5. cAMP 産生抑制作用

ヒト S1P₁, ヒト S1P₅, ラット S1P₁ 受容体発現細胞及び mock 細胞に forskolin (Sigma-Aldrich) と ONO-4641 または S1P を同時に処置し, 37°C で 0.5 時間静置した. その後細胞を溶解し cAMP 量を ELISA 法 (Applied Biosystems) にて定量した. forskolin 刺激による cAMP 産生に対する ONO-4641 及び S1P の抑制作用は, 溶媒処置群の cAMP 量に対する相対値を算出し, EC₅₀ 値で評価した.

3-2-6. S1P₁ 受容体発現解析

ヒト S1P₁ 受容体を安定発現させた CHO 細胞を ONO-4641, S1P または SEW2871 で処置 (37°C, 1 時間静置) した後, 4% パラフォルムアルデヒド/PBS を用いて細胞を固定した. その後, 受容体の N 末端に付与した Myc タグに対する抗体 (anti-c-Myc monoclonal antibody clone 9E10, Sigma-Aldrich) を 1 次抗体として, 次に蛍光標識 2 次抗体 (R-phycoerythrin goat anti-mouse IgG, Invitrogen) を反応させた. 結合した抗体の蛍光強度をフローサイトメーター (FACSCalibur, BD Biosciences) を用いて測定し, 細胞膜表面の S1P₁ 受容体の発現解析を行った. 各化合物の細胞膜表面からの S1P₁ 受容体発現減少作用は, EC₅₀ 値を算出して評価した.

3-2-7. 末梢血リンパ球数の測定

雌性 Lewis ラットに ONO-4641 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg 又は媒体として 0.5% MC を 10 mL/kg の容量で, 経口ゾンデ (CLEA Japan) を用いて単回経口投与した. 投与液量は, 投与当日の個々の体重に基づいて算出した. 投与前 (群分け時), 投与 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 及び 120 時間後に, エーテル麻酔下にてラット尾静脈より 200 μ L 採血した. また, 雌性 NOD マウスは, ONO-4641 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg, 又は媒体として 0.5% MC を 10 mL/kg の容量で, 経口ゾンデを用いて単回経口投与した. 投与液量は, 投与当日の個々の体重に基づいて算出し, 投与 24 時間後にマウス腹部大静脈より採血した. 採取した血液は速やかに EDTA-2Na 粉末含有の微量採血管 (Terumo Corporation) に移し, 多項目自動血球分析装置 (SF-3000, Sysmex Corporation) にて末梢血リンパ球数を測定した.

3-2-8. 二次リンパ組織におけるリンパ球数測定

雌性 Lewis ラットから摘出した頸部, 単径及び腸間膜リンパ節由来の細胞を 1.5 vol% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 49 vol% RPMI1640 (Life Technologies), 49 vol% Hanks' balanced salt solution (Life Technologies) を含む 10 mM Hepes (Life Technologies) 培地に細胞を懸濁した. CFSE (Dojindo, Kumamoto, Japan) で標識した

後、細胞密度が 5×10^7 cells/mL となるように PBS に懸濁し、養子細胞懸濁液を調製した。

ONO-4641 0.1 mg/kg 及び媒体を雌性 Lewis ラットに経口投与し、投与 2.5 時間後に養子細胞懸濁液 1 mL を静脈内投与により移入した。移入 1.5 時間後に単径リンパ節、腋下リンパ節、腸間膜リンパ節の摘出及び採血を行った。二次リンパ組織及び末梢血中の標識リンパ球数は、フローサイトメーターを用いて測定した各検体中の標識リンパ球のイベント数及び Flow-Count 標準粒子 (Beckman Coulter) のイベント数を用いて算出した。

3-2-9. リンパ球活性化に対する ONO-4641 の評価

本実験は、小野薬品工業株式会社研究本部「ヒト組織を用いた研究」倫理規程を遵守して実施した。インフォームドコンセントにより協力を得た健常人ボランティアから血液を入手した。密度勾配遠心分離法を用いて、ヒト血液から PBMC を調製した。続いて、磁気ビーズによるリンパ球分離用キット (R&D Systems) を用いて、PBMC から T 細胞及び B 細胞を調製した。T 細胞は $10 \mu\text{g/mL}$ 抗 CD3 及び $3 \mu\text{g/mL}$ 抗 CD28 抗体 (共に R&D Systems) で 4 日間刺激を加えて、細胞増殖及び IFN- γ 産生を測定した。B 細胞は $20 \mu\text{g/mL}$ 抗 IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) 及び 10 ng/mL IL-4 (R&D Systems) で刺激し、細胞増殖の場合は 4 日間、IgG 産生の場合は 9 日間培養した後で測定した。

3-2-10. ラット EAE モデル

結核死菌 (Difco Laboratories, MI, USA) を注射用蒸留水に懸濁し、MBP (Myelin Basic Protein, SIGMA-ALDRICH, Inc.) を溶解させた (結核死菌: $1000 \mu\text{g/mL}$, MBP: $60 \mu\text{g/mL}$)。この溶液を FCA (フロイント完全アジュバント, CHEMICON International, Inc.) と等量混合してエマルジョンを調製し、これを惹起剤とした。雌性 Lewis ラットの足蹠に惹起剤 0.1mL を皮下投与することで免疫処置を行った。ONO-4641 (0.01, 0.03, 0.1 mg/kg) 及びプレドニゾロン (3 mg/kg) は免疫 4 日目から 21 日目まで 1 日 1 回反復経口投与した。免疫処置日及び免疫 9 日目から 22 日目まで神経症状を観察し、麻痺の程度をスコア化して神経症状スコアとした (正常: 0, 尾弛緩: 1, 後肢部分麻痺: 2, 後肢完全麻痺: 3)¹⁷。観察期間内における動物毎の神経症状スコアの最大値を最大神経症状スコアとした。

また、脊髄への細胞浸潤に対する ONO-4641 の評価について、雌性 Lewis ラットの足蹠に惹起剤を皮下投与してから 16 日目に脊髄を摘出した。脊髄をホルマリン固定した後、腰仙髄の HE 染色標本を作製し、HE 染色標本上の囲管性細胞浸潤血管数を

測定することで細胞浸潤を評価した¹⁸。また、細胞浸潤がみられた動物の未染色標本を、抗 CD3 抗体 (DAKO, Denmark) を用いて免疫染色した。このうち、対照群の免疫染色標本について細胞浸潤巣における CD3 陽性 T 細胞を観察した。

3-2-11. マウス再発寛解 EAE モデル

雌性 NOD マウスに Myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG 35-55, AnaSpec, CA, USA) を含む惹起剤を皮下投与し、Pertussis toxin (PTX; Sigma-Aldrich, Inc.) を静脈内投与した。初回発症の後に寛解を示した動物を選抜して群割り付けした後、ONO-4641 (0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg) 又は 0.5%MC を 1 日 1 回 8 週間反復経口投与した。免疫処置日 (惹起剤投与前) 及び免疫処置 7 日後から投与開始 56 日後まで神経症状を観察し、麻痺の程度をスコア化して神経症状スコアとした (正常: 0, 尾弛緩: 1, 後肢部分麻痺: 2, 後肢麻痺: 3, 前肢麻痺: 4, 瀕死または死亡: 5)¹⁹。また、群分け後に神経症状スコア 1 以上を示すことを再発とし、実験終了日までに再発した動物の割合 (再発率) を求めた。

3-2-12. ラット CIA モデル

ウシ II 型コラーゲン (コラーゲン技術研修会) とアジュバント・ペプチド (ペプチド研究所) を含む希釈液を作製し、Incomplete Freund Adjuvant (IFA) (DIFCO) と等量混合してコラーゲンエマルジョン液を調製してこれを惹起剤とした。惹起剤をエーテル麻酔下にて雌性 LEW ラットの背部に 10 ヶ所 0.1 mL ずつ皮内投与した。初回感作日を 0 日目とし (Day 0), 更に、7 日後に惹起剤 0.12 mL を尾根部に皮内投与した (Day 7)。ONO-4641 は 0.03 及び 0.1 mg/kg を Day0 より Day27 まで 1 日 1 回反復経口投与した。また、対照物質として用いた MTX 1.2 及び 2.4 mg/kg は週 3 分割して、Day0 より Day22 まで間欠経口投与した (各週の第一日目に 1 日 2 回, 第二日目に 1 日 1 回投与して, 第 3~7 日目は 0.5%MC を 1 日 1 回投与)。タクロリムスは 1, 3 mg/kg は 1 日 1 回反復経口投与した。無処置群には何も投与しなかった。マウス・ラット後肢足浮腫容積測定装置 (TK-101CMP; BrainScience Idea, Osaka, Japan) を用いて, Day0, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 に足容積を測定した。関節炎スコアは, 足容積測定日と同じ日に観察及び測定し, 下記の様に紅斑と腫脹の強さにより前肢及び後肢について個別に評点した。すなわち, 指節間関節は, 腫脹なし: 0, 少なくとも一つの関節に腫脹: 1, 手根間関節は, 腫脹なし: 0, 僅かな腫脹: 1, 中等度の腫脹: 2, 高度の腫脹: 3 とした。また, 足根間関節は, 同じ日に測定した足容積をもとに評点し, 関節炎を発症したラットについて, 足容積が 1.4mL 未満: 1, 足容積が 1.4mL~1.6mL: 2, 足容積が 1.6mL 以上: 3 とした。この評点法に従うと 30 点満点となる。

3-2-13. 統計解析

統計解析は、SAS System Release 9.2 TS2M3 (SAS Institute Japan Inc.) 及び EXSAS Version. 7.7.1 (CAC EXICARE Corporation)を用いて行った。有意差検定は、2 群間の比較は t 検定、多群間比較の場合は Dunnett を用いた。両側検定とし、有意水準は 5%とした。

3-3. 結果

3-3-1. ONO-4641 は S1P₁ 及び S1P₅ に高い結合親和性及びアゴニスト作用を有する

各ヒト S1P 受容体発現 CHO 細胞から調製した膜各分を用い、各受容体への ³³P-S1P の特異的結合に対する ONO-4641 の競合結合実験を行った。ONO-4641 は S1P₁ 及び S1P₅ 受容体への ³³P-S1P の特異的結合を濃度に応じて阻害し、それらの K_i 値は、それぞれ 0.626, 0.574 nM であった。ONO-4641 は S1P₄ 受容体への ³³P-S1P の特異的結合も阻害したが、その K_i 値は 28.8 nM と S1P₁ 及び S1P₅ 受容体に比べて 50 倍ほど結合親和性が乖離していた。一方、S1P₂ 及び S1P₃ 受容体への ³³P-S1P の特異的結合に対する ONO-4641 の阻害率は 10 μM においても 50%未満であった。また、種差を検討するため、ONO-4641 のラット S1P₁ 受容体に対する競合結合実験を行い、ONO-4641 は 0.772 nM の K_i 値を示し、ラット S1P₁ 受容体に対しても高い結合親和性を有していた (表 1)。

表 1 ONO-4641 及び S1P の S1P 受容体に対する結合親和性

受容体	K _i 値 (nM) (95%信頼区間)	
	ONO-4641	S1P
hS1P ₁	0.626 (0.567-0.694)	0.221 (0.195-0.249)
hS1P ₂	>5450	0.543 (0.453-0.649)
hS1P ₃	>5630	0.0507 (0.0459-0.0560)
hS1P ₄	28.8 (25.8-32.2)	5.57 (5.11-6.07)
hS1P ₅	0.574 (0.513-0.644)	0.225 (0.207-0.243)
rS1P ₁	0.772 (0.656-0.906)	0.298 (0.253-0.350)

S1P₁及びS1P₅受容体はGi蛋白とカップリングしているという報告がある²⁰. 次に, ONO-4641 の S1P₁ 及び S1P₅ 受容体に対するアゴニスト作用を, アデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin 刺激による環状アデノシン 1 リン酸 (cAMP) 産生に対する抑制作用を指標に検討した. ヒト S1P₁あるいは S1P₅ 受容体発現 CHO 細胞に forskolin と ONO-4641 を同時に処置し, その後に細胞を溶解して cAMP 濃度を測定した. その結果, ONO-4641 は S1P₁ 及び S1P₅ 受容体発現 CHO 細胞において, ONO-4641 はいずれも濃度に応じた cAMP 産生抑制作用を示し, EC₅₀ 値はそれぞれ 0.0273 及び 0.334 nM であった. また, ラット S1P₁ 受容体発現 CHO 細胞を用いて同様の実験を行った結果, ONO-4641 の EC₅₀ 値は 0.0286nM であり, S1P₁ 受容体に対するアゴニスト作用にヒトとラット間で種差はみられなかった (表 2) .

