

201442042A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))

新規 BAFF 受容体阻害剤を用いた
シェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 竹内 勤

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患等実用化研究事業）））委託事業による委託業務として、学校法人慶應義塾 理事長 清家 篤が実施した平成 26 年度「新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発」の成果をとりまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))

新規 BAFF 受容体阻害剤を用いた
シェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 竹内 勤

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

新規BAFF受容体阻害剤を用いた
シェーグレン症候群の革新的治療薬の開発
竹内 勤

（慶應義塾大学 医学部 リウマチ内科） ----- 1

II. 委託業務成果報告（分担業務項目）

1. リポジショニングを目的とした既承認薬
ライブラリーの構築とスクリーニング
水島 徹

（慶應義塾大学 薬学部 分析化学講座） ----- 17

2. 抗BAFF受容体抗体の作製に関する研究
仲 哲治

（独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部） ----- 21

3. 抗BAFF受容体抗体の作製に関する研究
角田 慎一

（独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト） ----- 25

4. ハイスループットスクリーニング法および
医薬品リポジショニングを用いたBAFF受容体
阻害剤の探索と最適化

鈴木 勝也

吉本 桂子

（慶應義塾大学 医学部 リウマチ内科） ----- 28

III. 学会等発表実績 ----- 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 49

I. 委託業務成果報告
(総括)

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))
委託業務成果報告(総括)

新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

業務主任者・研究代表者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部 リウマチ内科 教授
慶應義塾大学病院 病院長

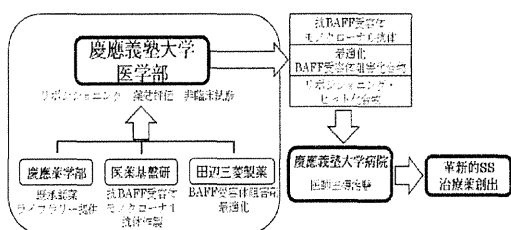
研究要旨：本研究は厚生労働省の定める指定難病であり、未だ治療法が確立されていないシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) を対象とし、SS の病態に深く関与する BAFF (B cell stimulating factor of TNF family) 受容体を標的とする革新的治療薬を創出することを目的とする。本研究代表者竹内らが独自に開発したハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって見出したピロロピリミジン誘導体化合物の最適化、ドラッグリポジショニング、BAFF 受容体を標的としたバイオ医薬品の 3 つの手段を用いて、免疫難病を対象とする早期探索的臨床研究拠点病院 (慶應義塾大学病院)、慶應義塾大学医学部、薬学部、独立行政法人医薬基盤研究所、製薬企業が協力して BAFF 受容体阻害剤を SS 治療薬として開発する。SS の病態には B 細胞による過剰な抗体産生、多種の自己抗体産生が関与している。これまでに研究代表者竹内らは SS 患者末梢血単球で BAFF 受容体の発現が異常に亢進していることや、このことが患者末梢血 B 細胞からの過剰な抗体産生に影響を与えていることを世界で初めて明らかにした。これらの結果から BAFF 受容体は SS 治療にむけた格好の標的であると考えられ、化合物ライブラリーを用いた HTS 法により BAFF 受容体への BAFF 結合を阻害するピロロピリミジン化合物を取得した (特許第 5628647 号)。これらの化合物は SS 患者末梢血 B 細胞と単球の共培養で得られた抗体産生を容量依存的に阻害し (PCT/JP2014/076820)、マウス脾臓リンパ球からの *in vitro* 抗体産生も強力に抑制したことから極めて有望な治療薬の候補と考えられ、これらをリード化合物として製薬企業 (田辺三菱製薬株式会社) と共同で最適化を開始した。一方で、*in vitro* での BAFF 受容体機能評価系を用いて慶應義塾大学薬学部より提供された既承認薬ライブラリーのリポジショニングを開始した。これまで 210 医薬品を検定し、そのうち約 10% に有意な阻害活性を見出した。また医薬基盤研究所のバイオ医薬品創出技術を用いて抗 BAFF 受容体モノクローナル抗体作製を開始し、バイオ医薬品の開発を試みる。

研究分担者
 水島 徹（慶應義塾大学薬学部分析化学講座 教授）
 仲 哲治（独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部 創薬基盤研究部長）
 角田慎一（独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト プロジェクトリーダー）
 鈴木勝也（慶應義塾大学医学部リウマチ内科 講師）
 吉本桂子（慶應義塾大学医学部リウマチ内科 特任研究員）
 研究協力者
 菅原邦夫（田辺三菱製薬薬理第一研究所主任研究員）
 鎌田春彦（独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト サブプロジェクトリーダー）
 長野一也（独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト プロジェクト研究員）

