

201322045A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業  
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)

IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 保之

平成26(2014)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究 ----- 1  
石井保之  
(資料) NKT細胞によるIgEアイソタイプ特異的産生抑制機構 (解説図)

### II. 分担研究報告

1. IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究 (分担研究1) ----- 8  
田代卓哉  
(資料) 小スケール製造RCAI化合物の高速液体クロマトグラフィー分析 (結果)
2. IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究 (分担研究2) ----- 10  
谷口 克  
(資料) RCAI化合物リポソーム製剤投与後マウスNKT細胞のIL-21発現の定量PCR解析 (結果)
3. IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究 (分担研究3) ----- 12  
石井保之  
(資料1) RK-156<sup>\*1</sup>, RK-261<sup>\*2</sup>及びRK-364<sup>\*3</sup>の細菌を用いる復帰突然変異試験 (最終報告書)  
(資料2) LRX<sup>\*4</sup>, LRY<sup>\*5</sup>及びLRZ<sup>\*6</sup>の細菌を用いる復帰突然変異試験 (最終報告書)  
(資料3) LRX<sup>\*4</sup>, LRY<sup>\*5</sup>及びLRZ<sup>\*6</sup>のhERG導入HEK293細胞のカリウム電流に対する試験  
(最終報告書)  
(資料4) LRX<sup>\*4</sup>, LRY<sup>\*5</sup>及びLRZ<sup>\*6</sup>のマウスにおける2週間間歇静脈内投与 (計6回) 毒性試験  
(最終報告書)
- <sup>\*1</sup>RK-156: RCAI-X化合物単体, <sup>\*2</sup>RK-261: RCAI-Y化合物単体, <sup>\*3</sup>RK-364: RCAI-Z化合物単体  
<sup>\*4</sup>LRX: RCAI-Xリポソーム (LRK-9処方), <sup>\*5</sup>LRY: RCAI-Yリポソーム (LRK-9処方), <sup>\*6</sup>LRZ: RCAI-Zリポソーム (LRK-9処方)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (該当なし)

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 (該当なし)

## 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

### 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野) 総括研究報告書

(課題名) IgE 抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究

研究代表者氏名 石井保之

(所属施設名及び職名) 独立行政法人理化学研究所統合生命医科学研究センター

ワクチンデザイン研究チーム チームリーダー

研究要旨 ナチュラル・キラーT (NKT) 細胞はそのリガンド化合物によって活性すると、IgE 産生 B 細胞特異的に細胞死を誘導するサイトカイン IL-21 を産生する。本研究課題では、NKT 細胞のリガンド化合物群の中から、マウス *in vivo* IgE 産生抑制に高い活性を示す化合物を選択した後、アレルギー疾患治療薬を目指す開発候補製剤を製造し、GLP 動物試験と早期探索的臨床試験で安全性と有効性を確認する。平成 25 年度は、開発候補化合物として NKT 細胞からの IL-21 発現誘導能が高い RCAI-X を選択し、その製造工程の検討と製剤で使用するリポソーム処方の最適化を実施した。安全性に関する 3 つの予備的試験(細菌を用いる復帰突然変異試験、hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験、マウス 2 週間間歇静脈投与試験)を実施した結果、薬効有効用量域における重篤な副作用がないことが確認された。また有効性に関して、卵白アルブミン (OVA) 感作マウスを用いた OVA 吸入チャレンジ前日の静脈内単回投与によって、IgE 産生が抑制される作用機序に加えて、気道反応性亢進や肺への好酸球浸潤が有意に抑制される発症予防効果も認められた。以上結果から、RCAI-X リポソーム製剤をアレルギー疾患治療薬として開発することを決定した。

#### 研究分担者

田代卓哉 独立行政法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター生命機能動的イメージング部門創薬化学基盤ユニット(和光分室) 研究員

谷口克 独立行政法人理化学研究所統合生命医科学研究センター免疫制御戦略研究グループ グループリーダー

#### A. 研究目的:

これまでに、ナチュラル・キラーT (NKT) 細胞リガンドの標準的化合物であるアルファガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) のリポソーム製剤が、IgE 産生を強力に抑制する作用機序を明らかにしてきた(資料: NKT 細胞による IgE アイソタイプ特異的産生抑制機構)。作用機序は以下に記載する三段階に分けられる。第一段階では、 $\alpha$ -GalCer リポソームが脾臓辺縁帯 (MZ) B 細胞に優先的に取り込まれた後、MZB 細胞は遊走因子 CXCL-16 を発現する。第二段階では、CXCL-16 受容体の CXCR6 陽性 NKT 細胞が遊走され、MZB 細胞上の  $\alpha$

-GalCer/CD1d を認識することにより NKT 細胞が活性化され IL-21 が産生される。第三段階では、 $\alpha$ -GalCer リポソームの標的細胞群と共存する IL-21 受容体強陽性の IgE 産生 B 細胞が NKT 産生 IL-21 によって細胞死が誘導される。本研究課題では、 $\alpha$ -GalCer よりも高活性を示す新規 NKT 細胞リガンド化合物 (RCAI シリーズ) の中から開発候補品を選定し、IgE 産生を選択的に抑制する新規アレルギー根本治療薬の開発を目指す。平成 25 年度は、リポソーム製剤の最適化を実施した後、RCAI シリーズ化合物リポソーム製剤を作製する。有効性と安全性を評価基準にして開発候補化合物を選定した後、治験薬 GMP 製造工程を構築する。

#### B. 研究方法:

##### 1) リード化合物の選定

RCAI シリーズの化合物 138 種類を化学構造の特徴から 4 つのグループ (I, II, III, IV) に分類し、それぞれから代表的な化合物を選定する。そ

それぞれの化合物をスクリーニング用の予備的リポソーム処方で製剤化する。RCAI リポソームを卵白アルブミン (OVA) 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与し、IgE 産生抑制効果が高いリード化合物をスクリーニングする。

#### 2) リード化合物の小規模製造

リード化合物から開発候補品を選定するため、高純度 (不純物含有率5%以下) のリード化合物を外部の委託製造機関と共同で約1g製造する。

#### 3) リード化合物スクリーニング用製剤のリポソーム処方の決定

医薬品として既に承認されているリポソーム構成成分 (リン脂質、コレステロール等) と  $\alpha$ -GalCer を組み合わせて、各種リポソーム製剤を作製する。OVA 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与し、IgE 産生抑制効果が高いリポソーム処方を選定する。

