HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	臓器移植における抗ドナー特異的抗体産生に対するPI3Kδ選択的阻害剤の抑制効果
Author(s)	丸井, 崇則
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7107号
Issue Date	2020-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7107
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79710
Type	doctoral thesis
File Information	Takanori_Marui.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

臓器移植における抗ドナー特異的抗体産生に対する PI3Kδ 選択的阻害剤の抑制効果

丸井　崇則

目次

略語表

I 緒言 …… 1

II 方法

1. 動物 …… 11

2. 試験化合物 …… 11

3. キナーゼ阻害アッセイ …… 12

4. Akt リン酸化アッセイ …… 13

5. B 細胞増殖アッセイ …… 14

6. MHC クラス II 発現抑制 …… 16

7. ラット *ex vivo* MHC クラス II 発現抑制試験 …… 17

8. ラット T 細胞依存的抗体産生モデル …… 18

9. ラット T 細胞非依存的抗体産生モデル …… 18

10. ラットリコール応答抗体産生モデル …… 19

11. ラット心臓移植モデル …… 20

12. ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデル …… 22

13. サル *ex vivo* MHC クラス II 発現抑制試験 …… 23

14. サル破傷風トキソイド免疫モデル …… 23

15. サル腎臓移植モデル …… 24

16. 統計分析 ……..…….. 25

III 結果

1. AS2541019 の *in vitro* プロファイル ……..…… 27

2. B 細胞 MHC クラス II 発現抑制 …… 30

3. ラット *ex vivo* 試験における B 細胞活性阻害 …….. 32

4. ラット抗体産生抑制 ……... 34

5. ラットリコール応答による抗体産生抑制 ……... 36

6. ラット同種間心臓移植モデルにおける DSA 産生抑制 …….. 39

7. ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルにおける効果 …... 41

8. サル *ex vivo* 試験における B 細胞活性阻害 …….. 44

9. サル破傷風トキソイド免疫モデルにおける抗体産生抑制 ……..….. 46

10. サル腎臓移植モデルにおける DSA 産生抑制 ……..…… 48

IV 考察 ……..……... 52

V 結論 ……...…… 64

VI 謝辞 ……...… 66

VII 引用文献 ……...… 67

VIII 英語抄録 ……... 75

略語表

AMR	Antibody-mediated rejection
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosine triphosphate
AUC	Area under the curve
CNI	Calcineurin inhibitor
DNP	Dinitrophenylate
DSA	Donor-specific antibody
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HLA	Human leukocyte antigen
IMPDH	Inosine-5’-monophosphate dehydrogenase
IVIG	Intravenous immunoglobulin
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex

MMF	Mycophenolate mofetil
MZ	Marginal zone
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP_3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PP	Plasmapheresis
SLE	Systemic lupus erythematosus
TNP	Trinitrophenylate
dsDNA	double-strand DNA

I　緒言

臓器不全に陥った場合には種々の治療が施されるが、今のところ臓器移植を実施することが唯一の根本的治療法である。臓器移植を実施した場合、移植された臓器は自己と非自己を判別する免疫反応によって拒絶される。これは主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) が個人間で異なっているためであり、MHCの異なる細胞、その細胞から構成される組織・臓器は非自己と判別され、レシピエント患者の免疫反応により拒絶反応が誘導される。移植された臓器を構成する組織の一部は、レシピエント体内のマクロファージなどの抗原提示細胞によって貪食され、$CD4^+$ helper T 細胞に抗原の情報が提示される (抗原提示)。抗原を認識した $CD4^+$ helper T 細胞は活性化し、様々な免疫反応を誘導するサイトカインを産生する。サイトカインによって $CD8^+$ killer T 細胞が活性化し、臓器または組織に対して直接攻撃し、移植臓器に対する拒絶反応が起きる。$CD8^+$ killer T 細胞による拒絶反応は急性拒絶と呼ばれ、移植後 3〜4 ヶ月の間に起こる反応である。レシピエント患者の免疫反応を抑制する免疫抑制剤には様々な作用機序を有する物質が知られているが、現在の移植医療で標準的に使用されているのが、カルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitor: CNI) およびイノシン一リン酸デヒドロゲナーゼ (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: IMPDH) 阻害剤である。カルシニューリンは T 細胞の活性化に重要な役割を果たす。T 細胞が T 細胞受容体の刺激により活性化すると細胞内に Ca^{2+} が流入し、これによ

りカルシニューリンが活性化する。活性化したカルシニューリンは転写因子である NF-AT (Nuclear factor of activated T cells)を脱リン酸化することにより核内移行を誘導し、この NF-AT により Interleukin-2 (IL-2)など T 細胞の機能として重要なサイトカインが産生される。CNI によりサイトカインの産生が抑制されると、本来 T 細胞が持つ免疫機構の誘導が行われなくなる (Azzi *et al.*, 2013)。この CNI で代表的な医薬品として、シクロスポリンおよびタクロリムス知られている (Ruhlmann and Nordheim, 1997)。一方、IMPDH は核酸の合成に必要な酵素であり、イノシン一リン酸をキサントシン一リン酸に変換し、このキサントシン一リン酸がさらにグアノシン一リン酸に変換される (Allison and Eugui, 2000)。このグアノシン一リン酸がグアニンの合成に必要であるため、IMPDH を抑制することでプリン代謝が阻害され、細胞増殖が抑制される。代表的な IMPDH 阻害剤としてミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil: MMF) が知られており (Behrend, 1998)、臓器移植時の免疫抑制剤として使用されている。これらの薬物により、臓器移植後急性期に起こる T 細胞媒介性の急性拒絶反応が起こらないようにコントロールされ、その使用については、現在の移植医療において既に確立されている。また、獣医療において、ネコの死因として 30-50 %を占める慢性腎臓病は臨床的に特に問題となる疾患である。ネコの慢性腎臓病に対する根本的治療法は存在せず、しかもその有病率は年々増加している (Brown *et al.*, 2016)。腎臓移植を行うことが根本的治療法となるため、腎臓移植法が確立されることが期待されている。しかし、腎臓移植を実施したレシピエントネコの生存率は 6 か月後に約 65 %、

3 年後に約 40%と低く (Schmiedt *et al.*, 2008)、免疫抑制剤の使用方法を標準化し、生着率を上げることが課題となっている。

移植臓器の長期に渡る生着の達成は未だ不十分である。これは、CNI と IMPDH 阻害剤で急性拒絶を抑制しても、移植臓器に対する慢性拒絶が発症するためであり、慢性拒絶を抑制することが現在の移植医療における重要な課題である (Kreis and Ponticelli, 2001; Arias *et al.*, 2011)。この慢性拒絶の原因の 1 つは、ドナー特異的抗体 (Donor-specific antibody: DSA) の産生によって引き起こされる抗体関連性拒絶 (Antibody-mediated rejection: AMR)である (Gloor *et al.*, 2008; Valenzuela and Reed, 2017)。AMR が起こる機序は以下の通りである。まず、抗原提示細胞により移植臓器の一部が貪食され、移植組織由来抗原が細胞表面に提示される。この抗原はレシピエントの T 細胞によって非自己として認識され、T 細胞が活性化する。さらに、活性化 T 細胞との相互作用によって活性化した抗原特異的な B 細胞がプラズマ細胞へと分化することにより、DSA が産生される。臓器移植では、主に移植組織の MHC が抗原となることから、DSA は主に MHC に特異的である。DSA が結合した移植臓器は、補体依存性細胞障害または抗体依存性細胞障害により障害を受ける (Cai and Terasaki, 2005)。レシピエント患者の体内で移植臓器に対する DSA が産生された場合、移植臓器の長期生着率は低下することが示されている (Mao *et al.*, 2007; Everly *et al.*, 2013; Wiebe *et al.*, 2015)。したがって、AMR を予防し、移植臓器の生着期間を改善するためには、DSA 産生を制御することが重要である。

DSA による AMR 発症を防ぐために、現在、様々な治療が行われている。例えば、血漿交換療法 (plasmapheresis: PP) および静脈内免疫グロブリン (intravenous immunoglobulin: IVIG) は、血清中 DSA レベルを低下させることで AMR 発症リスクを低下させる (Rocha *et al.*, 2003)。しかし、これらの非免疫抑制的療法は免疫細胞に直接的な影響を及ぼさないため、PP および IVIG 実施後には、DSA が新たに産生される可能性がある (Abu Jawdeh *et al.*, 2014)。このため、現在の免疫抑制剤に加えて、DSA 産生を抑制する新しい医薬品が必要とされている。

DSA 産生は、B 細胞の増殖および形質細胞への分化を含む B 細胞に依存したプロセスによって起こるとされている (Stegall *et al.*, 2009; Stegall and Gloor, 2010)。MMF は T 細胞だけでなく B 細胞の増殖抑制作用も有するが (Halloran, 1996)、標準的免疫抑制療法を行っているにも関わらず AMR を発症するレシピエント患者は一定の割合で存在する。このことから、現在の免疫抑制療法では不十分である B 細胞活性化を抑制する薬が求められている。B 細胞を抑制する医薬品として、抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブが、複数の自己免疫疾患の治療に使用されている。リツキシマブは B 細胞表面に発現している CD20 に特異的に結合し、抗体依存性細胞傷害または補体依存性細胞傷害のいずれかによって B 細胞を死滅させ、自己免疫疾患患者の血清中自己抗体の減少をもたらすことから (Jiang *et al.*, 2015)、DSA 産生の抑制にも使用される場合がある。しかしながら、CD20 は前駆 B 細胞上にも発現しているので、リツキシマブは末梢血中の B 細胞をほぼ完全に枯渇させ (Randall, 2016)、感染

症のリスクが上昇する可能性がある。一方で、薬物投与が終了した後に B 細胞機能が速やかに回復するような低分子化合物であれば、感染症のリスクを軽減でき、自己免疫疾患や AMR や引き起こす抗体産生を抑制するのに適していると考えられる。

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K) は、様々な生体反応を調節する脂質キナーゼである。PI3K は、3 つのアイソフォーム (class I、II、III) に分類され、class I アイソフォームはさらに 2 つのサブセット、IA および IB に細分される (Vanhaesebroeck *et al.*, 2016)。Class I の PI3K は、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスホスフェート (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PIP_2) をリン酸化して細胞膜中にホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリスホスフェート (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate: PIP_3) を生成する。PI3K により生成された PIP_3 は、Akt をはじめとする種々のシグナル伝達タンパク質のドッキングドメインとして作用し、細胞増殖、成長、生存および代謝などに重要な機能を果たしている (Cantley, 2002)。Class IA PI3K のひとつである PI3Kδ は、p110δ 触媒性サブユニットおよび p85α などの抑制性サブユニットから構成される (Fung-Leung, 2011)。PI3Kδ は主にリンパ球に発現し、p110δ 欠損または変異マウスは胎子異常を伴わず、B 細胞の不活性化および抗体産生の減少を表現型とする (Cantley, 2002; Jou *et al.*, 2002; Okkenhaug *et al.*, 2002)。従って、PI3Kδ は B 細胞の活性化を抑制するための標的として適しており、その選択的阻害剤が B 細胞を不活性化させ、過剰な抗体産生を抑制する可能性がある (図 1)。また rituximab の標的である CD20 に加え、CD19 や BAFF (B cell activating