A. 研究目的

本研究は、免疫難病である SS に対し、慶應義塾大学医学部・薬学部、慶應義塾大学病院（早期・探索的臨床試験拠点）と医薬基盤研究所および田辺三菱製薬が連携して、BAFF 受容体を新規標的分子とした革新的治療薬を開発することを目的とする（図 1）。

図 1 研究流れ図

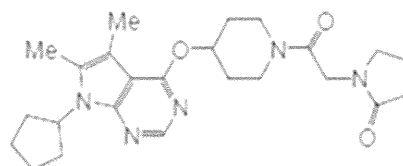


B. 研究方法

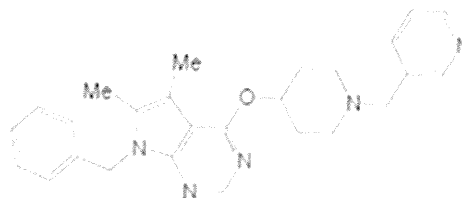
1) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物 A および B (図 2) の in vitro および in vivo での作用の検証

図 2 化合物の構造

化合物 A



化合物 B



マウス脾臓由来 B 細胞、ヒト単球由来細胞株 THP-1、ヒト末梢血単球、B 細胞を用いた BAFF 受容体機能評価系にて、化合物 A および B の阻害作用を検証した。具体的には下記に示す方法を用いた。

(1) マウス脾臓 B 細胞を用いた評価系

C57BL/6N マウス脾臓より naïve B 細胞を単離し、抗マウス IgM 抗体、CpG、マウス IL-4 およびマウス BAFF による IgG 産生促進に対する化合物 A および B の影響を検証した。

(2) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた評価系

IFN γ 刺激 THP-1 (human acute monocytic leukemia) 細胞からの BAFF により誘導された IL-6 産生に対する化合物 A および B

の影響を検証した。

(3) ヒト末梢血単球を用いた検証

健常人末梢血単球からのBAFFにより誘導されるIL-6産生に対する化合物AおよびBの影響を検証した。

(4) ヒト末梢血B細胞を用いた検証

健常人末梢血B細胞からの抗ヒトIgM抗体、CD40ligand、ヒトIL-4、ヒトBAFFにより誘導されるIgG産生に対する化合物AおよびBの影響を検証した。

(5) ヒト末梢血単球とB細胞の共培養による検証

ヒト末梢血B細胞と単球をヒトBAFF存在下で共培養し、誘導されるIgG産生に対する化合物AおよびBの影響を検証した。

(6) 化合物AおよびBのin vivoでのIgG産生抑制作用の検証

MRL/lprマウス、メス8週令に化合物を投与し、生存率、体重、血中抗ds-DNA抗体価を経時的に測定し、炎症モデルにおける化合物の影響を検証した。

2) ハイスループットスクリーニング(HTS)法によって得られた化合物の最適化に向けた準備

研究協力者である田辺三菱製薬の薬理第一研究所にてMRL/lprマウスに化合物を1mg/kg腹腔内投与し、血中における化合物の濃度を経時的に測定する薬物動態試験を立案した。

3) 医薬品リポジショニング

本研究の分担研究者である慶應義塾大学薬学部分析化学教室水島教授より供与された840種類の既存医薬品のうち210種類の医薬品について研究方法1)-(2)に示したBAFF受容体機能評価系を用いて、BAFFにより誘導されるIL-6産生に対す

る作用を検討し、抑制作用を有する既承認薬の探索を施行した。

5) 抗ヒトBAFF受容体抗体作製

(1) 抗ヒトBAFF抗体評価系の構築

NZBマウスとNZWマウスの交配によって得られるNZBWF1雌マウス、およびNODマウスは、全身性エリテマトーデスやSS類似の自己免疫疾患を自然発症することが報告されている。本研究の分担研究者である医薬基盤研究所創薬基盤研究部 仲創薬基盤研究部長らにより、これらのマウスを用いて医薬基盤研究所実験動物施設にて維持および病態形成の観察を行った。継時的に組織を摘出し、病理的検討を行った。

(2) 抗ヒトBAFF受容体抗体産生ハイブリドーマ作製

本研究の分担研究者である医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト 角田プロジェクトリーダーらにより、Balb/cマウスに対し、ヒトBAFF受容体遺伝子発現ベクター、BAFF受容体細胞外ドメインFcキメラ蛋白を腹腔投与した。経日的に採血し、BAFF受容体に対する抗体価の上昇が確認できたマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3U1と融合させることでハイブリドーマを作製した。培養上清のBAFF受容体結合性をスクリーニング系で評価し、候補のハイブリドーマクローンを獲得した。

