

**図1** CaMKIV (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV) の細胞内シグナルにおける役割と CaMKIV 阻害薬 KN-93 の構造

A, B: CaMKIV は Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体の下流にある CaMKK を介しリン酸化を受け核内に移行する。つづいてリン酸化を受けた CREM は IL-2 を抑制、あるいは IL-17 産生を促進させる。また別の経路では AKT/mTOR signaling を活性化させ、Th17 細胞の分化に関与する (Koga T *et al.*, 2014<sup>3)</sup>/Crispin JC *et al.*, 2010<sup>4)</sup>より引用)。

C: KN-93 は CaM と競合的にはたつき、CaMKK による CaMKIV のリン酸化を阻害する (Racioppi L *et al.*, 2008<sup>7)</sup>より改変引用)。

D: KN-93 の化学式: C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, 分子量 = 501.1 (TOCRIS 社 <http://www.tocris.com> より引用)

を MRL/*lpr* マウスの腹腔内に投与することにより、腎炎進展抑制効果や疾患の活動性を調節することを報告した<sup>5)6)</sup>。これらのことから CaMKIV をターゲットとしたキナーゼ阻害薬が SLE をはじめとする自己免疫疾患の治療薬として有用となりうる事が示唆された。

本稿では自己免疫疾患における CaMKIV の役割および治療標的分子としての可能性について概説したい。

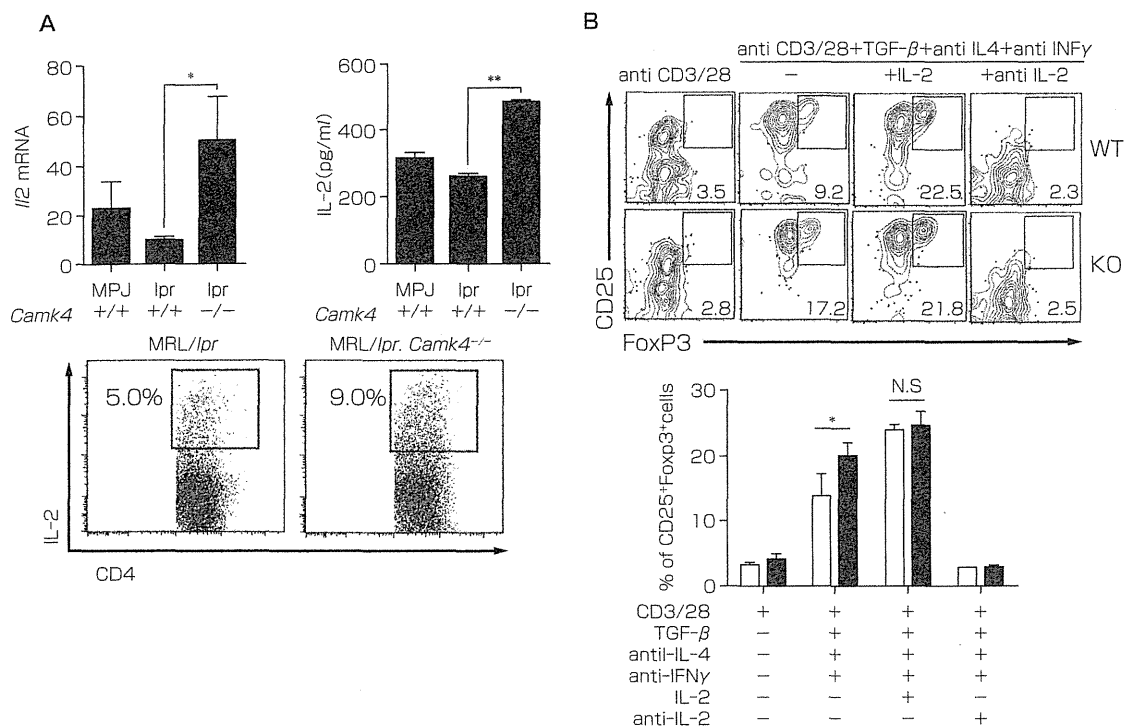
## 1. CaMKIV

Ca<sup>2+</sup>シグナルは神経細胞、骨格筋細胞とともに免疫細胞でもセカンドメッセンジャーとして細胞増殖、分化、分泌、遊走などに重要な役割を担っている。カルモジュリン (calmodulin: CaM) は細胞内でカルシウムと結合するおもな蛋白で、Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体を形成する。