#### 4) 開発候補 RCAI 化合物の選定

最適化されたリポソーム処方で RCAI リード化合物の製剤を作製する。全ての製剤を、薬効評価系 (RCAI リポソーム投与マウスの脾臓 NKT 細胞産生サイトカイン mRNA の定量と OVA 感作アレルギーモデルマウス IgE 産生抑制、IL-21 産生、食物アレルギー症状 (下痢)、気道炎症抑制効果及び血中サイトカイン産生能を判定) と毒性評価系 (細菌を用いる復帰突然変異試験、hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験、マウス2週間間歇静脈投与試験) で試験を実施し、開発候補 RCAI 化合物を選定する。

5) RCAI 化合物の治験薬 GMP 製造工程の開発小規模製造用に確立できている化学合成経路を大量製造用に最適化するため、全工程に使用する材料と合成ルートの再検討を委託製造機関と共同で実施し、来年度製造予定の治験薬 GMP に対応する工程を確立する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びその改正法案「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(平成17年法律第68号)の第5章第41条にある動物実験の基本理念である3R (Replacement, Reduction, Refinement) に関する条項に従い、実験計画を立

案した。実験の実施にあたっては「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日文科科学省告示第71号)に基づく独立行政法人理化学研究所の動物実験実施規定を遵守した。

### C. 研究結果：

#### 1) RCAI リード化合物の選定

RCAI シリーズの化合物138種類は全て糖とセラミド脂質の構造を持つ $\alpha$ -GalCer 化合物の誘導体であることから、糖構造とセラミド構造で4つのグループ (I, II, III, IV) に分類された。全てのグループから、代表的な化合物を選定して、それぞれをスクリーニング用の予備的リポソーム処方で製剤化した結果、グループ III の化合物を除く全ての化合物でリポソーム製剤を作製することができた。RCAI 予備的リポソームを OVA 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与した結果、グループ I に属する1化合物 (RCAI-X) とグループ II に属する2化合物 (RCAI-Y, RCAI-Z) の予備的リポソームを投与した群に、IgE 産生抑制効果が認められた。3つの化合物 RCAI-X, -Y, -Z をリード化合物に選定した。

#### 2) リード化合物の小規模製造

RCAI-X は研究分担者によって約1g (純度97.5%)、RCAI-Y と RCAI-Z は研究分担者が製造した中間体化合物をベースに外部委託製造機関が製造し、それぞれ約2.4g (純度97.4%と96.6%) の最終製造物を得ることができた。

#### 3) リード化合物スクリーニング用製剤のリポソーム処方の決定

医薬品として既に承認されているリポソーム構成成分として、飽和脂肪酸で炭素数18のジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) とジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、同じく飽和脂肪酸で炭素数が16のジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、また不飽和脂肪酸で炭素数18のジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) とジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG) 等とコレステロールにポリエチレングリコール (PEG) 修飾を組み合わせた13種類の処方で $\alpha$ -GalCer リポソーム

製剤を作製した。OVA 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与した結果、on-going IgE 産生を抑制するとともに、腹腔内 OVA 投与にチャレンジ後の二次的 IgE 産生も低用量 (50-5000 ng/kg) で抑制できるリポソーム処方 (LRK-9) で RCAI 化合物スクリーニング用の製剤を作製することに決定した。

#### 4) 開発候補化合物の選定

一次スクリーニングで選択された 3 種類リード化合物 (RCAI-X, -Y, -Z) をそれぞれ LRK-9 の処方でもリポソーム製剤を作製し、薬効評価系と毒性評価系に供与した。マウスを用いた in vivo 薬効評価系では、RCAI-X リポソーム製剤を静脈内に単回投与した群において、IgE 産生抑制と NKT 細胞の IL-21 産生を誘導する活性がみとめられた。OVA 感作マウスに OVA を経口チャレンジして下痢を誘発する食物アレルギーマウスモデルを用いた薬効評価系では、チャレンジ前の静脈内投与で IgE 産生抑制と下痢症状の軽減作用を認めなかった。RCAI-X 化合物のリポソーム製剤を最適化する目的から、LRK-9 処方を基準に新たに 3 つの処方でもリポソーム製剤を作製した。新処方で作製した RCAI-X リポソーム製剤を卵白アルブミン (OVA) 感作マウス喘息の抗原吸入チャレンジ前日に、単回静脈内投与した。その結果、抗原チャレンジ後の気道抵抗亢進、肺への好酸球・好中球の浸潤、肺洗浄液中サイトカイン (IL-5, IL-9, IL-13 等)、ケモカイン (エオタキシン、MCP-1、MIP-1 $\alpha$  等)、抗原特異的 IgE および全 IgE の産生が、RCAI-X リポソーム製剤の投与用量に依存的 (5~5000 ng/kg) に抑制されることを認めた。

毒性評価系の細菌を用いる復帰突然変異試験では 3 つのリード化合物単体およびそれらのリポソーム製剤の最大濃度 (5000  $\mu$ g/mL と 100  $\mu$ g/mL) から最低濃度まで全て陰性と判定されたことから、化合物が自身の変異原性はないと判断された。また hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験では、リポソーム製剤のみ評価したが、想定している最高薬効用量 (5  $\mu$ g/kg) から換算した血中濃度 (50 ng/mL) の約 200 倍の濃度 (10  $\mu$ g/mL) でも陰性であったことから、QT 延長に伴う心臓疾患を誘発する可能性が極めて低

い事が示唆された。マウス 2 週間間歇静脈投与試験では、2 週間に 6 回マウス静脈内に反復投与する毒性評価系において、薬効有効用量の 10 倍 (50  $\mu$ g/kg) と 1,000 倍 (5000  $\mu$ g/kg) を投与する群では、投与 2 日後の一過性の体重減少が認められたが 7 日目に回復し、その後は順調に体重が増加した。また投与開始 7 日後の 4 回目の投与 1 時間以内に 5000  $\mu$ g/kg (最大用量) 投与マウス群だけに死亡例が認められた。特に RCAI-Y リポソーム製剤の最大用量投与群については死亡例の割合が大きかった。反復投与後の病理組織学的検査では脾臓とリンパ節の腫大が認められたが、生化学検査では最大用量投与群で認められた AST/ALT 値上昇も陰性対照群の 2 倍以下に留まっており、その他重篤な副作用を示唆する所見や数値は認められなかった。以上の結果と特許性の観点から、RCAI-X を開発候補化合物に選定することに決定した。

#### 5) RCAI 化合物の治験薬 GMP 製造工程の開発

RCAI-X 化合物の小規模製造用に確立できている化学合成経路は約 20 工程あり、大量製造用に使用する材料と合成ルートを見直す作業を委託製造機関と共同で実施した。化合物を糖、スフィンゴシン、アシル鎖の 3 つのパートに分けて、それぞれの合成工程を検討した結果、カラムでの精製工程を除く全ての反応系が大量製造にスケールアップ可能であることが確認できた。来年度は 3 つのパートの化合物をそれぞれ大量製造する際の精製工程を改良し、最終的には 3 つのパート化合物から最終化合物 RCAI-X までの製造工程を治験薬 GMP に対応できるように整備する予定である。

