



Title	自己免疫疾患におけるBTK阻害剤チラブルチニブの薬理学的作用の研究
Author(s)	有座, 夕子
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 乙第7082号
Issue Date	2019-09-25
DOI	10.14943/doctoral.r7082
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/75829
Type	theses (doctoral)
File Information	Yuko_ARIZA.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

自己免疫疾患における
BTK 阻害剤チラブルチニブの薬理学的作用の研究

有座 夕子

北海道大学大学院生命科学院

令和元年 9 月

目次

略語表.....	3
序章.....	5
第1章 B細胞制御を介したチラブルチニブによる薬理学的作用.....	9
1 抗体産生に対するチラブルチニブの作用.....	9
1.1 実験材料及び方法.....	9
1.1.1 被験物質.....	9
1.1.2 TNP-フィコール誘導抗体産生モデル.....	9
1.1.3 血清中 TNP 特異的 IgM 濃度の測定.....	9
1.1.4 統計解析.....	10
1.2 実験結果.....	10
1.3 考察.....	12
2 全身性エリテマトーデスモデルにおけるチラブルチニブの作用.....	14
2.1 実験材料及び方法.....	14
2.1.1 被験物質.....	14
2.1.2 NZB/W F1 マウスモデル.....	15
2.1.2.1 尿中蛋白質濃度の測定.....	15
2.1.2.2 血中抗 dsDNA 抗体の測定.....	15
2.1.2.3 腎臓病理評価.....	15
2.1.2.4 脾臓中 B 細胞の解析.....	16
2.1.2.5 Enzyme-Linked Immunospot (ELISpot) assay.....	16
2.1.2.6 フローサイトメトリー.....	17
2.1.3 MRL/lpr マウスモデル.....	17
2.1.4 統計解析.....	17
2.2 実験結果.....	18
2.3 考察.....	24
第1章まとめ.....	25
第2章 B細胞以外の制御を介したチラブルチニブによる薬理学的作用.....	26
1 各種ヒト由来細胞に対するチラブルチニブの作用.....	26
1.1 実験材料及び方法.....	27
1.1.1 ヒト B 細胞及び T 細胞.....	27
1.1.2 ヒト単球.....	27
1.1.3 ヒト肥満細胞.....	27

1.1.4 ヒト破骨前駆細胞.....	28
1.2 実験結果.....	28
1.3 考察.....	29
2 マウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおける作用	31
2.1 実験材料及び方法.....	31
2.1.1 マウス CIA モデルの作製.....	31
2.1.2 血中パラメーターの測定.....	32
2.1.3 mRNA 測定	32
2.1.4 病理組織学的評価.....	33
2.2 実験結果.....	33
2.3 考察.....	37
第2章まとめ.....	38
第3章破骨細胞における他シグナル阻害剤との比較.....	39
1 破骨前駆細胞を用いた細胞実験.....	39
1.1 実験材料及び方法.....	39
1.1.1 被験物質.....	39
1.1.2 ヒト破骨前駆細胞の分化.....	39
1.1.3 ヒト破骨前駆細胞におけるシグナル解析.....	40
1.2 実験結果.....	40
1.3 考察.....	43
2 RANKL 惹起骨破壊モデルにおけるチラブルチニブの作用	47
2.1 実験材料及び方法.....	47
2.1.1 被験物質.....	47
2.1.2 RANKL 惹起骨破壊モデルの作製.....	47
2.1.3 血清中 TRAP の測定.....	47
2.1.4 尿中 CTx 濃度測定.....	48
2.1.5 骨密度測定 (pQCT)	48
2.1.6 骨梁構造解析 (μCT)	48
2.2 実験結果.....	48
2.3 考察.....	53
第3章まとめ.....	54
総括.....	55
謝辞.....	64

略語表

BCR	: B-cell receptor、B 細胞受容体
BID	: twice daily、1 日 2 回
BMD	: bone mineral density、骨密度
BTK	: Bruton's tyrosine kinase、ブルトン型チロシンキナーゼ
BV/TV	: bone volume over total volume、骨量
Conn.Dens	: connectivity density、骨梁連結性
CFA	: complete Freund's adjuvant、フロイント完全アジュバント
CIA	: collagen-induced arthritis、コラーゲン誘発関節炎
CRE	: creatinine、クレアチニン
CTX	: C-terminal telopeptide type I collagen、 I 型コラーゲン架橋 C 末端テロペプチド
CXCR	: CXC chemokine receptors、CXC ケモカイン受容体
dsDNA	: double stranded deoxyribonucleic acid、二本鎖 DNA
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay、酵素免疫測定法
ELISpot	: enzyme-linked immunospot、酵素免疫スポットアッセイ
FcεRI	: Fc epsilon receptor I、高親和性 IgE 受容体
FcγR	: Fc gamma receptor、IgG 受容体
GM-CSF	: granulocyte macrophage colony-stimulating Factor、 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子
IC	: immune complex、免疫複合体
IC ₅₀	: half-maximal inhibitory concentration、50%阻害濃度
IgG	: immunoglobulin G、免疫グロブリン G
IgM	: immunoglobulin M、免疫グロブリン M
IL-x	: interleukin-x、インターロイキン-x
IP	: intraperitoneal、腹腔内
JAK	: Janus kinase、ヤヌスキナーゼ
LCK	: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase、 リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ
LYN	: Lck/Yes related novel protein tyrosine kinase、 Lck/Yes 関連新規タンパク質チロシンキナーゼ

MC	: methylcellulose、メチルセルロース
M-CSF	: macrophage colony stimulating factor、 マクロファージコロニー刺激因子
MIP-x	: macrophage inflammatory protein-x、マクロファージ炎症性蛋白質-x
NF- κ B	: nuclear factor kappa B、核因子 κ B
P-BTK-Y223	: phosphorylated BTK on tyrosine 223、 チロシン 223 における BTK の自己リン酸化
PBMC	: peripheral blood mononuclear cell、末梢血単核細胞
PBS	: phosphate-buffered saline、リン酸緩衝生理食塩水
PCR	: polymerase chain reaction、ポリメラーゼ連鎖反応
PO	: oral administration、経口
QD	: once daily、1 日 1 回
RA	: rheumatoid arthritis、関節リウマチ
RANKL	: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand 、 NF- κ B 活性化受容体リガンド
RNA	: ribonucleic acid、リボ核酸
SLE	: systemic lupus erythematosus、全身性エリテマトーデス
SMI	: structure model index、骨梁形態
SYK	: spleen tyrosine kinase、脾臓チロシンキナーゼ
Tb.N	: trabecular number、骨梁数
Tb.Th	: trabecular thickness、骨梁幅
Tb.Sp	: trabecular separation、骨梁間隙
TLR	: Toll-like receptor、Toll 様受容体
TNF- α	: tumor necrosis factor- α 、腫瘍壊死因子 α
TNP	: 2,4,6-trinitrophenyl、2、4、6-トリニトロフェニル
TRAP	: tartrate-resistant acidic phosphatase、酒石酸耐性酸フォスファターゼ
XLA	: X-linked agammaglobulinemia 、X連鎖無ガンマグロブリン血症

序章

自己免疫疾患の病態には免疫異常が関与し、現在、80種以上の疾患が特定されている¹⁾。一方で、疾患の原因は十分に解明されておらず、多くの場合、ステロイドや免疫抑制剤が治療の中心となるが、依然として効果は十分でなく、しばしば重篤化して生命予後に影響する。また、ステロイドの副作用は深刻な問題であり、高いアンメットメディカルニーズが存在する²⁾⁴⁾。

自己免疫疾患は自己抗体の産生が特徴の一つであり、B細胞を標的とするB細胞除去療法やB細胞活性化制御薬が注目されている。B細胞除去療法の一つであり、B細胞の表面抗原CD20分子を標的とする抗CD20キメラ抗体のリツキシマブは、RA、ANCA関連血管炎の顕微鏡的多発血管炎及び多発血管炎性肉芽腫症、天疱瘡といった自己免疫疾患の治療薬として海外で承認されている。一方、リツキシマブによる治療は入院を要するため利便性が悪く、また、長期間に渡りB細胞数を低下させるため、液性免疫の低下に伴った感染症等のリスクが報告されており⁵⁾、新たな治療選択肢が望まれる。

ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) は、非受容体型タンパク質チロシンキナーゼのTecファミリーに属し、主として造血細胞、特にB細胞に発現する⁶⁾⁸⁾。B細胞ではB細胞受容体 (BCR) の下流に位置し、B細胞の増殖と活性化を制御し、生存、分化及びクローン増殖を促進することが知られている⁶⁾⁷⁾⁹⁾ (図1)。また、BTKはBCRのみでなくToll様受容体 (TLR) やCXCR4及び5のシグナル伝達にも重要な役割を担っている⁹⁾¹²⁾。X染色体上のBTK遺伝子変異によって生じるX連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) の患者では、骨髄におけるプロB細胞からプレB細胞への分化が障害され、末梢血B細胞及び形質細胞のほぼ完全な欠損と、すべてのクラスの免疫グロブリンが著減した抗体産生不全を呈することが知られている¹³⁾¹⁶⁾。また、自己免疫疾患の一つであるRA患者のCD19陽性B細胞では、活性型BTKの発現及びBCRシグナルの活性化が報告されている¹⁷⁾。したがって、BTK阻害剤はヒトにおいてB細胞の活性化を制御し、自己免疫疾患の新たな治療選択肢となる可能性がある。

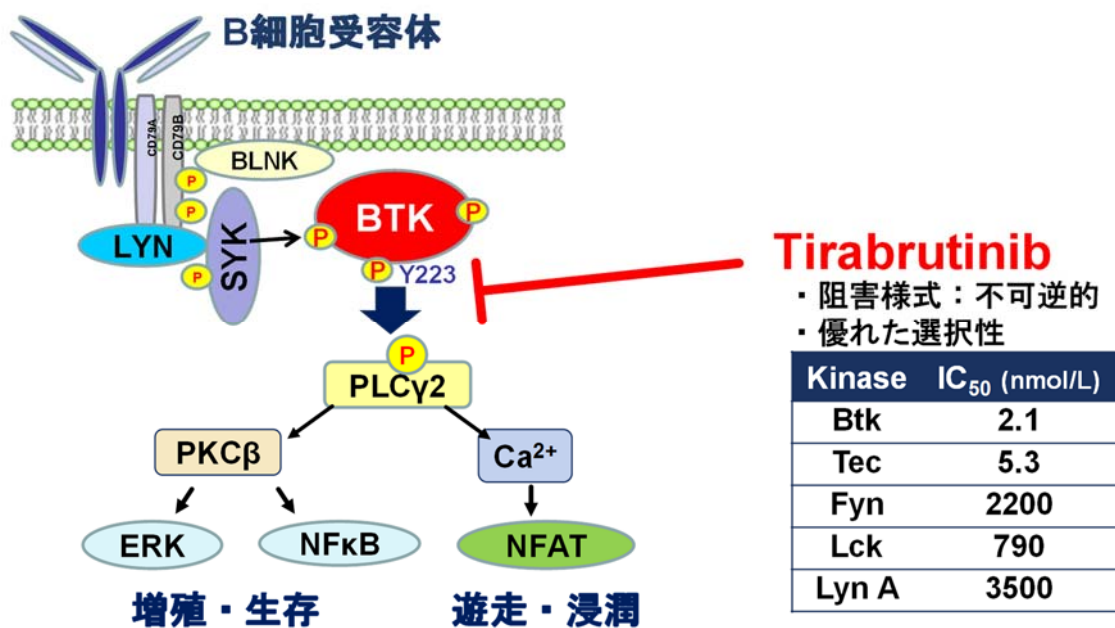


図1 B細胞受容体シグナル及びチラブルチニブの作用点

また、BTKは、形質細胞やT細胞には発現しない⁸⁾ものの、単球、マクロファージ、破骨細胞、好塩基球、肥満細胞等の種々の細胞に発現している。単球、マクロファージではFcγR、好塩基球、肥満細胞ではFcεRIの下流にてシグナルの伝達に寄与しており¹⁸⁾⁻²⁰⁾、また、破骨細胞では分化、活性化に寄与することが報告されている²¹⁾。したがって、BTK阻害剤は、B細胞に限らず、炎症性疾患の原因となる様々な細胞集団を制御することによって多面的な作用を発揮することから、新たな治療選択肢となる可能性がある。

チラブルチニブは、BTKのキナーゼ活性を不可逆的に強力に阻害する共有結合型の経口剤である²²⁾²³⁾。チラブルチニブのBTKキナーゼ活性阻害のIC₅₀値は2.1 nmol/Lであり、BTKと同じファミリーのTECキナーゼに対して同程度の濃度において阻害活性を示すものの、その他、BTK上流に位置する細胞質型チロシンキナーゼ(FYN、LCK及びLYN)についてはIC₅₀値が375から1660倍超と乖離している(図1)。また、共有結合することによって制御可能なキナーゼとして、ATP結合部位付近にCys残基を有するキナーゼは、BTKの他にEGFR、ErbB2、ErbB4、BMX、ITK、TEC、TXK、BLK及びJAK3が知られており²⁴⁾、共有結合型キナーゼ阻害剤のオフターゲットとして作用する可能性があるが、チラブルチニブはBTKとTEC、BMX以外のキナーゼに対しては選択性を維持している。さらに、チラブルチニブのキナーゼ選択性を

442 種類のキナーゼ活性部位に対する競合結合活性により評価した KINOMEscan において、結合活性を示したキナーゼは BTK を含めわずか 5 キナーゼ (300 nmol/L における結合活性、BTK : 97%、TEC : 92%、BMX : 89%、HUNK : 89%、RIPK2 : 67%) であり、優れたキナーゼ選択性を有することが示されている (図 2)²²⁾。

一方、ファーストインクラスの不可逆的な共有結合型 BTK 阻害剤であるイブルチニブは、BCR を介したシグナル伝達が寄与する B 細胞腫瘍患者において臨床的効果が得られることを立証し、その結果、慢性リンパ性白血病、マントル細胞リンパ腫及びワルデンストロームマクログロブリン血症患者の治療薬として米国食品医薬品局に承認されている²⁵⁾。しかし、BTK (IC₅₀=0.5 nmol/L) 以外に、上記の共有結合部位を有するキナーゼに対しても数十 nmol/L の濃度にて阻害活性を示すこと、さらに活性部位に Cys を含有しない CSK、FGR、BRK、HCK、YES、FRK、LCK、RET 等のキナーゼに対しても同程度の濃度で阻害することが報告されており²⁶⁾、そのブロードなキナーゼ選択性 (図 2) から、留意すべき有害事象として、脳出血、下痢、心房細動などが報告されている^{27) 28)}。チラブルチニブは優れたキナーゼ選択性を有することから、安全性の高い薬剤となり、がんのみならず、自己免疫疾患など幅広い疾患に使用可能な新たな治療選択肢となり得る可能性がある。

本研究では、B 細胞並びにその他の免疫細胞を用い、チラブルチニブの作用機序を検討するとともに、これらの免疫細胞が関与する自己免疫疾患モデルにおけるチラブルチニブの薬理学的作用を検討した。

a) チラブルチニブ

b) イブルチニブ

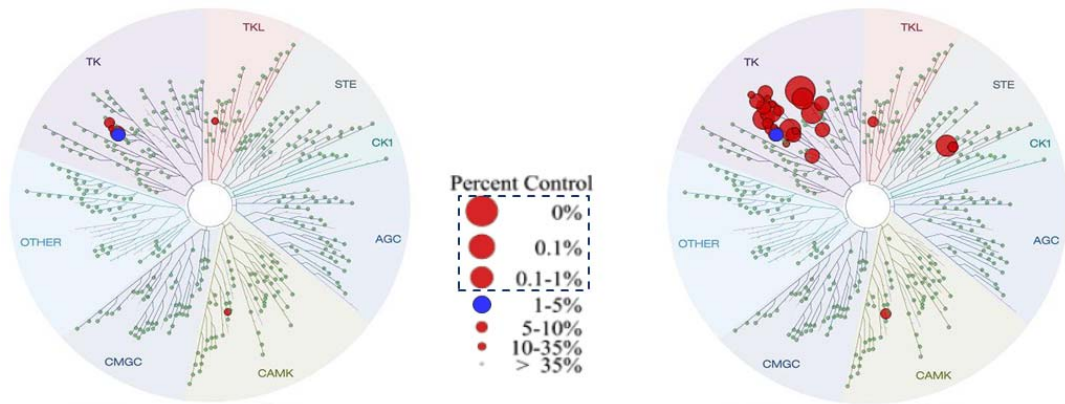


図 2 チラブルチニブ及びイブルチニブのキナーゼ選択性 (KINOMEscan)

a) チラブルチニブ及び b) イブルチニブの 300 nmol/L における 442 キナーゼに対する結合活性を KINOMEscan (DiscoverRx 社) にて評価した。Staurosporine を陽性対照として競合結合アッセイを実施した結果、陽性化合物の結合が 35%以下のキナーゼを円で示した。円が大きいほどキナーゼに対する強い結合を示す。

第 1 章 B 細胞制御を介したチラブルチニブによる薬理学的作用

1 抗体産生に対するチラブルチニブの作用

XLA 患者では、免疫グロブリンが著減した抗体産生不全となることが知られている。また、XLA のモデル動物であるマウス X 染色体連鎖免疫不全症 (murine X-linked immunodeficiency : Xid) 及び BTK と TEC のダブルノックアウトマウスは T 細胞非依存性抗原 (TNP-フィコール) に対する特異的抗体産生能が欠損しているとの知見がある²⁹⁾⁻³¹⁾。そこで TNP-フィコール誘導抗体産生モデルを用い、チラブルチニブが上記のマウスと同様に *in vivo* にて抗体産生を抑えるか検討した。

1.1 実験材料及び方法

1.1.1 被験物質

チラブルチニブ (小野薬品工業株式会社) は、0.5 w/v% methyl cellulose 400 cP solution (和光純薬工業株式会社、以下 0.5%MC) に懸濁して使用した。チラブルチニブを含有する CRF-1 固型飼料をオリエンタル酵母工業株式会社にて製造した。

1.1.2 TNP-フィコール誘導抗体産生モデル

7 週齢の雄性 BALB/c マウス (日本チャールス・リバー株式会社) に、50 μ g/mL TNP-フィコール (Biosearch Technologies) 溶液を 10 μ g/200 μ L/body の用量で腹腔内に投与した。非惹起群には TNP-フィコールの代わりに PBS を投与した。チラブルチニブ懸濁液は 1 日 1 回若しくは 2 回、Day 0、1、2 及び 3 の 4 日間経口投与した。媒体投与群には 0.5% MC を投与した。または、チラブルチニブを含有する飼料を Day-1 から Day4 まで自由摂取させた。惹起 7 日後に、イソフルラン麻酔下にて下大静脈より採血し、血清中の TNP 特異的 IgM 濃度の測定に供した。実験は、小野薬品工業株式会社の動物実験に関する規程を遵守して実施した。

1.1.3 血清中 TNP 特異的 IgM 濃度の測定

TNP-BSA 25 μ g/mL 溶液を 96 ウェルイムノプレートに固相化し、1%BSA (Sigma Aldrich) でブロッキングした後、希釈した血清を添加した。室温で 2 時間静置した後、HRP Conjugated Rat Anti-Mouse IgM (BD Biosciences) を添加し、室温で 30 分間静置し

た。o-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Aldrich) を基質とし 15 分間反応させ、2N H₂SO₄ を添加して反応を停止させた。490 nm における吸光度を測定した。

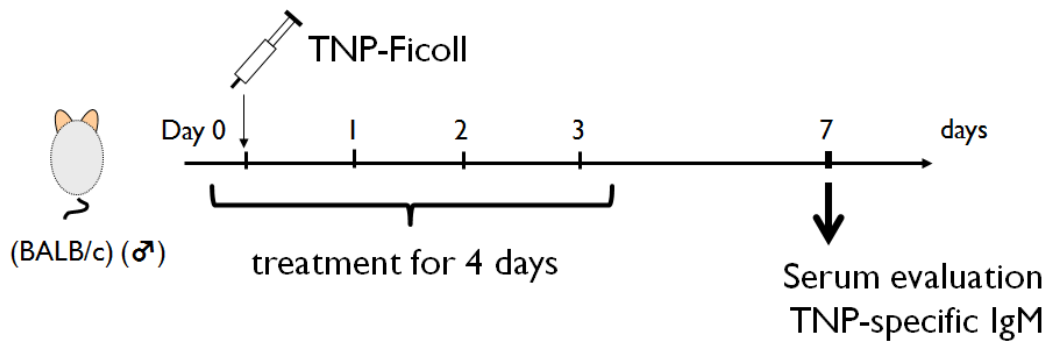
1.1.4 統計解析

有意差検定は SAS 9.1.3 Service Pack 4 (SAS Institute Japan) 及びその連動システム EXSAS Ver.7.5.2 (シーエーシー) を用いて行った。非惹起群と惹起群の比較は t 検定で、惹起群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行った。また、チラブルチニブ群の用量反応性は直線回帰分析により検討した。検定は両側検定とし、有意水準は 5% とした。