この複合体は Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性セリン-スレオニンキナーゼ (CaMK) ファミリーである CaMKI, CaMKII, CaMK

IV を活性化させる。そのなかで CaMKIV は Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体の下流にある CaMK キナーゼ (CaMKK) を介しリン酸化を受け核内に移行し、さまざまな転写因子に結合した結果、細胞の機能変化をもたらすものと考えられている。CaMKIV はリンパ球や脳などに多く発現しており、血球系前駆細胞、神経細胞、胸腺細胞、骨芽細胞などで細胞の生存や分化に関与していることが報告されている<sup>7)</sup>。

免疫細胞では SLE 患者の T 細胞の核内で CaMKIV の発現が亢進しており、IL-2 のプロモーター領域にある転写因子 CREM $\alpha$  のリン酸化を誘導し、IL-2 の発現抑制メカニズムが示された<sup>2)</sup>。さらに MRL/*lpr*.*Camkiv*<sup>-/-</sup> マウスでは MRL/*lpr* マウスにくらべて IL-2 の発現が回復しており、Treg の発現を誘導した結果、SLE の病態改善効果をもたらしていることが示唆された<sup>6)</sup> (図2A, B)。

免疫細胞以外においてもわれわれは MRL/*lpr* マウスにおける腎系球体からメサンギウム細胞を単離し、



**図2 CaMKIV は pCREM を介した IL-2 発現を制御する**  
 A: T 細胞由来の IL-2 発現は MRL/lpr マウス (WT) で抑制され, MRL/lpr.camkiv<sup>-/-</sup> マウス (KO) でその発現が回復していた. B: MRL/lpr.camkiv<sup>-/-</sup> マウスでは WT マウスにくらべ, IL-2 依存性に制御性 T 細胞 (Treg) の発現を誘導した. (\*p<0.05, \*\*p<0.01)  
 (Koga T et al, 2012<sup>9)</sup>より引用)