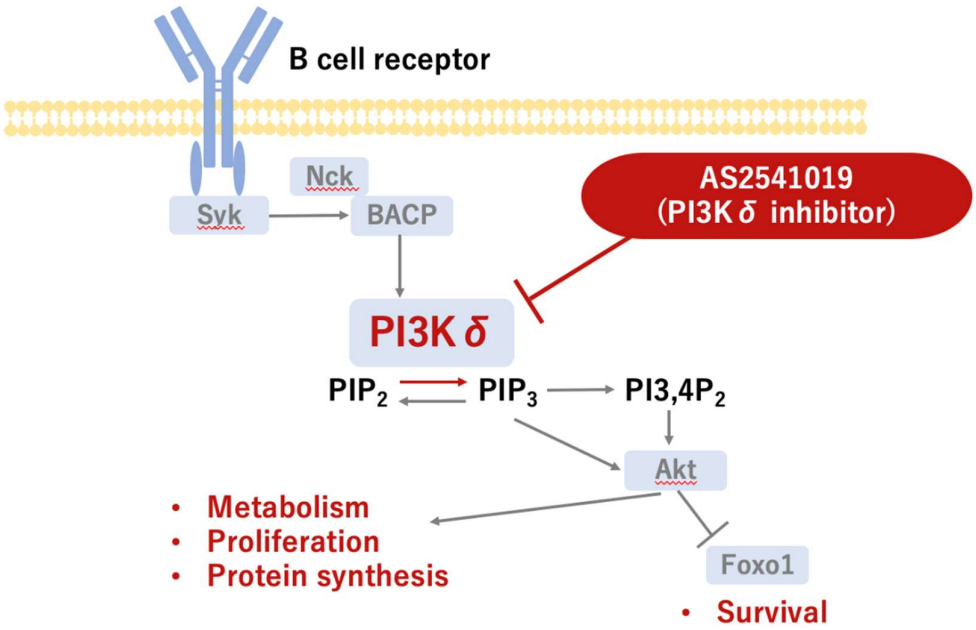


図 1 PI3Kδ シグナル経路

PI3Kδ は B 細胞受容体 (B cell receptor) の下流に存在するキナーゼである。PI3Kδ により、PIP_2 は PIP_3 に変換され、Akt リン酸化を介して種々の反応 (survival, metabolism, proliferation, protein synthesis) が誘導される。

factor) も B 細胞を抑制する標的であるが、B 細胞受容体の下流シグナルに存在する PI3Kδ が、抗原刺激による B 細胞活性化抑制には適している。

最初に上市された PI3Kδ 阻害剤であるイデラリシブは、ヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) の B 細胞受容体刺激による Akt リン酸化を減少させる (Herman *et al.*, 2010; Do and Rexwinkle, 2016)。別の PI3Kδ 阻害剤の GS-9829 は、マウス脾臓細胞のリン酸化 Akt レベルを低下させ、また MRL/lpr (MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$) マウスを用いた全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) モデルの血清中抗 double-strand DNA (dsDNA) 抗体レベルを減少させることが示された (Suarez-Fueyo *et al.*, 2014)。一方で、これらの化合物と同様に Akt リン酸化およびヒト B 細胞増殖阻害活性を有する PI3Kδ 阻害剤の MSC2360844 は、NZBWF1 (New Zealand Black x New Zealand White F1) マウスを用いた SLE モデルの抗 dsDNA 抗体レベルを減少させないと報告された (Haselmayer *et al.*, 2014)。これらの報告から、低分子 PI3Kδ 阻害剤は B 細胞活性化を阻害するが、抗体産生に対する効果については未だ議論の余地を残している。

アステラス製薬株式会社 (東京都) にて、B 細胞活性化を抑制可能な薬物の創出を目的として PI3Kδ 選択的阻害剤の探索研究を行った。新規に合成された化合物について、酵素阻害アッセイにてスクリーニングを実施し、PI3Kδ 選択的阻害活性を有する低分子化合物 AS2541019 (図 2) を見出した。本研究では、AS2541019 を用いて PI3Kδ を特異的に阻害することによる B 細胞の機能変化を検討した。まず、ラットの脾臓細

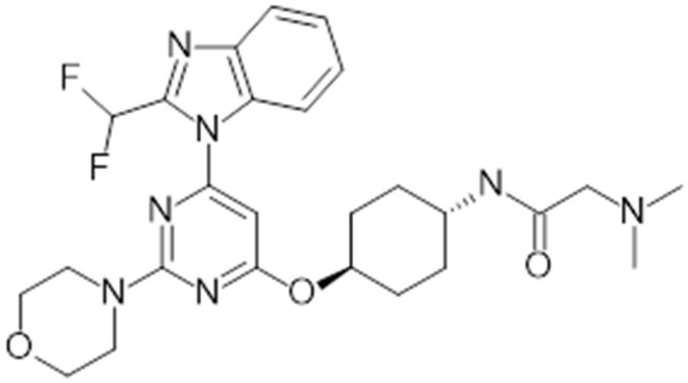


図 2 AS2541019 の構造

胞およびサルの PBMC を用い、AS2541019 の B 細胞増殖阻害作用を検討した。さらに臨床における効果を予測するため、ヒトの PBMC を用いて同様の検討を行なった。また、B 細胞の抗原提示能を評価するため、AS2541019 の MHC クラス II 発現に対する作用を、ラット、サルおよびヒト B 細胞を用いて検討した。次に、AS2541019 の薬力学的検討のため、ラットおよびサルに経口投与した後の抹消血中 B 細胞の機能解析を行った。さらにラットおよびサルを用い、AS2541019 の抗体産生に対する抑制作用を検討した。

DSA 産生に対する抑制効果を検討するためには、移植モデルを用いて検討を行うことが不可欠である。まず、ラット同種間心臓移植モデルを用いて、AS2541019 の DSA 産生抑制作用を検討した。また、ハムスターの心臓をラットに移植する、異種間心臓移植モデルを作製し、AS2541019 の効果を検討した。ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルでは、B 細胞依存的な拒絶反応、つまり AMR を確認することができるため、AS2541019 の DSA 産生抑制作用およびそれに伴う移植臓器生着延長効果を検討するには適していると考えられた。さらに、臨床での有効性を予測するために、免疫系がよりヒトに近いサルを用いた腎臓移植モデルを作製し、DSA 産生の推移を検討した。

臨床において、DSA が検出されるレシピエント患者で AMR はより頻繁に発生するため (Wiebe *et al.*, 2015)、DSA 産生を阻害することにより、AMR 発症を抑制することができると考えられる。そこで本研究では、移植臓器の長期生着延長効果を予測す

る因子として、移植レシピエントにおける DSA 産生を指標とすることにより、AMR 発症抑制の可能性を検討した。

II 方法

1. 動物

Lewis および ACI ラットを日本チャールズリバー株式会社 (神奈川県) および日本エスエルシー株式会社 (静岡県) からそれぞれ購入した。シリアンハムスターは日本エスエルシー株式会社から購入した。カニクイザルはハムリー株式会社 (茨城県) より購入した。カニクイザルは、特定の病原体 (サルモネラ菌、赤痢菌、サル免疫不全ウイルス、シミアンレトロウイルスおよびヘルペスウイルス) を含まない個体を事前に検査して購入した。アステラス製薬株式会社つくば研究センターは、AAALAC インターナショナル (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) の認定を受けており、動物実験はアステラス製薬株式会社の Institutional Animal Care and Use Committee により審査・承認を得た上で実施した。

2. 試験化合物

AS2541019 (*N*-[*trans*-4-({6-[2-(difluoromethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]-2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl}oxy)cyclohexyl]-2-(dimethylamino)acetamide) (図 2) 、タクロリムスおよび MMF は、アステラス製薬株式会社にて合成した。AS2541019 は、*in vitro* にて使

用する際、ジメチルスルホキシドで溶解した。また、*in vivo* にて使用する際、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した。筋肉内投与用のタクロリムスは、生理食塩水で希釈して目的の投与量に調製した。経口投与用のタクロリムスは 20%固形分散製剤を作製し、蒸留水中に懸濁させた。また MMF は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁させた。*in vivo* おいて使用する際、vehicle として 0.5%メチルセルロース溶液を使用した。

3. キナーゼ阻害アッセイ

PI3Kδ、PI3Kβ および PI3Kγ に対する AS2541019 の阻害効果を、均一時間分解蛍光 (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence: HTRF®) PI3-キナーゼアッセイキット (Merck Millipore, MA, USA) によって、以下の方法により評価した。AS2541019、アデノシン三リン酸 (ATP) 、および PIP_2 を、室温で 35 分間、384 ウェルプレートで各種組換え PI3K (Merck Millipore) とインキュベートした。EDTA とビオチン化 PIP3 の添加により反応を停止させた。Europium 標識抗 Glutathione S-transferase (GST) 抗体、GST タグ付 pleckstrin homology domains および streptavidin-allophycocyanin (APC) を含む検出バッファーを添加した。Over night でインキュベートした後、Artemis マルチプレートリーダー (フルノ、兵庫県) を使用して蛍光シグナルを検出した。また、PI3Kα アッセイとして、組換え PI3Kα (Merck Millipore) 、ホスファチジルイノシトール、ATP および AS2541019 を 384 ウェルプレートを用いて 37℃で 3 時間インキュベートし、

Kinase-Glo Plus (Promega ,WI, USA) を各ウェルに加えた。ウェルあたりの発光は、ARVO ルミノメーター (PerkinElmer, Inc., MA, USA) を使用して検出した。各 PI3K に対する AS2541019 の阻害活性は、次の式に従って計算した [PI3K-inhibition (%) = (sample – control) / (no enzyme control - control) × 100] 。Control では、化合物の非存在下で各キナーゼを基質および ATP と共にインキュベートした。No enzyme control では、キナーゼの非存在下で基質を ATP と共にインキュベートした。

AS2541019 による他のチロシンおよびセリン/スレオニンキナーゼの阻害は、Carna Biosciences (兵庫県) に委託し、ELISA または Mobility Shift Assay を使用して測定した。

4. Akt リン酸化アッセイ

ヒトの B 細胞株である Ramos (RA.1) 細胞 (ECACC) を 2.0×10^6 cells / ml に調製し、AS2541019 と 20 分間インキュベートした。RPMI1640 培地中にて、10 μg/ml のヤギ由来抗ヒト IgM 抗体 (MP Biomedical, CA, USA) で 10 分間刺激した。刺激後、Ramos 細胞を PhosFlow Fix Buffer I (BD Biosciences, CA, USA) で 10 分間反応させて固定し、PhosFlow Perm Buffer III (BD Biosciences) を用いて氷上で 30 分間反応させ、細胞の透過処理を行なった。透過処理後の細胞を AlexaFluor®647 標識マウス由来抗 Akt 抗体 (BD Biosciences) で染色し、フローサイトメトリーによりリン酸化 Akt を検出した。