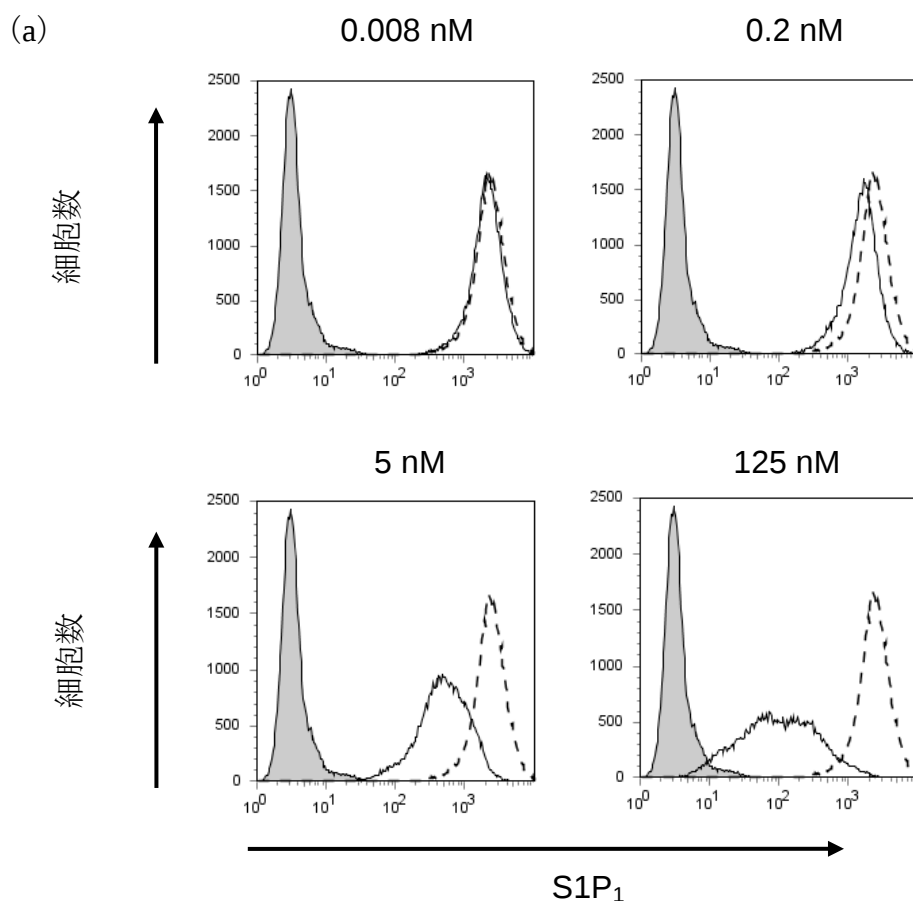
表 2 ONO-4641 及び S1P の S1P_{1/5} 受容体に対するアゴニスト活性

	EC ₅₀ (nM) (95%信頼区間)		
	hS1P ₁	hS1P ₅	rS1P ₁
ONO-4641	0.0273 (0.0121~0.0617)	0.334 (0.244~0.456)	0.0286 (0.00972~0.0843)
S1P	0.627 (0.280~1.40)	0.681 (0.461~1.01)	0.518 (0.360~0.746)

3-3-2. ONO-4641 は細胞膜上の S1P₁ 受容体を内在化させる

フィンゴリモドや SEW2871 といった S1P 受容体作動薬は細胞表面からの S1P₁ 受容体を内在化することでリンパ球減少作用を発揮すると考えられている^{21~23}.

ONO-4641 の細胞膜上の S1P₁ 受容体に対する内在化作用を検討するため、Myc タグを付加した S1P₁ を発現させた CHO 細胞を用いてフローサイトメーターにて解析した. この際、S1P 及び選択的 S1P₁ 受容体作動薬として知られる SEW2871 を対照物質として使用した. 結果、ONO-4641 は濃度に応じた S1P₁ 受容体内在化作用を示し、125 nM の濃度で 90% 以上の S1P₁ 受容体を細胞内へ内在化させた (図 1a). ONO-4641, S1P 及び SEW2871 の EC₅₀ 値はそれぞれ 0.778, 132 及び 118 nM であり、ONO-4641 は S1P 及び SEW2871 よりも強力な S1P₁ 受容体内在化作用を有していた (図 1b).



(b)

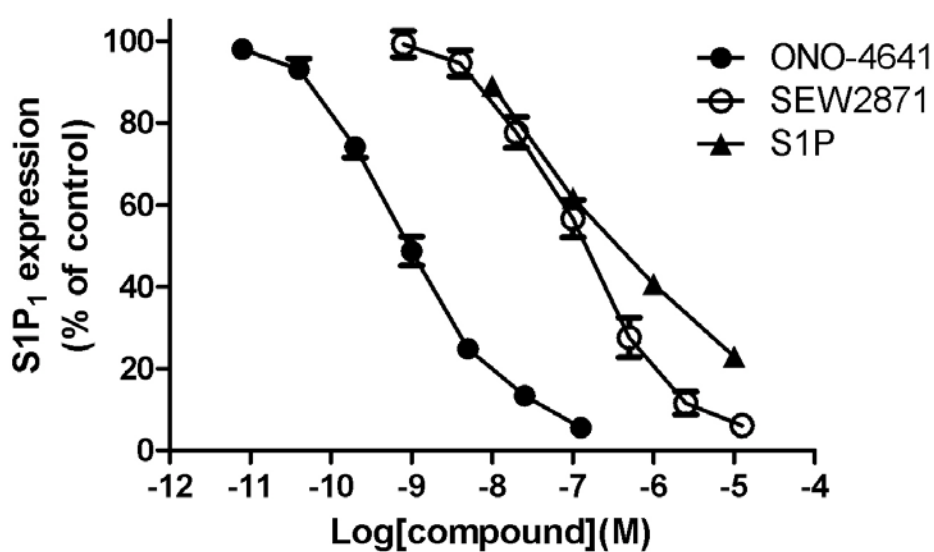


図1 ONO-4641 による S1P₁ 受容体の内在化作用

ヒト S1P₁ 受容体を安定的に発現させた CHO-K1 細胞に ONO-4641 (0.008~125 nM, 黒実線) 又は DMSO (黒破線) を 37°C で 1 時間反応させた. ネガティブコントロールとして, ヒト S1P₁ 受容体を発現していない CHO-K1 細胞を用いた (灰色塗). データは 3 回の独立した実験の代表結果を示している. (b) ONO-4641 (0.008~125 nM), S1P (10~10,000 nM) 及び SEW2871 (0.8~12,500 nM) の S1P₁ 受容体の内在化作用の検討. コントロール群の S1P₁ 受容体の平均発現量を 100% とした時の S1P₁ 受容体の発現量 (%) を示す. 3 回の実験結果の平均値 ± 標準誤差を示す.

3-3-3. ONO-4641 は末梢血リンパ球数を減少させる

S1P₁ 受容体作動薬は、リンパ球上に発現している S1P₁ 受容体を内在化させることで末梢血リンパ球数を減少させると考えられており^{21, 22}, ONO-4641 も S1P₁ 受容体の内在化作用を有していた (図 1) . 次に, ONO-4641 の末梢血リンパ球の減少作用及びその強度を検討するため, 雌 Lewis ラットに ONO-4641 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 及び 1 mg/kg を単回経口投与した時の末梢血リンパ球数を測定した. 投与前, 投与後 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 及び 120 時間に尾静脈より採血を行い, 0.5%MC (媒体投与) 群と ONO-4641 投与群の各時点における末梢血リンパ球数を測定した.

ONO-4641 は 0.01 及び 0.03mg/kg 群の末梢血リンパ球数は投与後 4 時間より, 0.1, 0.3 及び 1mg/kg 群の末梢血リンパ球数は投与後 2 時間より, 用量に応じて減少し, 0.1mg/kg 以上の用量において最大作用が認められた. ONO-4641 投与群の末梢血リンパ球数は, いずれも投与後 12 時間で作用がピークに達し, その後 48~120 時間かけて媒体投与群と同程度の値まで回復した. ONO-4641 は, 可逆的な末梢血リンパ球減少作用を示し, 0.1mg/kg 以上の用量において最大作用が認められた (図 2) .

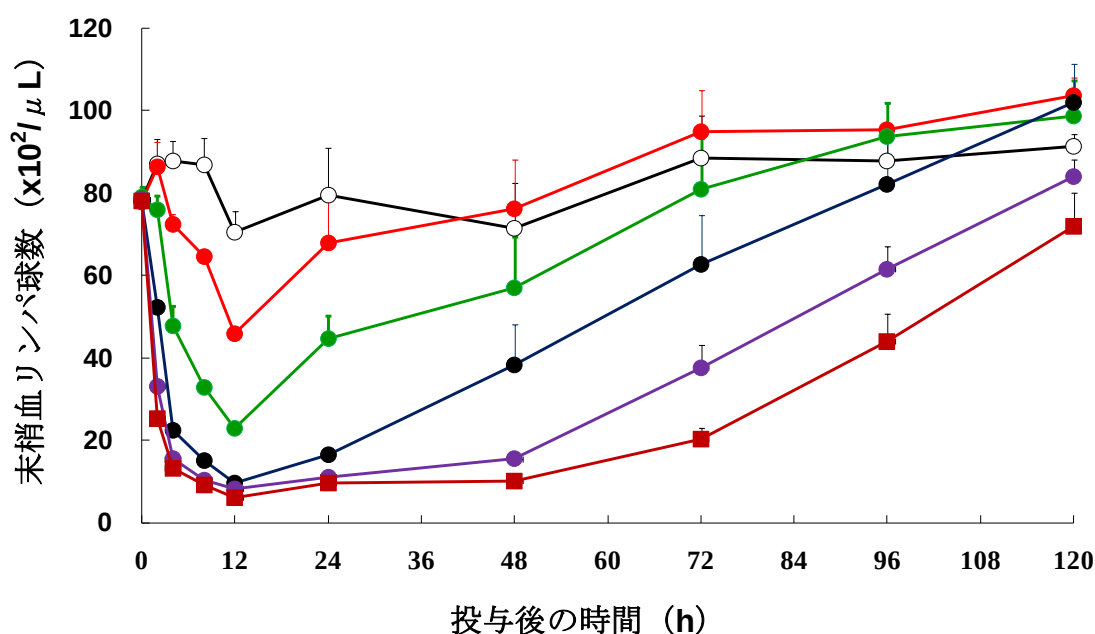


図2 ラットでの ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用

雌性 Lewis ラットに, ONO-4641 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg 又は 0.5%MC を単回経口投与した後, ラット尾静脈より継時的に採血して末梢血球数を測定した. 媒体投与群 (○) ONO-4641 0.01 (●), 0.03 (●), 0.1 (●), 0.3 (●), 又は 1 mg/kg (■) は平均値±標準誤差で示す (n=6).