追記：抗BAFF受容体抗体の作製は永田諭博士および阿部康弘博士（Sanford Research）の協力も得て実施した。

（倫理面への配慮）

1) 薬効薬理試験に使用したSS患者の

血液検体は慶應義塾大学病院においてS Sの外来患者からインフォームドコンセントを得たうえで採取した。患者の臨床情報も当該患者からインフォームドコンセントを得たうえで利用する。血液検体の採取および臨床情報の利用については、慶應義塾大学医学部の倫理委員会の審査を受け、すでに承認を得ている。

2) 動物実験は「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」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して実施する。

C. 研究結果

BAFF 受容体阻害剤化合物 A および B について特許査定を受けた (特許第 5628647 号)。

1) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物 A および B の in vitro および in vivo での作用の検証

(1) C56BL/6N マウス脾臓 B 細胞から抗マウス IgM 抗体、CpG、マウス IL-4 およびマウス BAFF により誘導される IgG および IgM 産生を化合物 A、B とも 3 μ M でそれぞれ 60% および 70% 抑制することが検証された。

(2) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた検証

IFN γ 刺激された THP-1 からの BAFF により誘導される IL-6 産生を化合物 A、B とも 6 μ M で約 50% 阻害することが検証された。

(3) ヒト末梢血単球を用いた検証

健康人末梢血単球からの BAFF による IL-6 産生を化合物 A、B とも 6 μ M で約 50% 阻害を示すことが検証された。

(4) ヒト末梢血 B 細胞を用いた検証

健康人末梢血 B 細胞からの抗ヒト IgM 抗体、CD40ligand、ヒト IL-4、ヒト BAFF により誘導される IgG 産生を化合物 A、B とも 7.5 μ M でほぼ 100% 抑制した。

(5) ヒト末梢血単球と B 細胞の共培養による検証

ヒト末梢血 B 細胞と単球をヒト BAFF 存在下で共培養することにより誘導される IgG 産生を化合物 A および B は 7.5 μ M でそれぞれ約 40%、100% 阻害することを検証した。

(6) 化合物 A および B の in vivo での IgG 産生抑制作用の検証

MRL/lpr マウス、メス 8 週令に化合物 A および B を投与し、生存率、血中抗 dsDNA 抗体価を測定した。その結果、化合物 A、B とも 0.2mg/kg 投与群において生理食塩水投与群と比較して有意に高い生存率と抗 dsDNA 抗体の低下を認めた。これらの結果について PCT 出願を行い、田辺三菱製薬へ知財の導出を行った (PCT/JP2014/076820)。

2) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物の最適化に向けた準備

MRL/lpr マウスに化合物を 1mg/kg 腹腔内投与し、血中における化合物の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて経時的に測定する試験を立案し、田辺三菱製薬薬理第一研究所にて薬物動態試験を開始した。また同所にて化合物の最適化に向けてプロファイリングを施行し、

主要キナーゼ活性阻害について網羅的解析を施行した。その結果化合物 A および B とともに主要なキナーゼ活性阻害作用を有しないことが明らかとなった(図3、図4)。