5. B 細胞増殖アッセイ

雄性 Lewis ラットを 2-3%イソフルラン吸入麻酔下にて放血により安楽死処置した後、脾臓を摘出して溶血処理し、単離した脾臓細胞を 10%ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 50 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に懸濁した。脾臓細胞を 2.0×10^5 cells / ml に調製し、3 μg/ ml のマウス由来 F (ab ') $_2$ 抗ラット IgM (SouthernBiotech) で B 細胞を刺激し、AS2541019 の存在下または非存在下にて、37℃、5% CO_2 の条件下で 2 日間インキュベートした。インキュベーション終了の 4 時間前に、^{3}H-thymidine を 1 μCi / well で添加した。Perkin Elmer Unifilter GF/C プレート (PerkinElmer) を使用して細胞を回収し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定し、^{3}H-thymidine の取り込み量を増殖活性と定義した。ラット B 細胞増殖に対する AS2541019 の阻害活性は、次の式に従って計算した [Inhibition (%) = (control – sample) / (control – no stimulation) × 100] 。Control として、化合物の非存在下において脾臓 B 細胞を IgM で刺激した場合の測定値を使用した。No stimulation control では、化合物の非存在下、IgM 刺激なしの条件下での測定値を使用した。

霊長類を用いた検討では、カニクイザルより採取した血液を遠心分離し、Ficoll-Paque plus (GE Healthcare, IL, USA) により上層の細胞を回収することによって PBMC を単離した。採取した PBMC を 10%ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシン

および 50 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に懸濁した。1.0×10^5 cells/well に調製し、10 μg/ ml のヤギ由来 F (ab ')$_2$ 抗ヒト IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) を用いて B 細胞を刺激した。37℃、5% CO_2 の条件下で 3 日間、AS2541019 存在下または非存在下でインキュベートした。インキュベーション終了の 4 時間前に、^{3}H-thymidine を 1 μCi / well で添加した。以降の実験はラット脾臓細胞と同様に実施し、AS2541019 のサル B 細胞増殖阻害率についても、ラット脾臓細胞の場合と同じ計算式にて算出した。

ヒト血液を用いた検討は、アステラス製薬株式会社におけるヒト倫理委員会にて承認を受けた上で実施した。本試験では、社内ボランティア採血制度において健常人より採取した血液を使用した (ヒト倫理委員会承認番号: S090170#, S100400#)。血液を遠心分離し、Ficoll-Paque plus (GE Healthcare) により上層の細胞を回収することによって PBMC を単離した。採取した PBMC を 10%ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 50 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地に懸濁した。1.0×10^5 cells/well に調製し、3 μg/ml のヤギ由来 F (ab ') $_2$ 抗ヒト IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) を用いて B 細胞を刺激した。37℃、5% CO_2 の条件下で 2 日間、AS2541019 存在下または非存在下でインキュベートした。インキュベーション終了の 4 時間前に、^{3}H-thymidine を 1 μCi / well で添加した。以降の実験はラット脾臓細胞と同様に実施し、AS2541019 のヒト B 細胞増殖阻害率についても、ラット脾臓細胞の場合と同じ計算式にて算出した。

6. MHC クラス II 発現抑制

雄性 Lewis ラットの末梢血を、10 mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 55 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地にて、10 μg/ ml マウス由来 F (ab ') $_2$ 抗ラット IgM (SouthernBiotech, AL, USA) で刺激した。AS2541019 の存在下または非存在下にて、37℃、5% CO_2 の条件下で 1 日間インキュベートした。刺激した末梢血を、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識マウス由来抗ラット CD45R モノクローナル抗体 (BD Biosciences) および APC 標識マウス由来抗ラット MHC クラス II 抗体 (eBioscience, CA, USA) で染色した。B 細胞上の MHC クラス II 発現を、CD45R 陽性細胞 (B 細胞) 中の、APC (MHC クラス II) の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI) と定義して、フローサイトメトリーによって測定した。

霊長類を用いた検討では、カニクイザルの末梢血を、10 mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 55 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地にて、30 μg/ ml ヤギ由来 F (ab') $_2$ 抗ヒト IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で刺激した。AS2541019 の存在下または非存在下にて、37℃、5% CO_2 の条件下で 1 日間インキュベートした。刺激された末梢血を、FITC 標識マウス由来抗 HLA-DP、DQ、DR 抗体 (BD Biosciences) および APC 標識マウス由来抗ヒト CD20 抗体 (BD Biosciences) で染色した。B 細胞上の MHC クラス II 発現を、CD20 陽性細胞 (B 細胞)

の、FITC (MHC クラス II) の MFI と定義して、フローサイトメトリーによって測定した。

ヒト血液を用いた検討では、社内ボランティア採血制度において健常人より採取した血液を使用した (ヒト倫理委員会承認番号: S110070#)。採取した末梢血を、10 mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 55 µM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地にて、30 µg/ ml ヤギ由来 F (ab ') $_2$ 抗ヒト IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で刺激した。AS2541019 の存在下または非存在下にて、37℃、5% CO_2 の条件下で 1 日間インキュベートした。刺激された末梢血を、FITC 標識マウス由来抗 HLA-DP、DQ、DR 抗体 (BD Biosciences) および APC 標識マウス由来抗ヒト CD20 抗体 (BD Biosciences) で染色した。B 細胞上の MHC クラス II 発現を、CD20 陽性細胞 (B 細胞) の、FITC (MHC クラス II) の MFI と定義して、フローサイトメトリーによって測定した。

ラット、サルおよびヒトの実験について、阻害率は B 細胞増殖阻害と同様に、次の式に従って計算した[Inhibition (%) = (control – sample) / (control – no stimulation) × 100]。

7. ラット *ex vivo* MHC クラス II 発現抑制試験

AS2541019 (2 mg/kg) を雄性 Lewis ラット (7 週齢) に経口投与した。2 時間後または 16 時間後に末梢血を採取し、10 µg/ml マウス由来 F (ab') $_2$ 抗ラット IgM

(SouthernBiotech) で刺激し、37℃、5% CO_2 の条件下で 4 時間インキュベートした。刺激した血液を、FITC 標識マウス由来抗ラット CD45R および APC 標識マウス由来抗ラット MHC クラス II 抗体で染色した。MHC クラス II 発現を CD45R 陽性 B 細胞中の発現率と定義し、フローサイトメトリーにて測定した。(動物実験承認番号: C-T09154)

8. ラット T 細胞依存的抗体産生モデル

7 週齢の雄性 Lewis ラットに、T 細胞依存的抗原である dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin (DNP-KLH、Cosmo Bio Co., Ltd, 東京都) 50 μg を完全フロイントアジュバント (Sigma-Aldrich, MO, USA) と共に腹腔内投与した。免疫した当日より、AS2541019 (5、10 または 20 mg/kg) または MMF (10 mg/kg) をそれぞれ 1 日 2 回または 1 日 1 回経口投与した。DNP-KLH 投与後 7 日目と 11 日目に、血液サンプルをラットから採取し、血漿中抗ジニトロフェノール抗体 (抗 DNP IgM および IgG) レベルを ELISA にて測定した。抗 DNP IgG 測定時、ELISA における検出限界以下の値を 20 U/ml に換算した。(動物実験承認番号: D-T09123)

9. ラット T 細胞非依存的抗体産生モデル

7 週齢の雄性 Lewis ラットに T 細胞非依存的抗原である trinitrophenylated aminoethylcarboxymethyl-Ficoll (TNP-Ficoll、Biosearch Technologies, CA, USA) 300 μg を静脈内投与した。TNP-Ficoll 投与当日から、AS2541019 (1 または 2 mg/kg)またはタクロリムス (0.05 または 0.1 mg/kg) をそれぞれ 1 日 1 回経口または筋肉内投与した。TNP-Ficoll 投与後 7 日目に、血液サンプルをラットから採取し、血漿中抗トリニトロフェノール抗体 (抗 TNP IgM) レベルを ELISA により測定した。(動物実験承認番号: D-T09513)

10. ラットリコール応答抗体産生モデル

6 週齢の雄性 Lewis ラットに Alum アジュバントを用いて、DNP-KLH 50 μg を腹腔内投与することにより初回免疫を行なった。最初の免疫から 15 日後に、ELISA により血漿中の抗 DNP IgG レベルを測定し、IgG レベルが均等になるようにラットをコントロール群、AS2541019 投与群および MMF 投与群にグループ分けした。21 日目に DNP-KLH を生理食塩水に溶解し、アジュバントの併用無しで腹腔内投与することにより 2 回目の免疫 (50 μg /ラット) を行った。2 回目の免疫の日から、AS2541019 (5 mg/kg) または MMF (40 mg/kg) を 1 日 1 回経口投与した。28 日目に、ラットから血液サンプルを採取し、血漿中抗 DNP IgG レベルを ELISA によって測定した。36 日目に、2-3%イソフルラン吸入麻酔下にて放血により安楽死処置した後に脾臓細胞を単

離し、phycoerythrin (PE) 標識抗ラット CD45RA および FITC 標識抗ラット IgG1/2a で染色した。総脾臓細胞における B 細胞の割合および脾臓 B 細胞におけるクラススイッチされた B 細胞の割合を、フローサイトメトリーによって評価した。(動物実験承認番号: D-T09123)

11. ラット心臓移植モデル

7 週齢の雄性 Lewis および ACI ラットをそれぞれレシピエントおよびドナーとして使用した。腹部異所性心臓移植手術 (Ono and Lindsey, 1969) について、以下に概要を説明する。ドナーである ACI ラットにペントバルビタール 50 mg/kg を腹腔内投与することにより全身麻酔し、腹部正中切開により開腹した。後大静脈よりヘパリン入り生理食塩水を注入し、全身還流を行った後に腹大動脈を切開し、放血により安楽死処置をした。肋骨を切断することにより開胸し、心臓を露出させた。大動脈および肺動脈を切断し、それ以外の血管をまとめて結紮した後に心臓を摘出した。レシピエントである Lewis ラットは、2-3%イソフルラン吸入による全身麻酔下にて開腹し、腸管を滅菌ガーゼで包んで腹腔外に移動させ、腹大動脈および後大静脈を露出させた。ブルドック血管鉗子により両血管を挟み、血流を停止させた。腹大動脈および後大静脈それぞれに、頭側方向に切開を入れることにより、血管吻合口を作製した。ドナーの心臓とレシピエントの血管を縫合する際は顕微鏡下にて、ドナー大動脈-レシピエン

ト腹大動脈、ドナー肺動脈-レシピエント後大静脈をそれぞれ吻合した。吻合後、ブルドック血管鉗子を除いて再灌流し、ドナー心臓の拍動開始を確認した。その後、腸管を元の位置に戻し、腹部の筋層および皮膚を縫合して閉腹した。