#### D. 考察 :

##### 1) RCAI リード化合物の選定

RCAI シリーズの化合物を分類した 4 つのグループの中で、グループ III の化合物だけがリポソーム製剤化ができなかった。その原因として、セラミド部分の脂肪酸長が他の 3 つのグループに比べて著しく短い設計になっていることが原因と考えられた。また、グループ IV 化合物のリポソーム製剤の投与群に IgE 産生抑制効果が認められなかった理由として、グループ I や II と大きく構造が異なる糖部分の大きな修飾基がネガティブに作用している可能性が考えられた。

## 2) リード化合物の小規模製造

RCAI-X、RCAI-Y、RCAI-Z 全ての小規模製造は目標の重量である 1 g 以上と不純物含有率 5 % 以下を達成できたことから、最小有効用量が低い場合には、この小規模製造の工程をベースにして、大量製造工程を構築することで対応できることが明らかとなった。今後、治験薬 GMP 製造前には製造物中の不純物の同定を実施する必要があるが、 $\alpha$ -GalCer の製造実績から予想される不純物の多くは、セラミド構造を形成する脂肪酸数が減少した化合物であることが示唆されている。

## 3) リード化合物スクリーニング用製剤のリポソーム処方の決定

13 種類の処方で作製した  $\alpha$ -GalCer リポソーム製剤の中で、LRK-9 処方では低用量 (50-5000 ng/kg) 域では薬効を示したが、高用量 (100  $\mu$ g/kg) では薬効を示さなかった。マウスの静脈内に  $\alpha$ -GalCer を 100  $\mu$ g/kg で投与すると、様々なサイトカインやケモカインの血中濃度が高まることから、 $\alpha$ -GalCer リポソーム製剤の低用量投与群では IgE 産生抑制にネガティブな免疫応答が惹起されず、ポジティブな作用が維持された可能性が考えられた。

4) 開発候補化合物の選定: 3 種類のリード化合物の製剤化は、 $\alpha$ -GalCer で最適化されたリポソーム処方 (LRK-9) を用いた。OVA 感作マウス IgE 産生薬効評価試験では、低用量 (500 ng/kg) 静脈内単回投与で、RCAI-X リポソーム製剤のみ有意な IgE 産生抑制傾向を示したものの、OVA 感作マウスを用いた食物アレルギーモデルでは、有効性が認められなかった。これらの結果から LRK-9 処方では RCAI-X 化合物の活性を十分に引き出せていないと判断し、新たに 3 つのリポソーム処方では製剤を作製した。新処方の中から、OVA 感作マウスの抗原吸入チャレンジ後の症状軽減作用を示す RCAI-X リポソーム製剤を見出すことができたが、血中 IgE 産生の抑制は認められなかった。肺洗浄液中の抗原特異的 IgE 抗体と全 IgE とともに有意に抑制されていたことから、NKT 細胞は抗原感作部位である肺へ移行して IgE 産生 B 細胞にアポトーシスを誘導した可能性が示唆される。今後、詳細な作用機序を解明する必要があるが、RCAI-X リポソ

ーム製剤が IgE 産生抑制作用に加えて、好酸球 (さらに好中球) 性炎症を抑制できる可能性を示したことは、喘息治療薬としての高いポテンシャルを持つことを意味している。来年度は、最終処方では製造する RCAI-X リポソームを用いて、投与回数、投与用量、投与タイミング、投与ルートの詳細に実施して、血中 IgE 濃度を低下させる投与条件を確定したい。

毒性評価試系では、細菌を用いる復帰突然変異試験と hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験の両方において、想定している最高有効用量より 200 倍以上高い濃度設定で陰性であることが確認されたことから、化合物の構造に由来する一般毒性は低いことが予想される。しかしながら、マウス 2 週間間歇静脈内反復投与試験の最大用量投与マウス群の死亡例は全て、試験開始 7 日目の 4 回投与直後に発生していることから、作用機序に基づく副作用である可能性は否定できないものの、3 つのリード化合物中の不純物が同定できていないことから、活性成分 (API: active pharmaceutical ingredient) 以外の化合物の作用である可能性も残っている。来年度に製造予定の非 GMP グレードの RCAI-X 化合物で、再度同様の毒性試験を実施することで明らかになると予想される。

## E. 結論:

新規 NKT 細胞リガンド化合物から RCAI-X を開発候補品として選定した。製剤として最適なりポソーム処方を見出し、マウス喘息モデルで症状軽減作用を確認した。IgE 抑制アレルギー治療薬として RCAI-X リポソーム製剤の前臨床試験を開始する。

## F. 健康危険情報

マウス 2 週間間歇静脈内反復投与試験の最大用量 (5000  $\mu$ g/kg) 投与群に死亡例が認められた。本試験は最適化されていないリポソーム処方 (LRK-9) で作製したりポソーム製剤を用いて実施した予備的試験であるため、来年度に RCAI-X 化合物およびリポソーム製剤を非 GMP レベルで製造した後、実施する GLP 動物試験で再確認する。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1) 「新規擬似糖脂質及びその用途」  
W02008/102888(出願日：2008.2.22)