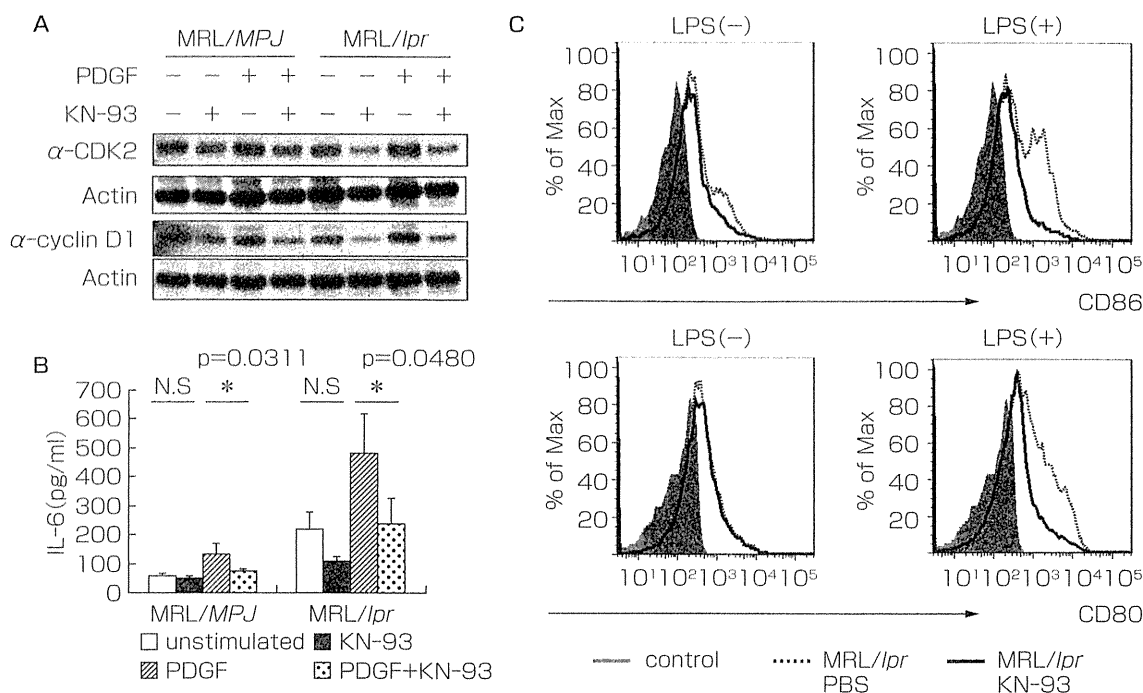
CaMKIVを介した増殖能, サイトカイン産生能を検討した. その結果 MRL/lpr マウス由来のメサングウム細胞では CaMKIV 発現が亢進しており, MRL/lpr.camkiv<sup>-/-</sup> マウスおよび KN-93 投与下では, c-Jun の発現制御を介してメサングウム細胞の増殖能や IL-6 産生が抑制されていることが明らかとなった. これらの結果より, ループス腎炎におけるメサングウム細胞の CaMKIV 発現亢進が腎炎進展にも関与している可能性が考えられた<sup>8)</sup> (図3A, B).

Sato らは破骨細胞形成の Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) シグナルのトランスクリプトーム解析を進め, カルシウムを介する転写制御シグナルに CaMKIV が重要であることを報告した. RANKL 刺激により CaMKIV とその下流で活性化された phosphorylated cyclic AMP response element binding protein (pCREB) が破骨細胞分化の必須転写因子である c-Fos の誘導を介して分化を制御し, Camkiv<sup>-/-</sup> マウスでは

wild type と比較して破骨細胞数が減少しており, それに伴って骨量が増加していることが明らかとなった. さらに *in vivo* の炎症性骨破壊モデルや卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいても, CaMKIV 阻害薬は治療効果があるとされ, 今後の新たな治療標的分子となりうることを示唆された<sup>9)</sup>.

## 2. CaMKIV-CREM pathway

SLE では IL-2 プロモーター領域の -180 部位にある CRE への CREMα と CREB (cAMP response element-binding) の相互的な結合により, T 細胞における IL-2 発現を制御している. CREM は alternative splicing により多くの isoform に分けられるが, CREMα は IL-2 産生を抑制するはたらきがある. 一方, もう一つの転写因子である CREB はリン酸化を受けると IL-2 の転写活性を亢進させるはたらきがある. SLE の T 細胞では CaMK



**図3** CaMKIV 阻害薬 KN-93 による腎メサンギウム細胞増殖および MRL/lpr マウス B 細胞活性化の抑制  
 A, B: KN-93 は MRL/lpr マウスの腎メサンギウム細胞において細胞増殖に関与する CDK-2, cyclin D1 の蛋白発現を抑制し, IL-6 産生を低下させた. これらの効果は血小板由来成長因子 (PDGF) 刺激で有意な差がみられた. C: KN-93 は MRL/lpr マウスにおける脾臓由来の CD19<sup>+</sup>B 細胞では LPS 刺激下で CD80 および CD86 の発現が低下していた.  
 (Ichinose K *et al.*, 2011<sup>5)</sup>/Ichinose K *et al.*, 2011<sup>8)</sup>より引用)

IVによってリン酸化された CREM $\alpha$  と Protein phosphatase 2A (PP2A) により脱リン酸化された CREB により IL-2 発現が抑制される<sup>410)</sup> (図1A).