臓器移植における標準的免疫抑制療法として、CNI のタクロリムスと IMPDH 阻害剤である MMF が使用される。この標準的免疫抑制療法をマウス腹部異所性心臓移植モデルで再現するため、筋肉内注射により 0.02 mg/kg のタクロリムスを、経口投与により 15 mg/kg の MMF を併用投与した。タクロリムスおよび MMF にさらに併用する形で、被験物質である AS2541019 を 0.5、1 または 2 mg/kg で経口投与した。タクロリムス、MMF および AS2541019 は、移植心臓の生着・拒絶にかかわらず、移植後 21 日間連続して 1 日 1 回投与した。AS2541019 と MMF は何れも経口投与したが、吸収率の変化等の影響を考慮して混合せず、まず MMF を投与してから 30 分以上空けて AS2541019 を投与した。移植心臓の生着の評価は、移植後 21 日目まで毎日触診によってモニターすることにより行った。触診により移植心臓の拍動停止を確認した場合に、拒絶されたと判断した。血液をレシピエントから定期的に採取し、DSA レベルを以下の方法にて測定した。各血漿サンプルをドナーである ACI ラット脾臓細胞 (1×10^5 cells / well) と共に 4℃で 30 分間インキュベートし、続いて FITC-conjugated 抗ラット IgG1/2a で染色した。染色した細胞を、フローサイトメトリーにより平均蛍光強度 (MFI) を評価した。また、陰性対照として正常 Lewis ラットの血漿を使用した。(動物実験承認番号: D-T09179)

12. ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデル

10-17 週齢の雄性シリアンハムスターを心臓ドナーとして使用し、7 週齢の雄性 Lewis ラットをレシピエントとして使用した。ハムスターからラットへの腹部異所性心臓移植手術は、既知の手法に従い、ラット同種間心臓移植手術と同じ方法で実施した (Ono and Lindsey, 1969)。移植手術を実施した当日より、0.1 mg/kg タクロリムスおよび 15 mg/kg MMF を、それぞれ筋肉内および経口投与した。さらに、AS2541019 の各用量 (1、2 または 4 mg/kg) をタクロリムスおよび MMF と併用して投与した。これらの被験化合物については全て、移植後 14 日間連続して 1 日 1 回の投与を行なった。MMF と AS2541019 は何れも経口投与であったことから、AS2541019 投与の 30 分以上前に MMF を投与した。移植後 14 日まで毎日触診により移植心臓の生着を確認し、触診可能な拍動の停止を以って移植心臓の拒絶と定義した。また、血液サンプルをレシピエントラットから採取し、フローサイトメトリーによりハムスター特異的抗体 (ハムスター脾臓細胞結合抗体) を測定した。各血漿サンプルをハムスター脾臓細胞 (1×10^5 cells / well) と 4℃で 30 分間インキュベートした後、FITC 標識抗ラット IgM または IgG1/2a (BD biosciences) によって染色し、その後 MFI をフローサイトメトリーによって測定した。本実験では、正常 Lewis ラットの血漿サンプルを、異種抗体の陰性対照として使用した。(動物実験承認番号: D-T09467)

13. サル *ex vivo* MHC クラス II 発現抑制試験

2 頭の雄性カニクイザルに 10 mg/kg の AS2541019 を経口投与した。その後最初の投与の影響を避けるために投与間隔を約 1 ヶ月あけ、同じサルに 3 mg/kg の AS2541019 を経口投与した。末梢血を AS2541019 投与前および投与 16 時間後に採取し、30 μg/ml ヤギ由来 F (ab')$_2$ 抗ヒト IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で刺激し、21 時間インキュベートした。刺激した末梢血を、FITC 標識マウス由来抗 HLA-DP、DQ および DR (BD biosciences) および APC 標識マウス由来抗ヒト CD20 (BD biosciences) で染色した。 MHC クラス II 発現を CD20 陽性 B 細胞における FITC (HLA) の MFI と定義し、フローサイトメトリーにて測定した。(動物実験承認番号: D-T10200)

14. サル破傷風トキソイド免疫モデル

サル抗体産生モデルを作製するために、破傷風トキソイド (デンカ生研、東京都) (濃度: 10 Lf/ml 未満) を抗原として使用した。雄性カニクイザルに破傷風トキソイド溶液 0.6 ml を背中の 12 箇所に別々に皮内投与した。同時に、0.6 ml の破傷風トキソイド溶液を筋肉内投与した。感作した日より、AS2541019 (1 または 3 mg/kg) をタク

ロリムス 1 mg/kg および MMF 20 mg/kg と併用して投与した。何れの化合物についても、1 日 1 回経口投与を行なった。破傷風トキソイド感作後 0、7、10、14、21 日目にサルから血液サンプルを採取し、血漿中抗破傷風トキソイド IgG レベルを ELISA により測定した。(動物実験承認番号: D-T10389)

15. サル腎臓移植モデル

サル腎臓移植手術は、既知の手法を元にして実施した (Kinugasa *et al.*, 2008)。なお、ドナーとレシピエントの組み合わせは、移植前の ABO 血液型適合性により血液型が一致している個体同士とした。また、混合リンパ球反応アッセイにより、お互いにリンパ球の反応性が高い組み合わせで実施した。移植手術ではまず、サルを 2-3%イソフルラン吸入で麻酔し、正中切開を行って開腹した。腹膜を切開後、左の腎臓を体壁から剥離し、腎動脈、腎静脈および尿管を露出させて切断し、摘出した。ドナー腎臓は、移植されるまで氷冷にて保存した。レシピエントの腹大動脈および後大静脈を露出し、それぞれサテンスキー血管鉗子にてクランプした。腹大動脈および後大静脈に頭側方向に切開を入れ、血管吻合口を作製した。ドナーから摘出した腎臓を、レシピエント腹大動脈とドナー腎動脈、レシピエント後大静脈とドナー腎静脈を吻合することにより移植した。血管吻合は顕微鏡下にて行い、移植後すぐに移植腎臓を再灌流した。ドナーおよびレシピエントの尿管の末端同士を吻合し、尿の生成を確認した。移

植腎臓の機能不全によるレシピエントの死亡を避けるために、レシピエント自身の右腎臓を摘出せずに残存させ、閉腹した。これにより、移植腎臓拒絶反応後においても、十分な DSA 産生の検出が可能となった。移植した当日より、AS2541019 (2 または 3 mg/kg) をタクロリムス 1 mg/kg および MMF 20 mg/kg と併用して投与した。これらの化合物については全て、1 日 1 回経口投与した。血液サンプルをレシピエントサルから採取し、ドナー特異的 IgG レベルをフローサイトメトリーを用いて測定した。まず、移植前のドナー血液から PBMC を単離し、-80℃で保存しておいた。レシピエントサルより採取した血漿をドナーPBMC (2.5×10^5 cells/well) と混合し、4℃で 30 分間インキュベートした。PBMC に結合した DSA を FITC 標識抗ヒト IgG (Dako, CA, USA) で染色し、MFI をフローサイトメトリーにて測定した。また、陰性対照として移植前に冷凍保存したレシピエントの血漿を使用した。(動物実験承認番号: D-T11069)

16. 統計分析

すべての統計解析は、Graph Pad Prism (Graph Pad Software, CA, USA) を用いて行い、図中のデーターを mean ± S.E.M.で示した。また、Sigmoid Emax non-linear regression analysis を用いて IC_{50} 値を算出した。統計的有意差は Dunnett's multiple comparison test または unpaired Student's t-test を用いて解析し、$P<0.05$ を有意水準とした。ラット同種間心臓移植モデルおよびハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルにおけ

る移植臓器生着時間を、Log-rank test を用いて比較した。

III 結果

1. AS2541019 の *in vitro* プロファイル

新規合成した低分子化合物 AS2541019 の機能を解析するにあたり、まず PI3Kδ に対する選択性を評価した。AS2541019 は、IC_{50} 値 20.1 nM で PI3Kδ 酵素活性を阻害したが、PI3Kα、PI3Kβ、PI3Kγ の酵素活性阻害作用の IC_{50} 値は全て μM 単位の範囲かそれ以上であった (表 1)。他のタイプのキナーゼに対する酵素活性阻害作用を検討したところ、AS2541019 (10 μM) は弱い阻害作用しか示さなかった (表 2) 。これらの結果により、AS2541019 が高い選択性を有する PI3Kδ 阻害剤であり、PI3Kδ の機能を明らかにするのに適した低分子化合物であることが示された。

次に、B 細胞受容体シグナル伝達に対する AS2541019 の効果を明らかにするために、ヒト Ramos B 細胞株を使用して抗 IgM 刺激 Akt リン酸化アッセイを実施した。その結果、AS2541019 は Akt リン酸化を阻害し、IC_{50} 値は 14.3 nM であった。Akt のリン酸化は B 細胞受容体下流の経路の主要なシグナルの 1 つであるため、この結果により、AS2541019 が B 細胞受容体シグナル伝達を阻害することで B 細胞の活性化を抑制することが示唆された。

PI3K のサブクラスのうち、3 つのクラス IA サブユニット (δ、α、β) とクラス IB サブユニット (γ) のそれぞれが B 細胞で発現しているため、PI3Kδ 選択的阻害剤であ

表 1 AS2541019 の各 PI3K 活性抑制作用 (IC_{50} 値) およびヒト B 細胞株 Ramos cell における Akt リン酸化抑制作用 (IC_{50} 値)

PI3K (nM)				Akt phosphorylation in Ramos cells
δ	α	β	γ	(nM)
20.1	>10000	2400	>10000	14.3

表 2 AS2541019 のチロシンおよびセリン/スレオニンキナーゼ活性に対する抑制作用

Tyrosine kinases	% inhibition by 10 μM AS2541019	Serine/threonine kinases	% inhibition by 10 μM AS2541019
ABL	-3.2	AKT1	-0.1
AXL	12.2	AurC	-5.0
BMX	1.5	CDK2/CycA2	-2.4
BTK	1.5	CK1δ	22.3
EGFR	4.6	Erk5	-13.7
EPHA2	0.1	GSK3β	0.1
FAK	-13.0	IKKβ	7.2
FLT3	7.0	JNK1	2.9
FMS	12.3	NEK2	-4.2
HER2	-9.9	p38β	8.2
ITK	6.9	p70S6K	11.6
KDR	6.2	PIM1	27.5
LCK	6.5	RAF1	33.5
PDGFRα	6.6		
PDGFRβ	2.0		
TRKA	6.7		

(10 μM における抑制率)

る AS2541019 の B 細胞への作用を検討することより、B 細胞の活性化がどのタイプの PI3K に依存しているかを明らかにすることができる。そこで、ラット脾臓細胞を AS2541019 の存在下にて抗 IgM で刺激し、増殖活性を測定した。AS2541019 は抗 IgM 刺激 B 細胞増殖を抑制し、IC_{50} 値は 4.3nM であった (図 3A)。この結果より、PI3K のサブタイプのうち PI3Kδ が B 細胞活性化に強く関与していることが示された。

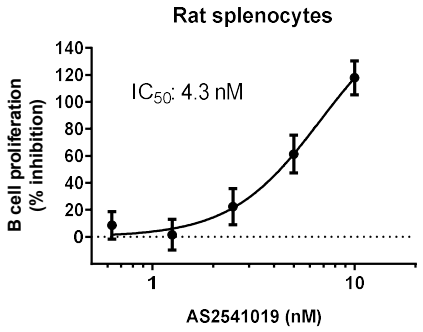
げっ歯類と霊長類の免疫系の違いを考慮すると、臨床における有効性を予測するためには霊長類を用いた検討が不可欠である。そこで、ヒトと比較的類似する免疫系を有するサルを用いて、さらなる検討を行った。PBMC をカニクイザルから単離し、AS2541019 の存在下で抗ヒト IgM を用いて刺激し、増殖活性を測定した。その結果、AS2541019 は、IC_{50} 値 16.1 nM でサル B 細胞増殖を抑制した (図 3B)。