1.2 実験結果

マウス TNP-フィコール誘導抗体産生モデルの惹起 7 日後における各群の血清中 TNP 特異的 IgM 濃度を図 3 に示した。まず、チラブルチニブを 1 日 1 回若しくは 2 回投与し、用法を検討した。両群における TNP 特異的 IgM 濃度は、惹起群と比べていずれも有意に低値を示した。また、1 日 1 回及び 2 回投与群の抑制率はそれぞれ 61.6 及び 87.5% と、1 日 1 回に比べて 1 日 2 回投与した方が高い抑制率を示した。

次に、チラブルチニブの 1 日 2 回投与における用量反応性を検討した。非惹起群及び惹起群の TNP 特異的 IgM 濃度は、それぞれ 21.6 ± 2.54 及び $105.0 \pm 18.59 \mu\text{g/mL}$ であり、非惹起群と比べ、惹起群では有意な TNP 特異的 IgM 濃度の上昇が認められた。これに対し、チラブルチニブ 1、3、10 及び 30 mg/kg 投与群における TNP 特異的 IgM 濃度はそれぞれ 94.4 ± 7.14 (抑制率: 12.6%)、 52.9 ± 4.68 (62.4%)、 30.0 ± 3.15 (89.9%) 及び $21.7 \pm 1.58 \mu\text{g/mL}$ (99.9%) であり、3、10 及び 30 mg/kg 投与群において惹起群と比べて有意に低値を示した。また、チラブルチニブ各群の TNP 特異的 IgM 濃度について直線回帰分析を行った結果、直線の傾きが有意 ($p < 0.0001$) であり本作用は用量依存的であることが判った。



a) 用法比較

b) 用量反応性検討

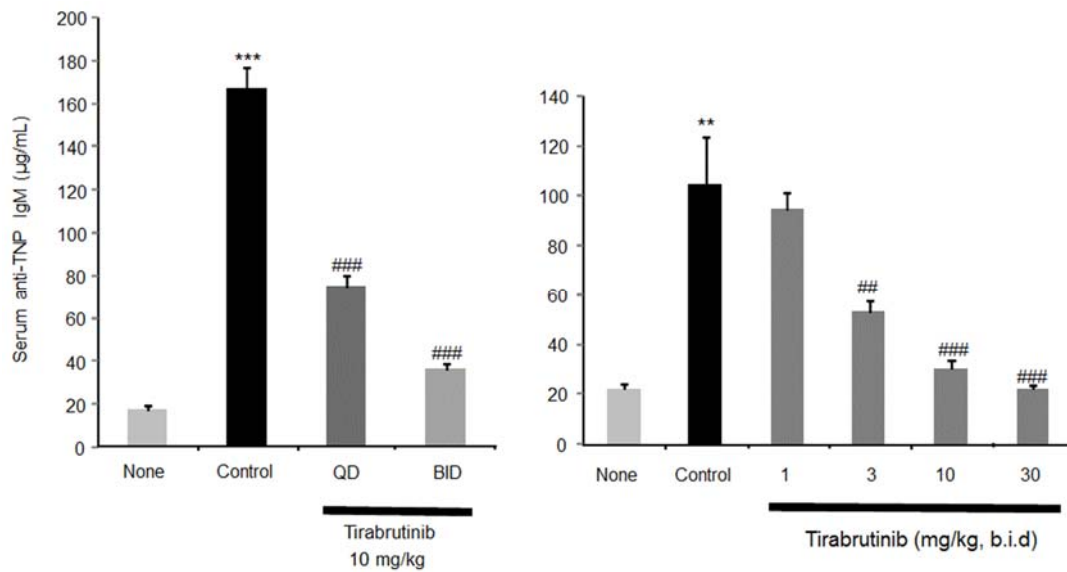


図3 TNP-フィコール誘導抗体産生に対するチラブルチニブの作用

雄性 BALB/c マウスに TNP-フィコールを腹腔内投与し、7 日後の血清中 TNP 特異的 IgM 濃度を ELISA にて測定した。チラブルチニブは a) 10 mg/kg の用量で 1 日 1 若しくは 2 回、b) 1、3、10 及び 30 mg/kg の用量で 1 日 2 回、4 日間投与した。各群 6 例の TNP 特異的 IgM 濃度の平均値±標準誤差を示した。非惹起群と惹起群の比較は t 検定で、惹起群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。**, ***: p<0.01、p<0.001 vs 非惹起群。##, ###: p<0.01、p<0.001 vs 惹起群。チラブルチニブ群の直線回帰分析結果：傾きの p<0.0001。

次に、長期間に及ぶ自己免疫疾患モデルでの薬効評価並びにモデル動物に与える投薬ストレスの軽減を目的とし、チラブルチニブの混餌投与による作用を検討した結果を図4に示した。本試験において、非惹起群及び惹起群の TNP 特異的 IgM 濃度は、それぞれ 12.3 ± 0.45 及び $90.6 \pm 13.31 \mu\text{g/mL}$ であり、惹起により有意な TNP 特異的 IgM 濃度の上昇が認められた。これに対してチラブルチニブ 0.00037, 0.0012, 0.0037, 0.012 及び 0.037% 投与群における TNP 特異的 IgM 濃度はそれぞれ 101.3 ± 6.42 , 97.6 ± 8.44 , 36.1 ± 6.10 , 15.5 ± 1.08 及び $16.8 \pm 1.26 \mu\text{g/mL}$ であり、抑制率は、それぞれ -13.6, -8.9, 69.6, 95.9 及び 94.3% であった。この結果より、3 及び 10 mg/kg、1 日 2 回の経口投与に相当する混餌飼料の濃度は、0.0037 及び 0.012% と考えられた。なお、本混餌飼料を与えたマウスにて、一般状態、体重及び摂餌量に異常は認められなかった。

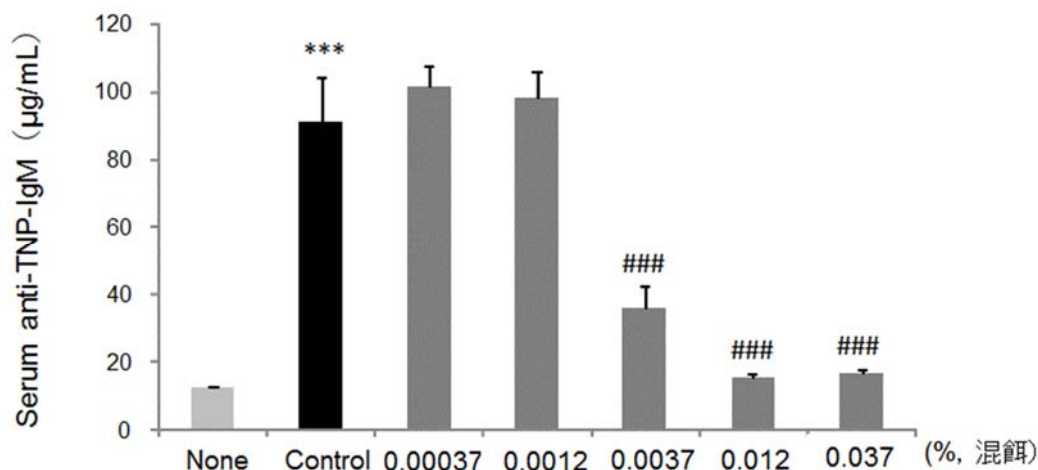


図4 TNP-Ficoll 惹起抗体産生モデルにおけるチラブルチニブの混餌投与による作用

チラブルチニブを 0.00037、0.0012、0.0037、0.012 及び 0.037% の濃度で含有する固形混餌飼料を Day-1 の夕方から Day4 の朝まで自由摂取させた。Day7 における各群 6 例の TNP-Ficoll 特異的 IgM 濃度の平均値 ± 標準誤差を示した。非惹起群と惹起群との比較は t 検定で、惹起群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5% 未満を統計学的有意とした。*** : p<0.001 vs 非惹起群. ### : p<0.001 vs 惹起群。

1.3 考察

X 染色体上の BTK 遺伝子異常によっておこる XLA では、骨髄におけるプロ B 細胞からプレ B 細胞への分化が障害され、末梢血 B 細胞が欠損し、全ての免疫グロブリン

が著減した抗体産生不全となることが知られている¹³⁾⁻¹⁶⁾。一方、XLA のモデル動物であるマウス X 染色体連鎖免疫不全症 (murine X-linked immunodeficiency : Xid) においては BTK 遺伝子の欠損は見られるものの免疫不全は軽度であり、相当量の B 細胞が存在し、免疫グロブリンも IgG3、IgM のみに減少がみられる²⁹⁾⁻³²⁾。これは BTK と同じキナーゼファミリーに属する TEC が相補的に働いたためと考えられている。チラブルチニブは BTK だけでなく TEC に対しても同等の阻害活性を持つことから、マウスを用いた抗体産生系では強力な抑制効果が期待できる。本試験の結果、T 細胞非依存性に B 細胞を活性化する Ti-II (Thymus-independent type II) 抗原である TNP-フィコールによって誘導された IgM 産生に対し、チラブルチニブは抑制作用を示した。これは BTK ノックアウトマウスが同抗原に対する抗体産生能を持たないとの報告と一致する²⁹⁾⁻³¹⁾。すなわち、チラブルチニブは B 細胞中の BTK に対する直接的な抑制作用に基づいて抗体産生を抑制したと考えられる。以上、チラブルチニブによる *in vivo* 活性は、BTK ノックアウトマウスと同様の表現型を示した。

なお、T 細胞依存性に B 細胞を活性化する TNP- Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) による抗体産生に対しても、BTK ノックアウトマウスでは同抗原に対する IgM と IgG1 の産生が低いこと、二次応答において、BTK ノックアウトマウス以上に BTK/TEC のデュアルノックアウトマウスでは、IgG1 及び IgG2a の産生が低いことが報告されている³²⁾。実際に、SD 系ラットを用いた検討において、KLH を免疫したラットにチラブルチニブを 10 mg/kg/day で投与すると、1 週後の血清中抗 KLH IgM 抗体及び抗 KLH IgG 抗体が低値を示し、対照群に対する抑制率はそれぞれ 40~80% 及び 50~80% であることが明らかとなっている (データ非提示)。

以上より、チラブルチニブは T 細胞非依存性抗原のみならず T 細胞依存性抗原による抗体産生を抑制し、XLA 患者や BTK 並びに BTK/TEC デュアル欠損マウスと類似した表現型を示すことがわかった。

また、チラブルチニブの用法用量に関しては 1 日 1 回並びに 1 日 2 回の経口投与、また、混餌投与にて薬効評価が可能であることがわかった。なお、チラブルチニブは共有結合基を有する非可逆的阻害様式の薬剤であるが、本モデルにおいて 1 日 1 回投与よりも 2 回投与の方が阻害作用が強かったことから、マウスにおいて BTK タンパク質のターンオーバーが早いと推察された。実際に、マウスにおいては 24 時間、ヒトにおいては 48 時間でおおよそ 50% の BTK タンパク質が回復することが報告されている³³⁾。以降の動物実験では、本試験にて抗体産生抑制作用が認められた用法用量を考慮して薬効評価を実施した。

2 全身性エリテマトーデスモデルにおけるチラブルチニブの作用

全身性エリテマトーデス (SLE) は、二本鎖 (ds) DNA や核に対する抗体などの自己抗体の産生と免疫複合体の沈着に伴う組織障害による炎症を特徴とする全身性の自己免疫疾患であり³⁴⁾、病態の再燃時に抗 dsDNA 抗体の上昇が認められることが報告されている。全身倦怠感や疲労感などの全身症状に加え、皮膚症状、関節炎、神経障害などの様々な症状が現れる。特にループス腎炎は重篤で生命予後にも影響する症状であり、SLE 患者の 6 割が腎炎を合併することが知られている³⁵⁾。ループス腎炎の治療においては、ステロイドや免疫抑制剤等が使用されるが、治療抵抗性や再発例も存在する。また、B 細胞を標的とする抗 BAFF 抗体のベリムマブが SLE を対象として米国食品医薬品局に承認されているものの³⁶⁾、ループス腎炎を対象とした臨床試験は行われておらず、ループス腎炎に効果的な薬剤は存在せず、高いアンメットニーズが存在する。NZB/W F1 マウス及び MRL/lpr マウスは抗 dsDNA 抗体の上昇と腎臓への免疫複合体の沈着によるループス腎炎様症状を自然発症する代表的な SLE モデルである³⁷⁾³⁹⁾。NZB/W F1 マウスでは抗 BAFF 抗体や抗 CD20 抗体の投与により、病態が抑制される⁴⁰⁾⁴¹⁾。また、NZB/W F1 マウスに Xid を掛け合わせることによって、DNA に対する抗体の産生が抑制され、糸球体腎炎の抑制、死亡率の低下が認められている⁴²⁾。チラブルチニブは、Xid マウスと同様に *in vivo* において B 細胞からの抗体産生を制御することから、本モデルにおいて有効性を示す可能性が考えられた。そこで、NZB/W F1 マウスに対し、チラブルチニブを抗 dsDNA 抗体が上昇する前の 12 週齢から予防的に投与するとともに、抗 dsDNA 抗体が上昇した 28 週齢の時点から投与し病態の進展に対する作用を検討した。また、MRL/lpr マウスにおいては、病態発症前の 6 週齢の時点からチラブルチニブを投与し、予防的効果を検討した。

2.1 実験材料及び方法

2.1.1 被験物質

チラブルチニブを 0.0037 並びに 0.012% の濃度で含有する CRF-1 固型飼料 (それぞれ 6 並びに 20 mg/kg/day 相当) をオリエンタル酵母工業株式会社にて製造した。

2.1.2 NZB/W F1 マウスモデル

雌性 Slc:NZBWF1 マウス（日本エスエルシー株式会社）を通常飼料（CRF-1）群、チラブルチニブを 0.0037 若しくは 0.012%の濃度で含有する飼料に割り付け、試験期間中、飼料を自由摂取させた。投与期間は、12 週齢から 37 週齢までの 25 週間、若しくは 28 週齢から 38 週齢までの 10 週間とした。28 週齢から投薬した試験では、28 週齢の時点で血清中抗 dsDNA 抗体価が 20 週齢の時点より上昇し、且つ尿中蛋白質濃度が 0.3~1 mg/mL に上昇した個体を採用した。実験は、小野薬品工業株式会社の動物実験に関する規程及び株式会社 LSI メディエンスの動物実験に関する指針を遵守して実施した。

2.1.2.1 尿中蛋白質濃度の測定

動物を保定し、腹部を軽く圧迫して採尿した。Coomassie plus protein assay kit（Pierce Chemical Co.）を使用して、Bradford 法にて 595 nm における吸光度を測定して尿中蛋白質濃度を測定した。

2.1.2.2 血中抗 dsDNA 抗体の測定

キャピラリー毛細管（Hirschmann Laborgerate）を用いて尾静脈より 75 μ L 採血し、遠心して血清を得た。血清を緩衝液で希釈し、レビス抗 dsDNA-マウス ELISA KIT を用い、キット付属の説明書に従って抗 dsDNA 抗体濃度を測定した。

2.1.2.3 腎臓病理評価

動物をイソフルラン麻酔下で腹部大静脈より注射筒を用いて全採血して安楽死させた後、腎臓を採取し、右腎を 4%パラホルムアルデヒド液で固定した。パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色標本作製し、下記の基準に従って炎症巣及び糸球体病変を評価した。

炎症巣 (Inflammatory foci)

- 5 : 極めて多数の炎症巣が認められる。
- 4 : リンパ濾胞形成を伴い、間質、糸球体内、血管周囲、糸球体周囲、腎盂周囲を含む組織全体にわたる炎症細胞浸潤が認められる。
- 3 : リンパ濾胞形成を伴うもしくは伴わない限局性の炎症巣が認められる。
- 2 : 腎盂周囲を主体とした白血球浸潤および集簇巣の形成が認められる。

- 1 : リンパ球が 25 個までの集簇が腎盂周囲に 25 個程度認められる。
0 : 軽微な白血球浸潤が認められる。

糸球体病変 (Glomerular pathology)

- 5 : 75%以上の糸球体で高度の糸球体基底膜の肥厚および糸球体メサンギウム基質の増加が認められる。
4 : 50~75%の糸球体で中等度もしくは高度の糸球体基底膜の肥厚および糸球体メサンギウム基質の増加が認められる。
3 : 25~50%の糸球体で軽度もしくは中等度の糸球体基底膜の肥厚および糸球体メサンギウム基質の増加が認められる。
2 : 10~25%の糸球体で軽微もしくは軽度の糸球体基底膜の肥厚および糸球体メサンギウム基質の増加が認められる。
1 : 10%未満の糸球体で軽微もしくは軽度の糸球体基底膜の肥厚および糸球体メサンギウム基質の増加が認められる。
0 : 糸球体の傷害は認められない。

2.1.2.4 脾臓中 B 細胞の解析

脾臓を摘出し、ピンセットを用いて破碎した後、溶血液を加えて室温で 5 分間静置した。室温にて遠心して上清を除去した後、沈査に培地を加えて懸濁し、70 μ m 径のセルストレーナーを通して脾細胞懸濁液とした。

2.1.2.5 Enzyme-Linked Immunospot (ELISpot) assay

ELISpot 用の 96 ウェルフィルタープレート (ミリポア) に Methyl-BSA (Sigma) 及び dsDNA (Alpha diagnostic) を固定し、dsDNA 特異的 IgG 及び dsDNA 特異的 IgM 産生細胞の検出に用いた。また、Goat Anti-Mouse IgM+IgG+IgA (H+L) purified Antibody (SouthernBiotech) を固定し、総 IgG 及び総 IgM の検出に用いた。各ウェルに脾細胞懸濁液を 100 μ L ずつ添加し、16 時間培養した。脾細胞懸濁液を除去し、dsDNA 特異的 IgG 並びに総 IgG 測定用のプレートには Goat Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate (SouthernBiotech) を、dsDNA 特異的 IgM 並びに総 IgM 測定用のプレートには Goat Anti-Mouse IgM Alkaline Phosphatase Conjugate (SouthernBiotech) を添加した。BCIP/NBT Phosphatase Substrate を添加して発色させ、抗体産生細胞の陽性スポット数を ELISpot アナライザー (ImmunoSpot 5.0, CTL) で計数した。プレートへの播種細胞

数とスポット数から抗体産生細胞数を算出し、脾細胞 10^6 個当たりの抗体産生細胞数として示した。

2.1.2.6 フローサイトメトリー

脾細胞懸濁液に Fix buffer を加えて細胞を固定した。Fc block 溶液を添加した後、抗体混合液を加え、遮光下にて 5°C で 30 分間静置した。胚中心 B 細胞 ($\text{CD}3^+$, $\text{B}220^+$, Fas^+ , $\text{GL}7^+$ cells) 及び形質細胞 ($\text{CD}3^+$, $\text{B}220^{\text{lo/int}}$, $\text{CD}138$ cells) をフローサイトメーター (BD Accuri、BD Biosciences) で検出した。

2.1.3 MRL/lpr マウスモデル

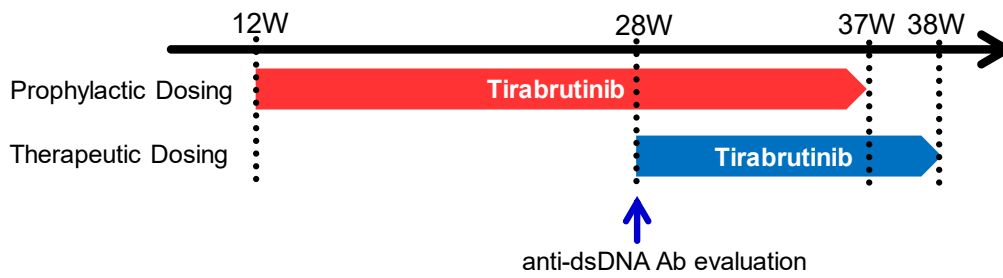
雌性 MRL/MpJ Jms Slc-lpr/lpr マウス (日本エスエルシー株式会社) に、6 週齢から 30 週齢まで 24 週間、通常飼料 (CRF-1)、チラブルチニブを 0.0037 若しくは 0.012% の濃度で含有する飼料を自由摂取させた。尿中蛋白質濃度及び抗 dsDNA 抗体の測定は NZB/W F1 マウスの試験に従った。実験は、小野薬品工業株式会社の動物実験に関する規程及び株式会社 LSI メディエンスの動物実験に関する指針を遵守して実施した。