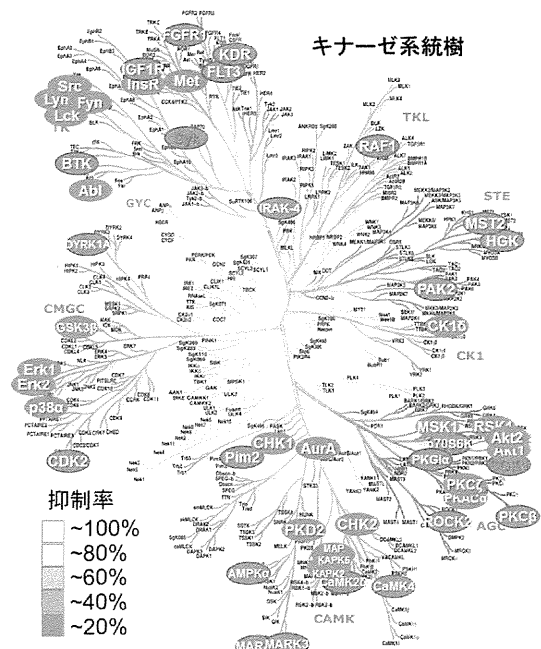


図3 化合物 A のキナーゼ活性阻害網羅的解析

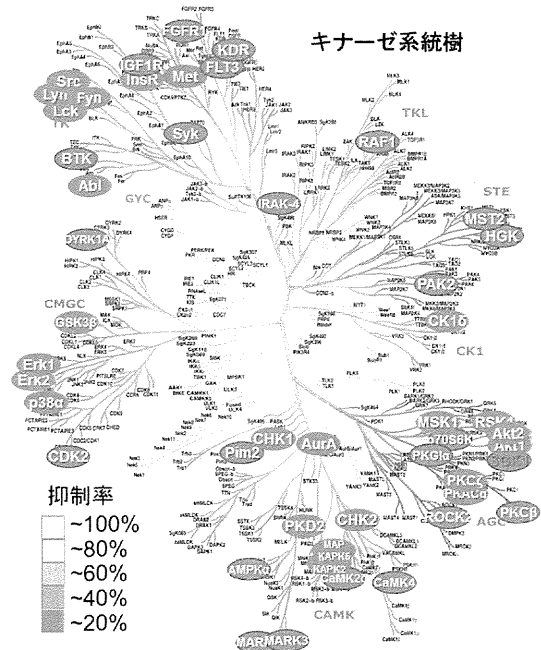


図4 化合物 B のキナーゼ活性阻害網羅的解析

3) 医薬品リポジショニング

本研究の分担研究者である慶應義塾大学薬学部分析化学教室水島教授より提供された既存医薬品 210 種類の医薬品について THP-1 を用いた BAFF 受容体機能阻害評価系でその作用を検定した。その結果、約 10%の既存医薬品に BAFF により誘導された IL-6 産生を抑制する作用を有することが明らかとなった。

慶應義塾大学薬学部分析化学教室では我が国で使用されている既承認薬約 1500 種の内、1300 以上を網羅した既承認薬ライブラリーを構築し、スクリーニングを可能にする準備を行った。さらに個々の既承認薬に関するデータベースを構築している。

4) 抗ヒト BAFF 受容体抗体作製

本研究の分担研究者である独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部 仲研究部長とバイオ創薬プロジェクト 角田プロジェクトリーダーにより抗ヒト BAFF 受容体抗体作製と評価系の構築が試みられた。

BAFF-R 発現ベクターと BAFF-R-Fc タンパク質をマウスに投与し、感作マウスの脾臓細胞とミエロマとの細胞融合によりヒト BAFF-R に対する抗体を産生するマウスハイブリドーマの取得を試みた。その結果、4 つの抗 BAFF-R 抗体産生候補クローンを取得した。さらに抗 BAFF-R 抗体の一次スクリーニング系として、ヒト BAFF-R 全長 cDNA を 293T 細胞に一過性発現させた細胞を用いたフローサイトメトリー法を構築した。

一方でシェーグレン症候群のモデルマウスの顎下腺を採取して、組織学的検索を

行い病態モデルの候補の絞り込みを行い、NZBWF1 マウス顎下腺にリンパ球浸潤を認め病態の一部を反映していることが示唆された (図 5a、5b)。

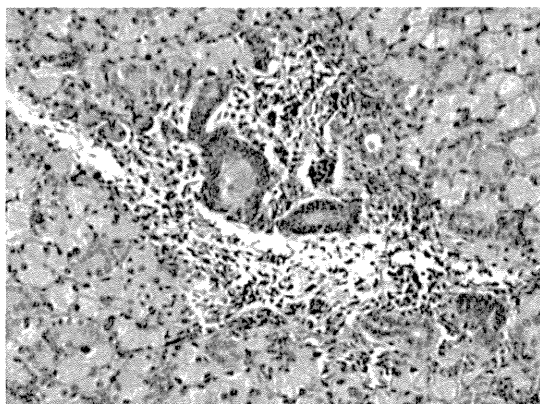


図 5a NZBWF1 マウス顎下腺 (HE 染色)

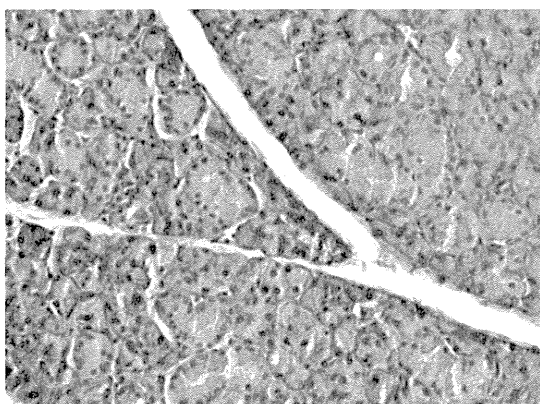


図 5b コントロールマウス (Balb/c) 顎下腺 (HE 染色)