また、臨床予測性をさらに向上させるため、ヒト末梢血中 B 細胞に対する AS2541019 の増殖活性阻害作用を評価した。その結果、AS2541019 は、IC_{50} 値 3.6 nM でヒト B 細胞の増殖を抑制した (図 3C)。これらの結果により、AS2541019 の B 細胞増殖抑制作用にげっ歯類と霊長類において大きな種差が存在しないことが示され、AS2541019 がヒトの臨床において有用であることが示唆された。

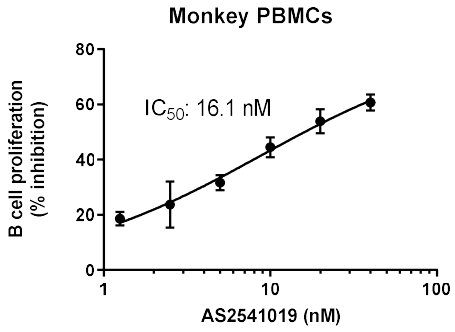
2. B 細胞 MHC クラス II 発現抑制

B 細胞上の MHC クラス II は $CD4^+$ helper T 細胞への抗原提示に重要な役割を果た

A



B



C

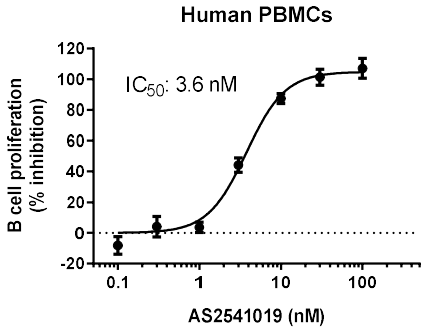


図 3 AS2541019 の B 細胞増殖抑制作用

(A) ラットより脾臓細胞を単離し、抗ラット IgM で刺激して B 細胞を増殖させた。培養液中に AS2541019 (0.63-10 nM) を添加し、B 細胞増殖抑制作用を検討した (n=5)。(B) サル末梢血より、比重勾配を利用した遠心分離法を用いて PBMC を単離した。PBMC を抗ヒト IgM で刺激し、B 細胞を増殖させた。培養液中に AS2541019 (1.25-40 nM) を添加し、B 細胞増殖抑制作用を検討した (n=3)。(C) ヒト末梢血より、比重勾配を利用した遠心分離法を用いて PBMC を単離した。サルと同様に PBMC を抗ヒト IgM で刺激し、B 細胞を増殖させ、AS2541019 (0.1-100 nM) の B 細胞増殖抑制作用を検討した (n=4)。B 細胞増殖活性は thymidine の取り込みを指標として評価し、データは mean ± S.E.M で表記した。

し、抗体産生は $CD4^+$ helper T 細胞からのサイトカイン刺激によって誘導される (Crawford *et al.*, 2006)。従って本研究において、B 細胞上の MHC クラス II 発現に対する効果を調べることにより、抗原提示に対する AS2541019 の効果を検証した。ラット末梢血を抗ラット IgM で刺激し、フローサイトメトリーにより MHC クラス II の発現を検出した。その結果、AS2541019 はラット B 細胞における MHC クラス II 発現を IC_{50} 値 16.3 nM で抑制した (図 4A) 。

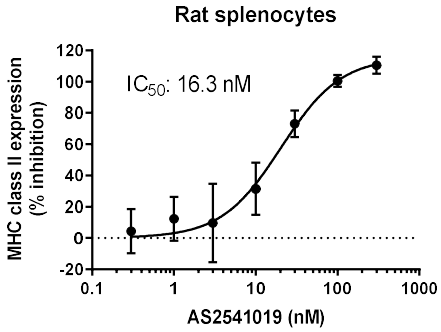
次に抗ヒト IgM でカニクイザルの末梢血を刺激し、B 細胞上の MHC クラス II の発現をフローサイトメトリーによって検討した。結果として、AS2541019 は B 細胞受容体シグナル誘発 MHC クラス II 発現を IC_{50} 値 79.1 nM で抑制した (図 4B)。

さらに、抗ヒト IgM 抗体でヒト PBMC を刺激することによりヒト B 細胞 MHC クラス II 発現に対する AS2541019 の作用を検討した。AS2541019 は、IC_{50} 値 13.2 nM でヒト B 細胞上の MHC クラス II 発現を抑制した (図 4C)。これらの結果により、AS2541019 は B 細胞上の MHC クラス II 発現抑制作用を有し、この作用にげっ歯類と霊長類の間で大きな種差が認められなかったことから、AS2541019 がヒトの臨床においても B 細胞に対して抑制作用を有することが示唆された。

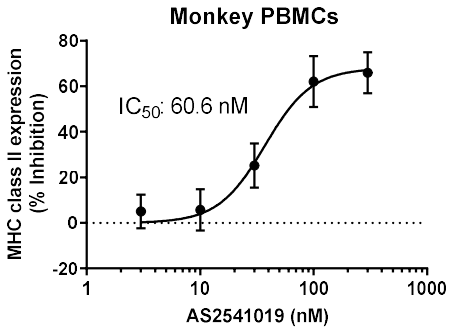
3. ラット *ex vivo* 試験における B 細胞活性阻害

次に、ラットに AS2541019 (2 mg/kg) を単回経口投与し、2 時間後と 16 時間後の末

A



B



C

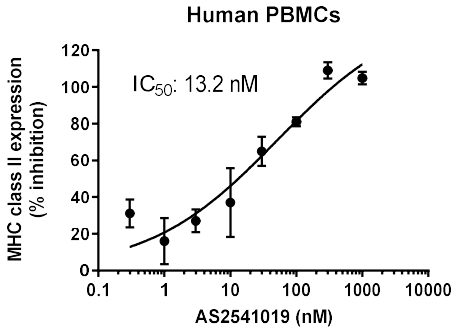


図 4 AS2541019 の B 細胞 MHC クラス II 発現に対する作用

(A) ラット末梢血サンプルを抗ラット IgM で刺激して B 細胞上の MHC クラス II 発現を誘導した。培養液中に AS2541019 (0.3-300 nM) を添加し、MHC クラス II 発現抑制作用を検討した (n=3)。(B) サル末梢血サンプルを抗ヒト IgM で刺激して B 細胞上の MHC クラス II 発現を誘導した。培養液中に AS2541019 (3-300 nM) を添加し、MHC クラス II 発現抑制作用を検討した (n=6)。(C) サルと同様に、ヒト末梢血を抗ヒト IgM で刺激し、AS2541019 (0.3-1000 nM) の B 細胞 MHC クラス II 発現抑制作用を検討した (n=4)。B 細胞を CD45RA 陽性細胞 (ラット) または CD20 陽性細胞 (サルおよびヒト) と定義し、B 細胞の MHC クラス II 発現を MFI を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。データーは mean ± S.E.M で表記した。

梢血中 B 細胞の MHC クラス II 発現を調べることにより、AS2541019 の生体内での作用を検討した。実験では、薬物投与後に採血した末梢血を抗 IgG で刺激しない場合の自発的 MHC クラス II 発現と、抗 IgM 刺激により誘導される MHC クラス II 発現の上昇を検討した。採血した末梢血を抗 IgM で刺激しなかった場合、vehicle 投与ラット由来 B 細胞の 20.6% (2 時間後) および 20.5% (16 時間後) が表面に MHC クラス II を自発的に発現していた。AS2541019 の投与により、MHC クラス II の発現は 2 時間後で 17.0%に (図 5A)、16 時間後で 15.5%に減少した (図 5B)。また、採取した末梢血を抗 IgM 抗体で刺激し、MHC クラス II の発現上昇を評価したところ、AS2541019 は、投与 2 時間後で B 細胞の MHC クラス II 発現上昇を 47.3%から 34.1% (図 5A)、および投与 16 時間後で 44.3%から 33.8% (図 5A) にそれぞれ抑制した。これらの結果から、AS2541019 投与により B 細胞の MHC クラス II の自発的発現と、抗 IgM 抗体で刺激した場合の発現上昇が両方とも阻害され、その効果は経口投与後 16 時間まで維持されることが示された。AS2541019 の生体内での活性が長時間維持されたことにより、AS2541019 は、*in vivo* 試験を実施するに当たり適切な薬効評価が可能な薬力学的プロファイルを有していることが明らかとなった。

4. ラット抗体産生抑制

ラット T 細胞依存的 (DNP-KLH 免疫) または非依存的 (TNP-Ficoll 免疫) 抗体産生

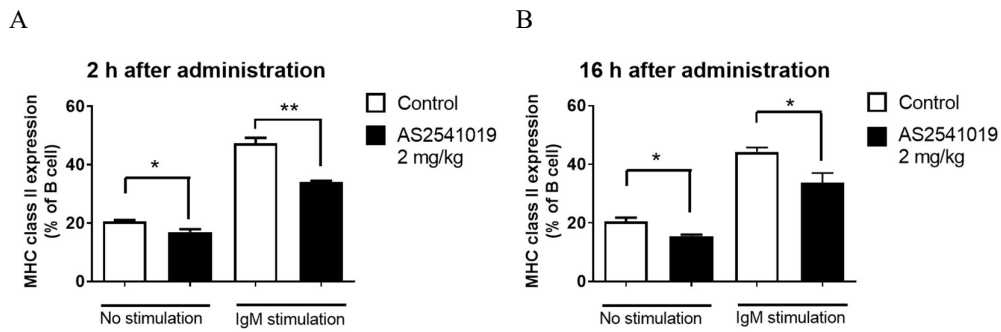


図 5 AS2541019 経口投与後の末梢血中 B 細胞 MHC クラス II 発現抑制作用

ラットに AS2541019 を経口投与し、末梢血中 B 細胞の MHC クラス II 発現抑制作用を検討した。経口投与より (A) 2 時間後および (B) 16 時間後に採血を行い、B 細胞上の MHC クラス II 発現をフローサイトメトリーにより検出した。また、採取した末梢血を抗 IgM で刺激し、B 細胞上の MHC クラス II 発現上昇に対する AS2541019 の効果を検討した (n=3)。データーは mean ± S.E.M.で示し、統計学的有意差は Student's t-test により検定を行なった (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$)。

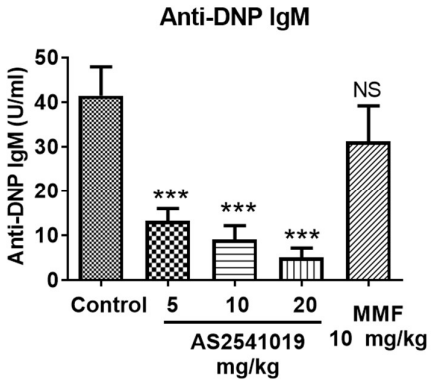
モデルにおける AS2541019 の効果を検討した。T 細胞依存的抗体産生モデルの場合、AS2541019 (5、10 および 20 mg/kg) を免疫実施日から試験終了日まで 1 日 2 回経口投与した。抗体産生のピークは抗 DNP IgM が 7 日目、IgG は 11 日目であったため、これらのタイミングにおける血漿中抗体価のレベルを評価した。陽性対照として、IMPDH 阻害剤である MMF (10 mg/kg) を 1 日 1 回経口投与した。MMF は T 細胞および B 細胞の活性化に対して非選択的な阻害効果があるため (Allison and Eugui, 2000)、抗 DNP IgG 産生を顕著に抑制した。AS2541019 は、用量依存的に抗 DNP 抗体産生を阻害し、IgM と IgG の両方の産生を減少させた (図 6)。