一方, SLE では IL-17 を産生する Th17 細胞と制御性 T 細胞のアンバランスが発症に関与していると考えられている. Koga らは CaMKIV が CREM $\alpha$  を介した IL-17 産生を制御し, Th17 細胞における CaMKIV-CREM pathway の役割を明らかにした. また同時に CaMKIV は AKT/mTOR signaling を活性化させ Th17 細胞の分化に関与することを報告した<sup>3)</sup> (図1B).

### 3. CAMKIV-CD86, CD80 制御

抗原提示細胞としての B 細胞, マクロファージ, 樹状細胞は T 細胞とかかわり, co-stimulatory pathway である CD80, CD86 などを通して T 細胞の自己抗原に対する免疫寛容状態の破綻により, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) や tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性サイ

トカインを誘導する.

Illario らは単球由来の樹状細胞の表面に発現している CD83 や CD86 がリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) 刺激下で KN-93 により抑制されていることを報告した. この toll-like receptor 4 (TLR4) によって活性化されるシグナルは pCREB, Bcl-2, Bcl-xL を介して CaMKIV によって制御されており, 樹状細胞の cell survival に寄与していることを明らかにした<sup>11)</sup>.

われわれは MRL/lpr マウスに CaMKIV 阻害薬である KN-93 を 8 週齢および 12 週齢から 16 週齢まで腹腔内投与し, 蛋白尿, 血清サイトカイン発現, 抗 ds-DNA 抗体価, 脾臓, リンパ節における炎症性サイトカイン, 表面抗原の発現変化についての検討をおこなった. 8 週齢および 12 週齢から KN-93 を投与されたマウス (KN-93 投与群) では, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 投与群にくらべ蛋白尿抑制と腎炎進展抑制効果が認められた. 抗 ds-DNA 抗体価, IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン発現は 8 週齢から投与開始された KN-93 投与群

マウスで有意に低下していた。脾臓由来の CD19<sup>+</sup> B 細胞では LPS 刺激下で CD80 および CD86 が KN-93 投与群で低下していた<sup>5)</sup> (図 3C)。以上の結果から、KN-93 は抗原提示細胞と T 細胞の相互作用を制御した結果、細胞増殖、炎症や抗体産生能を抑制し、ループス腎炎の治療に寄与する可能性がある。

## おわりに

CaMKIV は T 細胞だけではなく、抗原提示細胞や単球・マクロファージに類似した機能をもつ腎メサンギウム細胞、破骨細胞にも関与し、炎症や増殖を抑制することによって、さまざまな病態における治療的側面を担うことが期待される。今後はヒトへの臨床的応用に向けて、投与方法や薬剤の安全性について更なる検討をおこなう必要がある。

## 文献

- 1) Tsokos GC : Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **365** : 2110-2121, 2011
- 2) Juang YT *et al* : Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* **115** : 996-1005, 2005
- 3) Koga T *et al* : CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM-alpha underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J Clin Invest* **124** : 2234-2245, 2014
- 4) Crispin JC *et al* : T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* **6** : 317-325, 2010
- 5) Ichinose K *et al* : Suppression of autoimmunity and organ pathology in lupus-prone mice upon inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV. *Arthritis Rheum* **63** : 523-529, 2011
- 6) Koga T *et al* : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV suppresses IL-2 production and regulatory T cell activity in lupus. *J Immunol* **189** : 3490-3496, 2012
- 7) Racioppi L *et al* : Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses : novel routes for an ancient traveller. *Trends Immunol* **29** : 600-607, 2008
- 8) Ichinose K *et al* : Cutting edge : Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase type IV is essential for mesangial cell proliferation and lupus nephritis. *J Immunol* **187** : 5500-5504, 2011
- 9) Sato K *et al* : Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med* **12** : 1410-1416, 2006
- 10) Katsiari CG *et al* : Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **115** : 3193-3204, 2005
- 11) Illario M *et al* : Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. *Blood* **111** : 723-731, 2008