D. 考察

SS は自己免疫疾患の一種で、わが国の患者数は約 30 万人とされ、厚生労働省の定める指定難病の一つであり根治薬は存在しない。主な症状は涙液や唾液の減少であり、これが患者の QOL を著しく害し治療薬の開発が強く望まれている。研究代表者竹内らは BAFF 受容体を治療標的とする新規治療法および治療薬開発の有用性を見出し、HTS 法を用いて BAFF 受

容体阻害剤の候補化合物を取得し、平成 26 年度で特許査定を受けた (特許第 5628647 号)。今年度の研究成果より候補化合物 A および B はマウス脾臓 B 細胞、THP-1、ヒト末梢血単球、ヒト末梢血 B 細胞を用いた *in vitro* 評価系で有望な化合物の候補であることが検証された。さらに、これらの化合物を全身性の炎症モデルである MRL/lpr マウスを用いた *in vivo* 評価系においても顕著に高い生存率と血中抗 dsDNA 抗体価の低下を認めた。これらの結果をもとに PCT 出願を行った (PCT/JP2014/076820)。これらの結果

から、化合物 A および B は SS 治療薬の有力候補と考えられる。今後はこれらの化合物をリード化合物として、田辺三菱製薬と共同で BAFF 受容体阻害剤の最適化を行う。そのため薬物動態試験の準備を開始した。一方では化合物のプロファイリングを施行し、主要なキナーゼ阻害活性は有しないことが明らかとなり、この点においても新規の作用機作を有する有望な化合物と考えられる。

また、慶應義塾大学薬学部分析化学教室水島教授から既承認薬の供与を受け、リポジショニングを検討した。この目的で THP-1 を用いた BAFF 受容体機能評価系で検定を行ったところ、210 種類の医薬品の約 10% に BAFF 受容体機能阻害作用が認められた。既承認薬は承認された用法・用量の範囲で安全性が担保されていること等から、速やかな SS 治療薬の開発が可能になることが有利な点であり、BAFF 受容体阻害活性が認められた薬剤に関して、*in vitro*, *in vivo* の両面からさらなる詳細な検討を進めていく予定である。

分担研究者である独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部 仲研究部長とバイオ創薬プロジェクト 角田プロジェクトリーダーにより、抗 BAFF 受容体抗体の作製および評価系の構築の試みが成され、その結果 4 種類の抗ヒト BAFF 受容体抗体を産生するハイブリドーマを獲得することができた。また、抗 BAFF 受容体抗体を評価する動物モデルの構築も達成された。このように BAFF 受容体を標的とした SS 治療薬の開発について低分子無機化合物のみならずバイオ医薬品の開発に向けて順調なスタートを切ったと考えられる。

E. 結論

HTS 法により見出した化合物 A および B はマウス脾臓 B 細胞およびヒト末梢血単球、B 細胞を用いて構築した *in vitro* BAFF 受容体機能評価系にて阻害作用を有し、マウス *in vivo* 試験においても高い生存率と血中抗 dsDNA 抗体低下を示した。さらに化合物のプロファイリングにより新規の作用機作を有する可能性が示され、これらの結果から化合物 A および B は SS 治療薬の有力候補と考えられ、今後これらをリード化合物として田辺三菱製薬と共同で最適化など BAFF 受容体阻害剤の開発を進めていく。また既存医薬品リポジショニングで BAFF 受容体阻害作用が認められた医薬品については今後 *in vitro*、*in vivo* 両面から詳細な検討を進めていく。

独立行政法人医薬基盤研究所（平成 27 年度より国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所）で行っている抗 BAFF 受容体抗体の作製とその評価について、得

られた 4 種類のクローンを主軸に *in vitro*、*in vivo* の評価を行いながら抗体製剤への可能性の検討を進めていく。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shirai Y, Okazaki Y, Inoue Y, Tamura Y, Yasuoka H, Takeuchi T, and Kuwana M. Elevated pentraxin 3 in systemic sclerosis: Associations with vascular manifestations and defective vasculogenesis. *Arthritis & Rheum*, in press.

2) Takeuchi T, Matsubara T, Ohta S, Mukai M, Amano K, Tohma S, Tanaka Y, Namanaka H, and Miyasaka N Biologic-free remission of established rheumatoid arthritis after discontinuation of abatacept: a prospective multi-center, observational study in Japan. *Rheumatology*, online September 24, 2014.

3) Kaneko Y, Koike T, Oda H, Yamamoto K, Miyasaka N, Harigai M, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, and Takeuchi T. Obstacles to the implementation of the treat-to-target strategy for rheumatoid arthritis in clinical practice in Japan. *Mod Rheum*, online June 20, 2014.