次に、T 細胞非依存的抗体産生に対する AS2541019 の効果を評価するために、AS2541019 (1 および 2 mg/kg) または対象薬のタクロリムス (0.05 および 0.1 mg/kg) を 1 日 1 回、免疫日から試験終了日まで投与した。AS2541019 は用量依存的に抗 TNP-IgM 産生を阻害したが、対照的に T 細胞を選択的に阻害するタクロリムスは抗体産生を抑制しなかった (図 7)。これらの結果により、AS2541019 が T 細胞依存的および非依存的抗原を免疫した場合の両方で、抗体産生を抑制することが示された。

5. ラットリコール応答による抗体産生抑制

移植レシピエント患者におけるリコール応答による DSA の産生は、移植臓器の拒絶を引き起こすリスクファクターの 1 つであり (Stegall *et al.*, 2009)、リコール応答に

A



B

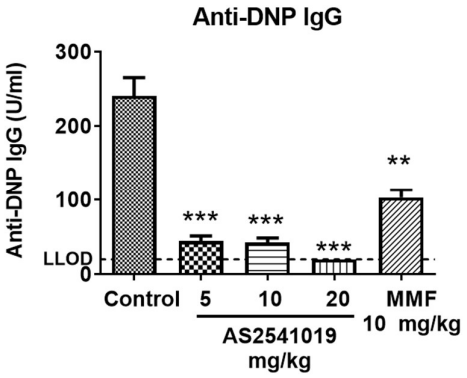


図 6 ラット抗体産生モデルにおける AS2541019 の T 細胞依存的抗体産生抑制効果

抗原として DNP-KLH を用い、(A) 感作から 7 日目の抗 DNP IgM 抗体価および (B) 11 日目の抗 DNP IgG 抗体価を ELISA にて測定した。各用量の AS2541019 を 1 日 2 回経口投与した。また、陽性対照として MMF を 1 日 1 回経口投与した (n=4 または 5)。Anti-DNP IgG 測定時、ELISA における検出限界 (LLOD: lower limit of detection) 以下の値を 20 U/ml に換算した。データーは mean ± S.E.M.で示し、統計学的有意差について、control と AS2541019 各用量投与群の比較は Dunnett's multiple comparisons test にて、また control と MMF 投与群の比較は Student’s t-test を用いて検定した (**$P < 0.01$, ***$P < 0.001$)。

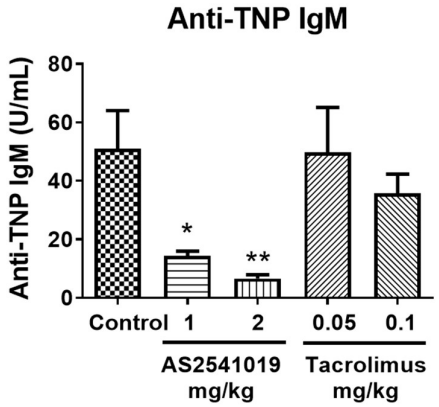


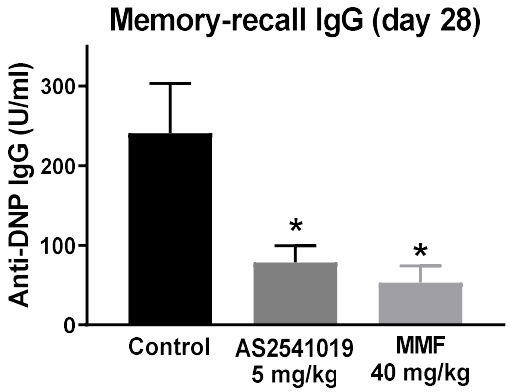
図 7 ラット抗体産生モデルにおける AS2541019 の T 細胞非依存的抗体産生抑制効果
抗原として TNP-Ficoll を用い、感作から 7 日目の抗 TNP IgM 抗体価を ELISA にて測定した。各用量の AS2541019 を 1 日 1 回ラットに経口投与した。また、対照として T 細胞を抑制する作用を持つタクロリムスを用い、1 日 1 回経口投与した (n=4)。データーは mean ± S.E.M.で示し、統計学的有意差について、control と AS2541019 各用量投与群の比較および control とタクロリムス各用量投与群の比較を Dunnett's multiple comparisons test にて検定した (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$)。

よる DSA 産生を抑制することにより生着期間を延長できる可能性がある。リコール応答による抗体産生における PI3Kδ の関与は明らかにされていないため、ラットのモデルを用いて AS2541019 の効果を評価した。ラットを DNP-KLH で免疫した後、DNP-KLH を再度投与し、2 回目の免疫後に AS2541019 (5 mg/kg) または MMF (40 mg/kg) を経口投与した。AS2541019 投与は、DNP-KLH の 2 回の免疫によって誘導された抗 DNP IgG 産生を阻害し (図 8A)、PI3Kδ がリコール応答による抗体産生に関与することが示唆された。さらに、抗体産生抑制作用のメカニズムを解明するために、1 次感作から 36 日目の脾臓細胞を回収し、B 細胞上の IgG 発現をフローサイトメトリーによって分析した。MMF が IgG へのクラススイッチに影響を与えずに B 細胞の数を減少させた一方で、AS2541019 は、B 細胞の数を減少させることなく B 細胞における IgG へのクラススイッチを有意に阻害し (図 8B、C)、現在使用されている免疫抑制剤である MMF とは異なるメカニズムによって AS2541019 は B 細胞を不活性化することが示された。

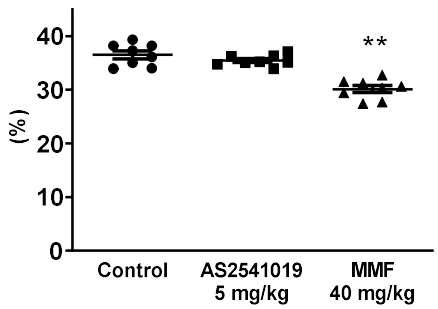
6. ラット同種間心臓移植モデルにおける DSA 産生抑制

AS2541019 が B 細胞活性化を阻害し、さらに抗体産生を抑制することが明らかとなったが、臓器移植における DSA 産生抑制効果を確かめるためには、移植モデルを用いた検討が不可欠である。従って本研究において、ラット同種間心臓移植モデルに

A



B



C

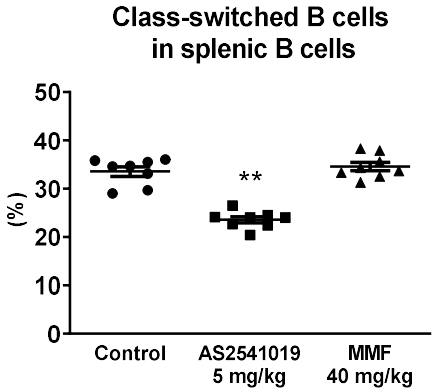


図 8 ラットリコール応答モデルにおける AS2541019 の効果

DNP-KLH を alum アジュバントと混合してラットの腹腔内に投与し、1 次感作を行なった。1 次感作から 15 日目に採血を行い、血漿中の抗 DNP IgG 抗体価を元に群わけを実施した。21 日目に 2 次感作として DNP-KLH を腹腔内投与した。被験薬物である AS2541019 と MMF は 2 次感作の日から 1 日 1 回、経口投与した。(A) 28 日目における抗 DNP IgG 抗体価を ELISA にて測定し、AS2541019 のリコール応答による抗体産生に対する抑制効果を検討した。(B, C) 36 日目において脾臓細胞を単離し、脾臓細胞中 B 細胞の割合、および B 細胞上の IgG を検出することによりクラススイッチを起こした B 細胞の割合を検出した (n=8)。データーは mean ± S.E.M.で示し、control と AS2541019 投与群または MMF 投与群の統計学的有意差を Student's t-test により検定した (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$)。

おける AS2541019 の DSA 産生抑制効果を検討した。タクロリムスおよび MMF の併用が臓器移植の標準的な免疫抑制療法であることを考慮して、0.02 mg/kg のタクロリムス筋肉内投与と 15 mg/kg の MMF の経口投与にさらに併用して、AS2541019 (0.5、1 および 2 mg/kg) を経口投与した。タクロリムスおよび MMF により、移植心臓生着期間は中央生存期間が 5 日 (コントロール) から 21 日以上に著しく延長された (表 3) 。一方、タクロリムス/MMF 併用下でも DSA 産生は残存していたが、AS2541019 のさらなる併用により、ドナー特異的 IgG レベルは顕著に低下し(図 9A)、ドナー特異的 IgG の AUC は有意に減少した (図 9B)。また、AS2541019 の投与は、試験終了時 (移植後 21 日目) において、レシピエントの体重に影響を与えなかった (表 3)。以上より、AS2541019 をタクロリムスおよび MMF と併用投与した場合、重篤な副作用なしに DSA 産生に対して強力な抑制効果を有することが示された。

7. ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルにおける効果

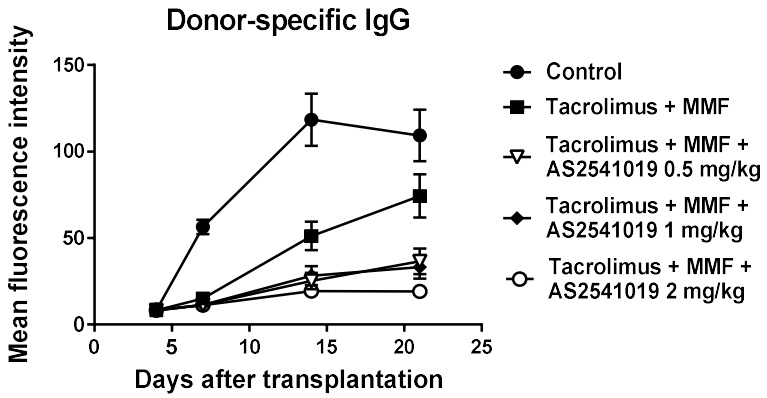
同種間心臓移植モデルではT細胞による拒絶反応の寄与が高く (Panther *et al.*, 2011)、本研究で用いたラット同種間心臓移植モデルでも AMR による移植臓器の拒絶反応を直接評価することはできなかった。そこで、B 細胞による拒絶反応の寄与が比較的高いハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルにおける効果を検討した。しかしながら、異種間移植でも T 細胞と B 細胞の両方が臓器拒絶に関与するため、過剰量