2.1.4 統計解析

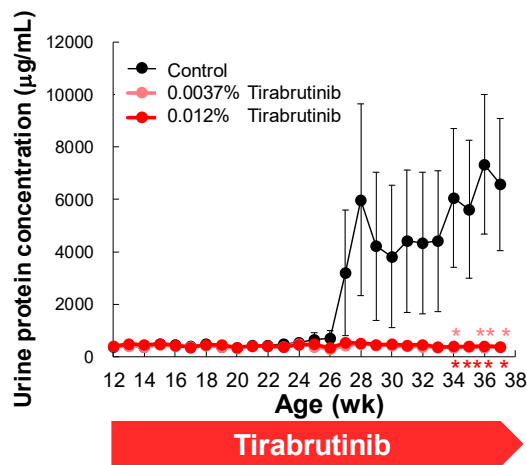
有意差検定は SAS 9.1.3 及びその連動システム EXSUS Version 7.7.1 を用いて行った。Control 群とチラブルチニブ群の尿中蛋白質濃度、血中抗 dsDNA 抗体濃度、抗体産生細胞数、胚中心 B 細胞数及び形質細胞数に関する比較は Dunnett 検定で行い、病理組織スコアの比較は Steel 検定で行った。検定は両側検定とし、有意水準は 5% とした。

2.2 実験結果

NZB/W F1 マウスの尿中タンパク質濃度推移、生存率及び血清中抗 dsDNA 抗体濃度をそれぞれ図 5、図 6 及び図 7 に示した。Control 群では、尿中蛋白質、抗 dsDNA 抗体が高値を示し、ループス腎炎の進行が認められた。NZB/W F1 マウスは、ループス腎炎の進行に伴い死に至ることが知られている。本試験でも、Control 群では加齢に伴って尿中タンパク質が高値を示し、病態悪化に伴う死亡例が認められた。一方、チラブルチニブを含有する混餌飼料を 12 週齢から投与した試験では、いずれの投与量においても尿中タンパク質の有意な抑制が認められ、0.012% のチラブルチニブでは死亡例も認められなかった。また、28 週齢から投与開始した試験においても、0.012% のチラブルチニブ群では Control 群と比べて尿中タンパク質濃度が有意に低く推移し、いずれの投与量においても死亡例は存在しなかった。一方、血清中抗 dsDNA 抗体については、12 週齢からチラブルチニブの投薬を開始した試験では、チラブルチニブの投与によりほぼ完全に血清中抗 dsDNA 抗体濃度の上昇が抑制されたものの、28 週齢から投薬を開始した群では、28 週以降の抗 dsDNA 抗体の上昇が抑制される傾向が認められたものの、すでに上昇している血清中抗 dsDNA 抗体が消失することは無かった。



a) Prophylactic dosing



b) Therapeutic dosing

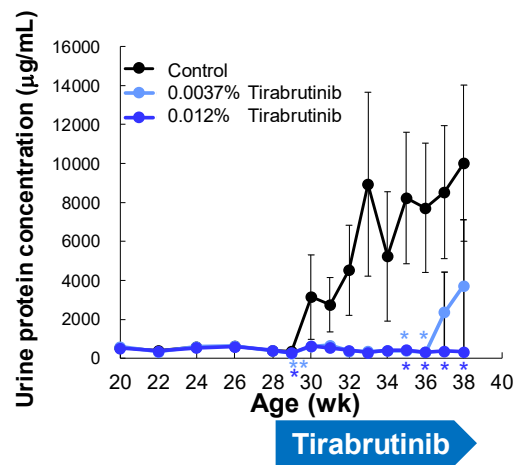
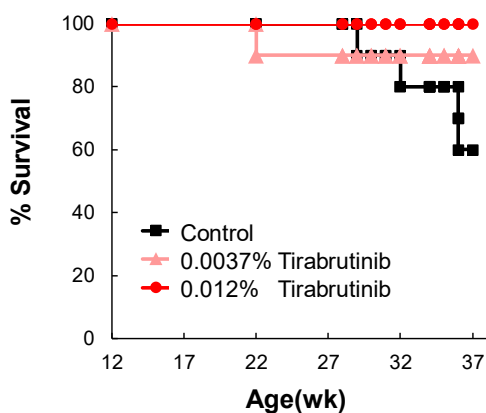


図5 NZB/W F1 マウスの尿中タンパク質濃度推移

雌性 NZB/W F1 マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037% 及び 0.012% の濃度で含有する飼料を a) 12 週齢から 37 週齢、若しくは b) 28 週齢から 38 週齢まで自由摂取させた。経目的に採尿し、尿中タンパク質濃度を Bradford 法にて測定した。Control 群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5% 未満を統計学的有意とした。*: P<0.05、**: P<0.01。

a) Prophylactic dosing



b) Therapeutic dosing

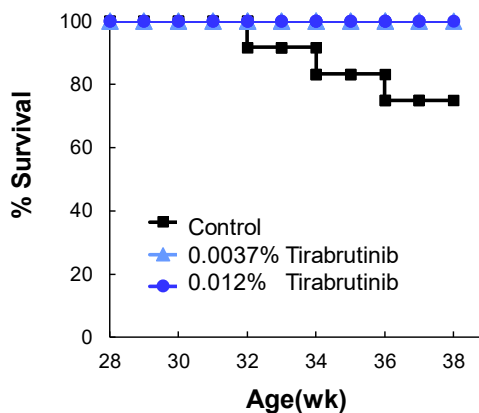
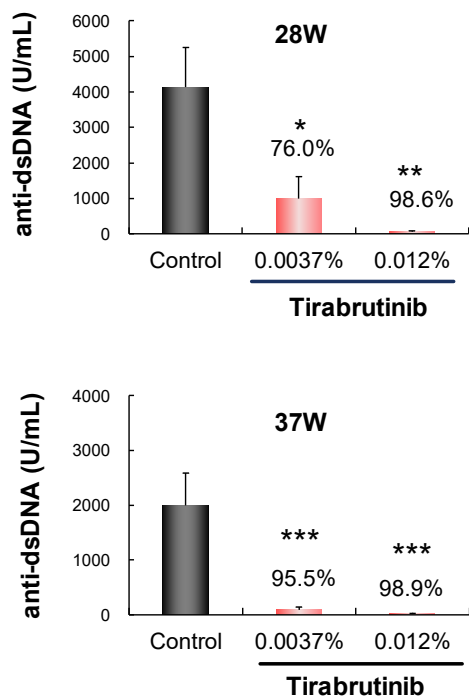


図6 NZB/W F1 マウスの生存率

雌性 NZB/W F1 マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037 及び 0.012% の濃度で含有する飼料を a) 12 週齢から 37 週齢若しくは b) 28 週齢から 38 週齢まで自由摂取させた。

a) Prophylactic dosing



b) Therapeutic dosing

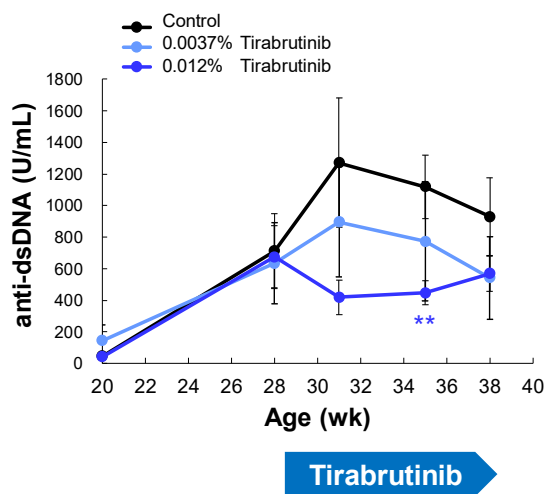


図7 NZB/W F1 マウスの血清中抗 dsDNA 抗体濃度

雌性 NZB/W F1 マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037% 及び 0.012% の濃度で含有する飼料を a) 12 週齢から 37 週齢、若しくは b) 28 週齢から 38 週齢まで自由摂取させた。血清中 dsDNA 抗体濃度を測定した。Control 群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5% 未満を統計学的有意とした。*: P<0.05、**: P<0.01、***: P<0.001。

次に、NZB/W F1 マウスの腎臓に対するチラブルチニブの予防的投与による効果を検討した。結果を図 8 に示す。Control 群の腎臓は糸球体の膨大及び細胞浸潤が認められループス腎炎様の組織像を呈した。糸球体病変の病理組織スコアは 3.0 ± 0.4 及び炎症スコアは 2.3 ± 0.2 であった。一方、チラブルチニブ投与により病変の抑制が認められ、0.0037%及び 0.012%含有飼料投与群の糸球体病変スコアはそれぞれ 0.4 ± 0.2 及び 0.1 ± 0.1 、炎症スコアは 0.9 ± 0.3 及び 0.4 ± 0.2 と Control 群に比べて有意に低値であった。以上よりチラブルチニブがループス腎炎を抑制する可能性が示唆された。

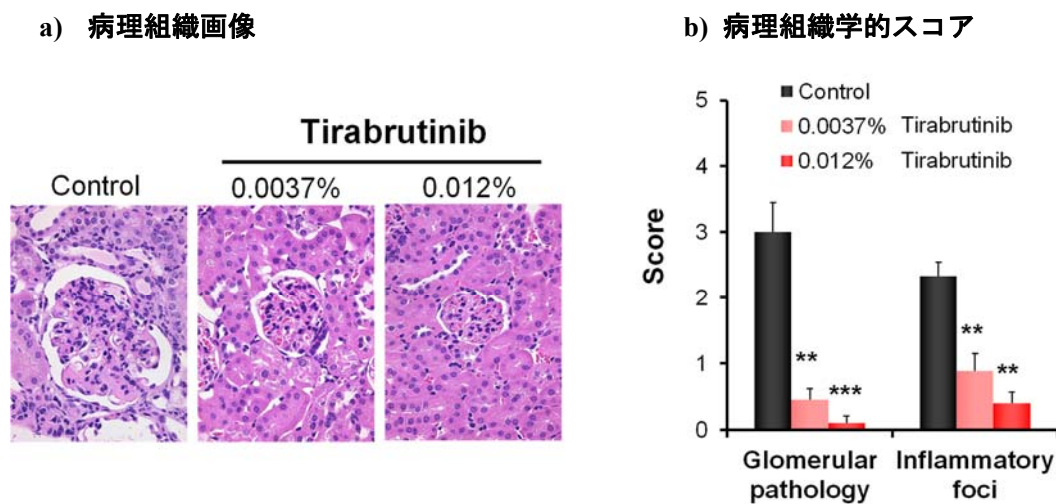


図 8 NZB/W F1 マウスの腎臓の病理組織学的評価

雌性 NZB/W F1 マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037%及び 0.012%の濃度で含有する飼料を、12 週齢から 37 週齢まで自由摂取させた。最終日に腎臓を採取し、H.E. 染色を施した。盲検化にて糸球体病変及び炎症の組織学的スコア評価を行った。Control 群とチラブルチニブ群の比較は Steel 検定で行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。

：P<0.01、*：P<0.001。

そこで、その作用機序として脾臓中の B 細胞への影響を解析した。抗体産生細胞数を図 9 に、胚中心 B 細胞及び形質細胞細胞数を図 10 に示した。チラブルチニブ含有飼料群では、Control 群に比べ dsDNA 特異的 IgG、dsDNA 特異的 IgM、総 IgG、総 IgM 抗体産生細胞数が有意に減少した。また、チラブルチニブ含有飼料群では、Control 群に比べ胚中心 B 細胞及び形質細胞数の有意な減少が認められた。

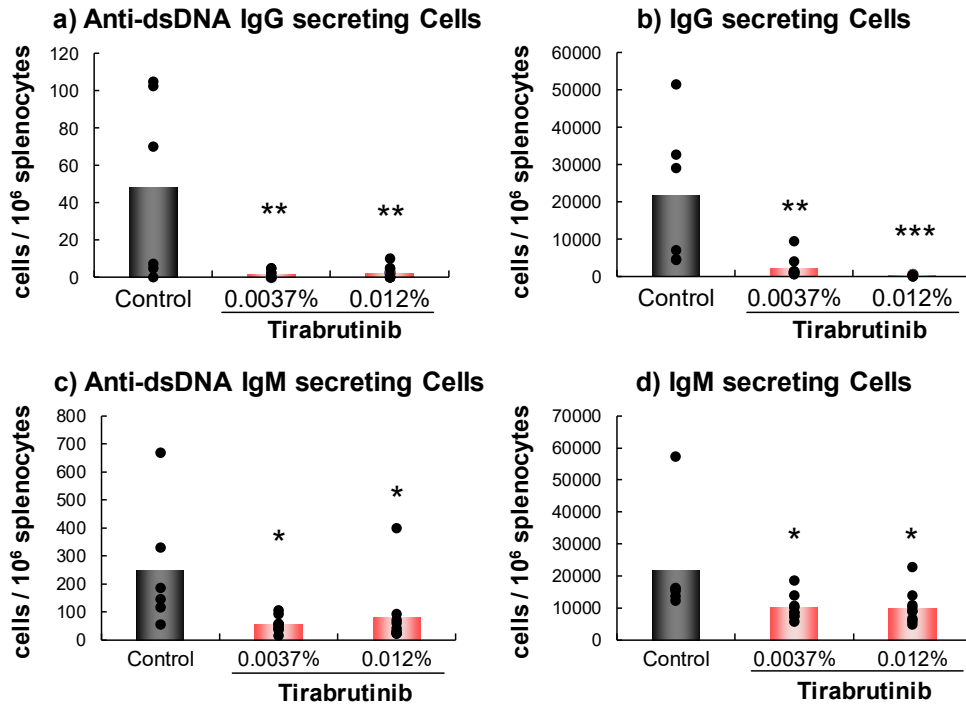


図 9 NZB/W F1 マウスの脾臓中 B 細胞の抗体産生細胞数 (ELISpot 解析)

雌性 NZB/W F1 マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037%及び 0.012%の濃度で含有する飼料を、12 週齢から 37 週齢まで自由摂取させた。最終日に脾臓を採取し、a) 抗 dsDNA IgG、b) 総 IgG、c) 抗 dsDNA IgM、d) 総 IgM 抗体産生細胞の数を ELISpot 解析により評価した。グラフは平均値と各個体の値で示した。Control 群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。*: P<0.05、**: P<0.01、***: P<0.001。

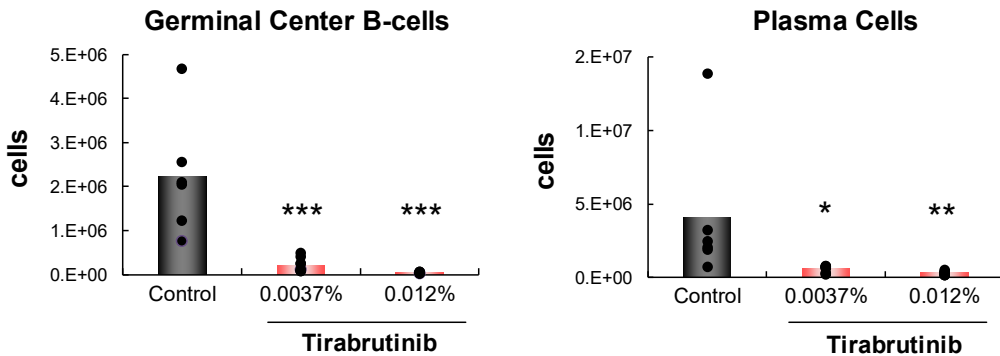


図 10 NZB/W f1 マウスの胚中心 B 細胞及び形質細胞数

雌性 NZB/W F1 マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037%及び 0.012%の濃度で含有する飼料を、12 週齢から 37 週齢まで自由摂取させた。最終日に脾臓を採取し、脾細胞中の胚中心 B 細胞数及び形質細胞数をフローサイトメーターを用いて計測した。胚中心 B 細胞は CD3⁻、B220⁺ Fas⁺、GL7⁺ cells 及び形質細胞は CD3⁻、B220^{lo/int}、CD138 cells とした。グラフは平均値と各個体の値で示した。Control 群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。*: P<0.05、**: P<0.01、***: P<0.001。

NZB/W F1 マウスモデルにてチラブルチニブがループス腎炎の病態を抑制することが示唆されたことから、次に MRL/lpr マウスを用いて評価を行った。尿中タンパク質濃度推移及び抗 dsDNA 抗体濃度推移を図 11 に示す。MRL/lpr マウスは自己抗体を産生し、ループス腎炎のみならずリンパ節の腫大や皮膚症状など SLE 様症状を発症するモデルである。本試験においても Control 群では MRL/lpr マウスの特徴的所見である尿中蛋白質、血清抗 dsDNA 抗体の高値が認められた。本モデルにおいて、チラブルチニブを 0.0037 及び 0.012% の濃度で 6 週齢から 30 週齢時まで混餌投与したところ、いずれの用量においても Control 群に比べて有意な血清中の抗 dsDNA 抗体濃度及び尿中蛋白質濃度の抑制が認められ、ループス腎炎の発症が抑制された。また、30 週齢時のリンパ浮腫スコアについては、Control 群で 5.7 ± 0.4 に対し、0.012% 含有混餌飼料投与群では、 4.1 ± 0.3 であり、有意なリンパ浮腫の抑制が認められた。これらの結果から、チラブルチニブがループス腎炎のみならず SLE 様症状を改善する可能性が示唆された。

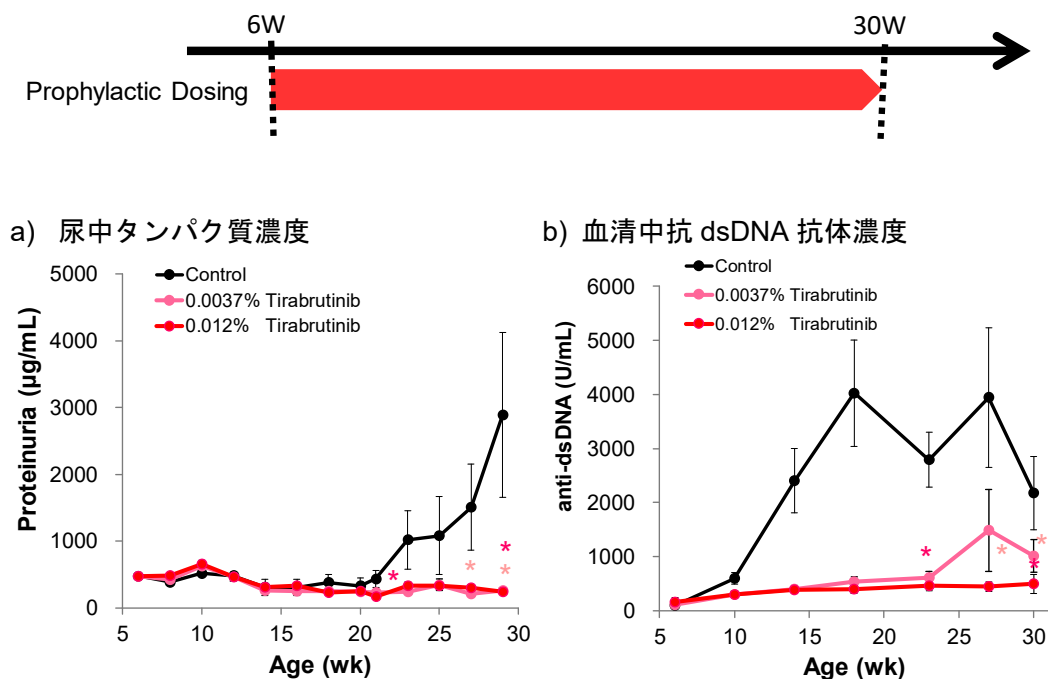


図 11 MRL/lpr マウスの尿中タンパク質濃度及び血清中抗 dsDNA 抗体濃度推移
 雌性 MRL/lpr マウスに CRF-1 若しくはチラブルチニブを 0.0037% 及び 0.012% の濃度で含有する飼料を 6 週齢から 30 週齢まで自由摂取させた。尿中タンパク質濃度及び血清中抗 dsDNA 抗体濃度の推移を評価した。Control 群とチラブルチニブ群の比較は Dunnett 検定で行い、p 値 5% 未満を統計学的有意とした。*: P<0.05