US 登録、JP, EP 審査中

- 2) 「新規糖脂質及びその用途」

WO2009/119692（出願日：2009.3.25）

US 登録、JP, EP 審査中

- 3) 「アレルギー疾患治療薬」

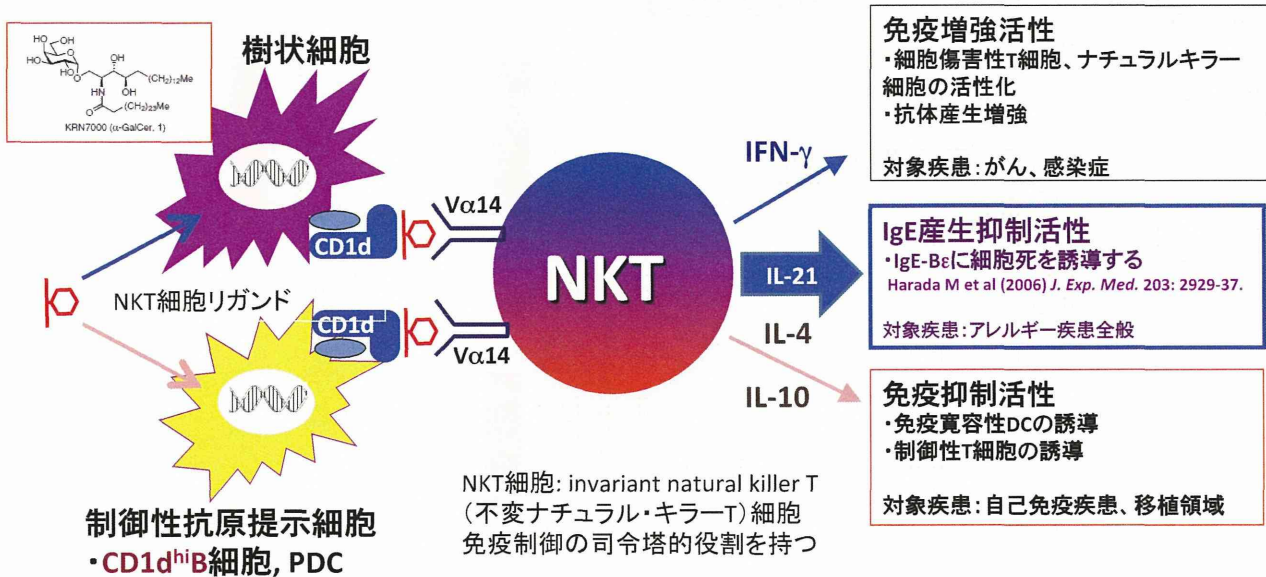
特願 2013-038047（出願日：2013.2.27）

PCT 出願（出願日：2014.2.26）





## NKT 細胞はIL-21を産生する



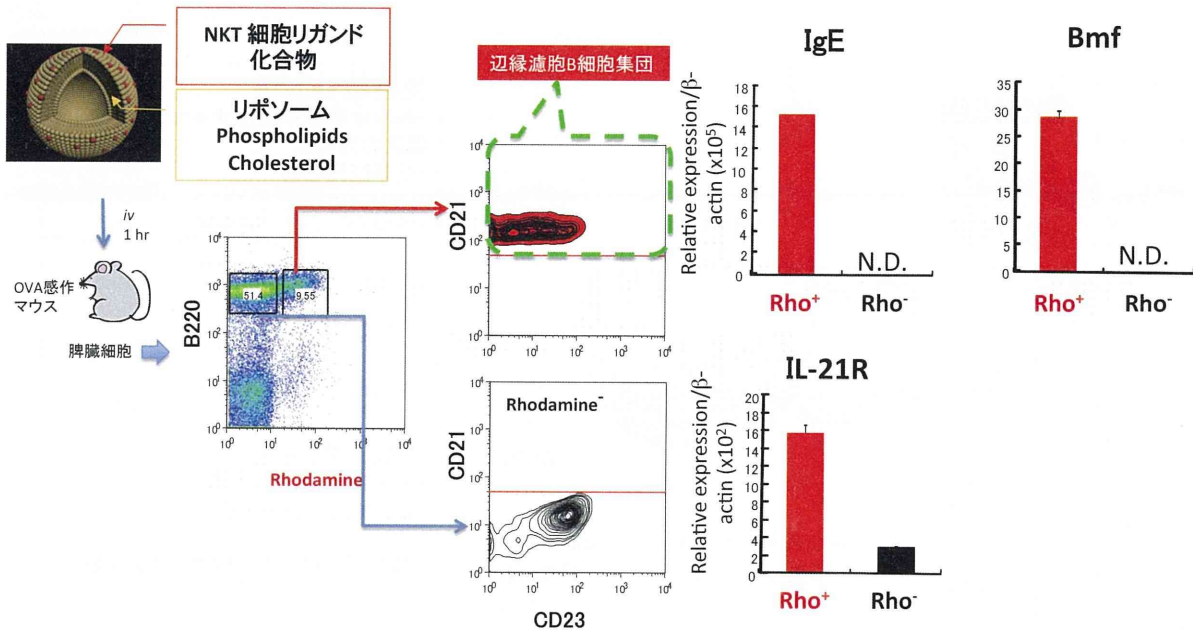
## IL-21はIgE産生B細胞にアポトーシスを誘導する



- IL-21 inhibits IgE class-switch.
  - “Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C $\epsilon$  transcription of IL-4-stimulated B cells.”
    - Suto A, et al. (2002) *Blood* **100**(13): 4565-4573.
- IL-21KO and IL-21R KO mice showed higher IgE but lower IgG1.
  - “IgE isotype switch and IgE production are enhanced in IL-21-deficient but not IFN- $\gamma$ -deficient mice in a Th2-biased response.”
    - Shang XZ, et al. (2006) *Cell Immunol* **241**(2): 66-74.
  - “A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production.”
    - Ozaki K, et al. (2002). *Science* **298** (5598): 1630–1634.
- IL-21 administration reduces allergic reactions.
  - “IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis.”
    - Yayoi H, et al. (2007) *J. Immunol.* **179**:7157-65.
  - “IL-21 reduces immediate hypersensitivity reactions in mouse skin by suppressing mast cell activation or IgE production.”
    - Tamagawa-Mineoka R, et al. (2011). *J Invest Dermatol* **131**:1513-1520.