3-3-4. ONO-4641 は循環リンパ球を二次リンパ組織へ集積させる

S1P₁ 受容体作動薬の末梢血リンパ球減少作用は、循環リンパ球を二次リンパ組織に集積させることで末梢血のリンパ球を減少させる機序が提唱されている^{24~26}。

ONO-4641 の循環リンパ球の二次リンパ組織への集積作用を検討するため、末梢血リンパ球減少の最大作用がみられた ONO-4641 0.1mg/kg の用量を用いて養子細胞移入法によって検討した。雌 Lewis ラットから摘出したリンパ節由来の細胞を CFSE で蛍光標識し、養子細胞懸濁液を調製した。ONO-4641 0.1mg/kg 又は 0.5%MC を雌 Lewis ラットに単回経口投与し、投与後 2.5 時間に養子細胞懸濁液を静脈内投与により移入した。ONO-4641 を投与した 4 時間後に頸部、鼠径及び腸間膜リンパ節の摘出及び採血を行い、各リンパ節及び末梢血中の標識リンパ球数を解析した。ONO-4641 0.1mg/kg 投与群の各リンパ節中における標識リンパ球数は、いずれも媒体投与群と比較して有意に高値であった。一方、ONO-4641 0.1mg/kg 投与群の末梢血中の標識リンパ球数は媒体投与群と比較して有意に低値であった。ラットにおいて、ONO-4641 0.1mg/kg は循環リンパ球の二次リンパ組織への集積作用を示した（図 3）。

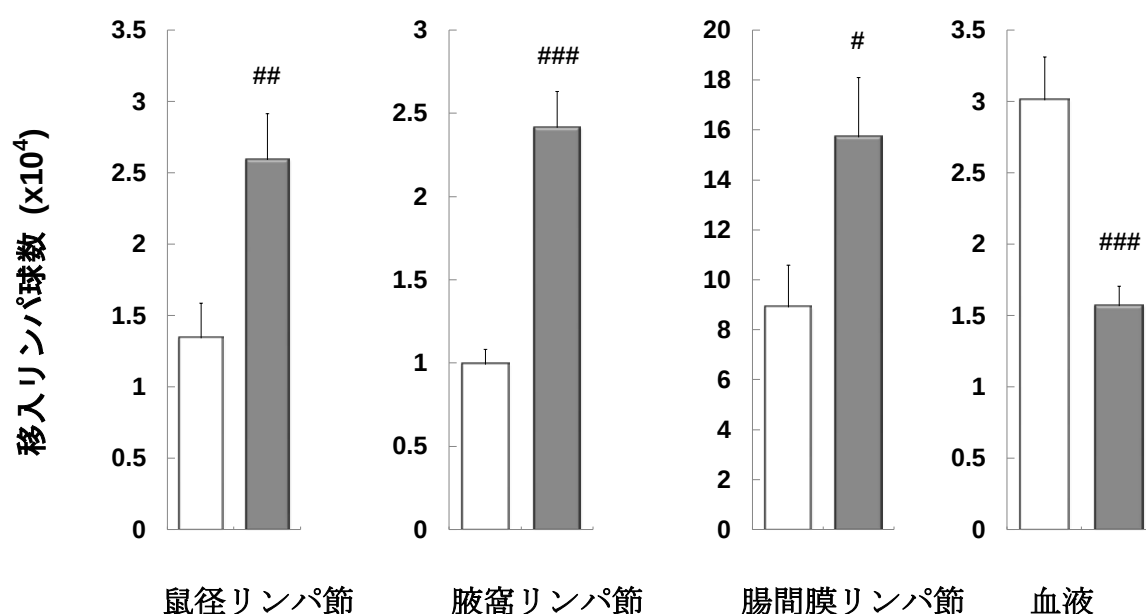


図 3 ONO-4641 による二次リンパ組織へのリンパ球集積作用

フローサイトメトリーにて各組織の移入細胞数を測定した。媒体投与群（□）及び ONO-4641 0.1 mg/kg 群（■）のデータは平均値±標準誤差で示し（n=10），群間の比較は t 検定にて行った。#，P<0.05；##，P<0.01；###，P<0.001。

3-3-5. ONO-4641 はリンパ球の活性化には影響を及ぼさない

ONO-4641 のヒトリンパ球の細胞増殖, IFN- γ 産生及び IgG 産生に対する作用を評価した. ONO-4641 の T 細胞の細胞増殖, IFN- γ 産生, B 細胞の細胞増殖及び IgG 産生に対する IC₅₀ 値はいずれも >1000 nM であり, 1~1000 nM において明らかな作用は認められなかった. 陽性対照に用いたカルシニューリン阻害剤タクロリムスの T 細胞の細胞増殖, IFN- γ 産生, B 細胞の細胞増殖及び IgG 産生に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 0.20, 0.10, 0.29 及び >1 nM であった (表 3) .

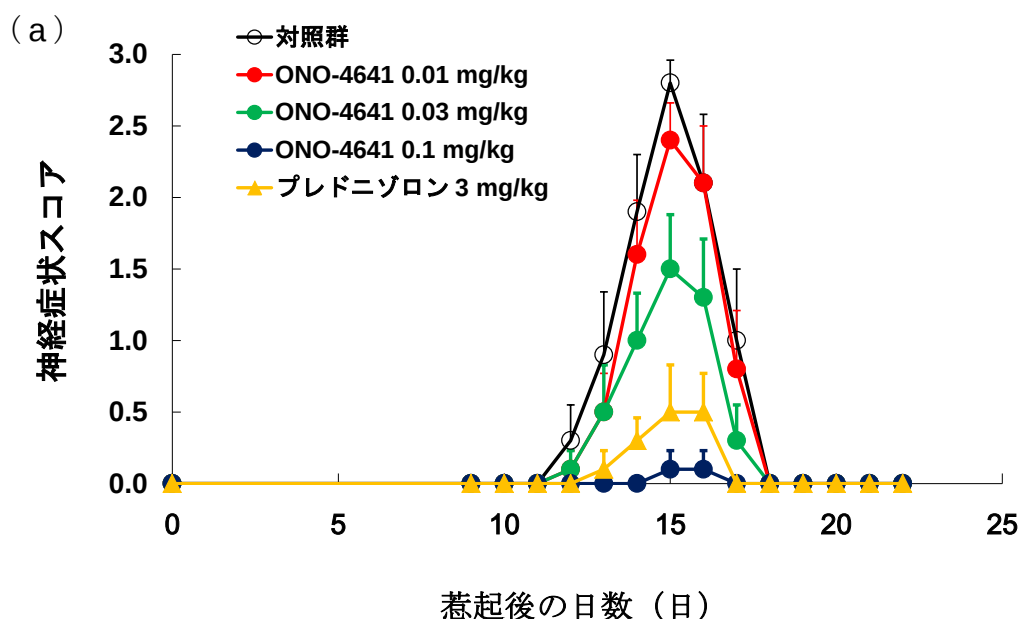
表 3 ヒトリンパ球の機能に対する ONO-4641 の評価

化合物	IC ₅₀ (nM) (95%信頼区間)			
	T 細胞		B 細胞	
	細胞増殖	IFN- γ 産生	細胞増殖	IgG 産生
ONO-4641	>1000	>1000	>1000	>1000
タクロリムス	0.20 (0.03-0.36)	0.10 (0.01-0.19)	0.29 (0.11-0.47)	>1

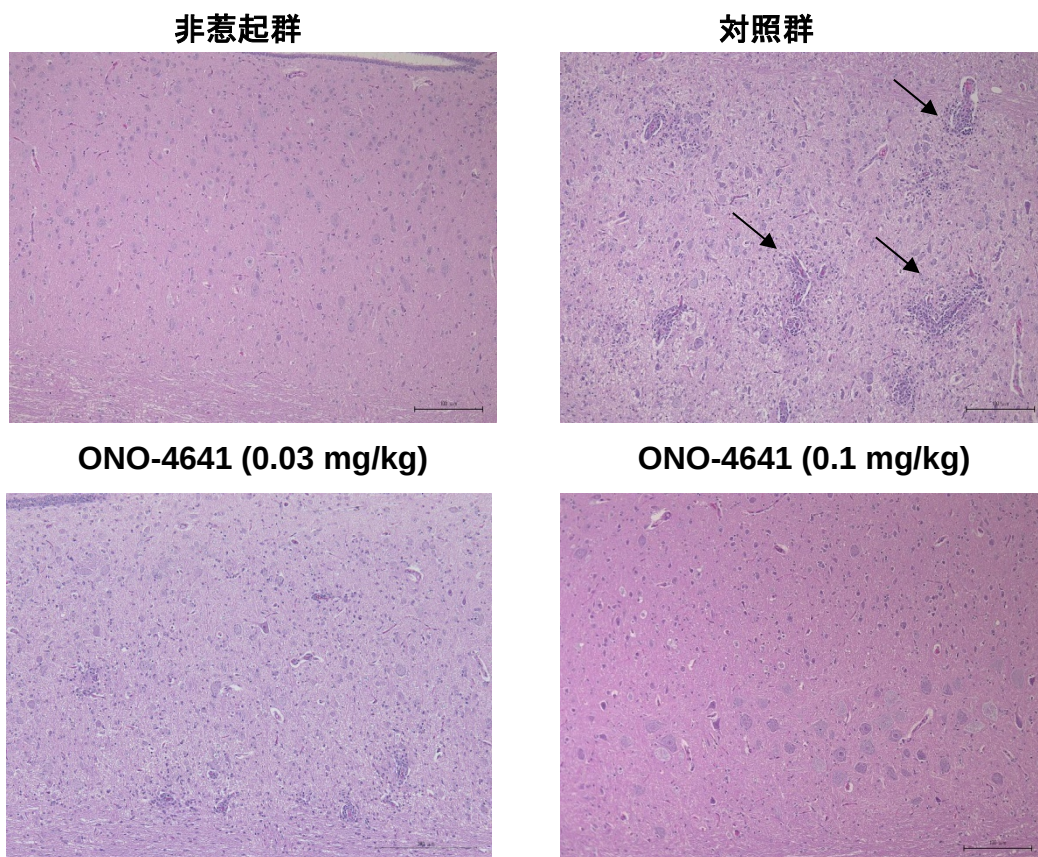
3-3-6. ONO-4641 は EAE モデルの病態発症及び脊髄への細胞浸潤を抑制する