2.3 考察

SLE は免疫寛容の破たんによって細胞内及び核内の抗原に対する自己抗体が産生されることによって発症し、B 細胞が病態に重要な役割を果たしていると考えられる。その機序の一つとして BCR シグナルの異常が示唆されている⁴³⁾。BCR の下流に存在する BTK については、ヒト BTK を過剰発現する CD19 細胞を C57Bl/6 マウスに導入することにより、胚中心 B 細胞及び形質細胞の形成が促進されることが報告されている⁴⁴⁾。また、本マウスは高週齢において抗 dsDNA 抗体などの自己抗体の産生、糸球体への免疫グロブリンの沈着、細胞の増多、メサンギウム基質の拡大など SLE 様の症状を呈する。NZB/W F1 マウスの SLE 様症状が Xid との掛け合わせで抑制される⁴²⁾ことと考えあわせると、BTK 活性が SLE の病態に重要な役割を果たしている可能性があり、BTK は SLE 治療の魅力的な標的と考えられる。

本試験では、チラブルチニブが NZB/W F1 マウス及び MRL/lpr マウスの 2 種類の SLE モデルにて腎障害の発症を抑制することが明らかになった。また、その機序として高親和性の抗体産生細胞への成熟に重要な胚中心 B 細胞数及び形質細胞数が減少するとともに、自己抗体産生細胞数が減少することがわかった。胚中心は、形質細胞への分化や自己抗体産生細胞のクローン増殖の場としての役割を担い、ループス腎炎では病態の進行に胚中心のサイズや数が増加すること、濾胞性 T 細胞が病態に関与することが報告されていることから^{45) 46)}、本機序を制御するチラブルチニブは、効果的なループス腎炎の治療薬となる可能性がある。

なお、本試験で認められた胚中心 B 細胞数及び形質細胞数の著しい低下は、強力な有効性に寄与する一方で、安全性面では易感染の懸念になる。マウスに 4 週間チラブルチニブを反復投与した結果では、血小板数、白血球数及びリンパ球数の変化は、毒性的意義に乏しい軽度な変化であったものの、脾臓重量の低下が認められ、免疫抑制を介した影響と考えられる（データ非提示）。したがって、免疫抑制に基づく安全性面については慎重に判断しなくてはならないが、抗体産生モデルで認められたチラブルチニブによる抗体産生抑制作用が強力であることを考慮すると、B 細胞に刺激が入り BTK が活性化を受ける状況において、チラブルチニブによる作用が現れやすいのではないかと考察している。また、ラットの T 細胞依存性抗原による抗体産生モデルにおいてチラブルチニブの休薬によって抗体産生能が回復する（データ非提示）ことから、過度な免疫抑制が生じた場合に、チラブルチニブを休薬することによって B 細胞は正常に分化、活性化すると考えている。

他方、NZB/W F1 マウスにおいて、抗 dsDNA 抗体が上昇した 28 週齢の段階からチラブルチニブを投与した結果、抗 dsDNA 抗体が消失していないにも関わらず尿中タンパク質の上昇が抑制された。これは、チラブルチニブが抗 dsDNA 抗体の更なる上昇を抑制したことによって腎障害の発症を抑制した可能性と、別の機序を介して有効性を発揮した可能性が考えられる。腎障害の機序として、免疫複合体が腎臓へ沈着することにより、マクロファージを介して炎症がおこることが知られている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。また、マウスに抗腎血清を免疫することによって B 細胞を介さず直接腎障害を誘導したモデルにおいても、BTK 阻害剤 (BI-BTK) を投与することによって有効性を示すことが報告されている⁴⁹⁾。したがって、抗 dsDNA 抗体が上昇し、病態が進行した後からチラブルチニブを投与した場合には、チラブルチニブが B 細胞からの抗体産生抑制以外に、マクロファージによる炎症を直接制御することによって腎障害を抑える可能性がある。

第 1 章まとめ

- チラブルチニブは、TNP-フィコール惹起による抗体産生を抑制し、*in vivo* において BTK 欠損マウスと同様の表現型を示した。
- チラブルチニブは、自己抗体産生が原因のマウス自然発症全身性エリテマトーデスモデルにおいて、B 細胞からの抗体産生を抑制し、腎障害の発症を抑制した。本結果から、BTK は病態の発症に重要な役割を有することが示唆された。
- チラブルチニブは、B 細胞の分化及び機能を制御することにより自己免疫疾患治療薬となる可能性が示唆された。

第 2 章 B 細胞以外の制御を介したチラブルチニブによる薬理学的作用

1 各種ヒト由来細胞に対するチラブルチニブの作用

自己免疫疾患の発症過程には、B 細胞以外に様々な免疫細胞が関与することから BTK の阻害は多面的な抗炎症作用をもたらし、RA などの炎症性疾患の発症過程にさまざまな影響を及ぼすことが予想される。RA 発症の原因は不明であるが、B 細胞からの自己抗体の産生や T 細胞の活性化が発症初期におこり、その後、好中球、単球、マクロファージ、肥満細胞などが滑膜組織に浸潤し、炎症性サイトカインの過剰産生や滑膜細胞の増殖を促すと考えられている。滑膜細胞はパンヌスを形成して骨や軟骨を侵食する。また、破骨細胞の形成が促進され過剰な骨の破壊が誘発されて最終的に関節が破壊される。

BTK は、単球、マクロファージ、破骨細胞、好塩基球、肥満細胞等の種々の細胞に発現している。単球・マクロファージをはじめ複数の免疫担当細胞に発現する $Fc\gamma R$ が、自己抗体や免疫複合体によって刺激を受けると、LYN や SYK 等のキナーゼの活性化を介して下流の BTK が活性化され、細胞内シグナルが伝達し、サイトカイン産生や貪食に至ることから、自己免疫疾患への関与が示唆される¹⁸⁾。また、肥満細胞や好塩基球では、 $Fc\epsilon RI$ が刺激を受けることにより、同様に LYN や SYK 等のキナーゼの活性化を介して下流の BTK が活性化され、脱顆粒や炎症性サイトカイン及び増殖因子の産生に至ることが明らかとなっている。肥満細胞や好塩基球はアレルギー反応の中心的役割を担い、アレルギー性鼻炎、アトピー、気管支喘息などの病態との関連が古くから知られてきたが、近年、RA などの自己免疫疾患にも関与することが報告されており⁵⁰⁾⁻⁵²⁾、 $Fc\epsilon RI$ シグナルの抑制は、種々の病態制御に有用と考えられる。

また、破骨細胞においては、RANKL による RANK 刺激により BTK/TEC が活性化され、ITAM の下流では Syk が活性化され、BLNK 及び SLP76 と会合して PLC γ のリン酸化を引き起こし、免疫細胞と類似したシグナル伝達機構を有することが報告されている²¹⁾。破骨細胞は、単球/マクロファージ系の前駆細胞に由来する多核巨細胞であり、骨基質に接着すると極性化し、酸やタンパク質分解酵素を分泌することによって骨を吸収する。骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性が保たれており、バランスの破たんは RA の関節破壊や閉経後骨粗鬆の原因となる。したがって、破骨細胞は骨の恒常性の維持に必須であるとともに、関節

破壊の中心を担っており、破骨細胞の分化が障害されたマウスでは、関節炎を誘導しても関節破壊がおこらないことが報告されている⁵³⁾。

以上、自己免疫疾患の発症過程には多様な免疫細胞が関与すること、BTK がシグナル伝達に関与することから、これらの細胞に対するチラブルチニブの作用を検討した。

1.1 実験材料及び方法

1.1.1 ヒト B 細胞及び T 細胞

ヒト末梢血単核球（ペリタス）に媒体又は各濃度のチラブルチニブを 10 分間処置した後、抗 IgM 抗体を 22 時間処置して B 細胞を刺激し、抗 CD3/CD28 抗体を 16 時間処置して、T 細胞を刺激した。フローサイトメーター（Cytomics FC500 MPL）を用いて CD20 陽性 CD3 陰性細胞（B 細胞）及び CD3 陽性 CD20 陰性細胞（T 細胞）領域の CD69 の平均蛍光強度を測定した。

1.1.2 ヒト単球

ヒト単球（ペリタス）に媒体又は各濃度のチラブルチニブを 1 時間処置した後、ヒト IgG を固相化したプレートに添加して 18 時間培養した。培養上清中の TNF- α 及び IL-6 濃度を Luminex 200 xPONENT3.1 System を用いて測定した。

1.1.3 ヒト肥満細胞

Saito らの方法⁵⁴⁾⁵⁵⁾に従い、ヒト骨髄 CD34 陽性細胞（ペリタス）より肥満細胞を 12 週分化誘導して用いた。ヒト myeloma IgE を一晚感作した肥満細胞に、媒体又は各濃度のチラブルチニブを 1 時間処置し、1 μ g/mL Goat anti-human IgE antibody を添加した。30 分間静置培養し、培養上清中のヒスタミン濃度をヒスタミン ELISA キット「イムノテック」（医学生物学研究所）を用いて測定した。また、実験群とは別に用意した肥満細胞に、ヒト myeloma IgE を感作し、Goat anti-human IgE antibody による刺激を行った後、TritonX-100 を終濃度 0.1% となるよう添加して細胞を破碎し、破碎液中のヒスタミン濃度を測定して全ヒスタミン濃度とした。各検体のヒスタミン濃度を全ヒスタミン濃度で除し、ヒスタミン遊離率（%）を算出した。さらに、同様に感作及びチラブルチニブの処置を行った肥満細胞に 1 μ g/mL Goat anti-human IgE antibody を 6 時間処置した後、培養上清中の TNF- α 、IL-8 及び顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の濃度を Luminex 200 を用いて測定した。

1.1.4 ヒト破骨前駆細胞

ヒト破骨前駆細胞 (Lonza) を、破骨前駆細胞分化培地キット (Lonza、基本培地及び SingleQuots) を用いて培養した。ヒト破骨前駆細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 及び NF- κ B 活性化受容体リガンド (RANKL) を含む培地に懸濁し、媒体又は各濃度のチラブルチニブを処置し 7 日間静置培養した。酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性で多核 (3 つ以上) の細胞の数を破骨細胞数として顕微鏡下で計測した。また、培養上清中の MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 及び IL-8 濃度 (pg/mL) を Luminex 200 xPONENT System にて測定した。骨吸収活性の評価においては、ヒト破骨前駆細胞を M-CSF 及び RANKL を含む培地にて調製し、Osteolyse Assay Plate に播種し 7 日間静置培養して成熟破骨細胞に分化させた。媒体又は各濃度のチラブルチニブを処置し 2 日間静置培養し、OsteoLyse Assay Kit (Lonza) を用いて上清中に含まれるコラーゲンフラグメントの蛍光強度を測定した。

以上の試験は、小野薬品工業株式会社の「ヒト組織を用いた研究」倫理規程及び病原体など安全管理規程を遵守して実施した。データ処理は Microsoft Office Excel 2007 SP1 (マイクロソフト株式会社) を用いて行った。非線形回帰分析には GraphPad Prism Ver.5.04 (GraphPad Software, Inc.) 及びその日本語化アドオンを用いた。

1.2 実験結果

ヒト由来細胞の各種刺激による対するチラブルチニブの IC₅₀ 値を表 1 に示す。

チラブルチニブはヒト B 細胞の BCR 刺激による CD69 発現の発現を 13.8 nmol/L の IC₅₀ 値にて抑制する一方で、BTK が発現しない T 細胞においては、10 μ mol/L の濃度においても TCR 刺激による CD69 の発現を抑制しなかった。一方、チラブルチニブはヒト単球において Fc γ R 刺激による TNF- α 及び IL-6 の産生を、ヒト肥満細胞において Fc ϵ RI 刺激によるヒスタミン遊離及び TNF- α 、IL-8 及び GM-CSF 産生を濃度依存的に抑制した。また、チラブルチニブはヒト成熟破骨細胞分化、骨吸収、ケモカイン産生を濃度依存的に抑制した。

表 1 各種ヒト由来細胞に対するチラブルチニブの作用

Human cells	Stimulus	Readout	IC ₅₀ (nmol/L)
B lymphocytes from PBMC	anti-IgM	CD69	13.8
Monocytes	FcγR	TNF-α	12.4
		IL-6	49.5
Mast cells	FcεRI	Histamine	32.2
		TNF-α	5.6
		IL-8	10.7
		GM-CSF	7.3
Osteoclast precursor cells	M-CSF, RANKL	TRAP (Differentiation)	1.4
		MIP-1α, MIP-1β, RANTES, IL-8	1.0 – 2.1
		Osteolysis (Resorption)	2.2
T lymphocytes from PBMC	Anti-CD3	CD69	>10,000

1.3 考察

自己免疫疾患の発症機序の多くは明らかではないものの、単一の機序ではなく複数の機序が重なり合って発症していると考えられ、チラブルチニブがどの細胞でどの機序を制御できるかを明らかにすることは重要である。本試験の結果から、BTK を発現しない T 細胞では活性化を抑制せず、細胞内においてチラブルチニブが高い選択性を維持することが明らかとなった。また、チラブルチニブを生体に投与した際には、B 細胞を制御するのと同程度の用量において BTK の発現する種々の細胞の活性化を制御しうることが示唆された。

全身性自己免疫疾患では、自己抗体の産生と免疫複合体の沈着による組織障害が問題となる。IgG を結合する FcγR の FcγRI、FcγRIIA、FcγRIII は、細胞内領域に immunoreceptor tyrosinebased activation motif (ITAM) を有し、BTK を介して活性化シグナルを伝達する。本試験では単球の FcγR シグナルに対するチラブルチニブの抑制作用を明らかとした。これは、第 1 章にて記載したとおり、SLE の病態機序である免疫複合体の沈着によるマクロファージによる腎障害をチラブルチニブが抑制する機序の説明に繋がると考えている。また、FcγR は単球、マクロファージのみでなく肥満細胞にも発現しており¹⁸⁾、例えば RA の滑膜由来の肥満細胞においては、FcγRI 及び FcγRIIA の刺激によって IL-8 や TNFα が産生することが報告されている⁵⁶⁾。チラブ

ルチニブは、Fc γ R 刺激した肥満細胞からの脱顆粒及びサイトカイン産生を抑制することを確認しており（データ非提示）、BTK は、一つではなく種々の細胞にて Fc γ R の下流にて重要な役割を果たすと考えられる。

他方、FcR には immunoreceptor tyrosinebased inhibitory motif (ITIM) を有する抑制性の Fc γ RIIB が存在する。通常、Fc γ RIIB は ITAM を有する BCR や Fc γ R 等と架橋されることにより ITIM がリン酸化され、ここにホスファターゼがリクルートされることによってシグナルが負に制御される。SH2-containing inositol polyphosphate phosphatase (SHIP) は、細胞膜の PI(3,4,5)P₃ を PI(3,4)P₂ に変換し、その結果、BTK と PI(3,4,5)P₃ との相互作用が減少してシグナル伝達が抑制される⁵⁷⁾。一方、近年、Fc γ RIIB の別の機序として、ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞並びに形質細胞において Fc γ RIIB のみが凝集することによって、細胞のアポトーシスが誘導されること、これをイブルチニブが抑制することが報告されている⁵⁸⁾。今後、抑制性シグナルにおける BTK の役割がさらに明らかとなることで、病態に応じた BTK 阻害剤の使い分けが可能となる可能性も考えられる。

また、FcR のうち IgE を結合する Fc ϵ RI はアレルギーや自己免疫疾患にて主要な役割を担っている。本試験では肥満細胞を用い、Fc ϵ RI 刺激による活性化に対するチラブルチニブの作用を検討したが、Fc ϵ RI は好塩基球にも発現しており、チラブルチニブは Fc ϵ RI 刺激したヒト好塩基球において活性化マーカー CD63 の発現を抑制することも明らかとしている（データ非提示）。抗 IgE 抗体であるオマリズマブは喘息並びに特発性蕁麻疹の治療薬として承認されており⁵⁹⁾、本シグナルを制御することにより、これらのアレルギー性疾患への適応の広がりも期待できる。

さらに、本試験の結果から、チラブルチニブは RANKL による RANK 刺激で誘導される破骨前駆細胞からの破骨細胞への分化を抑制すること、また分化後の破骨細胞においても骨吸収機能を低濃度にて抑制することから、効果的に破骨細胞を制御できる薬剤であることがわかった。

2 マウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおける作用

RA は滑膜の過形成と関節破壊を特徴とする全身性自己免疫疾患であり、その国内有病率は 0.6-1.0%と全身性自己免疫疾患の中で最も高い⁶⁰⁾。本疾患においては TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインが長期に組織の炎症及び破壊に関与することから、これらに対する生物製剤は臨床症状の改善及び関節破壊の抑制に有用である^{61) 62)}。しかし、TNF 阻害療法でも臨床的寛解達成率は十分ではなく、一度関節が破壊されると元に戻すのは容易でないことから、新規メカニズムによる補完が必要である。一方、リツキシマブによる RA 治療では抗 TNF α 抗体に対する非劣性が確認されており⁶³⁾、B 細胞は、自己抗体や炎症性サイトカインの産生や、自己反応性 T 細胞への自己抗原の提示により、RA の発症に寄与していると考えられている⁶⁴⁾。このように B 細胞除去療法が RA 治療に有効であることが示されているが、国内では抗 CD20 のヒト化抗体であるオクレリズマブの RA に対する開発が進められたものの、ベネフィットがリスクを上回るものではないという判断で開発は中止されている⁶⁵⁾。

BTK は、BCR シグナル伝達の重要なメディエーターであり、これを阻害することで、BCR の刺激による B 細胞の増殖、共刺激分子の発現や B 細胞における抗体産生が抑制されるだけでなく、抗 CD20 抗体投与によるインフュージョン・リアクション⁶⁶⁾ や B 細胞枯渇による感染症の頻度の増加⁵⁾といったリスクの軽減を期待できる。

マウスコラーゲン誘発関節炎モデル (CIA モデル) は、軟骨成分である II 型コラーゲンを免疫することにより抗 II 型コラーゲン抗体が産生され、その結果関節の破壊が生じる代表的な関節炎モデルである。関節炎の発症前に抗 II 型コラーゲン抗体の上昇が認められ、ヒトの病態と類似した経過を示す。チラブルチニブは B 細胞のみでなく各種細胞の活性化を抑制することから、関節炎発症後におけるチラブルチニブの治療的効果を検討した。

2.1 実験材料及び方法

2.1.1 マウス CIA モデルの作製

雄性 DBA/1JNCrlj マウス (日本チャールス・リバー株式会社) の尾根部皮内に II 型コラーゲン (高研) を含むフロイントの完全アジュバントを 150 μ g/0.1 mL/body で投与して初回免疫し、その 21 日後にマウスの尾根部皮内に II 型コラーゲンを含むフロイントの不完全アジュバントを 100 μ g/0.1 mL/body 投与して二次免疫した。35 日目に関節炎を発症したマウスを採用し、チラブルチニブを 1、3 及び 10 mg/kg の用量で初

回感作後 35 日から 49 日までの 15 日間、1 日 1 回経口投与した。陽性対照物質として、ステロイド系抗炎症薬であるプレドニゾロンを 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。偽処置群及び媒体群には 0.5% MC 溶液を 1 日 1 回経口投与した。以下の関節炎スコア判定基準にて目視及び触診にて四肢の関節炎スコアを判定した。

関節炎スコア判定基準

- 0 : 症状なし、正常
- 1 : 1 本の指が赤く腫れている (1 関節に浮腫)
- 2 : 2 本以上の指あるいは甲が赤く腫れている (2 関節以上あるいは甲に浮腫)
- 3 : 指、甲及び踵が赤く腫れている (肢根、肢首の浮腫)
- 4 : 肢全体の関節の動きが悪い (関節の変形)

2.1.2 血中パラメーターの測定

イソフルラン吸入麻酔下で、後大静脈腹部より全採血した後、マウスを放血により安楽死させた。ヘパリン処理血液を遠心分離して血漿を採取した。Mouse Anti-TypeI and TypeII Collagen IgG Assay Kit (Chondrex) を用いて抗 II 型コラーゲン抗体濃度を測定した。また、IL-6 及び KC を Luminex にて測定した。

2.1.3 mRNA 測定

後肢を採取し、踵を厚さ 0.5 cm 以下に細断後、RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) に浸漬した後、RNeasy Mini spin column (Qiagen) を用いて mRNA を調製した。また、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) 及びサーマルサイクラー (iCycler, BioRad) を用いて cDNA を合成した。サイトカイン及びケモカイン (MIP1- α 、IL-1 β 、KC、TNF- α 、IL-6、MCP-1、RANKL、IL-18)、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP3、MMP9) 及び内部標準である β アクチンの mRNA について LightCycler 480II (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて定量的リアルタイム PCR (RT-PCR) を行い、各組織のサイトカイン mRNA 量を $\Delta\Delta$ Ct 法にて相対定量した。

式 1 : Δ Ct = 標的遺伝子 Ct 値 - β アクチンの Ct 値

式 2 : $\Delta\Delta$ Ct = 各サンプルの Δ Ct 値 - 偽処置群の Δ Ct 値の平均値 (Δ Ct sham(ave.))