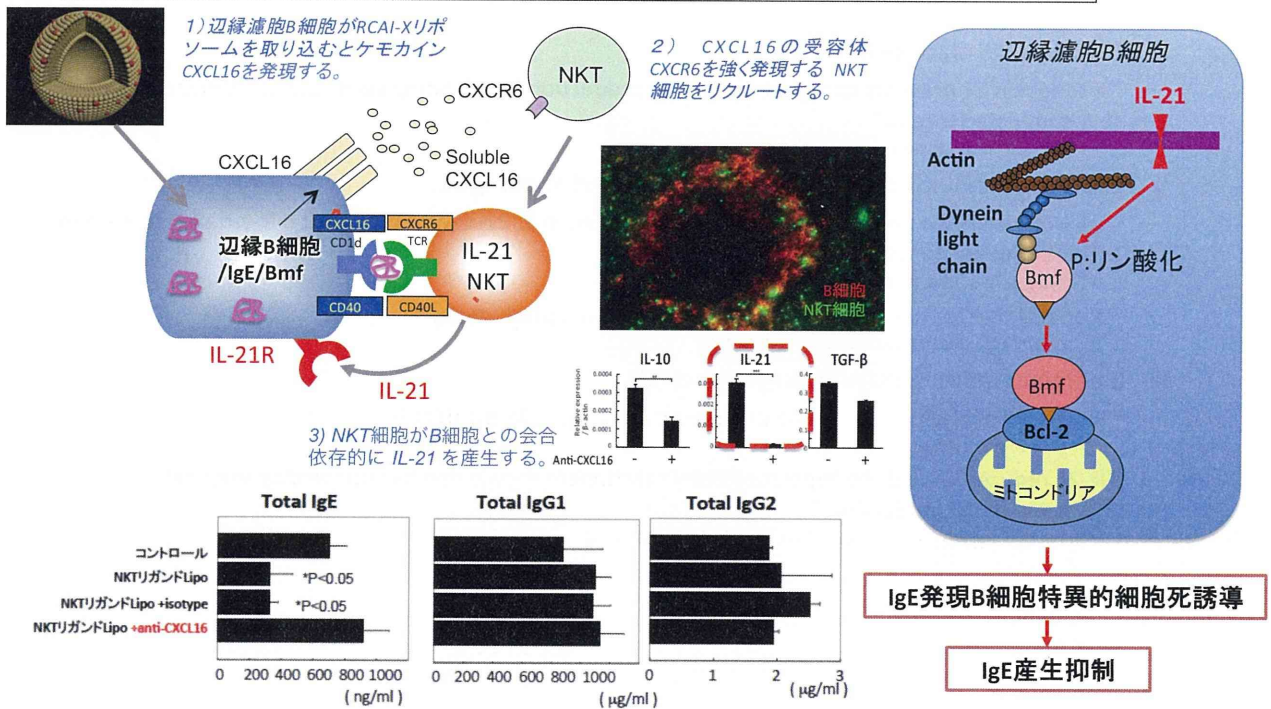


NKTリガンドリポソームは辺縁濾胞B細胞 (IgE産生、IL-21受容体・アポトーシス誘導因子Bmf 強発現) に選択的に取り込まれる。



3

辺縁濾胞B細胞と会合したNKT細胞はIL-21を産生してIgE発現B細胞にアポトーシスを誘導



## 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

### 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野) 分担研究報告書

(課題名) IgE 抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究 (分担研究 1)

研究分担者氏名 田代卓哉

(所属施設名及び職名) 独立行政法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター  
生命機能動的イメージング部門創薬化学基盤ユニット (和光分室) 研究員

研究要旨 ナチュラル・キラーT (NKT) 細胞の代表的リガンド化合物である  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) の誘導体 RCAI 化合物の中から、IgE 産生抑制活性を示した RCAI-X, RCAI-Y, RCAI-Z の全合成を実施した。RCAI-X は当機関内で約 1 g 製造した。RCAI-Y と RCAI-Z は当機関内で中間体を合成した後、委託製造機関にて最終化合物をそれぞれ約 2.4 g ずつ製造した。RCAI-X の大量生産を目標として製造工程の検討を委託製造機関と共同で実施し、GMP 下での製造工程の設計を完了した。研究目的：

$\alpha$ -GalCer よりも高活性を示す新規 NKT 細胞リガンド化合物 (RCAI シリーズ) の中から開発候補品を選定するため、薬効評価に必要な化合物を提供する。選定された RCAI 化合物の治験薬 GMP 製造工程を構築する。

#### I. 研究方法：

##### 1) リード化合物の小規模製造

リード化合物から開発候補品を選定するため、高純度 (不純物含有率 5% 以下) のリード化合物 (RCAI-X, RCAI-Y, RCAI-Z) を、外部の委託製造機関と共同で約 1 g 製造する。

2) RCAI 化合物の治験薬 GMP 製造工程の開発  
小規模製造用に確立できている化学合成経路を大量製造用に最適化するため、全工程に使用する材料と合成ルートの再検討を委託製造機関と共同で実施し、来年度製造予定の治験薬 GMP に対応する工程を確立する。

(倫理面への配慮)

倫理面の問題がないと判断した。

理由：すべて有機合成実験であり、ヒトや動物の材料を利用していない。

#### J. 研究結果：

##### 1) リード化合物の小規模製造

RCAI-X は研究分担者によって約 1 g (純度 97.5%)、RCAI-Y と RCAI-Z は研究分担者が製造した中間体化合物をベースに外部委託製造機関が製造し、それぞれ約 2.4 g (純度 97.4% と 96.6%) の最終製造物を得ることができた (資料：

RCAI-X/Y/Z の HPLC 分析チャート)。

##### 2) RCAI 化合物の治験薬 GMP 製造工程の開発

RCAI-X 化合物の小規模製造用に確立できている化学合成経路は約 20 工程あり、大量製造用に使用する材料と合成ルートを見直す作業を委託製造機関と共同で実施した。化合物を糖、スフィンゴシン、アシル鎖の 3つのパートに分けて、それぞれの合成工程を検討した結果、カラムでの精製工程を除く全ての反応系が大量製造にスケールアップ可能であることが確認できた。来年度は 3つのパートの化合物をそれぞれ大量製造する際の精製工程を改良し、最終的には 3つのパート化合物から最終化合物 RCAI-X までの製造工程を治験薬 GMP に対応できるように整備する予定である。

#### K. 考察：

RCAI-X, RCAI-Y, RCAI-Z 全ての小規模製造は目標の重量である 1 g 以上と不純物含有率 5% 以下を達成できたことから、最小有効用量が低い場合には、この小規模製造の工程をベースにして、大量製造工程を構築することで対応できることが明らかとなった。今後、治験薬 GMP 製造前には製造物中の不純物の同定を実施する必要があるが、 $\alpha$ -GalCer の製造実績から予想される不純物の多



# 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野）  
分担研究報告書

（課題名） IgE 抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究（分担研究 2）

研究分担者氏名 谷口 克

（所属施設名及び職名） 独立行政法人理化学研究所統合生命医科学研究センター  
免疫制御戦略研究グループ グループリーダー

研究要旨 活性化したナチュラル・キラーT (NKT) 細胞が産生するサイトカイン IL-21 によって、IgE 産生 B 細胞に細胞死が誘導されることを報告した。本研究改題では、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) 誘導体 RCAI 化合物による NKT 細胞の活性化と IL-21 発現能を確認する評価系を構築した。RCAI 化合物をマウスに投与後、脾臓 NKT 細胞を回収後、定量 PCR 法で IL-21 mRNA を定量した。その結果、RCAI-X リポソーム製剤が NKT 細胞の IL-21 発現を強く誘導することを確認した。今後、末梢血中 NKT 細胞の IL-21 発現を検出できる測定系に発展できれば、臨床試験でのバイオマーカーとして有効性の判断基準に応用できることが示唆された。