EAE モデルは多発性硬化症の動物モデルとして広く用いられており、その発症には脳脊髄へのリンパ球浸潤が関与していることが知られている²⁷。雌 Lewis ラットを用いた EAE モデルにおいて、ONO-4641 がリンパ球浸潤を阻害することで EAE 発症抑制作用を示すかを検討した。雌 Lewis ラットの足蹠に髄鞘の構成成分であるミエリン塩基性蛋白 (MBP) を含む惹起剤を皮下投与することで免疫処置した。ONO-4641 0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg, プレドニゾロン 3 mg/kg 又は 0.5%MC を免疫 4 日後から 21 日後まで 1 日 1 回反復経口投与した。免疫処置日及び免疫 9 日後から 22 日後まで神経症状を観察し、麻痺の程度をスコア化した。ONO-4641 0.03 及び 0.1mg/kg 群の神経症状スコアは媒体を投与した対照群に比べ低値で推移した (図 4a)。また、ONO-4641 投与群の最大神経症状スコアは用量に応じて低値を示し、ONO-4641 0.03 及び 0.1mg/kg 群では対照群に比べ有意に低値であった (表 4)。特に ONO-4641 の 0.1mg/kg 群では 8 例中 7 例で発症が完全に抑制された。プレドニゾロン 3mg/kg 群の最大神経症状スコアは対照群に比べ有意に低値を示した (表 4)。

次に、EAE モデルにおける脊髄 (腰仙髄) への細胞浸潤に対する ONO-4641 の作用を検討した。免疫処置 16 日後に脊髄を摘出し、腰仙髄の Hematoxylin-Eosin 染色標本を作製した。標本上において周辺に細胞浸潤が認められる血管の数 (周囲性細胞浸潤血管数) を測定することで細胞浸潤を評価した¹⁸。対照群の脊髄における周囲性細胞浸潤血管数は 78.3 ± 21.31 を示した。また、抗 CD3 抗体免疫染色標本を作製して細胞浸潤巣における T 細胞の浸潤を確認した¹⁶。ONO-4641 0.03 及び 0.1mg/kg 群の周囲性細胞浸潤血管数はそれぞれ 34.4 ± 6.53 及び 7.3 ± 2.86 と用量に応じて低値を示し、いずれも対照群との間に有意差が認められた (図 4b, 4c)。



(b)



(c)

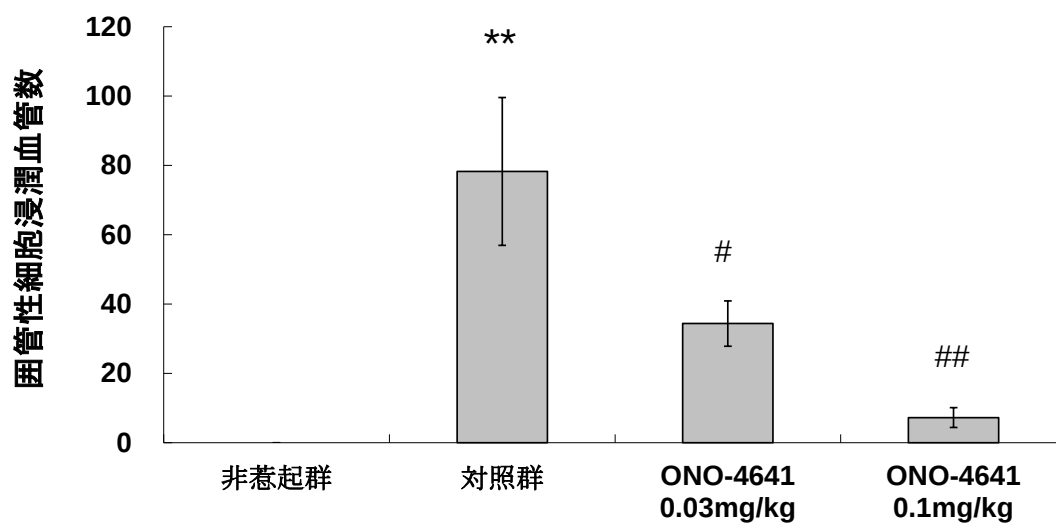


図4 ラット EAE モデルにおける ONO-4641 の発症抑制作用

(a) 対照群, ONO-4641 群, 及びプレドニゾロン群の神経症状スコアの変動. 雌性 Lewis ラットの足蹠に惹起剤を皮下投与して免疫した. 0.5%MC, ONO-4641 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg, 又はプレドニゾロン 3 mg/kg を免疫後 4 日目から 21 日目まで 1 日 1 回反

復経口投与した。神経症状スコアは、免疫処置日及び免疫 9 日目から 22 日目まで観察した。対照群 (○), ONO-4641 0.01 (●), 0.03 (●), 0.1 mg/kg (●), 及びプレドニゾロン (▲) は平均値±標準度差で示した (n=8)。 (b) 腰仙髄での囲管性細胞浸潤血管数の代表写真。ONO-4641 投与群または惹起群に惹起剤を処置し、MBP 無しのアジュバントのみで処置した非惹起群も設定した。0.5%MC, 又は ONO-4641 0.03, 0.1 mg/kg を免疫後 4 日目から 15 日目まで 1 日 1 回反復経口投与した。16 日目に HE 染色標本作製のため脊髄を摘出し、囲管性細胞浸潤血管数を顕微鏡下にて測定した (スケールバーは 100 μ m)。矢印は囲管性細胞浸潤血管を示している。 (c) 囲管性細胞浸潤数を各群 8 例の平均値±標準誤差で示した。対照群と ONO-4641 投与群間の比較は Dunnett 検定にて行った。#, $p<0.05$; ##, $p<0.01$ 。対照群と非惹起群の比較は t 検定にて行った。**, $p<0.01$ 。

表 4 ラット EAE モデルにおける最大臨床スコア

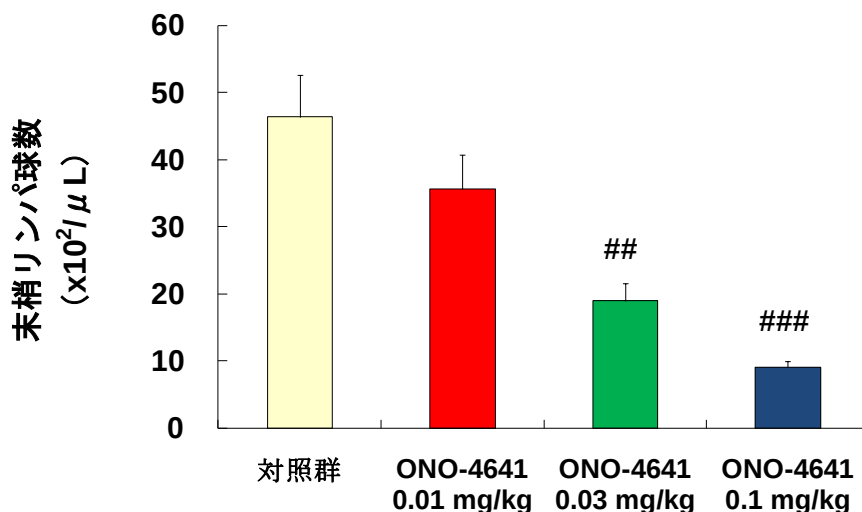
群構成	最大臨床スコア
対照群	2.9 $\pm$ 0.13
ONO-4641 0.01 mg/kg 群	2.6 $\pm$ 0.26
ONO-4641 0.03 mg/kg 群	1.9 $\pm$ 0.35 #
ONO-4641 0.1 mg/kg 群	0.1 $\pm$ 0.13 ###
プレドニゾロン 3 mg/kg 群	0.6 $\pm$ 0.32 ***

各ラットで、期間内に観察された最も高い臨床スコアを最大臨床スコアとした。最大臨床スコアを各群 8 例の平均値±標準誤差で示した。対照群と ONO-4641 投与群間の比較は Steel 検定にて行った。#, $p<0.05$; ###, $p<0.001$ 。対照群とプレドニゾロン群の比較は Wilcoxon rank sum 検定にて行った。***, $p<0.001$ 。

3-3-7. ONO-4641 は再発寛解型 EAE モデルの再発を抑制する

MS 患者の大部分は再発・寛解を繰り返す再発寛解型 MS であり，再発を予防することが MS の長期予後の改善に重要と考えられている．NOD マウスを用いて再発寛解型 EAE モデルを作製し，ONO-4641 の再発抑制作用について検討した．先に，正常 NOD マウスにおける ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用を検討した．ONO-4641 0.01, 0.03 又は 0.1 mg/kg を単回経口投与して 24 時間後に，末梢血のリンパ球数は 0.5% MC 投与（対照群）に比べておよそ 20, 60, 80% 減少した（図 5a）．NOD マウスに髄鞘の構成成分であるミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白（MOG）を含む惹起剤を免疫処置することで再発寛解型 EAE モデルを作製した．初回発症の後に寛解を示したマウスを選抜して群割り付けした後，ONO-4641 又は 0.5% MC（対照群）を 1 日 1 回 8 週間反復経口投与した．対照群では投与開始 3 日後から再発例がみられ，再発率は 90.0%（10 例中 9 例）を示し，再発例のうち 2 例が死亡した．対照群の累積神経症状スコアは 65.4 ± 18.50 であった．一方，ONO-4641 0.1 mg/kg 群において再発した動物はみられず，ONO-4641 は 0.1 mg/kg の用量で再発を完全に予防した．ONO-4641 0.03 mg/kg 群において投与開始 32 日後から再発例がみられ，再発率は 22.2%（9 例中 2 例）であった．ONO-4641 0.01 mg/kg 群では投与開始 5 日後から再発例がみられ，再発率は 80.0%（10 例中 8 例）を示し，再発例のうち 2 例が死亡した（図 5b）．ONO-4641 0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg 群の累積神経症状スコアはそれぞれ 65.4 ± 22.93 , 9.8 ± 6.60 及び 0.0 ± 0.00 であり，0.03 及び 0.1 mg/kg 群の累積神経症状スコアはいずれも対照群に比べ有意に低値であった（図 5c, 表 5）．

(a)