式 3 相対発現量 = $2^{(-\Delta\Delta$ Ct(ave.))}

2.1.4 病理組織学的評価

左右後肢を採取し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中に浸漬した後、EDTA 水溶液にて室温で脱灰し、足根関節部分の中央縦断面で切り出した。パラフィンブロックを作製し、厚さ 4~6 μ m で薄切し、H.E.染色標本及び TRAP 染色標本を作製した。TRAP 染色は、TRAP 染色キット (Cosmo Bio) を用いて行った。

H.E.標本は、光学顕微鏡下で観察し、左右後肢の足根関節 (足根下腿関節、足根間関節、足根中足関節を含む領域) における「炎症、パンヌス、骨破壊、軟骨破壊」の 4パラメータの病理組織学的評価を行った。4つのパラメータのグレード付けはそれぞれ、0: 正常、1: 軽微、2: 軽度、3: 中等度、4: 重度の 5段階で行った。

また、TRAP 染色標本について、TRAP 染色標本にて 2つ以上の核を持ち、TRAP 染色陽性の多型細胞質を有する細胞を破骨細胞とみなし、骨表面、骨髄腔及び周囲結合組織における総数を計測した。計測は 1 標本につき 3 回行い、その平均値を算出し、小数点以下を四捨五入して整数で示した。

2.3.1 統計解析

SAS 9.1.3 及びその連動システム EXSUS Version 7.7.1 を用いて統計学的解析を行った。関節炎スコアの個体値につき、測定日毎に偽処置群と媒体群の間で Wilcoxon 順位和検定を行った。次に、媒体群とチラブルチニブ各群との間で Steel 検定を、また媒体群とプレドニゾン群との間で Wilcoxon 順位和検定を行った。血中抗 II 型コラーゲン抗体、IL-6 及び KC 濃度については、偽処置群と媒体群及びプレドニゾン群との比較は t 検定を行い、媒体群とチラブルチニブ群との間の比較は Dunnett 検定を行った。破骨細胞数については、偽処置と媒体群並びに媒体群とチラブルチニブ群の比較は Wilcoxon 順位和検定で行った。検定は両側検定とし、有意水準は 5%とした。

2.2 実験結果

関節炎スコアの推移を図 12 に示した。媒体群では偽処置群と比較していずれの時点においても有意にスコアが高値であり、関節炎の進行が認められた。また、陽性対照であるプレドニゾン投与群では、媒体群と比較してスコアが低く推移した。本系において、チラブルチニブ群では用量依存的に関節炎の進展を抑制し、3、10、30 mg/kg 群では媒体群に比べて有意にスコアが低値であった。

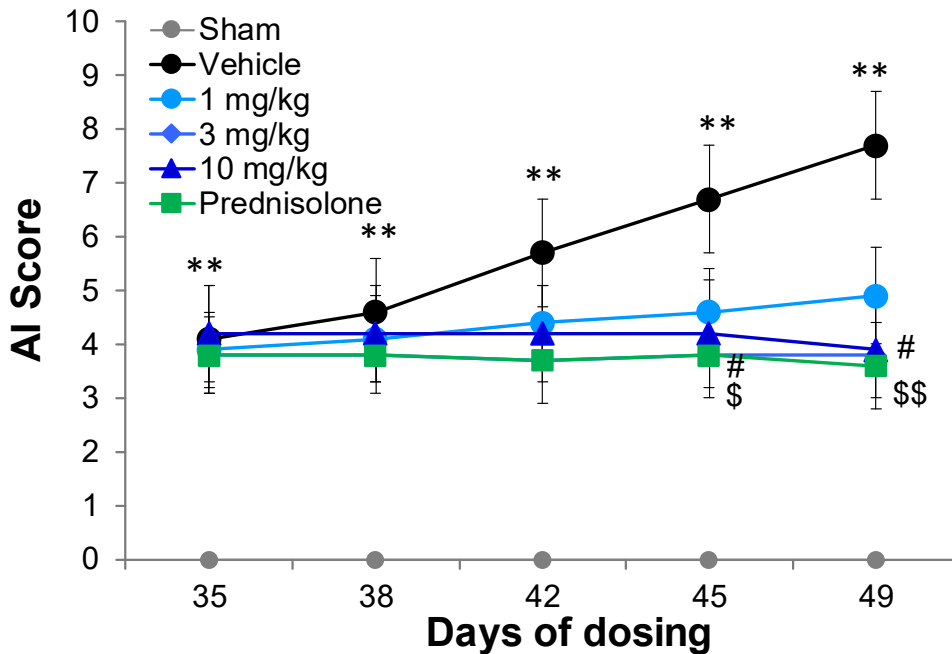
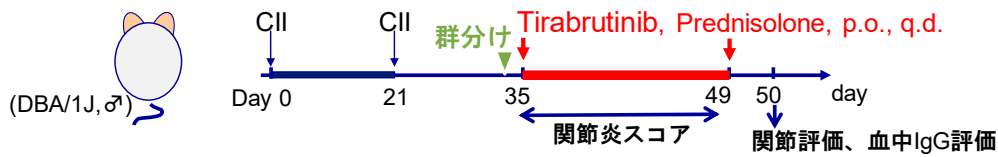


図 12 マウス CIA モデルにおける関節炎スコア推移

マウスの尾根部皮内に II 型コラーゲンを含むフロイントの完全アジュバントを投与して初回免疫し、その 21 日後に II 型コラーゲンを含むフロイントの不完全アジュバントで二次免疫した。35 日目に関節炎を発症したマウスを採用し、媒体並びにチラブルチニブを 0.3、1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した (n=10)。また、プレドニゾロンを 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。四肢の関節炎スコアを判定し、四肢の加算を個体値とした。関節炎スコアの個体値の平均値及び標準誤差を表示した。偽処置と媒体群並びに媒体とプレドニゾロン群の比較は t 検定で、媒体群とチラブルチニブ群の比較は Steel 検定で行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。*: p<0.05 vs 偽処置群、#: p<0.05 vs 媒体群、\$: p<0.05, \$\$: p<0.01 vs 媒体群。

次に、血中のパラメーターとして抗 II 型コラーゲン抗体、IL-6 及び KC 濃度を測定し、結果を図 13 に示した。チラブルチニブは、病態発症後から投与しても、血中抗 II 型コラーゲン抗体濃度に対し抑制作用を示さなかった。一方、IL-6 及び KC については、病態発症後からの投与であっても用量依存的な抑制作用を示した。したがって、本試験におけるチラブルチニブの関節炎に対する有効性は、抗体産生制御以外の抗炎症作用等に基づく可能性が考えられた。

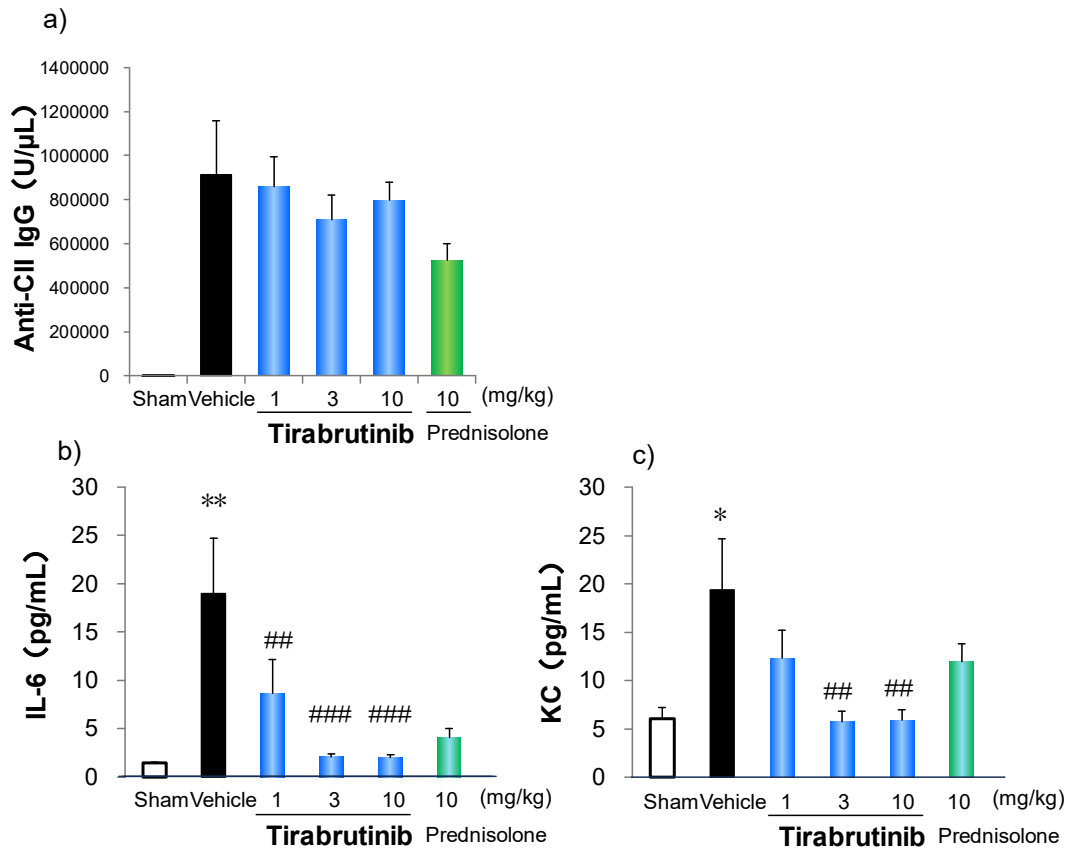


図 13 マウス CIA モデルにおける血中抗 II 型コラーゲン抗体、IL-6 及び KC 濃度
 初回免疫から 35 日目に関節炎を発症したマウスを採用し、媒体並びにチラブルチニブを 0.3、1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。また、プレドニゾロンを 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。初回感作 49 日後の血中の a) 抗 II 型コラーゲン抗体、b) IL-6、c) KC 濃度の平均値及び標準誤差を表示した。偽処置群と vehicle 群及びプレドニゾロン群との比較は t 検定で、媒体群とチラブルチニブ群との間の比較は Dunnett 検定を行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。*: P<0.05 vs 偽処置群、#, ##, ###: P<0.05, P<0.01, P<0.001 vs 媒体群

そこで、関節の病変局所においてチラブルチニブが抗炎症作用を発揮しているかを検討するため、関節組織中の各種 mRNA を相対定量した。結果を図 14 に示した。偽処置群に比べ媒体群では炎症性サイトカイン及びケモカイン類の MIP-1 α 、IL-1 β 、KC、IL-6、MCP-1、RANKL、並びに組織破壊に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -3、MMP-9 の発現が上昇し、これを、チラブルチニブは強力に抑制した。

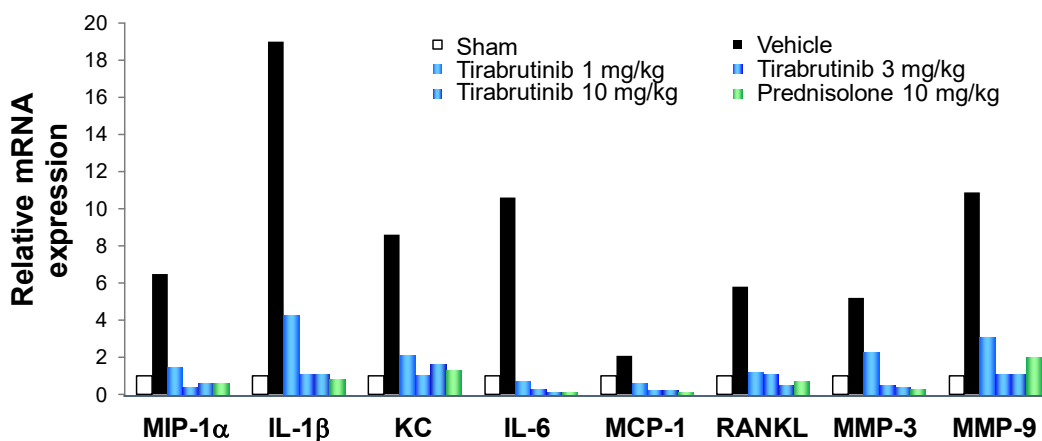


図 14 マウス CIA モデルの関節組織中 mRNA

初回免疫から 35 日目に関節炎を発症したマウスを採用し、媒体並びにチラブルチニブを 0.3、1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。また、プレドニゾロンを 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。初回感作 49 日後の左後肢関節組織中の MIP-1 α 、IL-1 β 、KC、MMP-3、MMP-9、IL-6、MCP-1、RANKL の $\Delta\Delta$ Ct 値 (平均値、n=10) を算出した。グラフは偽処置群に対するそれぞれの相対発現量を示した。

また、後肢の TRAP 染色標本を基に破骨細胞数を評価した結果を図 15 に示した。チラブルチニブ投与群では、破骨細胞数の有意な減少が認められた。

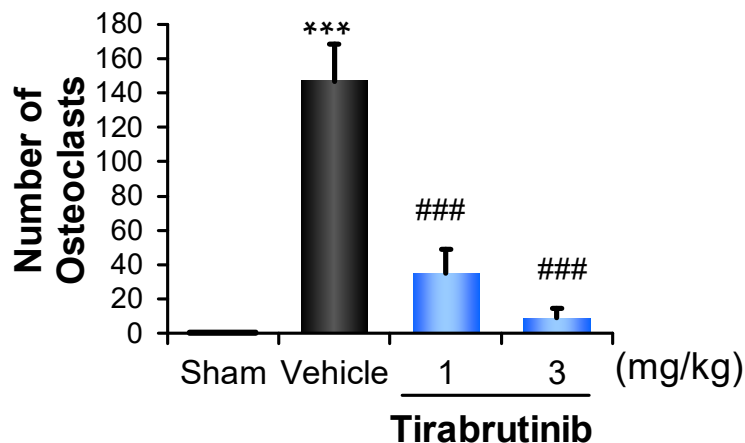


図 15 マウス CIA モデルの関節組織中破骨細胞

初回免疫から 35 日目に関節炎を発症したマウスを採用し、媒体並びにチラブルチニブを 1 及び 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。初回感作 49 日後の左右後肢の病理組織にて破骨細胞数を計測した (n=10)。偽処置と媒体群並びに媒体群とチラブルチニブ群の比較は Wilcoxon 順位和検定で行い、p 値 5%未満を統計学的有意とした。*** : p<0.001 vs 偽処置群、### : p<0.001 vs 媒体群。

後肢の病理組織の H.E.標本を基に、病理組織学的スコア評価した結果を図 16 に示した。II 型コラーゲンの免疫によって炎症、パヌス、骨破壊、軟骨破壊が誘導されること、一方、チラブルチニブ投与群により、これらが抑制されることが明らかとなった。以上より、チラブルチニブは、本系において抗炎症作用並びに破骨細胞分化抑制作用を発揮して関節炎局所の病変を抑制していることが明らかとなった。

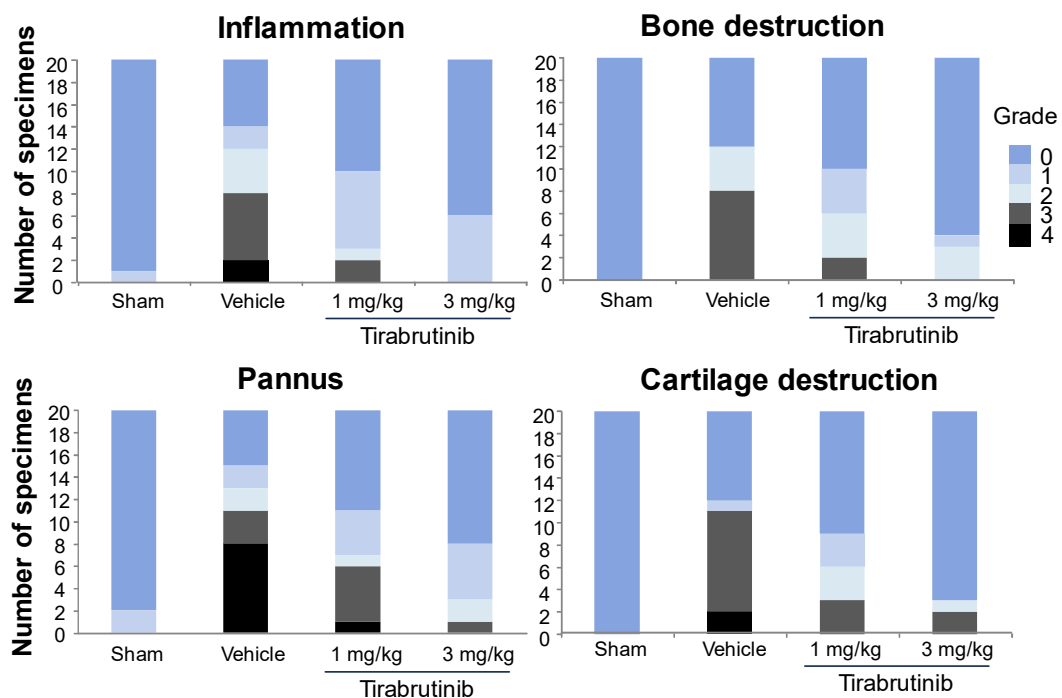


図 16 マウス CIA モデルの後肢関節の病理組織学的評価

初回免疫 49 日後の左右後肢を採取し、左右後肢の足根関節（足根下腿関節、足根間関節、足根中足関節を含む領域）の H.E.標本を用い、炎症、パヌス、骨破壊、軟骨破壊の 4 パラメータの病理組織学的評価を行った。0：正常、1：軽微、2：軽度、3：中等度、4：重度。各パラメータにおけるグレード毎の標本数を表示した。

2.3 考察

RA モデルとして汎用されているマウス CIA モデルは、抗炎症作用を持つ薬剤が有効性を示すことが知られており^{67) 68)}、本試験ではプレドニゾロンを陽性対照に設定した。チラブルチニブは本モデルにおいて病態発症後からの投与により、治療的効果を示した。本試験では、血清中の抗 II 型コラーゲン抗体濃度に対するチラブルチニブによる抑制作用が認められない一方で、関節リウマチの病態に深く関与する IL-6 等の

種々のサイトカイン類や、基底膜破壊に関与するマトリックスメタロプロテアーゼの産生が顕著に抑制された。さらに、本試験では、破骨細胞の数が有意に減少した。一方、本試験ではチラブルチニブによる抗 II 型コラーゲン抗体濃度の低下は認められなかった。本論文に示した結果は、1 日 1 回投与で実施した試験であるが、強い抗体産生抑制効果が得られる 1 日 2 回で投与した場合においても同様に抗 II 型コラーゲン抗体濃度の有意な低下は認められなかった（データ非提示）。なお、他社の選択的 BTK 阻害剤を CIA モデルにてポスト投与で評価した報告において、抗コラーゲン抗体濃度を抑制する報告（BMS-986142⁶⁹）、HM-71224⁷⁰）と、そうでない報告（エヴォヴルチニブ⁷¹）に分かれたことから、マウスの実験条件の違いが BTK 阻害剤の薬理作用そのものに影響したと考えている。一方、上記のいずれの BTK 阻害剤も抗体濃度を抑制する以上に、関節破壊の抑制効果が強力であったことから、BTK 阻害剤は、B 細胞からの自己抗体産生抑制作用以外の抗炎症作用及び破骨細胞分化抑制作用により、関節破壊を制御しうると考えられる。さらに、抗 CD20 抗体を CIA マウスの関節炎発症後に処置して B 細胞を枯渇させても、予防的投与とは結果が異なり、有効性が認められない⁶⁷）ことが報告されており、関節炎発症後の病態制御には B 細胞以外の機序を制御することの重要性を示唆している。