- 4) Akiyama M, Kaneko Y, Hanaoka H, Kuwana M, and Takeuchi T. Polychondritis presenting with oculomotor and abducens nerve palsies as initial manifestation. *Mod Rheum*, online June 2, 2014.
- 5) Iwahashi M, Inoue H, Matsubara T, Tanaka T, Amano K, Kanamono T, Nakano T, Uchimura S, Izumihara T, Yamazaki A, Karyekar C, and Takeuchi T. Efficacy, safety, pharmacokinetics and immunogenicity of abatacept administered subcutaneously or intravenously in Japanese patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate: a phase II/III, randomized study. *Mod Rheum*, online April 7, 2014.
- 6) Izumi K, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kameda H, Kuwana M, and Takeuchi T. Tocilizumab is clinically, functionally and radiographically effective and safe either with or without low-dose methotrexate in active rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to DMARDs and/or TNF inhibitors. A single center retrospective cohort study (KEIO-TCZ study) at 52 week. *Mod Rheum*, online April 1, 2014.
- 7) Kaneko Y, Kuwana M, Kondo H, and Takeuchi T. Discordance in global assessments between patient and estimator in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis: associations with progressive joint destruction and functional impairment. *J Rheumatology*, 40: 1061-66, 2014.
- 8) Inaba T, Hisatsune C, Sasaki Y, Sasaki Y, Ogawa Y, Ebisu E, Ogawa N, Matsui M, Takeuchi T, Mikoshiba K, and Tsubota T. Mice lacking inositol 1,4,5-triphosphate receptors exhibit dry eye. *Plos One*, 9:e99205, 2014.
- 9) Takeuchi T, Matubara T, Urata Y, Suematsu E, Ohta S, Honjyo S, Abe T, Yamamoto A, Miyasaka N, and the Japan Abatacept Study Group Phase III, multicenter, open-label, long-term study of the safety of abatacept in Japanese patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate conventional or biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *Mod Rheum*, 244:744-53, 2014.
- 10) Mok CC, Yap DY, Navarra SV, Liu Z-H, Zao M-H, Lu L, Takeuchi T, Avihingsanon Y, Yu X-Q, Lapid EA, Luge-Lizardo LR, Smethkul V, Shen N, Chen S-L, and Chan TM, for the Asian Lupus Nephritis Network Overview of lupus nephritis management guidelines

- and perspective from Asia.
Nephrology, 19:11-20, 2014.
- 11) Kaneko Y, Hanaoka H, Hirakata M, Takeuchi T, and Kuwana M. Distinct arthropaties of the hands in patients with anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies: usefulness of autoantibody profiles in classifying patients. *Rheumatology*, 53:1120-24, 2014.
 - 12) Yamanaka H, Ishiguro N, Takeuchi T, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Kupper H, Arora V, and Tanaka Y. Recovery of clinical but not radiographic outcomes by the delayed addition of adalimumab to methotrexate-treated Japanese patients with early rheumatoid arthritis: 52-week results of the HOPEFUL-1 trial. *Rheumatology*, 53:904-13, 2014.
 - 13) Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Miyasaka N, and Koike T. Long-term efficacy and safety of certolizumab pegol in Japanese rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate: 52-week results from an open-label extension of the J-RAPID study. *Mod Rheum*, 24:734-43, 2014.
 - 14) Tanaka Y, Kubo S, Yamanaka H, Amano K, Hirata S, Tanaka E, Nagasawa H, Yasuoka H, and Takeuchi T. Efficacy and safety of abatacept in routine care of patients with rheumatoid arthritis: Oencia® as Biological Intensive Treatment for RA (ORBIT) study. *Mod Rheum*, 24:754-762, 2014.
 - 15) Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K and Miyasaka N. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheum*, 24:8-16, 2014.
 - 16) Nishina N, Kikuchi J, Hashizume M, Yoshimoto K, Kameda H, and Takeuchi T. Baseline levels of soluble interleukin-6 receptor predict clinical remission in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: implications for molecular targeted therapy. *Ann Rheum Dis*, 73:945-7, 2014.
 - 17) Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Hartmut K, Vipin A, and Tanaka Y. Adalimumab, a Human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early RA;