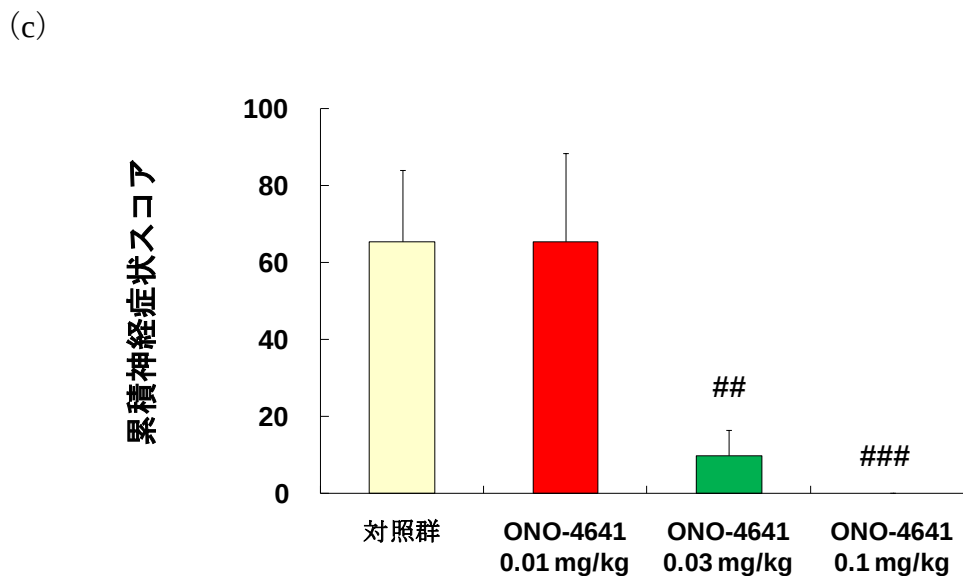
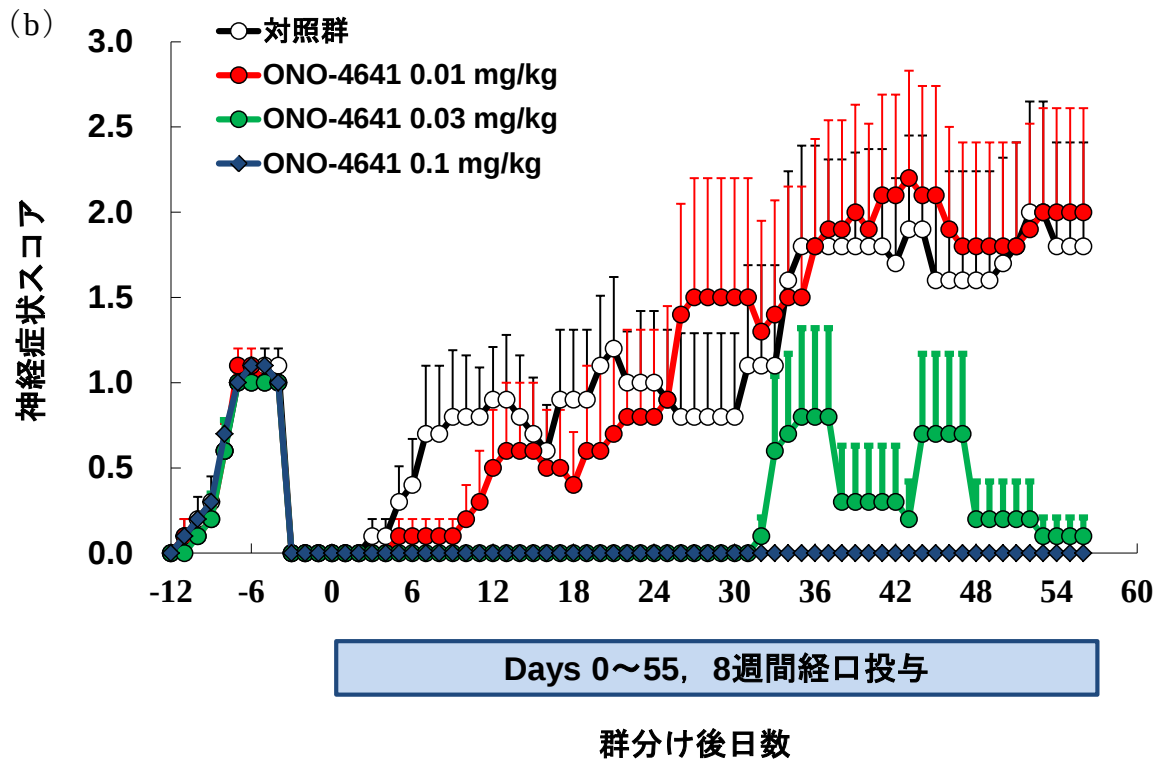


図5 マウス再発寛解型 EAE モデルにおける ONO-4641 の再発予防作用

(a) ONO-4641 (0.01, 0.03, 0.1 mg/kg) の単回経口投与 24 時間後の正常 NOD マウスでの末梢血リンパ球減少作用. 末梢血リンパ球数を各群 5 例の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した. 対照群と ONO-4641 投与群間の比較は Dunnett 検定にて行った. ##, $p < 0.01$. ###, $p < 0.001$. (b) 0.5%MC, 又は ONO-4641 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg を群分け日 (Day 0) から Day 55 まで 1 日 1 回反復経口投与した. 免疫処置日, 及び免疫処置 7 日目から化合物投与 Day 55 まで, マウスの神経症状スコアを観察した. 対照群 (n=10), ONO-4641 0.01 (n=10), 0.03 (n=9), 0.1 mg/kg (n=10) の神経症状スコアを平均値 $\pm$

標準誤差で示した．(c) 群分けから実験最終日までの各動物の神経症状スコアの累積値を累積神経症状スコアとして平均値±標準誤差で示した．対照群と ONO-4641 投与群間の比較は Steel 検定にて行った．##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$.

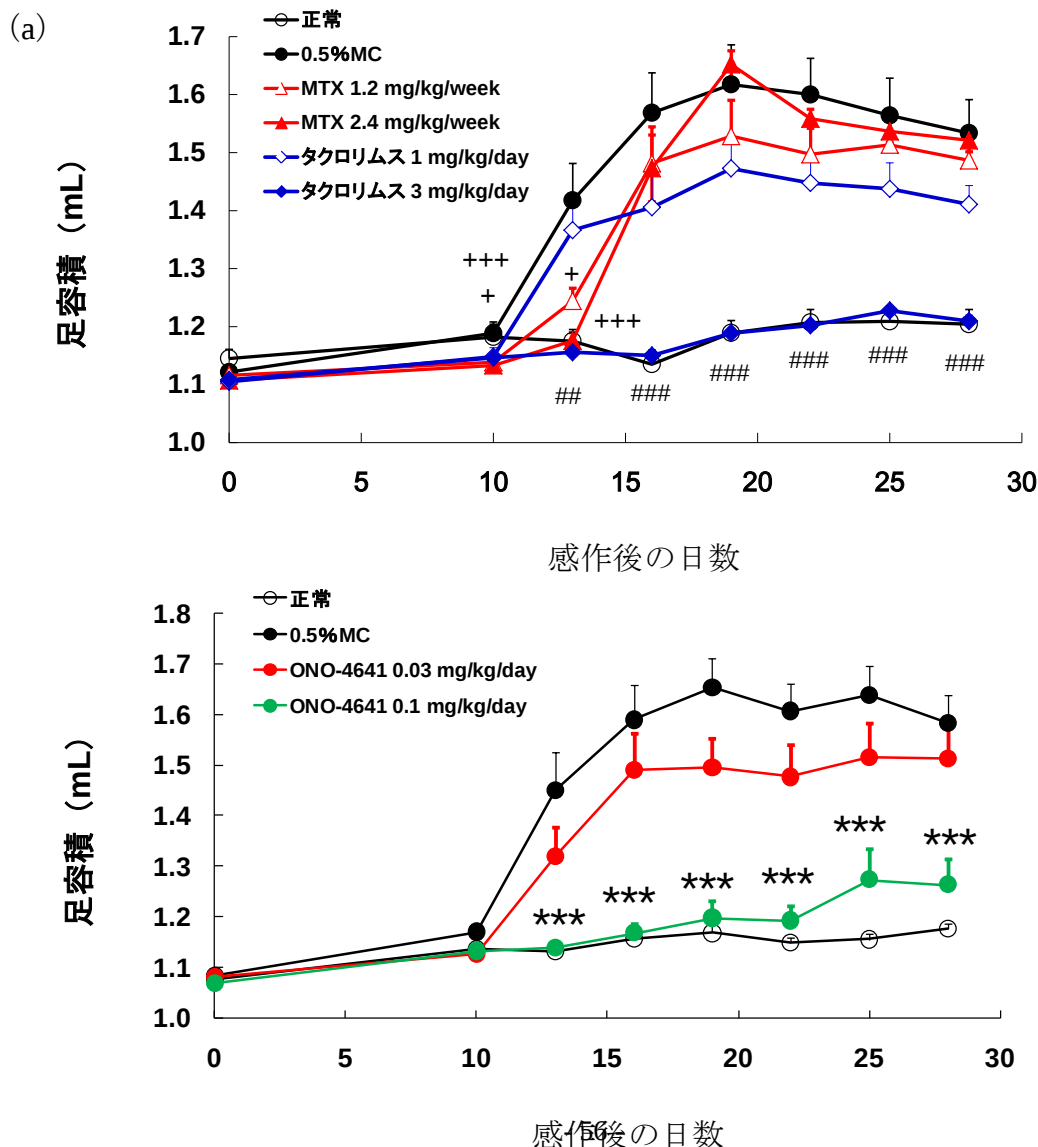
表 5 マウス再発寛解型 EAE モデルにおける再発率

群構成 (動物数)	再発率
対照群 (n=10)	90.0%
ONO-4641 0.01 mg/kg 群 (n=10)	80.0%
ONO-4641 0.03 mg/kg 群 (n=9)	22.2%
ONO-4641 0.1 mg/kg 群 (n=10)	0.0%

群分けから実験最終日の期間で，1 以上の臨床スコアが観察された場合に再発と判定した．

3-3-8. ONO-4641 は CIA モデルでの後肢浮腫及び関節炎スコアの増加を抑制する

次に、関節リウマチの動物モデルとして汎用されているラット CIA モデルにて、ONO-4641 の関節炎発症抑制作用について検討した。ONO-4641 は 0.03, 0.1 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 28 日間反復経口投与した。メトトレキサート (MTX) は、臨床の投与方法に準拠した間欠経口投与 (1 週間に 3 回投与) によって評価を行い、タクロリムスは 1, 3 mg/kg を 1 日 1 回経口投与した。MTX は 1.2, 2.4mg/kg/week の 2 用量を設定し、MTX 投与群は、0.5%MC 群に比べ Day13 で有意な後肢浮腫の抑制、関節炎スコア増加の抑制作用がみられたものの、Day13 以降は有意な抑制傾向を示さなかった。タクロリムスは 1, 3 mg/kg/day の 2 用量を用い、1 mg/kg/day 群では Day13 以降、足容積及び関節炎スコアの増加を 30%抑制した。3 mg/kg/day 群では関節炎の発症を完全に抑制した。ONO-4641 投与群では、足容積増加及び関節炎スコア増加に対して用量に応じた抑制作用がみられ、0.1 mg/kg では関節炎発症を強く抑制した (図 6a, 6b)。