## A. 研究目的

マウス NKT 細胞の IL-21 発現を検出する測定系を構築し、RCAI 化合物による IL-21 発現量を比較する。

## B. 研究方法

C57BL/6 マウス♀ 7-10 週令の尾静脈に  $\alpha$ -GalCer (KRN7000) または RCAI 化合物のリポソーム製剤を投与する。投与 1 時間または 20 時間後に脾臓を摘出し、全細胞を蛍光標識された抗 B220 (B 細胞マーカー分子) 抗体、抗 NK1.1 (NK 細胞マーカー分子) 抗体と抗 TCR  $\beta$  (T 細胞マーカー分子) 抗体で染色する。フローサイトメーターで B220 陰性 NK1.1 陽性 TCR  $\beta$  陽性の細胞群をソートして回収する。次に、回収した細胞から RNA を抽出した後、cDNA 合成を行い、定量 PCR の鋳型とする。IL-21 およびその他サイトカインに対するプライマーセットと SYBR Green を添加し、定量 PCR を実施する。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号）及びその改正法案「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」（平成 17 年法律第 68 号）の第 5 章第 41 条にある動物

実験の基本理念である 3R (Replacement, Reduction, Refinement) に関する条項に従い、実験計画を立案した。実験の実施にあたっては「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日 文部科学省告示第 71 号）に基づく独立行政法人理化学研究所の動物実験実施規定を遵守した。

## C. 研究結果：

RCAI 化合物群の予備的リポソーム (DPPC/Chol) 製剤を OVA 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与して、IgE 産生抑制効果を示した 3 つのリード化合物 RCAI-X, -Y, -Z について、NKT 細胞の IL-21 発現誘導能を調べた。 $\alpha$ -GalCer, RCAI-X, RCAI-Y, RCAI-Z の予備的リポソーム製剤を 2  $\mu$ g マウスの尾静脈に投与し、1 時間後または 20 時間後に NKT 細胞を回収した。投与 20 時間で RCAI-X リポソームの IL-21 発現が最大になることが明らかになった（資料：RCAI 化合物リポソーム製剤投与後マウス NKT 細胞の IL-21 発現の定量 PCR 解析結果）。IL-21 以外のサイトカイン IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 の発現には差が認められなかったが、IL-12 受容体の発現も RCAI-X 投与 20 時間で最大であった。

#### D. 考察：

RCAI-X リポソーム投与で NKT 細胞の IL-21 発現と IL-12 受容体発現が高まることから、RCAI-X リポソームを取り込んだ抗原提示細胞からの IL-12 が NKT 細胞に作用して IL-21 発現を誘導している可能性が示唆された。NKT 細胞は  $\alpha$ -GalCer やその誘導体で活性化されると、細胞表面 TCR の発現量が低下することが知られている。ソーティングで NKT 細胞を単離するためには、TCR を抗体で染色する必要があるため、化合物投与 24 時間後以降は単離ができなかった。今後は、NKT 細胞を単離せず、脾臓または末梢血中 NKT 細胞の再構成された TCR  $\alpha$  ゲノム DNA の定量値と全細胞中 IL-21 mRNA 定量値の比で、RCAI 化合物の活性を評価できるか試す予定である。

#### E. 結論：

マウス NKT 細胞の IL-21 発現を検出する定量

PCR 法を確立した。IL-21 発現誘導能が最大である RCAI-X リポソームを開発候補化合物に選定した。さらに簡便な測定系に改良できれば、臨床試験でのバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

#### F. 研究発表

5. 論文発表 なし
6. 学会発表 なし

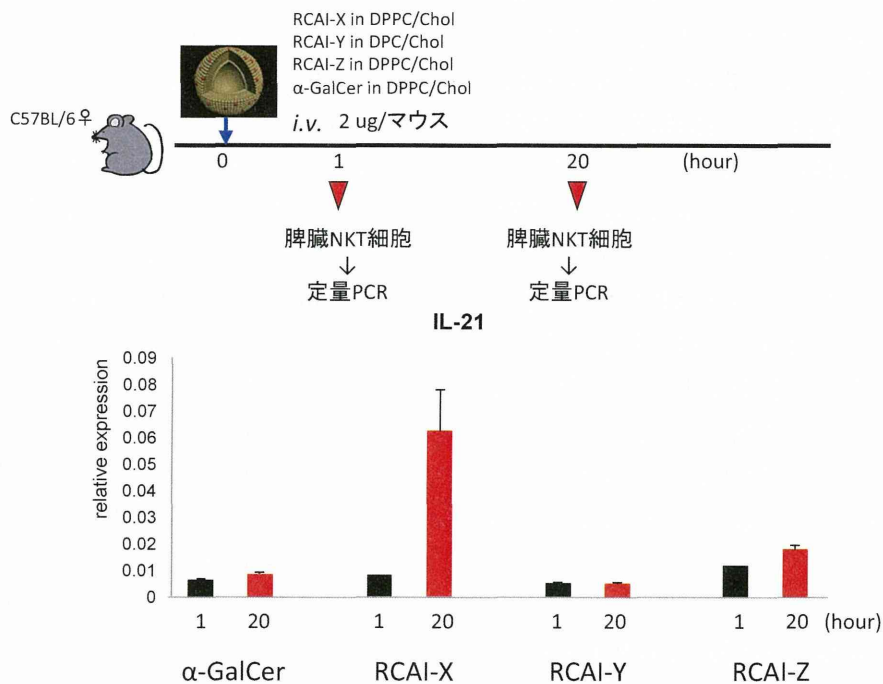
#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1) 「アレルギー疾患治療薬」

特願 2013-038047（出願日：2013.2.27）

PCT 出願（出願日：2014.2.26）

資料：RCAI化合物リポソーム製剤投与後マウスNKT細胞のIL-21発現の定量PCR解析結果





厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野）  
分担研究報告書

（課題名） IgE 抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究（分担研究 3）

研究分担者氏名 石井保之

（所属施設名及び職名） 独立行政法人理化学研究所統合生命医科学研究センター  
ワクチンデザイン研究チーム チームリーダー

研究要旨

ナチュラル・キラーT（NKT）細胞の新規リガンド RCAI 化合物群の中から、マウス *in vivo* IgE 産生抑制に高い活性を示す化合物をスクリーニングする事を目的に、リポソーム処方設計と製剤の製造を行った。安全性に関する3つの予備的試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験、マウス2週間間歇静脈投与試験）と IgE 産生抑制効果を評価するマウス薬効評価試験の結果から、RCAI-X 化合物を開発候補化合物に選定した。RCAI-X の薬効をさらに高めることを目標にリポソーム処方を設計し、新たに作製した RCAI-X リポソーム製剤について薬効試験を実施した。卵白アルブミン（OVA）感作マウスに抗原点鼻チャレンジする系では、チャレンジ前の静脈内単回投与によって、抗原特異的 IgE と全 IgE の有意な抑制を認めた。また同様のマウスに OVA 吸入チャレンジする系では、チャレンジ前の静脈内単回投与によって、気道反応性亢進や肺への好酸球浸潤が有意に抑制された。以上結果から、開発候補品に選定した RCAI-X リポソーム製剤は、IgE 産生と好酸球性炎症の両方を抑制することによって、喘息症状を軽減できる可能性が示唆された。