- the HOPEFUL 1 study. *Ann Rheum Dis*, 73:536-43, 2014
- 18) Kurasawa T, Nagasawa H, Kishimoto M, Amano K, Takeuchi T, and Kameda H. Addition of another disease-modifying anti-rheumatic drug to methotrexate reduces the flare rate within 2 years after infliximab discontinuation in patients with rheumatoid arthritis: An open, randomized, controlled trial. *Mod Rheum*, 24:561-6, 2014
- 19) Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Takeuchi T, and Kuwana M. A single nucleotide polymorphism of TRAF1 predicts the clinical response to anti-TNF treatment Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheum*, 32 (2): 211-217, 2014.
- 20) Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Iwai K, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, and Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol without methotrexate co-administration in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: the HIKARI randomized, placebo-controlled trial. *Mod Rheum*, 24:552-560, 2014.
- 21) Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, and Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in Japanese rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate: the J-RAPID randomized, placebo-controlled trial. *Mod Rheum*, 24:715-724, 2014
- 22) Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Takei S, Tanaka Y, Sano Y, Yamaguchi H, and Yamanaka H. Characteristics related to good effectiveness and safety with tocilizumab: Post-marketing surveillance of 7901 rheumatoid arthritis patients in Japan. *J Rheumatology*, 41:15-23, 2014.
- 23) Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence

(RESTORE) study. *Mod Rheum*,
24:26-32, 2014.

- 24) Nishimoto N, Amano K,
Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T,
Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka
H, Kondo M, Matsubara T, Mimura
T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y,
Saito K, Sano H, Takasugi K,
Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki
Y, Yamana J, Hashimoto J,
Matsutani T, Murakami M, Takagi
N. Drug free REmission/low disease
activity after cessation of
tocilizumab (Actemra) Monotherapy
(DREAM) study. *Mod Rheum*,
24:17-25, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1 - 1. 特許取得

- 1) ピロロピリミジン誘導体を有効成分とする BAFF の結合阻害剤
特許第 5628647 号：用途
- 2) 抗ヒト BAFF 抗体
特許第 5570681 号：物質

1 - 2. 特許出願

- 1) 炎症性疾患の予防及び／又は治療剤
PCT/JP2014/076820
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Ⅱ. 委託業務成果報告
(分担業務項目)

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))
委託業務成果報告(分担)

新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

分担業務項目

リポジショニングを目的とした既存薬ライブラリーの構築とスクリーニング

研究分担者 水島 徹 慶應義塾大学薬学部分析科学講座 教授

研究要旨

本研究では、既承認薬のリポジショニングによって BAFF 受容体阻害活性の高い候補薬剤も探索する。今年度は、我が国で使用されている既承認薬約 1500 種の内、1300 以上を網羅した既承認薬ライブラリーを構築した。これら水を、または DMSO に溶解し 96 ウェルプレートに保存し、スクリーニングを可能にする準備を行った。また個々の既承認薬に関するデータベースを構築している。

A. 研究目的

本研究は、慶應義塾大学医学部、薬学部、早期・探索的臨床試験拠点と医薬基盤研究所および田辺三菱製薬が連携して免疫難病である SS の免疫異常に作用点を有する治療として BAFF 受容体を新規標的分子とした薬剤の創薬を目的とする。

本研究では、既承認薬のリポジショニングによって BAFF 受容体阻害活性の高い候補薬剤も探索する。既承認薬は最適化が完了した化合物であり、承認された用法・用量の範囲で安全性が担保されていること等から、速やかな SS 治療薬の開発が可能になる。予備試験では BAFF 受容体機能を 70%以上阻害する薬剤を複数見出した。薬理作用も相互に類似しており、有望な治療薬候補である。

この中で本分担研究では、既承認薬ライブラリーを構築し、そのデータベース化を図ると共に、研究代表者へ供給する。

B. 研究方法

1. BAFF 受容体阻害剤の最適化およびリポジショニングの評価系(図1)

1) 単球系細胞からの IL-6 産生阻害

単球系細胞を BAFF で刺激すると IL-6 産生が誘導されるので、IL-6 産生を指標として BAFF 受容体阻害活性を測定する。

① ヒト BAFF 受容体を高発現する単球系培養細胞 (THP-1)

② SS 患者末梢血由来の単球 (倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

本研究予算を用いて、我が国で使用されている既承認薬約 1500 種の内、1300 以上を網羅した既承認薬ライブラリーを構築した。これら水を、または DMSO に溶解し 96 ウェルプレートに保存し、