一方で、関節破壊には、炎症に基づく間接的な破骨細胞の活性化と直接的な破骨細胞の活性化の両者が考えられる。マウス CIA モデルではチラブルチニブによって炎症が抑制されること、また関節組織において破骨細胞の分化を誘導する RANKL の発現がチラブルチニブによって低下していたことから、本試験においてチラブルチニブが直接的に破骨細胞分化を抑制したか否かは、結論づけられない。骨破壊の中心となる破骨細胞を直接制御できれば魅力的な薬剤になることから、*In vivo* でも直接的にチラブルチニブが骨破壊を抑制するかについては、第 3 章にて検討した。

第 2 章 まとめ

- チラブルチニブは単球、肥満細胞、破骨前駆細胞の活性化に対して B 細胞と同等の阻害活性を有する。
- チラブルチニブはコラーゲン惹起関節炎モデルにて、抗体産生抑制以外の機序に基づいて病態の治療的効果を示した。

第 3 章 破骨細胞における他シグナル阻害剤との比較

1 破骨前駆細胞を用いた細胞実験

破骨細胞は骨の恒常性の維持に重要な役割を果たすとともに、RA においては異常活性化し骨破壊をもたらす。破骨細胞は RANKL を発現する細胞との接触によって分化が誘導され、多核細胞を形成して骨吸収を行う。RANKL 欠損マウスでは破骨細胞の形成が見られず大理石病になることから、RANKL は分化に必須の分子と考えられる⁵³⁾。RANKL は RANK と結合して下流の NFATc1 を誘導するため、このシグナル経路を制御できれば骨破壊を効果的に抑制できる薬剤になると考えられる。実際に、抗 RANKL 抗体のデノスマブは骨粗鬆症並びに関節リウマチに伴う骨びらの進行抑制薬として臨床で使用されており^{72) 73)}、RANK 系路を制御できる薬剤は、ヒトにおいて骨破壊を抑制できる可能性がある。

第 2 章の検討でチラブルチニブは、RANKL 刺激による破骨細胞の分化を抑制したことから、骨に対する作用を併せ持つ新規機序の RA 治療薬となる可能性がある。そこで、RA 治療薬としてチラブルチニブの特徴を探索するため、RA を対象に承認されている JAK 阻害剤のトファシチニブ、あるいは BTK 上流の SYK 阻害剤のフォスタマチニブ、また先行 BTK 阻害剤のイブルチニブの 3 つのシグナル伝達阻害剤について、破骨細胞への作用を比較検討した。

1.1 実験材料及び方法

1.1.1 被験物質

チラブルチニブ、イブルチニブ、R406、トファシチニブ、p38 阻害剤は 10 mmol/L となるように dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した後、目的濃度に希釈して使用した。

1.1.2 ヒト破骨前駆細胞の分化

3 項に従って、ヒト破骨前駆細胞を培養した。媒体又は化合物を添加して RANKL 及び M-CSF 存在下で 7 日間分化培養した後、TRAP 染色して破骨細胞数を計測した。また、生細胞数の測定には CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ) を

使用し、マイクロプレートリーダーにて細胞内在性 ATP 量に比例した発光シグナルを測定した。

1.1.3 ヒト破骨前駆細胞におけるシグナル解析

ヒト破骨前駆細胞に媒体又は化合物を添加し、M-CSF 含有培地若しくは RANKL 及び M-CSF 含有培地にて 48 時間培養した。細胞を AEBSF 含有 Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) で破碎して破碎液を調製してウェスタンブロットに供した。なお、TEC の検出にはヒト単球を M-CSF 含有培地若しくは RANKL 及び M-CSF 含有培地にて培養した破碎液に抗 TEC 抗体 (SantaCruz) 及び Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (ベリタス) を添加して免疫沈降した試料を、ウェスタンブロットに供した。以上の試料は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (4-12%、Bio-Rad) し、PVDF 膜に転写した。一次抗体として、リン酸化 BTK (Tyr223) (Novus Biologicals)、BTK、リン酸化 PLC γ 2 (Tyr759)、PLC γ 2、リン酸化 BLNK (Tyr96)、BLNK、NFAT2 (以上 Cell Signaling Technology)、リン酸化チロシン (Millipore)、TEC (SantaCruz) に対する抗体を用い、各種タンパク質の細胞内のリン酸化及び総タンパク質を検出した。

1.2 実験結果

ヒト破骨前駆細胞の分化に対する各種阻害剤の作用を図 17 に示した。チラブルチニブが濃度依存的に破骨細胞の分化を抑制する一方で、JAK 阻害剤のトファシチニブは分化を抑制しなかった。また、SYK 阻害剤の R406 (フォスタマチニブの活性本体) は 300 nmol/L 以上の濃度において細胞障害性を示したために最大濃度として 100 nmol/L で評価したところ、分化に対する最大抑制率は 27.8% に留まった。さらに、BTK 阻害剤のイブルチニブは 10 nmol/L で最大 62.0% 抑制したが、チラブルチニブと異なり、100 及び 1000 nmol/L において作用が減弱した。イブルチニブの高濃度における分化抑制作用が減弱したことから、ヒト破骨前駆細胞に対する各 BTK 阻害剤の細胞傷害性を評価した結果を図 18 に示す。チラブルチニブ及びイブルチニブは 1000 nmol/L において細胞傷害性に影響を与えなかった。

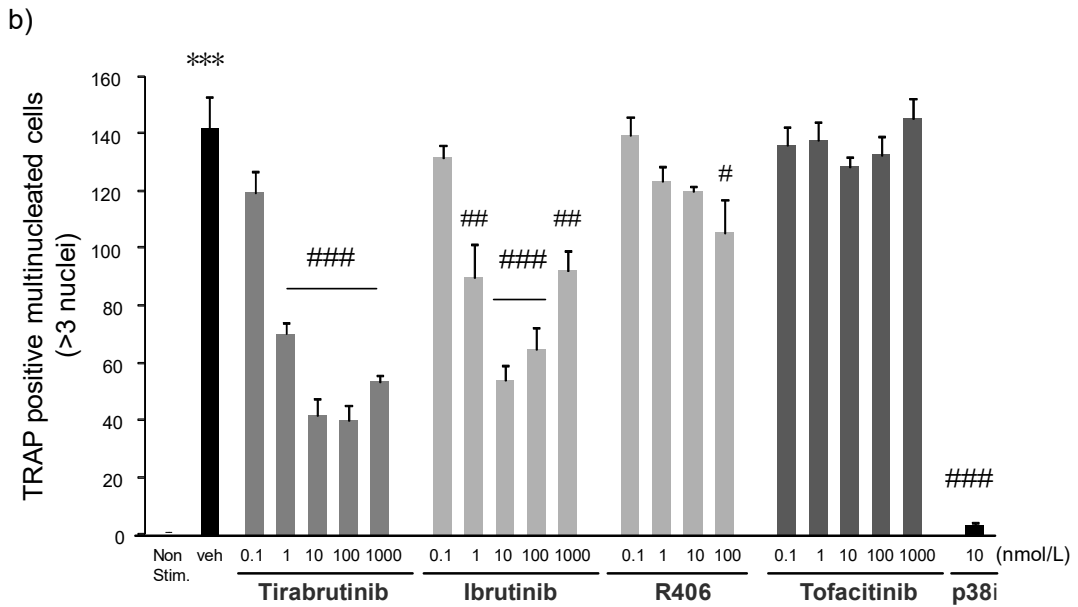
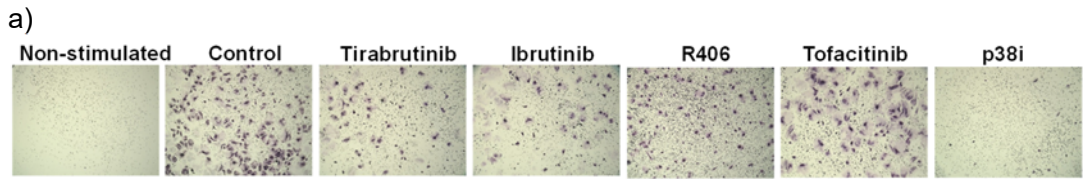


図 17 ヒト破骨前駆細胞の分化に対する各種阻害剤の作用

ヒト破骨前駆細胞を M-CSF 及び RANKL を含む培地にて調製し、媒体又は各濃度の化合物を添加した後、7 日間培養した。TRAP 染色した後、a) 光学顕微鏡下で撮影し、b) TRAP 陽性の多核 (3 つ以上) 細胞の数を破骨細胞数として計測した。各群 3 例の平均値 ± 標準誤差で示した。***: $p < 0.001$ vs 非刺激群。#, ##, ###: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs 媒体群。

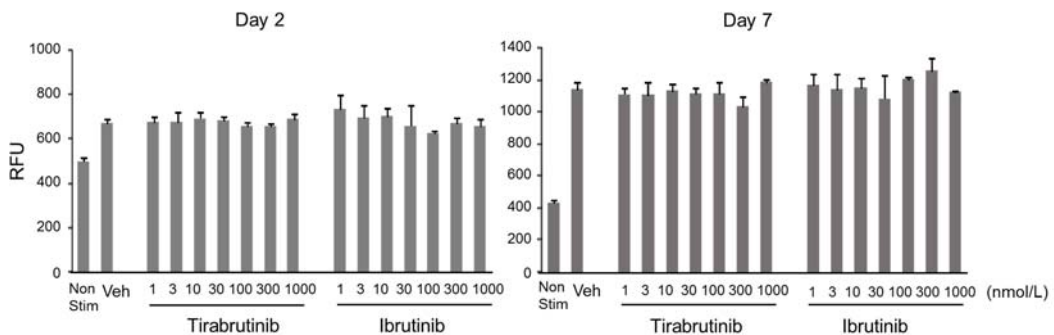


図 18 チラブルチニブ並びにイブルチニブ処置後の生細胞数

ヒト破骨前駆細胞を M-CSF 及び RANKL を含む培地にて調製し、媒体又は各濃度の化合物を添加した後、2 又は 7 日間培養した。CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用い、細胞内在性 ATP 量に比例した発光シグナル (相対発光単位, RLU) を測定した。各群 3 例の平均値 ± 標準誤差で示した。

B細胞ではBTKの上流に位置するキナーゼとして知られるSYK阻害剤のR406が、破骨前駆細胞の分化に対する抑制作用が弱かったこと、また同じBTK阻害剤のイブルチニブは高濃度において効果が減弱したことは意外な結果であった。破骨細胞ではRANKLによるRANKシグナル及びITAMシグナルが協調して下流のPLC γ 、NFATc1が活性化し、その結果、破骨細胞の分化が誘導されることが知られている²¹⁾が、上流のBTKとSYKのヒエラルキーは明らかではない。そこで、破骨細胞の細胞内シグナル分子に対するチラブルチニブ、R406並びにイブルチニブとの作用比較を行い、図19に示した。チラブルチニブはRANKL刺激によって誘導されるBTKの自己リン酸化及びTECのリン酸化を抑制し、下流のPLC γ 2のリン酸化も抑制した。一方、R406は、分化実験の長期間にわたって細胞障害性が無い濃度の100 nmol/Lにおいては、SYKのアダプタータンパク質であるBLNKのリン酸化を十分抑制していないこと、一方、1000 nmol/Lの濃度においてはBLNKのリン酸化を非刺激レベルにまで低下させるものの、BTK、TEC、PLC γ 2のリン酸化を抑制しないことがわかった。また、イブルチニブはチラブルチニブと同様にBTKの自己リン酸化を強力に抑制し、0.1 μ mol/LにおいてはPLC γ 2のリン酸化及びNAFTc1の発現を抑制したが、1及び10 μ mol/Lにおいては、LYNのリン酸化を非刺激レベルまで抑制し、Gab2のリン酸化を約1.5倍亢進した。さらに下流のPLC γ 2のリン酸化及びNAFTc1の発現抑制がチラブルチニブに比べ減弱することがわかった。

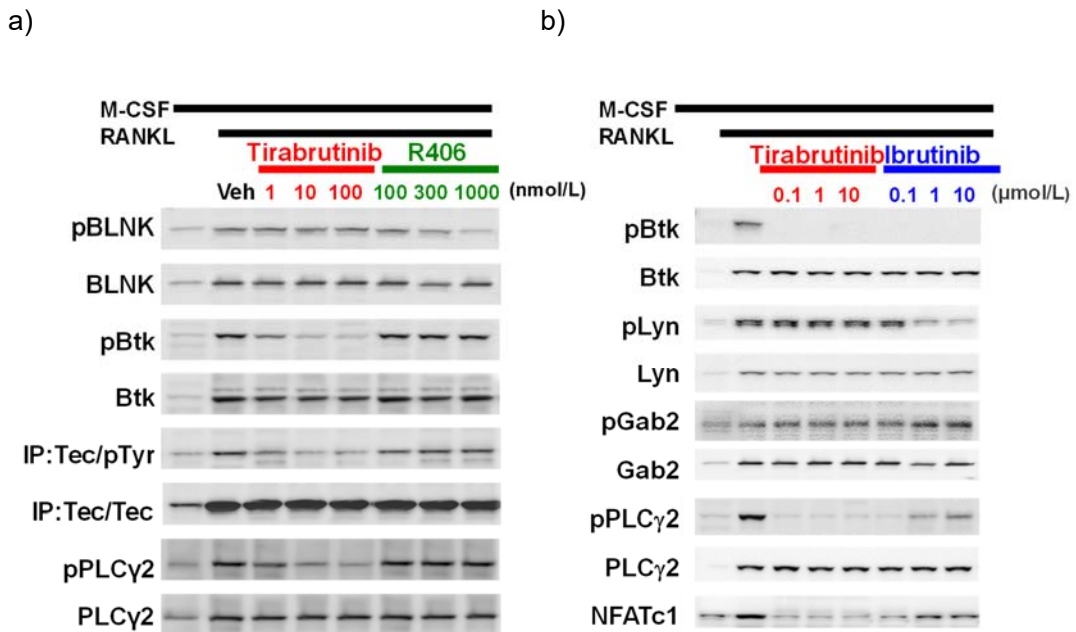


図 19 ヒト破骨前駆細胞の細胞内シグナルに対する各種阻害剤の作用

ヒト破骨前駆細胞を M-CSF 及び RANKL を含む培地にて調製し、媒体又は各濃度の化合物を添加した後、48 時間静置培養した。ウェスタンブロットにて細胞内のリン酸化タンパク及び総タンパクを検出した。また、ヒト単球を M-CSF 及び RANKL を含む培地にて調製し、媒体又は各濃度の化合物を添加した後、48 時間静置培養した。抗 Tec 抗体で免疫沈降後、ウェスタンブロットにてリン酸化チロシン (pTyr) 及び Tec タンパク質 (Tec) を検出した。

1.3 考察

RANKL は破骨細胞の分化に主要な刺激因子であり、受容体である RANK を介して転写因子の NFATc1 が誘導され、破骨細胞の分化が誘導される⁷⁴⁾。また、このシグナルは、FcR γ 鎖や DNAX-activating protein (DAP12) を介した ITAM シグナルによる PLC γ の活性化及び Ca シグナルとの協調が必須であることが明らかにされている⁷⁵⁾。BTK 及び TEC は、FcR γ 鎖を欠損した破骨細胞においても RANKL 刺激によってリン酸化を受けること、一方、FcR γ 鎖を欠損するとアダプター分子である BLNK との結合が失われることから、BTK 及び TEC は RANK シグナルと ITAM シグナルの両者を結びつける役割を果たすと考えられている²¹⁾。既報から、ITAM シグナルにて SYK がリン酸化され、ここに BLNK、SLP76 が近づいて足場となり、TEC、BTK が結合し、シグナル複合体を形成してカルシウム流入が生じると言われている。以上のように、破骨細胞においても、免疫細胞と類似したシグナル伝達機構を有することが示唆されている。

今回の検討において、チラブルチニブは、RANKL 処置によって誘導された BTK 及び TEC のリン酸化を抑制し、下流の PLC γ 2 のリン酸化及び NFATc1 の活性化を抑制した。また、BLNK のリン酸化を抑制しなかったことは、既報から予想される結果と一致していた。なお、本試験では RANKL 処置 48 時間後のリン酸化状態を検討したが、既報では RANKL 処置 30 分で BTK のリン酸化が生じることが示されており²¹⁾、チラブルチニブは、RANKL によって誘導される BTK 及び TEC のリン酸化を直接的に抑制し、その結果、下流のシグナルを制御し、破骨細胞の分化を抑制したと考えている。

SYK は免疫細胞において、ITAM シグナルの活性化並びに抑制に関与することが知られている¹⁸⁾。B 細胞や自然免疫系の細胞では、BTK の上流に位置しており、第 2 章にて検討した単球の Fc γ R 刺激によるサイトカイン産生、肥満細胞の Fc ϵ RI 刺激による脱顆粒やサイトカイン産生に対し、R406 はチラブルチニブと同様に抑制作用を示した（データ非提示）ことから、破骨細胞においても同様に SYK が BTK の上流に位置し、両阻害剤によって類似した作用が認められると予想していた。そのため、本試験にて、チラブルチニブが破骨細胞の分化を抑制する一方で、R406 による分化抑制作用が弱かったことは意外な結果であった。シグナル解析の結果、R406 は細胞障害性の無い濃度においては BLNK のリン酸化を抑制しなかったため、SYK 阻害に基づく分化抑制作用を発揮できなかった可能性があるが、同時に、1000 nmol/L の濃度においてはほぼ非刺激の状態までリン酸化を抑制しているにもかかわらず、BTK や TEC のリン酸化はもちろん、下流の PLC γ 2 のリン酸化を抑制しなかったことから、破骨細胞において SYK は BTK 及び TEC の上流には位置しないこと、PLC γ 2 のリン酸化は BTK 及び TEC を介したものであることが示唆された。シグナル解析の結果から、考えられる破骨細胞内のシグナル伝達経路の模式図を図 20 に示す。破骨細胞では、RANK と ITAM シグナルが協調して下流の PLC γ 2 をリン酸化することが知られているが、今回の結果より、BTK、TEC は SYK とは独立してシグナルを制御していると考えられた。すなわち BTK 及び TEC が RANK 下流の主要なシグナル調節分子であり、ITAM 下流の SYK を阻害しても下流にシグナルが伝わり、PLC γ 2 のリン酸化を抑制できず、分化を抑制できないと考えられる。

また、BTK が RANKL シグナル下流に位置するにも関わらず、イブルチニブは高濃度において分化の抑制が減弱するという予想外の結果も得た。破骨細胞の分化においては、BTK と TEC が補い合っており、それぞれの単独のノックアウトに比べて、BTK と TEC のデュアルノックアウトではより強い分化抑制作用が認められ、破骨細胞の欠

損により大理石病を呈することが報告されている²⁸⁾。チラブルチニブは、BTK を阻害すると同程度の濃度で TEC を抑制することから、BTK と TEC の両者を制御することで強力な作用を発揮できる。また、イブルチニブも同様に、破骨細胞にて BTK のみならず TEC のリン酸化も抑制することを確認しており（データ非提示）、BTK 及び TEC の抑制のみではチラブルチニブとイブルチニブの違いを説明できない。既報より、マウスにおいて、LYN が下流の Gab2 及び PLC γ 1 を抑制することで破骨細胞分化を抑制的に制御していることが知られている⁷⁶⁾⁷⁷⁾ことから、LYN のリン酸化に対する作用を検討したところ、チラブルチニブは LYN のリン酸化に影響しないのに対し、イブルチニブは、高濃度で LYN のリン酸化を抑制し、Gab2 のリン酸化を亢進することがわかった。以上より、高濃度のイブルチニブで認められた破骨細胞分化抑制作用の減弱は LYN のリン酸化抑制作用に基づく可能性がある。図 1 にて示した通り、チラブルチニブは LYN に対して優れた選択性を有している。一方、イブルチニブの *in vitro* における BTK 阻害活性は IC₅₀ 値 0.5 nmol/L、TEC に対して 78 nmol/L、LYN に対して 200 nmol/L であることが報告されており²⁶⁾、破骨細胞に高濃度でイブルチニブを処置した条件下においては LYN の抑制作用が現れたものと考えられる。以上より、阻害するキナーゼの種類によって、チラブルチニブとイブルチニブでは分化に対する作用強度の違いが現れたと考えられる。

なお、関節リウマチ治療薬として用いられている JAK 阻害剤のトファシチニブでは RANKL 惹起による分化に対する抑制が認められなかった。JAK はサイトカイン受容体に会合するキナーゼであることから、本系で評価した RANK 及び ITAM のシグナルには影響を与えないと考えられ、チラブルチニブは JAK 阻害剤と異なる作用機序で破骨細胞の分化の抑制作用を示すことが確認できた。

以上より、チラブルチニブは TEC 阻害を併せ持つ一方で LYN を阻害せず、優れたキナーゼ選択性を有すると言える。それによって効果的に RANK シグナルを制御し、破骨細胞への分化、骨吸収、サイトカイン産生を抑制すると考えられる。