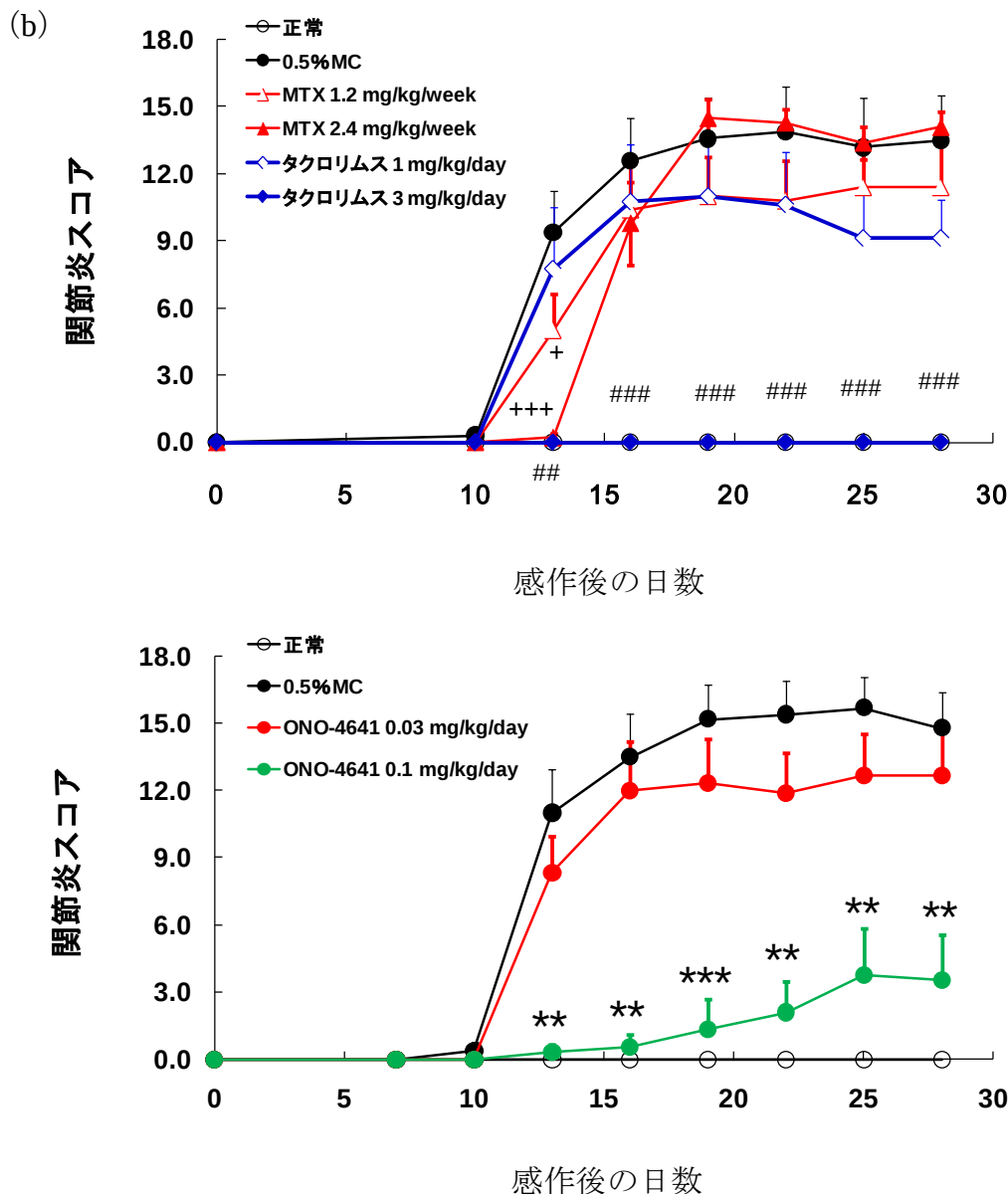


図6 ラット CIA モデルにおける ONO-4641 の後肢浮腫及び関節炎スコア増加に対する抑制作用

(a) Lewis ラットの背部に惹起剤を皮内投与し (Day0), 更に7日後に惹起剤を尾根部に皮内投与した (Day7). 0.5%MC, ONO-4641 0.03, 0.1 mg/kg, 及びタクロリムス 1, 3 mg/kg は Day0 より Day27 日目まで1日1回反復経口投与した. MTX 1.2, 2.4 mg/kg は週3分割して, Day0 より Day22 日まで間欠経口投与した (各週の第一日目に1日2回, 第二日目に1日1回投与して, 第3~7日目は0.5%MCを1日1回投与). 正常群は何も投与しなかった. 各群の足容積を平均値±標準誤差で示した (正常群は n=5, それ以外は全て n=10). 0.5%MC 群と化合物投与群の足容積の比較は, 各時点について Dunnett 検定により行った. 0.5%MC 群と MTX 群の比較: +, $p<0.05$; +++, $p<0.001$.

0.5%MC 群とタクロリムス群の比較:##, $p<0.01$;###, $p<0.001$. 0.5%MC 群と ONO-4641 群の比較:***, $p<0.001$.

(b) 各群の関節炎スコアを平均値 $\pm$ 標準誤差で示した. 0.5%MC 群と化合物投与群の関節炎スコアの比較は, 各時点について Steel 検定により行った. 0.5%MC 群と MTX 群の比較:+, $p<0.05$;+++, $p<0.001$. 0.5%MC 群とタクロリムス群の比較:##, $p<0.01$;###, $p<0.001$. 0.5%MC 群と ONO-4641 群の比較:**, $p<0.01$;***, $p<0.001$.

3-4. 小括

S1P と S1P₁ 受容体は、リンパ球が二次リンパ組織から移出する際に重要である¹. この機能は、免疫抑制剤として開発されていた FTY720 (フィンゴリモド) がリンパ球上の S1P₁ 受容体に作用することが発見されたことが契機となり、明らかとなった². 今回、フィンゴリモドよりも S1P 受容体選択性を高めた第二世代 S1P 受容体作動薬 ONO-4641 を創製し^{14, 15}, 本化合物のリンパ球循環動態に対する影響及び MS の動物疾患モデルでの有効性を検討した. ONO-4641 は S1P₁ 及び S1P₅ 受容体に選択的に結合し (表 1), S1P₁/S1P₅ 受容体に対するアゴニスト作用 (表 2) を有していた. また, S1P₁ 受容体に対してはリガンドである S1P よりも強力な細胞膜表面からの S1P₁ 受容体内在化作用を示した (図 1). S1P は S1P₁ 受容体に対する結合親和性とアゴニスト作用は同程度の値 (それぞれ, $K_i=0.221$ nM, $EC_{50}=0.627$ nM) であったが, ONO-4641 の結合親和性 ($K_i=0.626$ nM) とアゴニスト作用 ($EC_{50}=0.0273$ nM) には乖離がみられた. この理由は明らかではないが, ONO-4641 は S1P に比べて強力な S1P₁ 受容体内在化作用を有しており, これは強いアゴニスト作用に起因している可能性がある.

ファーストインクラスの S1P 受容体作動薬であるフィンゴリモドは、再発寛解型の MS 治療薬として使用されている. フィンゴリモドはプロドラッグ体であり、スフィンゴシンキナーゼによって可逆的なリン酸化を受けて活性体 (フィンゴリモドリノ化体) となる^{9, 10}. フィンゴリモドリノ化体はリンパ球上に発現している S1P₁ 受容体に結合し, S1P₁ 受容体の内在化を誘導することで機能的アンタゴニストとして作用する. 細胞膜上の S1P₁ 受容体が欠失したリンパ球はリンパ管で高濃度に保たれている S1P に反応しなくなり, その結果, 二次リンパ組織からリンパ球が移出するのを抑制することが提唱されている^{1, 28}. フィンゴリモドと同様に, ONO-4641 も S1P₁ 受容体の機能的アンタゴニスト作用を有していると考えられる. 実際, ONO-4641 は S1P₁ 受容体の内在化作用を示し, Lewis ラットにおいて, 二次リンパ組織へのリンパ球の集積作用及び末梢血リンパ球減少作用を示した (図 2, 3). 更に, MS の病態モデルである Lewis ラットを用いた EAE モデルにおいて, ONO-4641 の反復経口投与によって用量に応じた細胞浸潤抑制作用及び発症抑制作用を示し (図 4), ONO-4641 においても S1P 受容体作動薬の作用仮説を支持する結果が得られた (図 7). EAE モデルにおける脊髄での浸潤巣において CD3 陽性 T 細胞が確認された¹⁶ ことから, ONO-4641 は中枢神経組織内への T 細胞の浸潤を抑制することで EAE 発症抑制作用を示すと考えられた. EAE モデルにおける ONO-4641 0.1 mg/kg 群では, 8 例中 1 例が神経症状スコア 1 を示したのみであったことから, ONO-4641 の本モデルにおける抑制作用は, 0.1 mg/kg で最大効果を示すと考えられた (表 4). 正常 Lewis ラットを用

いた ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用も 0.1mg/kg で最大作用を示したことから (図 2), ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用と EAE 発症抑制作用は相関していた。

また, MS の臨床病態をより正確に反映していると考えられる NOD マウスの再発寛解型 EAE モデルにて ONO-4641 の有効性評価を行った。本モデルは, 他の再発寛解型 EAE モデル²⁹ と異なり明確な寛解期 (神経症状スコア 0) を示すことから, 被験物質の MS における再発予防薬としての可能性を評価するのに適したモデルと考えられた。本モデルにおいて, ONO-4641 は 0.03 mg/kg 以上の用量で再発予防効果を示し, 0.1 mg/kg の用量では再発を完全に予防した (図 5b, 表 5)。免疫処置を行っていない NOD マウスにおいて, ONO-4641 0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg は単回投与 24 時間後に末梢血中のリンパ球数をそれぞれ約 20, 60 及び 80%減少させた (図 5a)。このことから, ラット EAE モデルの場合と同様に, ONO-4641 のリンパ球減少作用と NOD マウス再発寛解モデルにおける EAE 再発予防効果には相関がみられ, ONO-4641 はリンパ球の再循環抑制作用を介して EAE 再発予防効果を示すと考えられた。

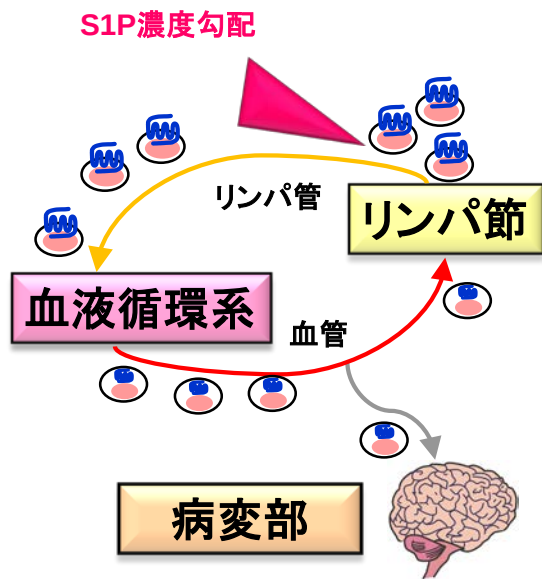
ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用は可逆的であり, ONO-4641 を休薬することで末梢血リンパ球数は回復した。末梢血リンパ球は様々なリンパ球サブセットから構成され, 中でも T 及び B 細胞は獲得免疫システムにおいて重要な役割を果たしており, それぞれ S1P₁ 受容体の発現が報告されている^{30, 31}。ONO-4641 は末梢血中の T 細胞及び B 細胞数を減少させることを確認している¹⁶。一方, ONO-4641 のヒトリンパ球活性に対する作用を検討した結果, ONO-4641 は 1000 nM でもヒト T 細胞の増殖及び IFN- γ 産生, B 細胞の増殖及び IgG 産生に対して明らかな作用を示さなかった (表 3)。この濃度は, ONO-4641 が末梢血リンパ球数を 70~80%減少させるときの血中濃度から更に 30~100 倍高い濃度に相当する¹⁶。以上のことから, ONO-4641 はリンパ球の機能には影響せず, リンパ球の循環動態を制御することで病巣へのリンパ球浸潤を抑制し, 免疫調節作用を発揮すると考えられた。