スクリーニングを可能にする準備を行った。また個々の既承認薬に関するデータベースを構築している。

D. 考察

既承認薬ライブラリーはスクリーニングの出発材料として適当と判断し、研究代表者へ供給し、スクリーニングに使用して頂いた。

E. 結論

上述のように予定通り研究を遂行し、完了することが出来た。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamakawa, N., Suzuki, K., Yamashita, Y., Katsu, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T. and Mizushima, T. Structure-activity relationship of celecoxib and rofecoxib for the membrane permeabilizing activity. *Bioorg. & Medic. Chem.* 22, 2529-2534. (2014)
2. Tanaka, K., Kurotsu, S., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi D., Yamashita, Y., Yamazaki, H., Ishihara, T., Watanabe, H., Maruyama, T., Suzuki, H. and Mizushima, T. Superiority of pulmonary administration of mepenzolate bromide over other routes as treatment for chronic obstructive pulmonary disease. *Sci. Rep.* 28, 4510. (2014).
3. Sawazaki, R., Ishihara, T., Usui, S., Hayashi, E., Tahara, K., Hoshino, T., Higuchi, A., Nakamura, S., Tsubota, K. and Mizushima, T. Diclofenac protects cultured human corneal epithelial cells against hyperosmolarity and ameliorates corneal surface damage in a rat model of dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 2547-2556. (2014)
4. Kurotsu, S., Tanaka, K., Niino, T., Sugizaki, T., Azuma, A., Suzuki, H. and Mizushima, T. Ameliorative effect of mepenzolate bromide against pulmonary fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 350, 79-88. (2014)
5. Yamashita, Y., Tanaka, K., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi D., Ishihara, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T., Wada, M., Mashimo, T., Fukunishi, Y. and Mizushima, T. Synthesis and biological comparison of enantiomers of mepenzolate bromide, a muscarinic receptor antagonist with bronchodilatory and anti-inflammatory activities. *Bioorg. & Medic. Chem.* 22, 3488-3497. (2014)
6. Ishihara, T., Nara, S. and Mizushima, T. Interactions of lecithinized superoxide dismutase with serum proteins and cells. *J. Pharm. Sci.* 103, 1987-1994. (2014)
7. Kamio, K., Azuma, A., Ohta, K., Sugiyama, Y., Nukiwa, T. Kudoh, S. and Mizushima, T. Double-blind controlled trial of lecithinized superoxide dismutase in patients with idiopathic interstitial pneumonia, short term evaluation of safety and tolerability. *BMC Pulm. Med.* 14, 86. (2014)
8. Ishihara, T., Kaneko, K., Ishihara, T.

- and Mizushima, T. Development of biodegradable nanoparticles for liver-specific ribavirin delivery. *J. Pharm. Sci.* 103, 4005-4011. (2014)
9. Kikuchi, E., Mori, T., Zeniya, M., Isobe, K., Ishigami-Yuasa, M., Kagechika, H., Ishihara, T., Mizushima, T., Sasaki, S., Sohara, E., Rai, T. and Uchida, S. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK-SLC12A transporter signaling in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.* in press.
 10. Ishihara, T., Hayashi, E., Yamamoto, S., Kobayashi, C., Tamura, Y., Sawazaki, R., Tamura, F., Tahara, K., Kasahara, T., Ishihara, T., Takenaga, M., Fukuda, K. and Mizushima, T. Encapsulation of beraprost sodium in nanoparticles: analysis of sustained release properties, targeting abilities and pharmacological activities in animal models of pulmonary arterial hypertension. *J. Control. Release* 97, 97-104. (2015)
- ## 2. 学会発表
1. 水島徹 ドラッグリポジショニング JST-ERATO 河岡感染宿主応答ネットワークプロジェクトシンポジウムでの招待講演 (2014) (東京)
 2. 水島徹 ドラッグリポジショニングの現状と課題 千里ライフサイエンス専門実務セミナー・新規効能治療薬の創製「ドラッグ・リポジショニングを用いて」での基調講演 (2014) (大阪)
 3. 水島徹 ドラッグリポジショニングの現状と課題 日本薬学会シンポジウムでの招待講演 (2014) (熊本)
 4. Tohru Mizushima Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. Invited lecture in the 4th International Forum in Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. (2014) (Tokyo)
 5. Tohru Mizushima Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on idiopathic pulmonary fibrosis in humans and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Invited lecture in the International Advanced Drug Delivery Symposium. (2014) (Taipei)
 6. Tohru Mizushima Drug repositioning Invited lecture in the San Diego Japan Bioforum. (2014) (San Diego)
 7. 水島徹 ドラッグリポジショニング—既承認薬を用いた新薬開発—東京大学薬学部での招待講演 (2014) (東京)
 8. 水島徹 ドラッグリポジショニング 医療薬学フォーラム 2014 での招待講演 (2014) (東京)
 9. 水島徹 ドラッグリポジショニングによる創薬パラダイムシフト 日本 DDS 学会での大会長講演 (2014) (東京)
 10. Tohru Mizushima Protection by expression of heat shock protein 70 against repeated social defeat stress-induced depression-like phenotypes in mice. Invited lecture in University of Singapore (2014) (Singapore)