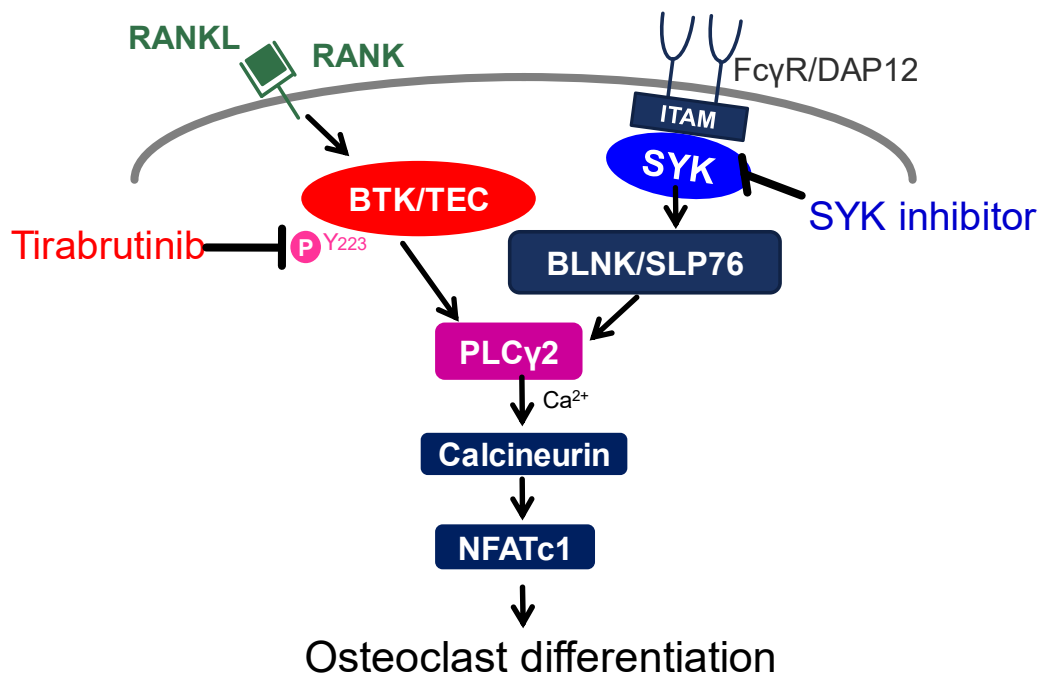


図 20 ヒト破骨前駆細胞の RANKL-RANK シグナル

RANK 刺激により BTK/TEC が活性化され、ITAM 下流の BLNK 及び SLP76 と会合して PLC γ のリン酸化を引き起す。その結果、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、カルシニューリンを介して NFATc1 の活性化及び自己増幅が誘導される。今回、RANK-RANKL 刺激下に BTK/TEC 経路が存在し、ITAM 下流 SYK によってアダプタータンパク質のリン酸化が抑制されても、BTK/TEC によって下流にシグナルが伝達されることが示唆された。

2 RANKL 惹起骨破壊モデルにおけるチラブルチニブの作用

BTK 阻害剤であるチラブルチニブが、優れた選択性を有することによって RANKL によって誘導される破骨細胞分化を効果的に抑制し、強力に骨破壊を抑制することが示唆されたことから、破骨細胞分化の主要因子である RANKL 惹起による骨破壊モデルにおいてチラブルチニブが直接的に作用するかを検討した。本モデルは、短期に破骨細胞分化及び成熟破骨細胞による骨吸収を誘導することで骨破壊を惹起するモデルとして知られており⁷⁸⁾、イブルチニブが本モデルで骨破壊を抑制することが報告されている⁷⁹⁾。また、本モデルにてトファシチニブ並びにフォスタマチニブとの作用比較を実施した。

2.1 実験材料及び方法

2.1.1 被験物質

チラブルチニブ及びフォスタマチニブは 0.5%MC に懸濁し、トファシチニブは 0.5% MC/0.025%Tween20 に懸濁して使用した。Anti-Human RANKL Monoclonal Antibody (以下、抗 RANKL 抗体、オリエンタル酵母工業) は用時 PBS に希釈して使用した。

2.1.2 RANKL 惹起骨破壊モデルの作製

7週齢の雌性 C57BL/6NCrCrIj マウス (日本チャールス・リバー株式会社) に Human sRANKL (オリエンタル酵母工業) を 24 時間毎に計 3 回腹腔内投与することで骨破壊を惹起した。被験物質又は媒体を惹起初日から 1 日 2 回、計 5 回経口投与した。RANKL 惹起後、経時的に、保定したマウスの下腹部を圧迫することにより尿を採取した。また、最終惹起の 1.5 時間後にイソフルラン麻酔下にて血液を採取し血清を調製した。マウスを放血致死により安楽死させた後大腿骨を摘出した。

2.1.3 血清中 TRAP の測定

Mouse TRACP5b ELISA (ImmunoDiagnostics) を使用し、添付の説明書に準じて実施し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M5e, Molecular Devices) を用いて測定した。

2.1.4 尿中 CTx 濃度測定

RatLaps ELISA (ImmunoDiagnostics) を使用し、添付の説明書に準じて測定した。また、同一検体の尿中クレアチニン (CRE) 濃度を Creatinine Microplate Assay (Oxford Biomedical Research) を用いて測定し、次式により尿中 CTx 濃度を算出した。

$$\text{尿中 CTx 濃度 } (\mu\text{ g/mmol CRE}) = \text{CTx 値 } (\mu\text{ g/L}) / \{\text{CRE 濃度 } (\text{mg/dL}) \times 0.088\}$$

2.1.5 骨密度測定 (pQCT)

大腿骨を測定容器に入れ、XCT Research SA+ (software version 5.50、Stratec Medizintechnik GmbH) を用いて大腿骨遠位骨幹端部 (大腿骨遠位成長板から近位方向に 0.6 mm の位置) の骨密度を測定した。海綿骨密度の算出は、contour mode 2、peel mode 20、対全骨断面積比 35%で行った。

2.1.6 骨梁構造解析 (μ CT)

右大腿骨遠位端部について、コーンビームマイクロ CT スキャナー μ CT40 (Scanco Medical) および付属のワークステーション AlfaStation DS10 (COMPAQ) ならびに解析ソフト Image Language (IPL、ver.3.1) を用いて解析した。大腿骨を測定容器に入れ、X線源にて大腿骨遠位成長板から 0.5 mm の位置から近位方向へ 0.012 μ m のスライス厚で 34 枚撮影し、二次元スライス画像を作成した。関心領域 (VOI) は、大腿骨遠位部の海綿骨領域を選択した。骨梁成分と骨髄成分をしきい値 182 として三次元画像を構築し、骨微細構造の各パラメータを得た。同様に、大腿骨遠位成長板から 0.5 mm の位置から近位方向へ 0.012 μ m のスライス厚で 58 枚撮影し、全骨の三次元画像を取得した。

2.2 実験結果

RANKL 惹起骨破壊モデルにおいてチラブルチニブ、トファシチニブ及び抗 RANKL 抗体を評価した際の骨密度及び血清中 TRACP5b 濃度を図 21 に示した。抗 RANKL 抗体は RANKL 惹起による骨密度低下及び血清中 TRACP5b 濃度上昇をほぼ完全に抑制した。本系において、チラブルチニブは用量依存的に骨密度の低下及び血清中 TRACP5b 濃度上昇を抑制し、3、10 及び 30 mg/kg 投与群の抑制率はそれぞれ 59.5、76.2、86.1%及び 42.7、58.6、74.8%であった。一方、トファシチニブはいずれの評価においても抑制作用を示さなかった。次に、 μ CT による骨梁構造解析の結果を図 22 に示した。RANKL 惹起によって骨量、連結性、骨梁数、骨梁幅の減少、骨梁間距離

の増大、板状から棒状への構造変化が認められた。これら骨梁構造パラメータの悪化を抗 RANKL 抗体はほぼ完全に抑制し、チラブルチニブ (30 mg/kg, b.i.d.) の抑制率はそれぞれ 49.8~102.2%であった。トファシチニブは骨梁構造パラメータの悪化を抑制しなかった。

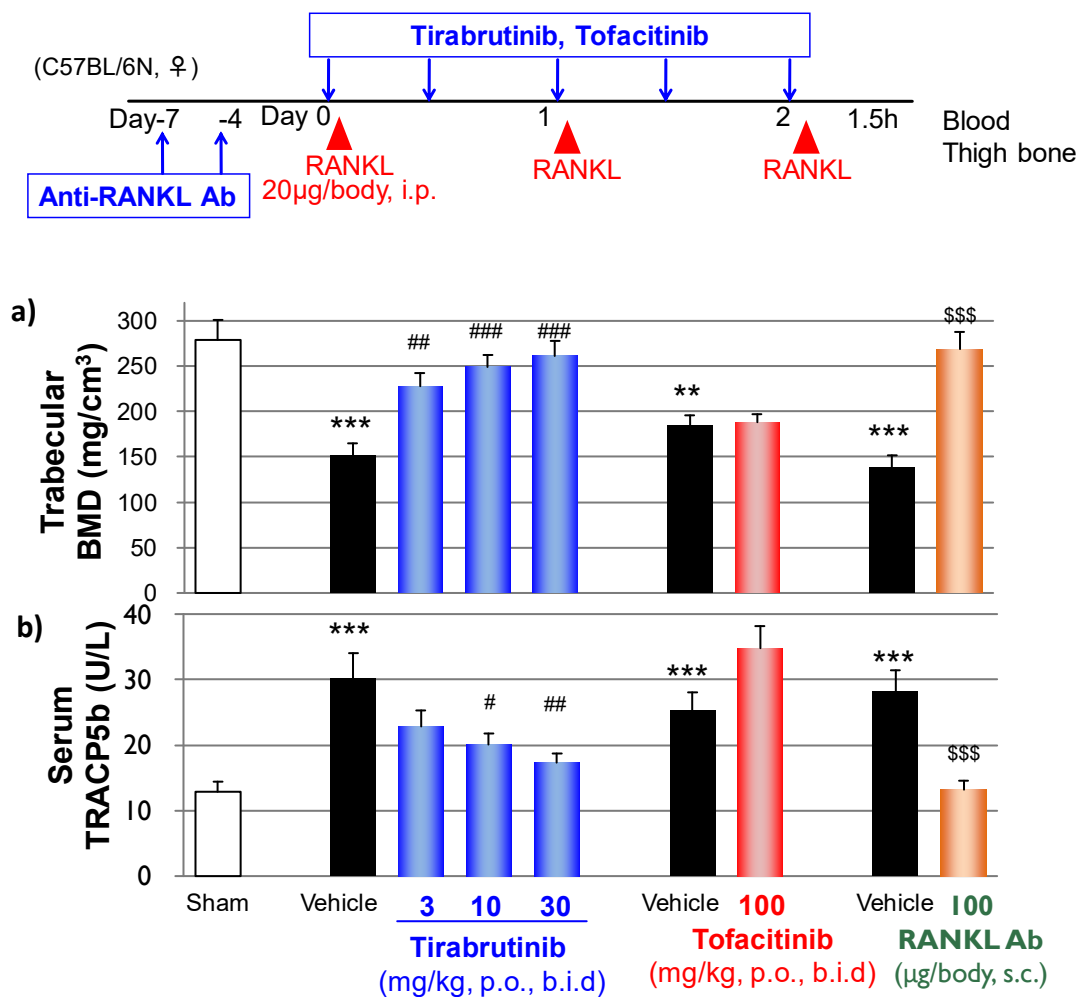


図 21 RANKL 惹起骨破壊モデルにおけるチラブルチニブ及びトファシチニブの作用
 雌性 C57BL/6N マウスに RANKL を 24 時間毎に計 3 回腹腔内投与することで骨破壊を惹起した。チラブルチニブ及びトファシチニブは 1 日 2 回、Day 0~2 の計 5 回経口投与した。抗 RANKL 抗体は Day -7 及び -4 の計 2 回皮下投与した。最終惹起の 1.5 時間後に採血及び大腿骨を摘出した。大腿骨遠位端部の骨密度を pQCT 法により測定した。血清中 TRACP5b 濃度は ELISA により測定した。各群 10 例の平均値±標準誤差を示した。**, ***: p<0.05, p<0.001 vs sham 群。#, ### : p<0.05, p<0.001 vs vehicle 群。

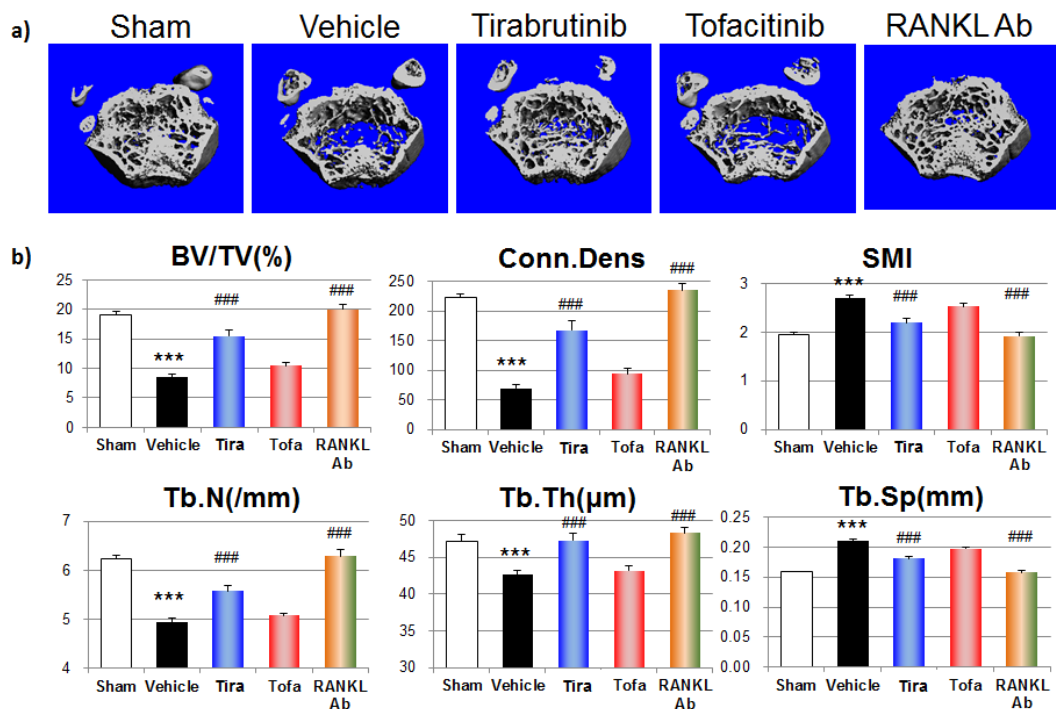


図 22 RANKL 惹起骨破壊モデルにおける骨梁構造解析

雌性 C57BL/6N マウスに RANKL を 24 時間毎に計 3 回腹腔内投与することで骨破壊を惹起した。チラブルチニブ 30 mg/kg 及びトファシチニブ 100 mg/kg は 1 日 2 回、Day 0~2 の計 5 回経口投与した。抗 RANKL 抗体は Day -7 及び -4 の計 2 回皮下投与した。最終惹起の 1.5 時間後に大腿骨を摘出した。大腿骨遠位端部について、 μ CT による骨梁構造解析を行い、三次元画像を取得した。各群 10 例の平均値±標準誤差を示した。***: $p < 0.001$ vs sham 群。###: $p < 0.001$ vs vehicle 群。

BV/TV : Bone volume/Tissue volume (骨量、%)

Conn.Dens : Connective Density (骨連結性)

SMI : Structure Model Index (骨梁形態、板状 : 0、棒状 : 3 として 0~3 で構造を評価)

Tb.N : Trabecular Number (骨梁数、/mm)

Tb.Th : Trabecular Thickness (骨梁幅、 μ m)

Tb.Sp : Trabecular Separation (骨梁間距離、mm)

次に、RANKL 惹起骨破壊モデルにおいてチラブルチニブ及びフォスタマチニブを評価し、骨密度及び血清中 TRACP5b 濃度を図 23 に示した。チラブルチニブは前試験と同様に、RANKL 惹起による骨密度低下及び血清中 TRACP5b 濃度上昇を抑制し、再現性を確認した。また、骨密度低下及び血清中 TRACP5b 濃度上昇に対するチラブルチニブ 1, 3 及び 30 mg/kg 群の抑制率はそれぞれ 40.4、64.5、90.1%及び 29.4、62.8、69.5%であった。一方、フォスタマチニブによる骨密度低下及び血清中 TRACP5b 濃度

上昇に対する抑制率は、それぞれ 23.7 及び 1.0%であり、ヒト破骨前駆細胞分化抑制活性と同様、骨破壊抑制作用は弱いものであった。

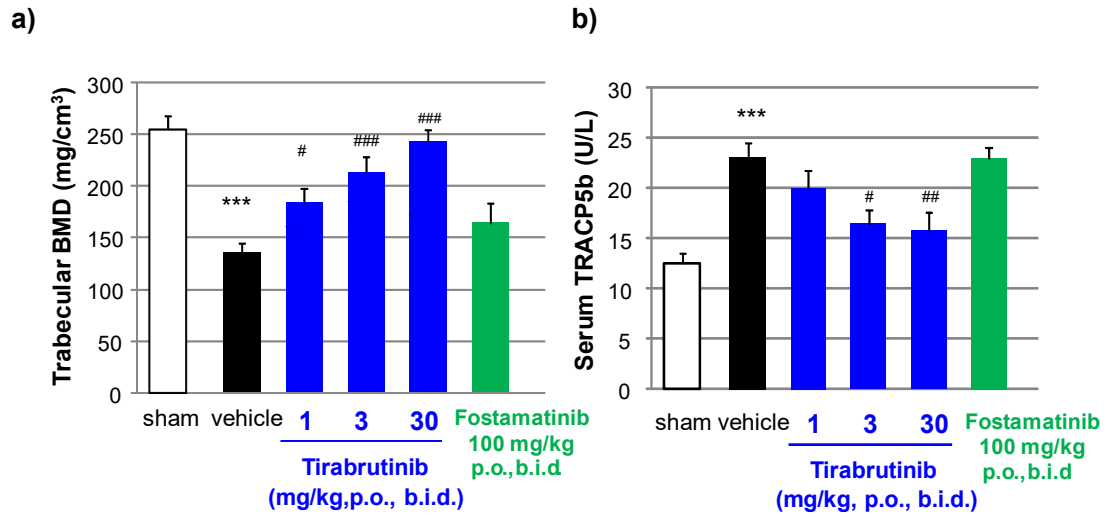


図 23 RANKL 惹起骨破壊モデルにおけるフォスタマチニブとの比較

雌性 C57BL/6N マウスに RANKL を 24 時間毎に計 3 回腹腔内投与することで骨破壊を惹起した。チラブルチニブ及びフォスタマチニブは各用量で 1 日 2 回、計 5 回経口投与した。最終惹起の 1.5 時間後に採血及び大腿骨を摘出した。a) 大腿骨遠位端部の骨密度を pQCT 法により測定した。b) 血清中 TRACP5b 濃度は ELISA により測定した。各群 10 例の平均値±標準誤差を示した。***: $p < 0.001$ vs sham 群。#, ##, ###: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs vehicle 群。

次に尿中 CTx に対するチラブルチニブの作用を図 24 に示した。初回惹起 5、24 時間及び 2 回目惹起 5 時間後における媒体群の CTx 濃度は sham 群と比較して 1.6、2.8 及び 4.0 倍の経時的な CTx 産生増加が認められた。各ポイントにおけるチラブルチニブの抑制率は 59.5、71.6 及び 64.8%であった。