最近の S1P₁ 受容体欠損マウスの知見では, S1P₁ 受容体はアストロサイトなどの中枢神経細胞にも作用することで EAE 病態に関与していることが報告されており^{32,33}, 更に, フィンゴリモドは免疫学的作用だけでなく神経学的な作用によっても MS 病態発症を抑制している可能性が示唆されている。また, ONO-4641 は S1P₁ だけでなく S1P₅ 受容体に対するアゴニスト活性を有しており, S1P₅ 受容体はオリゴデンドロサイトの機能に関与することが報告されている^{34, 35}。また, ONO-4641 はラットを用いた動態試験において脳に移行することが分かっており, 中枢神経細胞の S1P₁/S1P₅ 受容体への作用が示唆される。ONO-4641 の中枢神経細胞に対する作用は明らかとなっておらず, 今後の検討課題である。

動物実験のデータから、S1P₃受容体に対する作用が循環器系及び呼吸器系に対して有害な副作用の原因になる可能性が報告されている^{12, 13}。フィンゴリモドは5つのS1P受容体のうちS1P₂以外のS1P受容体に作用し、臨床試験では心拍数低下作用、肺機能障害、横斑浮腫などが報告されている。ONO-4641はS1P₁及びS1P₅受容体に選択的に作用し、S1P₃受容体には作用しないことからフィンゴリモドよりも安全性の高い薬剤になることが期待される。実際、覚醒下サルテレメトリー試験において、フィンゴリモドは3mg/kg以上の用量で全てのサルで心拍数減少作用を示したが、ONO-4641は30mg/kgの1/3例で心拍数減少を示したのみであった。このことから、ONO-4641はフィンゴリモドよりも心拍数低下作用が軽減されていると考えられた。しかし、臨床試験において、ONO-4641も心拍数低下作用を有していることが明らかとなり³⁶、S1P受容体の機能にはヒトとげっ歯類で種差があると考えられている³⁷。また、ONO-4641とフィンゴリモドのその他の差別化点について、フィンゴリモドは生体内でリン酸化されてS1P受容体に作用することからリン酸化体の血中濃度にヒトでばらつきが生じやすい。一方、ONO-4641は未変化体で直接作用すること¹⁶から作用調節がし易いことが想定される。更に、ヒトでのフィンゴリモドの消失半減期は6～9日と長く、投与を中止しても同剤の血中からの消失には最長で2ヵ月を要し³⁸、その間リンパ球減少作用の薬力学的作用も持続するため感染症などの発現時には注意を要する。ONO-4641の消失半減期は3日程度とフィンゴリモドよりも短く休薬後のリンパ球回復も早いこと³⁹から、この点からも作用調節が容易な薬剤と言える。

以上、S1P₁/S1P₅受容体作動薬であるONO-4641は、リンパ球の循環動態を制御することでEAEモデルにおいて強力な有効性を示した。更に、ONO-4641は関節リウマチの動物疾患モデルであるCIAモデルにおいても有効性を示したことから、ONO-4641は病態にリンパ球浸潤が関与するMSやMS以外の自己免疫疾患に対する治療薬になることが期待される。

(a)



(b)

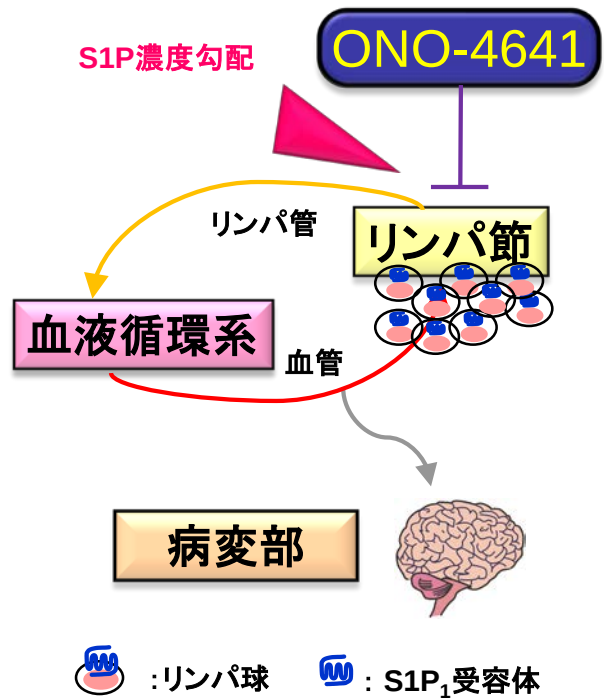


図7 ONO-4641 の作用機序

(a) リンパ球が二次リンパ組織から移出する過程では、S1P とリンパ球に発現している $S1P_1$ 受容体が結合することで移出が可能となる。(b) ONO-4641 はリンパ球上の $S1P_1$ 受容体に結合してその内在化を誘導する。それにより、リンパ球は二次リンパ節から移出することができず、末梢血中のリンパ球数が減少し病変部への浸潤も抑制される。

3-5. 参考文献

1. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346 (2002).
2. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-60 (2004).
3. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med* 201, 291-301 (2005).
4. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I et al. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* 316, 295-8 (2007).
5. Cohen JA, Barkhof F, Comi G et al. Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 362, 402-15 (2010).
6. Kappos L, Radue EW, O'Connor P et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362, 387-401 (2010).
7. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis - the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942-55 (2006).
8. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 366, 339-47 (2012).
9. Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett* 554, 189-93 (2003).
10. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277, 21453-7 (2002).
11. Yanagawa Y, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing

- in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. *Immunology* 95, 591–594 (1998).
12. Forrest M, Sun SY, Hajdu R et al. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 758-68 (2004).
 13. Sanna MG, Liao J, Jo E et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem.* 279, 13839-48 (2004).
 14. Kurata H, Kusumi K, Otsuki K et al. Discovery of S1P agonists with a dihydronaphthalene scaffold. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(13): 3885-9.
 15. Kurata H, Otsuki K, Suzuki R et al. Structure-activity relationship studies of S1P agonists with a dihydronaphthalene scaffold. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22(1): 144-8.
 16. Komiya T, Sato K, Shioya H et al. Efficacy and immunomodulatory actions of ONO-4641, a novel selective agonist for sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 5, in preclinical models of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology* 2013; 171: 54-62.
 17. Rausch M, Hiestand P, Foster CA, Baumann DR, Cannet C, Rudin M. Predictability of FTY720 efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis by in vivo macrophage tracking: clinical implications for ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 20, 16-24 (2004).
 18. Koh CS, Kwaan HC, Paterson PY. Neurovascular fibrinolytic activity in normal Lewis rats and rats with cell-transferred experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 28, 189-200 (1990).
 19. Onuki M, Ayers MM, Bernard CC, Orian JM. Axonal degeneration is an early pathological feature in autoimmune-mediated demyelination in mice. *Microsc Res Tech* 52, 731-9 (2001).

20. Okamoto H, Takuwa N, Gonda et al. EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* 273, 27104-10 (1998).
21. Jo E, Sanna MG, Gonzalez-Cabrera PJ et al. S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. *Chem Biol* 12, 703-15 (2005).
22. Mullershausen F, Zecri F, Cetin C. et al. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol* 5, 428-34 (2009).
23. Oo ML, Thangada S, Wu MT et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem* 282, 9082-9 (2007).
24. Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther* 108, 308-319 (2005).
25. Shimizu H, Takahashi M, Kaneko T et al. KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation* 111, 222-9 (2005).
26. Piali L, Froidevaux S, Hess P et al. The selective sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonist ponesimod protects against lymphocyte-mediated tissue inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 547-56 (2011).
27. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 162(1):1-11 (2010).
28. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol* 8, 1295-301 (2007).

29. Kataoka H, Sugahara K, Shimano K, Teshima K, Koyama M, Fukunari A, Chiba K. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol* 2, 439-48 (2005).
30. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski MJ, Xu Y, Low C, Lu T, Proia RL, Cyster JG. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 5, 713-20 (2004).
31. Graeler M, Goetzl EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J* 16, 1874-8 (2002).
32. Choi J W, Gardell SE, Herr DR et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 751-6 (2011).
33. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 69, 759-77 (2011).
34. Miron VE, Jung CG, Kim HJ, Kennedy TE, Soliven B, Antel JP. FTY720 modulates human oligodendrocyte progenitor process extension and survival. *Ann Neurol* 63, 61-71 (2008).
35. Novgorodov AS, El-Alwani M, Bielawski J, Obeid LM, Gudz TI. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB J* 21, 1503-14 (2007).
36. F Zipp, TL Vollmer, KW Selmaj et al. Efficacy and safety of the S1P receptor agonist ONO-4641 in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: results of a 26-week, double-blind, placebo-controlled, Phase II trial (DreaMS). 28th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. 28th Congress of theECTRIMS, 10–13 (2012).

37. Gergely P, Nuesslein-Hildesheim B, Guerini D et al. The selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate. *Br J Pharmacol* 167, 1035-47 (2012).
38. 田辺三菱製薬. ジレニア適正使用ガイド
39. Krösner S, Wolna P, Scaramozza M, et al. Investigation of Ceralifimod's (ONO-4641) Effect on Lymphocytes in Comparison with Fingolimod. Joint Congress of European Neurology 2014. In press.