表 3 ACI to Lewis ラット同種間心臓移植モデルにおける AS2541019 の移植心臓生着率および体重への影響

Treatment (mg/kg)			n	Graft survival time	Median survival time	Body weight (g) ± S.E.M.
Tacrolimus	MMF	AS2541019		(days × number of observations)	(days)	(21 days post-transplantation)
Control (no treatment)			12	5 ×10, 6 ×2	5	291.6 ± 4.2
0.02	15	0	11	7 ×2, 13 ×2, 19, ≥21 ×6 **	≥21	270.5 ± 3.2 ##
0.02	15	0.5	13	13, 14 ×2, 15, 18, ≥21 ×8 NS	≥21	269.2 ± 3.0 NS
0.02	15	1	13	10 ×2, 12, 13, 14, ≥21 ×8 NS	≥21	271.1 ± 3.3 NS
0.02	15	2	13	10 ×2, 13, 14 ×2, 16, ≥21 ×7 NS	≥21	275.9 ± 2.8 NS

表中の Graft survival time は [生着日数 ×例数]で示した。
タクロリムス+ MMF 投与群に対する AS2541019 投与群の統計学的有意差を Log-rank test により検定した (**$P < 0.01$)。
Control 群に対するタクロリムス+ MMF 投与群の統計学的有意差を Student's t-test により検定した(##$P < 0.01$)。

A



B

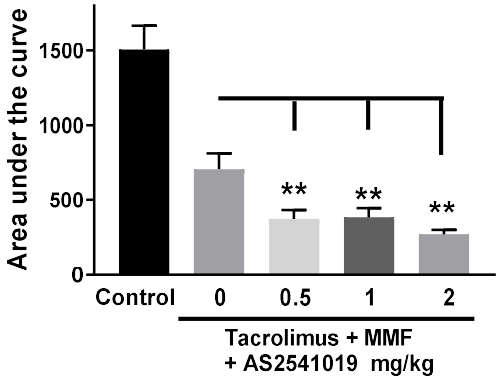


図 9 ラット同種間心臓移植モデルにおける抗ドナー抗体産生に対する AS2541019 の抑制効果

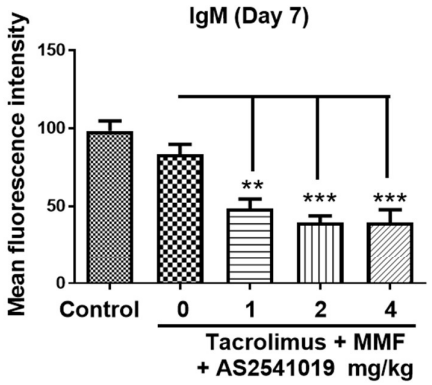
ACI ラットの心臓を摘出し、Lewis ラットの腹部に移植した。タクロリムス 0.02 mg/kg の筋肉内投与および MMF 15 mg/kg の経口投与を併用して、被験薬物である AS2541019 (0.5、1、2 mg/kg) を経口投与した。投与はすべての薬物について、1 日 1 回を 21 日間行った。末梢血を採取し、血漿中のドナー特異的 IgG の変化をフローサイトメトリーにより測定した。(A) ドナー脾臓細胞に結合したドナー特異的 IgG の変化を示した。(B) ドナー特異的 IgG 産生量の AUC を算出し、データーは mean ± S.E.M. で示した (n=11-13)。タクロリムス+ MMF 群に対する統計学的有意差を、Dunnett's multiple comparisons test にて検定した (**$P < 0.01$)。

の 0.1 mg/kg タクロリムスの筋肉内投与と 15 mg/kg MMF の経口投与による併用療法によって T 細胞を抑制した条件下において、B 細胞依存性の DSA 産生と AMR について検討した。図 10 に示すように、抗異種 IgM のピークは移植後 7 日目で MFI=83.4 であり、抗異種 IgG1/2a のピークは移植後 14 日目で MFI=116 であった。タクロリムスおよび MMF 投与群では、これらの時点のいずれにおいても異種反応性抗体産生は抑制されず、異種間移植心臓の生存期間をわずかに延長しただけであった。これは、タクロリムスおよび MMF の投与により T 細胞を抑制しても、B 細胞による抗体産生に依存した拒絶反応が起きていることを示している。タクロリムスおよび MMF に加え、1、2 および 4 mg kg の AS2541019 を併用した場合、抗異種 IgM (図 10A) および IgG1/2a (図 10B) 産生は顕著に抑制され、さらに移植臓器の中央生存期間 (コントロール=3 日) をそれぞれ 9.5 日、> 14 日および> 14 日に有意に延長した (図 10C)。これらの結果により、AS2541019 による異種反応性抗体産生の阻害が移植心臓生着期間の延長をもたらすことが示された。

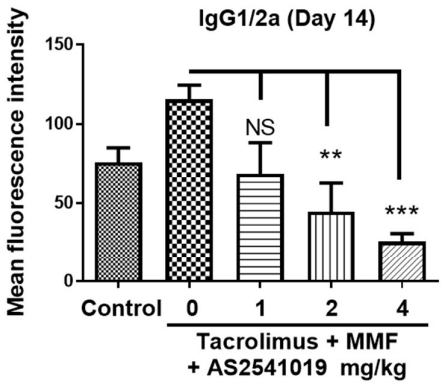
8. サル *ex vivo* 試験における B 細胞活性阻害

次に、ヒトと免疫系が比較的近いサルを用いて、AS2541019 の経口投与による末梢血中 B 細胞上の MHC クラス II 発現に対する作用を検討した。カニクイザル 2 個体に AS2541019 (3 および 10 mg/kg) を経口投与し、投与前および投与後 16 時間に採取

A



B



C

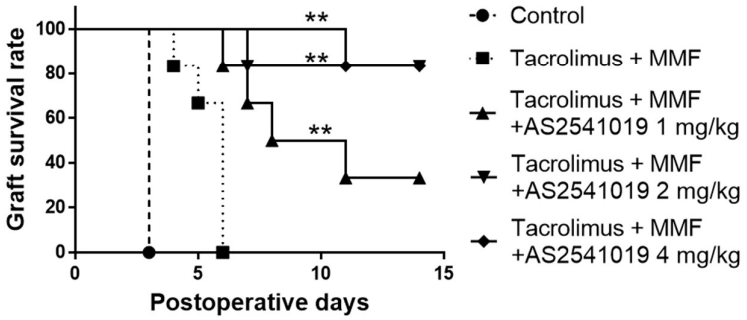


図 10 ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルにおける AS2541019 の抗ドナー抗体産生抑制効果および移植心臓生着延長効果

ハムスターの心臓を摘出し、Lewis ラットの腹部に移植することにより、異種間移植モデルを作製した。タクロリムス 0.1 mg/kg の筋肉内投与および MMF 15 mg/kg の経口投与に併用して、被験薬物である AS2541019 (1、2、4 mg/kg) を経口投与した。投与はすべての薬物について、1 日 1 回を 14 日間行った。移植後 7 および 14 日後に末梢血を採取し、血漿中のドナー特異的 IgM または IgG をフローサイトメトリーによりそれぞれ測定した。(A) 移植後 7 日目のドナー特異的 IgM 抗体価および (B) 移植後 14 日目のドナー特異的 IgG 抗体価について、データーは mean ± S.E.M.で示した (Control : n=3, その他の投与群: n=6)。タクロリムス+ MMF 群に対する統計学的有意差を Dunnett's multiple comparisons test にて検定した (**$P < 0.01$, ***$P < 0.001$)。 (C) 移植心臓の生着期間を示した。タクロリムス+ MMF 群に対する統計学的有意差を log-rank test にて検定した (**$P < 0.01$)。

した末梢血を、抗ヒトIgM刺激をする場合としない場合に分けて1日間インキュベートした。各個体におけるB細胞受容体刺激をしなかった場合の末梢血中B細胞MHCクラスII自発的発現は、投与前と比較してAS2541019投与により3 mg/kgで25.9%または32.3%、および10 mg/kgで44.2%または52.9%減少した (図11)。B細胞受容体を刺激した場合のMHCクラスII発現上昇は、AS2541019投与後16時間で3 mg/kgで14.1または38.6%、10 mg/kgで29.9または58.5%減少した (図11)。これらの結果から、AS2541019投与によりサル末梢B細胞における自発性およびB細胞受容体シグナル誘導性MHCクラスII発現の両方を効果的に阻害することが示された。

9. サル破傷風トキソイド免疫モデルにおける抗体産生抑制

次に、サルの抗体産生に対するAS2541019投与の効果を調べた。破傷風トキソイドは、*Clostridium tetani*によって産生され、カニクイザルにおいて抗体産生を誘導する抗原である (Oshima *et al.*, 2016)。タクロリムスおよびMMFは免疫抑制剤として確立されているため、本研究ではまず、抗体産生に対するこれらの免疫抑制剤の併用療法を評価した。タクロリムス 1 mg/kgおよびMMF 20 mg/kgの経口投与は、抗破傷トキソイド素抗体産生に対して抑制効果を示さず、この標準的免疫抑制療法が抗体産生を抑制するには不十分であることが示された（図12)。AS2541019を評価する際、破傷風トキソイド免疫後から1日1回、タクロリムス 1 mg/kgおよびMMF 20 mg/kgに

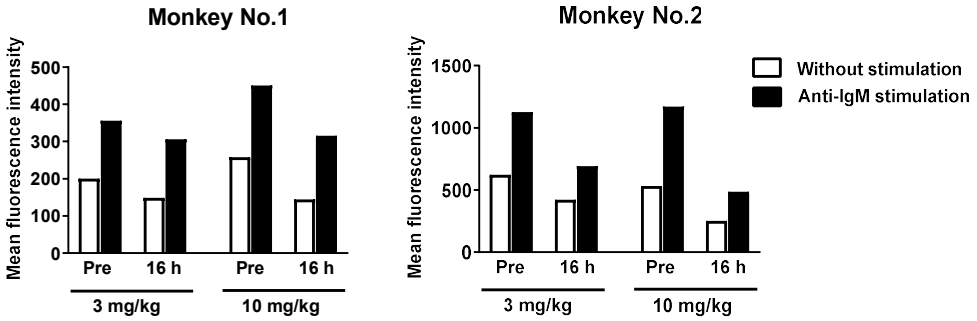


図 11 AS2541019 経口投与後のサル末梢血中 B 細胞 MHC クラス II 発現抑制作用

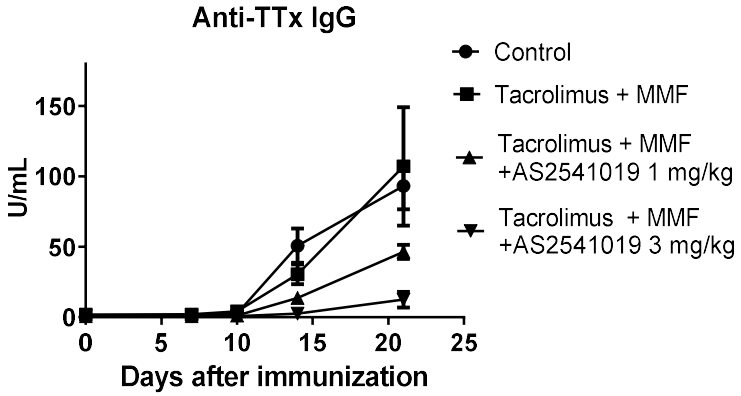
カニクイザルに AS2541019 (3、10 mg/kg) を経口投与し、投与前（Pre）および 16 時間後に採血を行った。末梢血中 B 細胞上の MHC クラス II 発現をフローサイトメトリーにて測定した。さらに、抗ヒト IgM で刺激した場合の B 細胞上 MHC クラス II 発現上昇に対する AS2541019 の抑制作用を、同様にフローサイトメトリーにて測定した (n=2)。それぞれの個体における MFI の値を図中に示した。