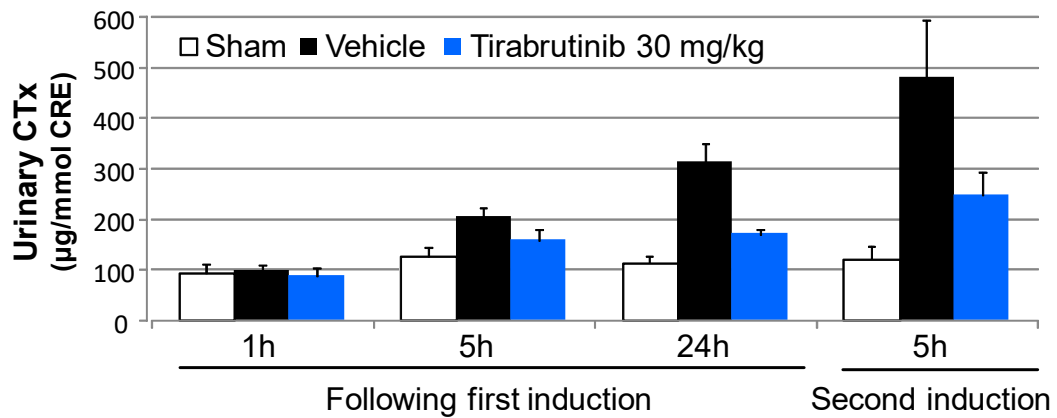


図 24 RANKL 惹起骨破壊モデルにおける尿中 CTx

雌性 C57BL/6N マウスに RANKL を 24 時間毎に計 3 回腹腔内投与することで骨破壊を惹起した。チラブルチニブは 30 mg/kg の用量で 1 日 2 回、計 5 回経口投与した。初回惹起の 1、5、24 時間後及び 2 回目惹起の 5 時間後に採尿し、尿中 CTx 濃度は ELISA により測定した。各群 4~10 例の平均値±標準誤差を示した。

2.3 考察

チラブルチニブは用量依存的に RANKL 惹起による骨密度の低下及び血清中 TRACP5b 濃度の上昇を抑制した。この作用は抗体産生モデルや CIA モデルの有効用量と同程度の投与量にて認められており、チラブルチニブは B 細胞や炎症細胞を制御するのと同程度の用量において破骨細胞を制御できると考えられる。また、チラブルチニブによる骨破壊の抑制作用は、抗 RANKL 抗体に迫る強度であり、BTK 及び TEC が RANKL シグナルの重要な因子であることを示唆している。

一方、SYK 阻害剤であるフォスタマチニブの骨破壊抑制作用は 2 割程度と弱く、*in vitro* ヒト破骨細胞分化に対する作用と同様の結果であり、RANKL-RANK シグナルにおいては、SYK は BTK の上流に位置しない可能性が示唆された。その一方で、SYK ノックアウトマウス由来の破骨前駆細胞や、選択的 SYK 阻害剤を処置した細胞では、RANKL 及び M-CSF 刺激による破骨細胞への分化が抑制されることが報告されており⁸⁰⁾⁻⁸²⁾、今回の結果とは矛盾がある。本試験で用いたフォスタマチニブの投与量は、マウス CIA モデルで有効性が認められている用量であり（データ非提示）、生体内にて SYK を阻害していると考えられるものの、その阻害が、SYK 阻害によって破骨細胞を制御する閾値には達していない可能性も否定できない。フォスタマチニブ以外に選択的 SYK 阻害剤を用い、細胞毒性や生体への毒性が認められない用量において SYK を十分に抑制した条件での解析を行う必要があると考えている。

トファシチニブは本系にて有効性を示さなかった。これは、*in vitro* において、RANKL 惹起による破骨細胞分化を抑制しない結果と一致したものである。トファシチニブは、RA 患者において関節の構造破壊を抑制すること、関節炎の動物モデルにおいても関節破壊を抑制することが知られている。その機序として、T 細胞からの RANKL 産生を抑制することや⁸³⁾、TNF α や IL-6 等のサイトカインによる破骨細胞様細胞への分化を抑制すること⁸⁴⁾が示唆されており、トファシチニブは RANK シグナルの直接的な制御とは異なる機序によって構造破壊を抑制すると考えられる。

チラブルチニブは生体内で RANKL-RANK 系路を制御し、トファシチニブとは異なる作用機序にて、骨破壊を抑制できる魅力的な薬剤になる可能性がある。一方、XLA 患者の解析から、患者由来の破骨細胞は骨吸収活性が低いことが明らかになっているが、それにもかかわらず、生体において骨密度や骨吸収パラメータは正常範囲であることが報告されている⁸⁵⁾⁸⁵⁾。これは、XLA による抗体産生の低下に伴い感染がおり、炎症性サイトカインである TNF α 、IL-6 等が増加して骨吸収を促進するため、直接的な骨吸収抑制活性が打ち消されると考えられている⁸⁶⁾。自己免疫疾患などの病態時は

免疫系が活性化している状態であり、チラブルチニブによる免疫系の抑制作用とあわせて骨破壊の抑制作用が発揮されると考えられる。以上より、チラブルチニブが自己免疫疾患患者において実際にどの程度の骨破壊抑制作用を示せるかは今後の検討が待たれるが、チラブルチニブがそのその魅力的な作用を発揮して病態の制御に貢献できることを願う。

第3章まとめ

- チラブルチニブは優れたキナーゼ選択性により、破骨細胞において他のシグナル阻害剤とは異なり強い効果を示した。
- チラブルチニブは、RANKL 惹起骨破壊モデルにて、骨破壊を抑制した。炎症抑制に基づく間接的なものではなく、チラブルチニブの直接的な破骨細胞の活性化抑制効果を確認した。

総括

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- チラブルチニブはB細胞並びに種々の炎症細胞、破骨細胞の機能を制御する。
- チラブルチニブはB細胞機能の特徴である抗体産生及び分化の制御、また、炎症細胞の活性化並びに破骨細胞の分化を制御することにより、全身性エリテマトーデスや関節リウマチに代表される自己免疫疾患の病態モデルで有効性を示す。
- チラブルチニブは他のシグナル阻害剤とは異なる作用機序に基づき、強い骨破壊抑制作用を示す。

本研究にて見いだされた知見より、キナーゼ選択性に優れたチラブルチニブが、その多彩な作用及び利便性を発揮することにより、自己免疫疾患に苦しむ患者さんの一助となることを願う。

【参考文献】

- 1) “Fact Sheets, Autoimmune Diseases” National institute of environmental and health sciences. https://www.niehs.nih.gov/health/materials/autoimmune_diseases_508.pdf (accessed 2019-06-16)
- 2) Kondo T, Amano K. Era of steroid sparing in the management of immune-mediated inflammatory diseases. *Immunol Med.* 2018;41:6-11.
- 3) Bakshi J, Segura BT, Wincup C, Rahman A. Unmet Needs in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;55:352-67.
- 4) Didona D, Maglie R, Eming R, Hertl M. Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies. *Front Immunol.* 2019;10:1418.
- 5) Henry J, Gottenberg JE, Rouanet S, Pavy S, Sellam J, Tubach F, et al. Auto-Immunity and Rituximab investigators. Doses of rituximab for retreatment in rheumatoid arthritis: influence on maintenance and risk of serious infection. *Rheumatology* 2018;57:538-47.
- 6) Qin Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene* 2000;19:5651-61.
- 7) Kurosaki T, Hikida M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev* 2009;228:132-48.
- 8) Geneviev HC, Hinshelwood S, Gaspar HB, Rigley KP, Brown D, Saeland S, et al. Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *European journal of immunology.*1994;24:3100-5.
- 9) Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nature reviews* 2013;13:578-91.
- 10) Kenny EF, Quinn SR, Doyle SL, Vink PM, van Eenennaam H, O'Neill LA. Bruton's tyrosine kinase mediates the synergistic signalling between TLR9 and the B cell receptor by regulating calcium and calmodulin. *PLoS ONE* 2013;8:e74103.
- 11) de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2590-4.
- 12) Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature reviews. Cancer* 2014;14:219-32.
- 13) Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009;27:199-227.

- 14) Conley ME, Rohrer J, Rapalus L, Boylin EC, Minegishi Y. Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse. *Immunological reviews* 2000;178:75-90.
- 15) Nomura K, Kanegane H, Karasuyama H, Tsukada S, Agematsu K, Murakami G, et al. Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway. *Blood* 2000;96:610-7.
- 16) Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72:279-90.
- 17) Wang SP, Iwata S, Nakayamada S, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kondo M, et al. Amplification of IL-21 signalling pathway through Bruton's tyrosine kinase in human B cell activation. *Rheumatology*. 2015;54:1488-97.
- 18) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews* 2008;8:34-47.
- 19) Xu D, Kim Y, Postelnek J, Vu MD, Hu DQ, Liao C, et al. RN486, a selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor, abrogates immune hypersensitivity responses and arthritis in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341:90-103.
- 20) Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, et al. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nature chemical biology* 2011;7:41-50.
- 21) Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* 2008;132:794-806.
- 22) Walter HS, Rule SA, Dyer MJ, Karlin L, Jones C, Cazin B et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood*. 2016;127:411-9.
- 23) Yasuhiro, T., Sawada, W., Klein, C., Kozaki, R., Hotta, S., Yoshizawa, T. Anti-tumor efficacy study of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ONO/GS-4059, in combination with the glycoengineered type II anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) demonstrates superior in vivo efficacy compared to ONO/GS-4059 in combination with rituximab. *Leuk Lymphoma* 2017;58:699–707.

- 24) A. Berglöf, A. Hamasy, S. Meinke, M. Palma, A. Krstic, R. Månsson, et al. Targets for Ibrutinib Beyond B Cell Malignancies. *Scand J Immunol.* 2015;82:208–17.
- 25) IMBRUVICA®, Pharmacyclics LLC. IMBRUVICA® (ibrutinib) capsules, for oral use. US Prescribing Information (USPI). Sunnyvale, CA. Revised: February. 2018
- 26) Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Louny D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:13075–80.
- 27) Shatzel JJ, Olson SR, Tao DL, McCarty OJT, Danilov AV, DeLoughery TG. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *J Thromb Haemost.* 2017;15:835-47.
- 28) Owen C, Berinstein NL, Christofides A, Sehn LH. Review of Bruton tyrosine kinase inhibitors for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Curr Oncol.* 2019;26:e233-e240.
- 29) Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G, et al. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 1995;3:283-99.
- 30) Kerner JD, Appleby MW, Mohr RN, Chien S, Rawlings DJ, Maliszewski CR, et al. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity* 1995;3:301-12.
- 31) Vinuesa CG, Sunners Y, Pongracz J, Ball J, Toellner KM, Taylor D, et al. Tracking the response of Xid B cells in vivo: TI-2 antigen induces migration and proliferation but Btk is essential for terminal differentiation. *Eur J Immunol* 2001;3:1340-50.
- 32) Ellmeier W, Jung S, Sunshine MJ, Hatam F, Xu Y, Baltimore D, Mano H, Littman DR. Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk. *J Exp Med.* 2000;192:1611-24.
- 33) Evans EK, Tester R, Aslanian S, Karp R, Sheets M, Labenski MT, et al. Inhibition of Btk with CC-292 provides early pharmacodynamic assessment of activity in mice and humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;346:219-28.
- 34) Hostmann A, Jacobi AM, Mei H, Hiepe F, Dorner T. Peripheral B cell abnormalities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008,17: 1064-1069.
- 35) Cheng Lay. The Causes and predictors of mortality in biopsyproven lupus nephritis: the Sarawak experience. *Clin Kidney* 2018;J 11:56-61.

- 36) Stohl W, Hilbert DM. The discovery and development of belimumab: the anti-BLyS–lupus connection. *Nat Biotechnol.* 2012;30: 69–77.
- 37) Du Y, Sanam S, Kate K, Mohan C. Animal models of lupus and lupus nephritis. *Curr Pharm Des* 2015;21:2320-49.
- 38) Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, More L. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:271694.
- 39) Li W, Titov AA, Morel L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29:434-41.
- 40) Ramanujam M, Wang X, Huang W, Liu Z, Schiffer L, Tao H. Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest.* 2006;116:724–34.
- 41) Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, Wang H, Lee W, French DM. BAFF/BLyS Receptor 3 Binds the B Cell Survival Factor BAFF Ligand through a Discrete Surface Loop and Promotes Processing of NF- κ B2. *Immunity*, 2002;10:515–24.
- 42) B J Steinberg, P A Smathers, K Frederiksen, A D Steinberg. Ability of the xid gene to prevent autoimmunity in (NZB X NZW)F1 mice during the course of their natural history, after polyclonal stimulation, or following immunization with DNA. *J Clin Invest.* 1982;70: 587–97.
- 43) Jenks SA, Sanz I. Altered B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2009;8:209-13.
- 44) Kil LP, de Bruijn MJ, van Nimwegen M, Corneth OB, van Hamburg JP and Dingjan GM, et.al. Btk levels set the threshold for B-cell activation and negative selection of autoreactive B cells in mice. *Blood.* 2012;119:3744-56
- 45) Gensous N, Schmitt N, Richez C, Ueno H, Blanco P. T follicular helper cells, interleukin-21 and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2017;56: 516-523.
- 46) Hostmann A, Jacobi AM, Mei H, Hiepe F, Dorner T. Peripheral B cell abnormalities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17: 1064-1069.
- 47) Bergtold A, Gavhane A, D'Agati V, Madaio M, Clynes R. FcR-Bearing Myeloid Cells Are Responsible for Triggering Murine Lupus Nephritis. *J Immunol* 2006;177:7287-95.
- 48) Chalmers SA, Chitu V, Herlitz LC, Sahu R, Stanley ER, Putterman C. Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies. *J Autoimmun.* 2015;57:42-52.

- 49) Chalmers SA, Doerner J, Bosanac T, Khalil S, Smith D, Harcken C. Therapeutic Blockade of Immune Complex-Mediated Glomerulonephritis by Highly Selective Inhibition of Bruton's Tyrosine Kinase. *Sci Rep.* 2016;19:26164.
- 50) Alasdair MG, Michael AB. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol* 2011;31:475-529.
- 51) Margaret EW, Julianne KH, Melissa AB. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: Evidence for a common mechanism of action? *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1822:57-65.
- 52) David ML, Daniel SF, Michael FG, Christophe B, Diane M, Michael BB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Scirnce* 2002;297:1689-92.
- 53) Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Miller R, Goldring SR, Choi Y, et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001;159:1689-99.
- 54) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitor. *Nat Prot* 2006;1:2178-83.
- 55) 岡山 吉道, 佐々木 朋美, 斎藤 博久, 羅 智靖. ヒト肥満細胞の培養法と多様性 *アレルギー* 2009;58:772-8.
- 56) Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc γ receptor I and Fc γ receptor II. *Arthritis Rheum.* 2013;65:109-19.
- 57) Bolland S, Pearse RN, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity.* 1998;8:509-16.
- 58) Tzeng SJ, Li WY, Wang HY. Fc γ RIIB mediates antigen-independent inhibition on human B lymphocytes through Btk and p38 MAPK. *J Biomed Sci.* 2015;22:87.
- 59) "Highlights of prescribing information" XOLAIR® (omalizumab) injection, for subcutaneous use. U.S. Food & Drug administration.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/103976s5234lbl.pdf#page=33
(Accessed 2019-08-01)
- 60) Yamanaka H, Sugiyama N, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S. Estimates of the prevalence of and current treatment practices for rheumatoid arthritis in Japan using reimbursement

- data from health insurance societies and the IORRA cohort (I). *Mod Rheumatol*. 2014;24:33-40.
- 61) Agarwal SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm* 2011;17:S14-8.
 - 62) Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363: 675-81.
 - 63) Porter D, van Melckebeke J, Dale J, Messow CM, McConnachie A, Walker A, et al. Tumour necrosis factor inhibition versus rituximab for patients with rheumatoid arthritis who require biological treatment (ORBIT): an open-label, randomised controlled, non-inferiority, trial. *Lancet*. 2016;388:239-47.
 - 64) Silverman GJ, Boyle DL. Understanding the mechanistic basis in rheumatoid arthritis for clinical response to anti-CD20 therapy: the B-cell roadblock hypothesis. *Immunol Rev*. 2008;223:175-85.
 - 65) Harigai M, Tanaka Y, Maisawa S; JA21963 Study Group. Safety and efficacy of various dosages of ocrelizumab in Japanese patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to methotrexate therapy: a placebo-controlled double-blind parallel-group study. *J Rheumatol*. 2012;39:486-95.
 - 66) Tachi T, Yasuda M, Usui K, Umeda M, Nagaya K, Osawa T, et al. Risk factors for developing infusion reaction after rituximab administration in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Pharmazie*. 2015;70:674-7.
 - 67) Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, Steeber DA, St Clair EW, Tedder TF. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol*. 2007;179:1369-80.
 - 68) Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol*. 2004;137: 65–73.
 - 69) Gillooly KM, Pulicicchio C, Pattoli MA, Cheng L, Skala S, Heimrich EM, et al. Bruton's tyrosine kinase inhibitor BMS-986142 in experimental models of rheumatoid arthritis enhances efficacy of agents representing clinical standard-of-care. *PLoS One*. 2017;12:e0181782.

- 70) Park JK, Byun JY, Park JA, Kim YY, Lee YJ, Oh JI, et al. HM71224, a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor, suppresses B cell and monocyte activation and ameliorates arthritis in a mouse model: a potential drug for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:91.
- 71) Haselmayer P, Camps M, Liu-Bujalski L, Nguyen N, Morandi F, Head J, Efficacy and Pharmacodynamic Modeling of the BTK Inhibitor Evobrutinib in Autoimmune Disease Models. *J Immunol* 2019; 202:2888-2906.
- 72) "Highlights of prescribing information" Prolia® (denosumab) injection, for subcutaneous use. U.S. Food & Drug administration.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/125320s198lbl.pdf#page=30
 (Accessed 2019-08-01)
- 73) 一般社団法人日本リウマチ学会 調査研究委員会 生物学的製剤使用ガイドライン 策定小委員会：関節リウマチに対するデノスマブ使用ガイドライン、2018年4月25日
- 74) Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med.* 2005;202:1261–1269.
- 75) Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 2004;428:758-63.
- 76) Kim HJ, Zhang K, Zhang L, Ross FP, Teitelbaum SL, Faccio R. The Src family kinase, Lyn, suppresses osteoclastogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:2325-30.
- 77) Yoon SH, Lee Y, Kim HJ, Lee ZH, Hyung SW, Lee SW, et al. Lyn inhibits osteoclast differentiation by interfering with PLCgamma1-mediated Ca²⁺ signaling. *FEBS Lett.* 2009;583:1164-70.
- 78) Tomimori Y, Mori K, Koide M, Nakamichi Y, Ninomiya T, Udagawa N, et al. Evaluation of pharmaceuticals with a novel 50-hour animal model of bone loss. *J Bone Miner Res* 2009;24:1194-205.
- 79) Shinohara M, Chang BY, Buggy JJ, Nagai Y, Kodama T, Asahara H et al. The orally available Btk inhibitor ibrutinib (PCI-32765) protects against osteoclast-mediated bone loss. *Bone.* 2014;60:8-15.

- 80) Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6158-63.
- 81) Csete D, Simon E, Alatshan A, Aradi P, Dobó-Nagy C, Jakus Z, et al. Hematopoietic or Osteoclast-Specific Deletion of Syk Leads to Increased Bone Mass in Experimental Mice. *Front Immunol*. 2019;10:937.
- 82) Hayashi H, Kaneko R, Demizu S, Akasaka D, Tayama M, Harada T, et al. TAS05567, a Novel Potent and Selective Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor, Abrogates Immunoglobulin-Mediated Autoimmune and Allergic Reactions in Rodent Models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018;366:84-95.
- 83) LaBranche TP, Jesson MI, Radi ZA, Storer CE, Guzova JA, Bonar SL, et al. JAK inhibition with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. *Arthritis Rheum*. 2012;64:3531-42.
- 84) Yokota, K., et al.: Combination of tumor necrosis factor α and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:121-29.
- 85) Mohebbi A, Azizi G, Tavakolinia N, Abbasi F, Sayarifard F, Karimipour M, et al. Comparison of Bone Mineral Density in Common Variable Immunodeficiency and X-Linked Agammaglobulinaemia Patients. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2017;17:134-140.
- 86) Danks L1, Workman S, Webster D, Horwood NJ. Elevated cytokine production restores bone resorption by human Btk-deficient osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2011;26:182-92.

謝辞

本論文を発表する機会を与えていただき、その発表並びに作成にあたり、ご指導を賜りました北海道大学大学院 薬学研究院 衛生化学研究室 松田 正 教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

本論文を審査いただき、貴重なご助言を賜りました北海道大学大学院 薬学研究院 薬物動態学研究室 菅原 満 教授、同 衛生化学研究室 室本 竜太 講師、国際医療福祉大学大学院 医学研究科 血液内科学 織谷 健司 教授に謹んで感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり貴重なご助言を賜りました北海道大学大学院 薬学研究院 衛生化学研究室 柏倉 淳一 講師に心より深く感謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、研究の遂行並びに本論文の発表にあたり、終始貴重なご助言と多大なご支援をいただきました小野薬品工業株式会社 研究本部の皆様に心より深く感謝申し上げます。

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、ご協力頂きました全ての皆様に心より感謝申し上げます。

2019年8月