A. 研究目的：

$\alpha$ -GalCer よりも高活性を示す新規 NKT 細胞リガンド化合物（RCAI シリーズ）の中から開発候補品を安全性と有効性の観点から選定する。

B: 研究方法：

1) リード化合物の選定

RCAI シリーズの化合物 138 種類を化学構造の特徴から4つのグループ（I, II, III, IV）に分類し、それぞれから代表的な化合物を選定する。それぞれの化合物をスクリーニング用の予備的リポソーム処方設計で製剤化する。RCAI リポソームを卵白アルブミン（OVA）感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与し、IgE 産生抑制効果が高いリード化合物をスクリーニングする。

2) リポソーム処方の決定

医薬品として既に承認されているリポソーム構成成分（リン脂質、コレステロール等）と  $\alpha$ -GalCer を組み合わせて、各種リポソーム製剤を作製する。OVA 感作アレルギーモデルマウスの

静脈内に投与し、IgE 産生抑制効果が高いリポソーム処方を選定する。

3) 開発候補 RCAI 化合物の選定

最適化されたリポソーム処方設計で RCAI リード化合物の製剤を作製する。全ての製剤を、薬効評価系（RCAI リポソーム投与マウスの脾臓 NKT 細胞産生サイトカイン mRNA の定量と OVA 感作アレルギーモデルマウス IgE 産生抑制、IL-21 産生、食物アレルギー症状（下痢）、気道炎症抑制効果及び血中サイトカイン産生能を判定）と毒性評価系（細菌を用いる復帰突然変異試験、hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験、マウス2週間間歇静脈投与試験）で試験を実施し、開発候補 RCAI 化合物を選定する。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日法律第105号）及びその改正法案「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」（平成17

年法律第68号)の第5章第41条にある動物実験の基本理念である3R (Replacement, Reduction, Refinement)に関する条項に従い、実験計画を立案した。実験の実施にあたっては「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日文科科学省告示第71号)に基づく独立行政法人理化学研究所の動物実験実施規定を遵守した。

### C. 研究結果：

#### 1) RCAI リード化合物の選定

RCAI シリーズの化合物 138 種類は全て糖とセラミド脂質の構造を持つ $\alpha$ -GalCer 化合物の誘導体であることから、糖構造とセラミド構造で4つのグループ (I, II, III, IV) に分類された。全てのグループから、代表的な化合物を選定して、それぞれをスクリーニング用の予備的リポソーム処方で製剤化した結果、グループ III の化合物を除く全ての化合物でリポソーム製剤を作製することができた。RCAI 予備的リポソームを OVA 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与した結果、グループ I に属する1化合物 (RCAI-X) とグループ II に属する2化合物 (RCAI-Y, RCAI-Z) の予備的リポソームを投与した群に、IgE 産生抑制効果が認められた。3つの化合物 RCAI-X, -Y, -Z をリード化合物に選定した。

#### 5) リポソーム処方の決定

医薬品として既に承認されているリポソーム構成成分として、飽和脂肪酸で炭素数18のジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) とジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、同じく飽和脂肪酸で炭素数が16のジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、また不飽和脂肪酸で炭素数18のジオレイルホスファチジルコリン (DOPC) とジオレイルホスファチジルグリセロール (DOPG) 等とコレステロールにポリエチレングリコール (PEG) 修飾を組み合わせた13種類の処方で $\alpha$ -GalCer リポソーム製剤を作製した。OVA 感作アレルギーモデルマウスの静脈内に投与した結果、on-going IgE 産生を抑制するとともに、腹腔内 OVA 投与にチャレンジ後の二次的 IgE 産生も低用量 (50-5000 ng/kg) で抑制

できるリポソーム処方 (LRK-9) を選定した。

#### 6) 開発候補化合物の選定

一次スクリーニングで選択された3種類リード化合物 (RCAI-X, -Y, -Z) をそれぞれ LRK-9 の処方でリポソーム製剤を作製し、薬効評価系と毒性評価系に供与した。マウスを用いた in vivo 薬効評価系では、RCAI-X リポソーム製剤を静脈内に単回投与した群において、IgE 産生抑制と NKT 細胞の IL-21 産生を誘導する活性がみとめられた。OVA 感作マウスに OVA を経口チャレンジして下痢を誘発する食物アレルギーマウスモデルを用いた薬効評価系では、チャレンジ前の静脈内投与で IgE 産生抑制と下痢症状の軽減作用を認めなかった。RCAI-X 化合物のリポソーム製剤を最適化する目的から、LRK-9 処方を基準に新たに3つの処方でリポソーム製剤を作製した。新処方で作製した RCAI-X リポソーム製剤をマウス喘息モデルの抗原吸入チャレンジ前日に、単回静脈内投与した。その結果、抗原チャレンジ後の気道抵抗亢進、肺への好酸球・好中球の浸潤、肺洗浄液中サイトカイン (IL-5, IL-9, IL-13 等)、ケモカイン (エオタキシン、MCP-1、MIP-1 $\alpha$  等)、抗原特異的 IgE および全 IgE の産生が、RCAI-X リポソーム製剤の投与用量に依存的 (5~5000 ng/kg) に抑制されることを認めた。

毒性評価系の細菌を用いる復帰突然変異試験では3つのリード化合物単体およびそれらのリポソーム製剤の最大濃度 (5000  $\mu$ g/mL と 100  $\mu$ g/mL) から最低濃度まで全て陰性と判定されたことから、化合物が自身の変異原性はないと判断された (資料1と2)。また hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験では、リポソーム製剤のみ評価したが、想定している最高薬効用量 (5  $\mu$ g/kg) から換算した血中濃度 (50 ng/mL) の約200倍の濃度 (10  $\mu$ g/mL) でも陰性であったことから、QT 延長に伴う心臓疾患を誘発する可能性が極めて低いことが示唆された (資料3)。マウス2週間間歇静脈投与試験 (資料4) では、2週間に6回マウス静脈内に反復投与する毒性評価系において、薬効有効用量の10倍 (50  $\mu$ g/kg) と1,000倍 (5000  $\mu$ g/kg) を投与する群では、投与2日後の一過性の体重減少が認められたが7日目に回復し、その後は順調に体重が増加した。また投与開始7日後の