第四章 結語

本研究では、二つのアプローチによってリンパ球の循環動態を制御する新規免疫調節薬の創製を試みた。CCR4 阻害薬 E0001-163 は、独自に開発したマウスエアーポートへの CCL22 誘発による T 細胞浸潤を完全に抑制したが、病態時のマウス気道への T 細胞浸潤抑制は僅かであった。この理由として、ケモカイン／ケモカイン受容体は機能が重複しており、CCR4 を阻害しても他のケモカイン受容体が代替している可能性が考えられた。そのため、CCR4 を標的とする場合、CCR4 選択的ではなく、それ以外のケモカイン受容体も幅広く阻害する薬剤の方が強力に T 細胞の浸潤を抑制できる可能性が考えられた。一方で、機能重複のないケモカイン受容体も報告されており、CCR9 は腸管指向性の T 細胞に発現しており、CCR9 以外のケモカイン受容体は腸管特異的な T 細胞遊走に関与していないようである¹。CCR9 のように、他の受容体との機能重複性がない方が標的として適しているかもしれない。CCR4 阻害薬 E0001-163 は T 細胞浸潤を抑制できず、アレルギー疾患治療薬としての限界が示された。但し、同標的の領域 (Scope) と限界 (Limitations) を示したという意味で研究の意義は小さくなく、本研究は薬剤候補の効果を確認するだけの薬効薬理試験とは趣を異にしている。

二つ目のアプローチとして、二次リンパ組織からのリンパ球の移出に関与する S1P₁ 受容体に着目し、S1P₁/S1P₅ 受容体選択的な作動薬 ONO-4641 を創製した。ONO-4641 を投与すると二次リンパ組織からのリンパ球移出が阻害され、その結果、末梢血のリンパ球数が減少した。EAE モデルでは、末梢血リンパ球減少が誘導される用量で ONO-4641 は病変部へのリンパ球浸潤を阻害し EAE 発症を抑制することが明らかとなった。これらの研究成果を基に、現在、ONO-4641 は MS を対象に臨床試験を実施している²。再発寛解型 MS 患者での第 II 相試験において、ONO-4641 0.05, 0.1, 0.15 mg を 1 日 1 回 26 週間投与した結果、投与前に比べて末梢血リンパ球数をそれぞれ 40%, 60%, 65% 減少させた (図 1)。また、プラセボ群に比べて MRI 検査による累積病巣数をそれぞれ 82%, 92%, 77% 抑制した (図 2)。ONO-4641 は 0.05 mg/person といった非常に低用量で有効性を示す可能性が示唆され、同用量での心拍数減少作用は軽度でその他の有害事象の発生頻度も低かった²。ONO-4641 は循環器系副作用との関与が示唆される S1P₃ 受容体の作動活性を回避しており、第 II 相試験結果から、フィンゴリモードに比べて安全性の高い薬剤になり得る可能性が示唆されている。また、ONO-4641 は MS 以外の自己免疫疾患への応用も期待され、MS 以外の自己免疫疾患モデルでの効果と作用機序について検討中である。今後も、リンパ球の循環動態制御に関する研究を進め、病気で苦しむ患者にとって福音となる革新的な免疫調節薬の創製に取り組んでいく。

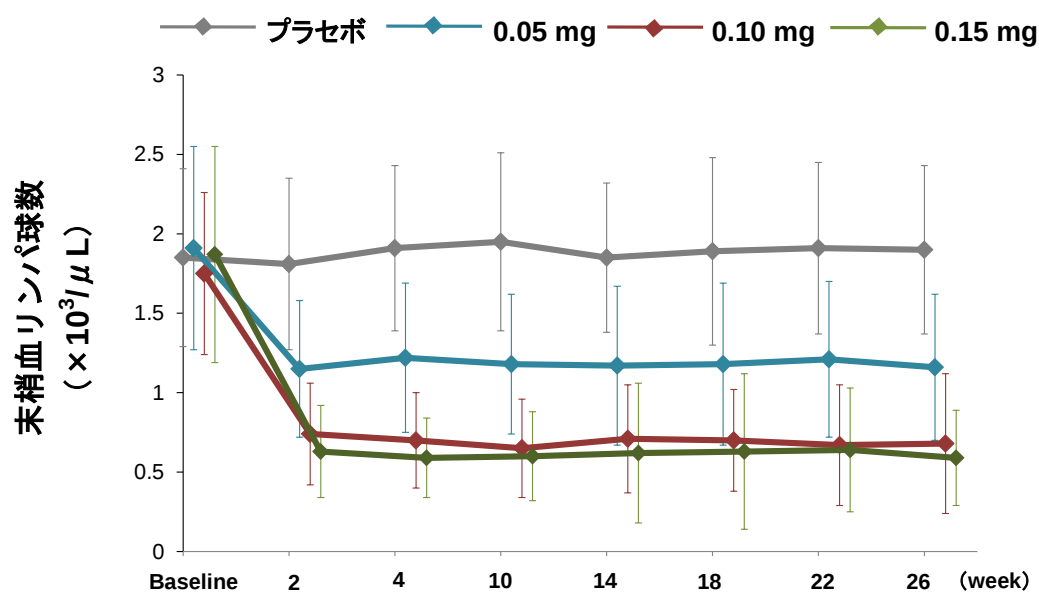


図1 再発寛解 MS 患者での ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用

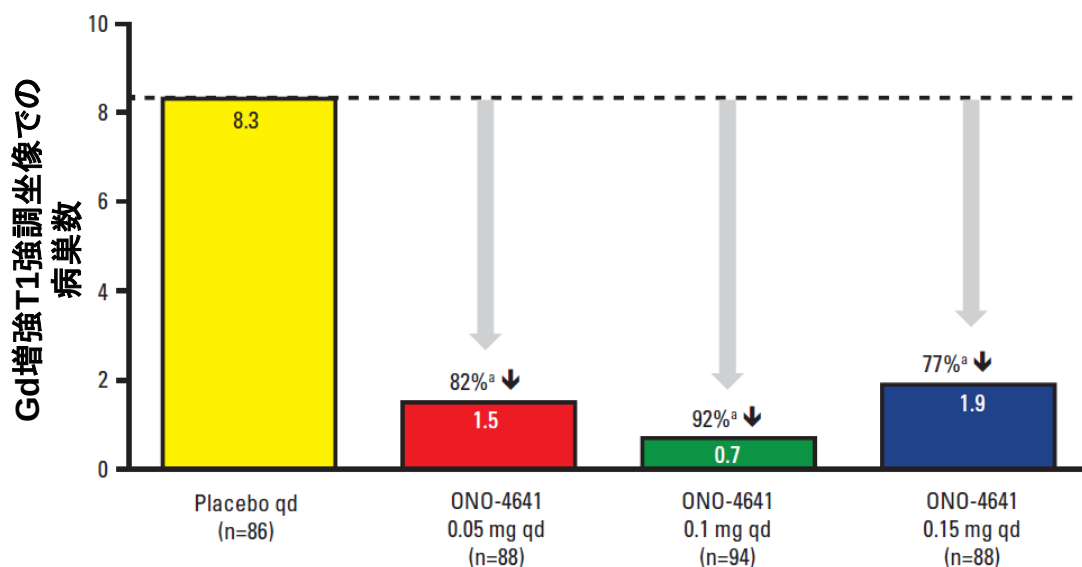


図2 10～26週に実施したMRI検査におけるGd増強T1強調画像での累積病巣数
プラセボ群との比較はWilcoxon rank sum検定にて行った。a, $P < 0.0001$

参考文献

1. Sigmundsdottir H, Butcher EC. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. Nat Immunol 9, 981-7 (2008).
2. F Zipp, TL Vollmer, KW Selmaj et al. Efficacy and safety of the S1P receptor agonist ONO-4641 in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: results of a 26-week, double-blind, placebo-controlled, Phase II trial (DreaMS). 28th Congress of the ECTRIMS, 10–13 (2012).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始親切なるご指導を承りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学研究室の垣内喜代三教授に深く感謝し、心からお礼申し上げます。

また、本論文を作成するにあたり、有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 谷原正夫教授、青野浩之教授、及び上久保裕生准教授に心から感謝申し上げます。

本研究は小野薬品工業株式会社 水無瀬研究所及び筑波研究所にて行われました。本研究及び本論文の作成の機会を与えて下さり、ご激励を賜りました川畔和一十博士、福島大吉博士、巾下広博士に心から感謝申し上げます。また、本研究に関する論文投稿及び本論文の作成にあたり、終始懇切なご助言、ご協力を賜りました倉田登晴博士、佐藤加寿豊氏、杉山哲也博士に感謝申し上げます。

本研究は水無瀬、福井、及び筑波研究所の諸先輩方、同僚、後輩の研究員の皆さんと多くの失敗を重ねながらも真剣に取り組み、今回の価値ある成果を得るに至りました。皆さんに厚くお礼申し上げます。

最後に、これまでお世話になった家族、友人に感謝すると共に、暖かく見守ってくれた妻 美佳に心から感謝します。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

1. Efficacy and immunomodulatory actions of ONO-4641, a novel selective agonist for sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 5, in preclinical models of multiple sclerosis. Takaki Komiya, Kazutoyo Sato, Hiroki Shioya, Yuichi Inagaki, Hiroshi Hagiya, Ryohei Kozaki, Masamichi Imai, Yuka Takada, Tatsuo Maeda, Haruto Kurata, Masakuni Kurono, Ryo Suzuki, Kazuhiro Otsuki, Hiromu Habashita, and Shinji Nakade. Clinical and Experimental Immunology 2013; 171: 54-62.
2. Suppressive effects of a novel CC chemokine receptor 4 antagonist on Th2 cell trafficking in ligand- and antigen-induced mouse models. Takaki Komiya, Tetsuya Sugiyama, Kazuhiko Takeda, Noriki Watanabe, Masamichi Imai, Masaya Kokubo, Natsuko Tokuda, Hiroshi Ochiai, Hiromu Habashita, and Shiro Shibayama. European Journal of Pharmacology 2013; 720: 335-43.
3. Chemokine receptor antagonist and medical use thereof. Hiromu Habashita, Hiroshi Ochiai, Natsuko Tokuda, Shiro Shibayama, Noriki Watanabe, Takaki Komiya, Kazuhiko Takeda. Patent No.: US7732442 B2

参考論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

1. Discovery of S1P agonists with a dihydronaphthalene scaffold. Haruto Kurata, Kensuke Kusumi, Kazuhiro Otsuki, Ryo Suzuki, Masakuni Kurono, Yuka Takada, Hiroki Shioya, Takaki Komiya, Hirotaka Mizuno, Takeji Ono, Hiroshi Hagiya, Masashi Minami, Shinji Nakade, Hiromu Habashita. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21(13): 3885-9.

2. Structure-activity relationship studies of S1P agonists with a dihydronaphthalene scaffold.
Haruto Kurata, Kazuhiro Otsuki, Ryo Suzuki, Kensuke Kusumi, Masakuni Kurono, Yuka Takada, Hiroki Shioya, Takaki Komiya, Hirotaka Mizuno, Takeji Ono, Hiroshi Hagiya, Masashi Minami, Shinji Nakade, and Hiromu Habashita. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012; 22(1): 144-8.

学会発表

1. Efficacy and immunomodulatory actions of the selective sphingosine 1-phosphate receptor agonist ONO-4641 in preclinical and clinical studies of multiple sclerosis
Takaki Komiya, Kazutoyo Sato, Yuichi Inagaki, Haruto Kurata, Hiromu Habashita, Kunio Yanagida, Hideaki Morioka, and Shinji Nakade. 2013 FASEB Summer Research Conference: Lysophospholipid and Other Related Mediators - From Bench to Clinic
2. 転写因子 MBP (MHC Enhancer Binding Protein) family の新たなメンバーの同定.
Takaki Komiya, Yoji Kukita, Tomoko Tahira, and Kenshi Hayashi. 日本分子生物学会 (1998 年 12 月)

出願特許

1. Compound capable of binding S1P receptor and pharmaceutical use thereof. Shinji Nakade, Hirotaka Mizuno, Takeji Ono, Masashi Minami, Hiroshi Saga, Hiroshi Hagiya, Takaki Komiya, Hiromu Habashita, Haruto Kurata, Kazuhiro Otsuki, Kensuke Kusumi.
Patent No.: US7825109
2. S1P 受容体結合能を有する化合物およびその医薬用途. 中出 眞嗣, 水野 弘貴, 小野 岳児, 南 真志, 佐賀 寛, 萩谷 洋, 小宮 貴樹, 巾下 広, 倉田 晴登, 大槻 和裕, 久須美 健介. 特許番号 : JP4947406B2