4回目の投与1時間以内に5000 $\mu$ g/kg（最大用量）投与マウス群だけに死亡例が認められた。特にRCAI-Yリポソーム製剤の最大用量投与群については死亡例の割合が大きかった。反復投与後の病理組織学的検査では脾臓とリンパ節の腫大が認められたが、生化学検査では最大用量投与群で認められたAST/ALT値上昇も陰性対照群の2倍以下に留まっており、その他重篤な副作用を示唆する所見や数値は認められなかった。

#### D. 考察：

##### 4) RCAI リード化合物の選定

RCAI シリーズの化合物を分類した4つのグループの中で、グループ III の化合物だけがリポソーム製剤化ができなかった。その原因として、セラミド部分の脂肪酸長が他の3つのグループに比べて著しく短い設計になっていることが原因と考えられた。また、グループ IV 化合物のリポソーム製剤の投与群にIgE産生抑制効果が認められなかった理由として、グループ I や II と大きく構造が異なる糖部分の大きな修飾基がネガティブに作用している可能性が考えられた。

##### 5) リポソーム処方の決定

13種類の処方で作製した $\alpha$ -GalCerリポソーム製剤の中で、LRK-9処方は低用量（50-5000ng/kg）域では薬効を示したが、高用量（100 $\mu$ g/kg）では薬効を示さなかった。マウスの静脈内に $\alpha$ -GalCerを100 $\mu$ g/kgで投与すると、様々なサイトカインやケモカインの血中濃度が高まることが知られていることから、 $\alpha$ -GalCerリポソーム製剤の低用量投与群ではIgE産生抑制にネガティブな免疫応答が惹起されず、ポジティブな作用が維持された可能性が考えられた。

3) 開発候補化合物の選定：3種類のリード化合物の製剤化は、 $\alpha$ -GalCerで最適化されたリポソーム処方(LRK-9)を用いた。OVA感作マウスIgE産生薬効評価試験では、低用量（500ng/kg）静脈内単回投与で、RCAI-Xリポソーム製剤のみ有意なIgE産生抑制傾向を示したものの、OVA感作マウスを用いた食物アレルギーモデルでは、有効性が認められなかった。これらの結果からLRK-9処方ではRCAI-X化合物の活性を十分に引き出せていないと判断し、新たに3つのリポソーム処方で作製した。新処方の中から、

OVA感作マウスの抗原吸入チャレンジ後の症状軽減作用を示すRCAI-Xリポソーム製剤を見出すことができたが、血中IgE産生の抑制は認められなかった。肺洗浄液中の抗原特異的IgE抗体と全IgEともに有意に抑制されていたことから、NKT細胞は抗原感作部位である肺へ移行してIgE産生B細胞にアポトーシスを誘導した可能性が示唆される。今後、詳細な作用機序を解明の必要があるが、RCAI-Xリポソーム製剤がIgE産生抑制作用に加えて、好酸球（さらに好中球）性炎症を抑制できる可能性を示したことは、喘息治療薬としての高いポテンシャルを持つことを意味している。来年度は、最終処方で製造するRCAI-Xリポソームを用いて、投与回数、投与用量、投与タイミング、投与ルートの詳細に実施して、血中IgE濃度を低下させる投与条件を確定したい。

毒性評価試系では、細菌を用いる復帰突然変異試験とhERG導入HEK293細胞のカリウム電流を測定する不整脈試験の両方において、想定している最高有効用量より200倍以上高い濃度設定で陰性であることが確認されたことから、化合物の構造に由来する一般毒性は低いことが予想される。しかしながら、マウス2週間間歇静脈内反復投与試験の最大用量投与マウス群の死亡例は全て、試験開始7日目の4回投与直後に発生していることから、作用機序に基づく副作用である可能性は否定できないものの、3つのリード化合物中の不純物が同定できていないことから、活性成分（API: active pharmaceutical ingredient）以外の化合物の作用である可能性も残っている。来年度に製造予定の非GMPグレードのRCAI-X化合物で、再度同様の毒性試験を実施することで明らかになると予想される。

#### E. 結論：

新規NKT細胞リガンド化合物からRCAI-Xを開発候補品として選定した。製剤として最適なりポソーム処方を見出し、マウス喘息モデルで症状軽減作用を確認した。IgE抑制アレルギー治療薬としてRCAI-Xリポソーム製剤の前臨床試験を開始する。

F. 研究発表

7. 論文発表 なし

8. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1) 「アレルギー疾患治療薬」

特願 2013-038047（出願日：2013.2.27）

PCT 出願（出願日：2014.2.26）

## 最終報告書

試験表題：RK-156, RK-261 及び RK-364 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：13K6178N

試験期間 2013年11月11日 ～ 2013年11月19日

株式会社シミックバイオリサーチセンター

試験責任者署名：

山中 妙子  
山中妙子

2013年11月19日

本報告書は表紙を含む14枚

最終報告書

表題： LRX, LRY 及び LRZ の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： SBL366-001

試験責任者： 林 亜耶

当該資料は原本を正確に複写した  
ものであり、原本と相違ないことを  
保証いたします。

株式会社新日本科学 安全性研究所

試験責任者 林 亜耶

日付 2013 年 11 月 26 日

署名

林 亜耶

2013 年 11 月 26 日

株式会社新日本科学 安全性研究所

本報告書は表紙を含む 22 ページ

## 目 次

要約.....	4
1. 試験目的.....	5
2. 適用規則.....	5
3. 試験委託者.....	5
4. 試験施設.....	5
5. 試験日程.....	5
6. 材料及び方法.....	5
6.1 被験物質及び対照物質.....	5
6.1.1 被験物質-1.....	5
6.1.2 被験物質-2.....	6
6.1.3 被験物質-3.....	6
6.1.4 媒体（陰性対照物質）.....	7
6.1.5 陽性対照物質.....	7
6.1.5.1 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2).....	7
6.1.5.2 Sodium azide (NaN <sub>3</sub> ).....	7
6.1.5.3 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate (9AA).....	7
6.1.5.4 2-Aminoanthracene (2AA).....	7
6.2 被験物質及び対照物質の調製.....	7
6.2.1 被験物質調製液.....	7
6.2.2 陰性対照調製液.....	8
6.2.3 陽性対照調製液.....	8
6.3 試験系（菌株）.....	8
6.4 代謝活性化系.....	9
6.4.1 S9（ラット肝ホモジネート）.....	9
6.4.2 S9 mix の調製.....	9
6.5 培地.....	10
6.5.1 前培養液.....	10
6.5.2 最少グルコース寒天平板培地.....	10
6.5.3 トップアガー.....	10
6.6 群構成及び用量の設定.....	11
6.7 試験の実施.....	11
6.7.1 菌の前培養.....	11
6.7.2 試験培養.....	12
6.7.3 無菌試験.....	12
6.7.4 生育阻害の分類とコロニー数の測定.....	12