さらに AS2541019 の併用投与を行なった。免疫後 0、7、10、14 および 21 日目に末梢血を採取し、抗破傷風トキソイド抗体レベルを測定した。抗破傷風トキソイド抗体レベルは、タクロリムスおよび MMF 投与群と比較して、AS2541019 との併用治療により顕著に低下した (図 12A)。また、AS2541019 投与は、抗破傷風トキソイド抗体の AUC を減少させ、その効果は、タクロリムスおよび MMF 投与群と比較して統計学的に有意であった (図 12B)。これらの結果により、サルにおいて現行の免疫抑制剤に加えて AS2541019 併用投与することにより、抗破傷風トキソイド抗体産生が阻害されることが示された。

10. サル腎臓移植モデルにおける DSA 産生抑制

霊長類における DSA 産生に対する AS2541019 の効果を明らかにするために、サル腎臓移植モデルにおける作用を検討した。片側の腎臓をドナーから摘出してレシピエントに移植する手術を 2 頭のサル間で実施し、片側の腎臓をお互いに入れ替えた。もう片方の腎臓は、腎臓の機能不全による死亡を避けるために無処置のままレシピエントに残し、移植腎臓が拒絶されて機能を失った場合にも DSA の検出を可能とした。以前の研究では、タクロリムス 1 mg/kg と MMF 20 mg/kg の併用で、本モデルの移植腎臓生着期間を延長させることが示されている (Nakamura *et al*., 2018)。しかしながら、タクロリムス 1 mg/kg および MMF 20 mg/kg による治療後も DSA 産生は完全に

A



B

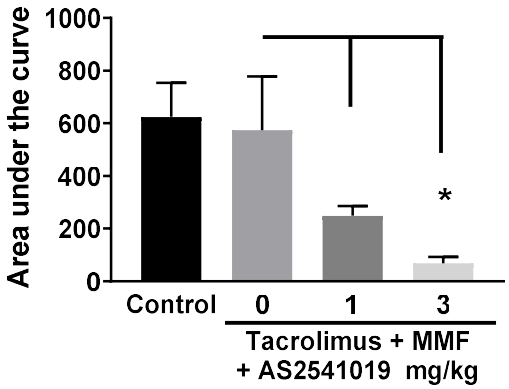
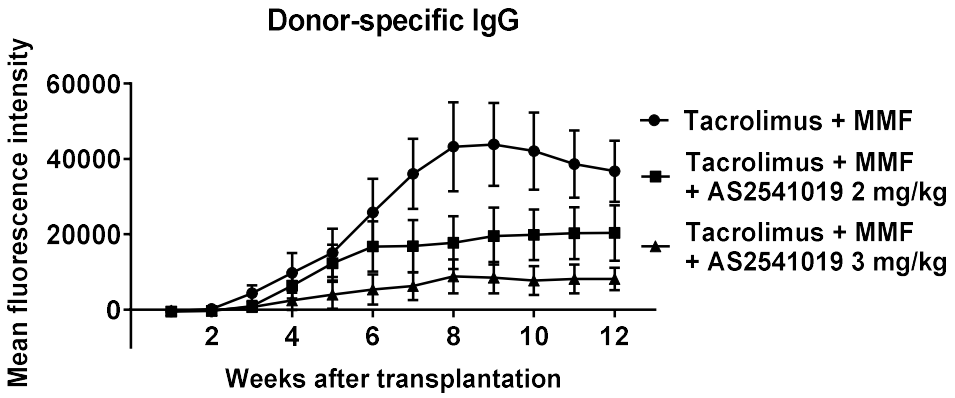


図 12 サル抗体産生モデルにおける AS2541019 の抗体産生抑制効果

破傷風トキソイドを抗原として使用し、カニクイザルに投与することで抗体産生を誘導した。タクロリムス 1 mg/kg + MMF 20 mg/kg に各用量の AS2541019 を併用し、1 日 1 回経口投与した。(A) 抗破傷風トキソイド IgG を ELISA にて測定し、抗体価の推移を示した。(B) 各群の AUC を算出し、タクロリムス+ MMF 群に対する AS2541019 併用投与による抑制効果を検討した (n=3)。データーは mean ± S.E.M.で示し、タクロリムス+ MMF 群に対する統計学的有意差を Dunnett's multiple comparisons test を用いて検定した (*$P < 0.05$)。

抑制されなかった（図 13)。現行の免疫抑制療法でも残存する DSA 産生に対する AS2541019 の効果を評価するために、AS2541019 をタクロリムスおよび MMF と併用投与し、移植当日から試験終了まで治療を続けた。AS2541019 の用量は、抗破傷風トキソイド抗体産生モデルにおける結果から有効性を推測し、2 mg/kg および 3 mg/kg とした。結果として、2 mg/kg および 3 mg/kg の AS2541019 の投与により、ドナー特異的 IgG 産生が顕著に抑制された (図 13A)。さらに AS2541019 投与により、ドナー特異的 IgG の AUC は用量依存的に低下し、タクロリムスおよび MMF 投与群と比較して 3 mg/kg の AS2541019 で統計的に有意であった (図 13B)。これらの結果により、サル腎臓移植モデルにおいて、タクロリムスおよび MMF による治療を行なってもなお残る DSA 産生を AS2541019 が抑制することが示された。

A



B

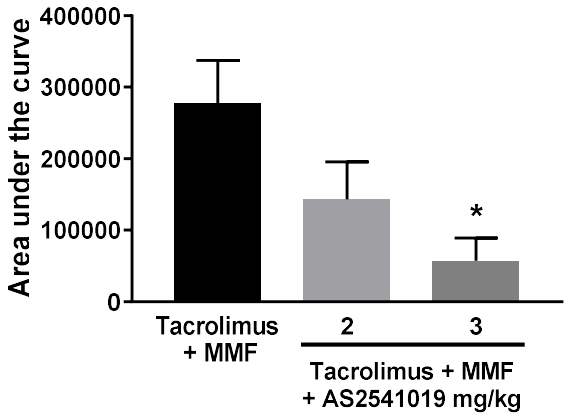


図 13 サル腎臓移植モデルにおける AS2541019 の抗ドナー抗体産生抑制効果

カニクイザルに腎移植手術を行い、タクロリムス 1 mg/kg + MMF 20 mg/kg に各用量の AS2541019 を併用投与した。移植手術当日より、各薬物を 1 日 1 回経口投与した。定期的に末梢血を採血し、血漿中の抗ドナー抗体をフローサイトメトリーにて測定した。(A) ドナーの PBMC に結合したドナー特異的抗体価の推移を示した。(B) 各群のドナー特異的抗体価について AUC を算出し、タクロリムス+ MMF 群に対して AS2541019 の併用投与による抑制効果を検討した (n=4)。データーは mean ± S.E.M.で示し、タクロリムス+ MMF 投与群に対する統計学的有意差を Dunnett's multiple comparisons test にて検定した (*$P < 0.05$)。

IV 考察

臓器移植後にレシピエント患者の免疫反応によって移植臓器の拒絶反応が起こるが、現在の移植医療において急性拒絶は免疫抑制剤によってコントロールされている。しかし、臓器移植後に産生される DSA によって発症する AMR は、未だに解決されていない問題である (Racusen and Haas, 2006; Singh *et al.*, 2009)。本研究では、新規に合成された化合物である AS2541019 の PI3Kδ 阻害作用を検討し、さらに PI3Kδ を阻害することによる B 細胞の免疫応答への効果を検討した。また、B 細胞は抗体産生細胞へと分化するため、AS2541019 により PI3Kδ を阻害することによる抗体産生に対する作用を検討した。種々の移植モデルを用いた試験においては、AS2541019 による DSA 産生に対する効果に焦点を当て、DSA 産生抑制による移植臓器の生着延長作用の可能性を検証した。現状の動物モデルでは AMR を発症させることは困難であるため、本研究では DSA 産生を確認することで AMR 発症の予測因子を検討した。将来、AMR を発症する移植モデルが構築され、AMR 抑制効果を検討することにより、臨床における効果予測が更に確かなものになることが期待される。

p110δ 欠損マウス、または遺伝的に p110δ を不活性化した ($p110\delta^{D910A/D910A}$) マウスの表現型は一般状態は正常だが、抗 IgM 刺激で誘導される B 細胞受容体の下流のシグナルである Akt のリン酸化や、B 細胞の増殖が減弱していると報告され、 B 細胞受容体シグナル伝達における PI3Kδ の重要性が示唆されている(Clayton *et al.*, 2002;

Jou *et al.*, 2002; Okkenhaug *et al.*, 2002)。本研究では、新規に合成された選択的 PI3Kδ 阻害剤 AS2541019 が、ヒト B 細胞の Akt リン酸化を抑制した。さらに AS2541019 は、ラット脾臓細胞、サル PBMC およびヒト PBMC の B 細胞増殖を阻害した。これらの結果は、PI3Kδ がヒトを含む霊長類およびげっ歯類の B 細胞の活性化において重要な役割を果たすことを示している。さらに本研究では、AS2541019 の抗体産生に対する作用を複数の動物モデルを用いて検討した。結果として、AS2541019 は T 細胞依存的および非依存的抗体産生の両方を抑制することが示され、低分子化合物の選択的 PI3Kδ 阻害剤で抗体産生が抑制されることが明らかとなった。

T 細胞依存的抗体産生は、以下のプロセスに従って誘導される。まず抗原提示細胞で抗原が処理され、MHC クラス II によって T 細胞に抗原提示される。MHC クラス II および抗原によって T 細胞受容体を介して T 細胞は刺激され、活性化する。B 細胞は活性化 T 細胞との相互作用およびサイトカイン誘導によって活性化し、形質細胞へと分化することで抗体が産生される。MHC クラス II 欠損 B 細胞を持つマウスを用いた研究により、B 細胞での MHC クラス II 発現が初期 T 細胞応答に必要であることが示されていたことから (Crawford *et al.*, 2006)、本研究では T 細胞と B 細胞の相互作用に注目した。検討の結果、AS2541019 が *in vitro* および *ex vivo* で B 細胞の MHC クラス II の発現を阻害することが示された。これにより、AS2541019 は MHC クラス II 発現を低下させることで抗原提示細胞としての B 細胞機能を抑制し、MHC クラス II と T 細胞受容体の相互作用を阻害することで T 細胞の活性化を阻害する可能性が示

された。また、AS2541019 はラットの T 細胞依存的 (DNP-KLH 免疫) 抗体産生を抑制した。これは、MHC クラス II と T 細胞受容体の相互作用の阻害、および PI3Kδ 阻害による B 細胞活性化の直接阻害の結果と考えられる。

T 細胞非依存的抗体は B 細胞受容体を直接活性化する単純な経路を介して産生される (Ron and Sprent, 1985)。ラットを用いた TNP-Ficoll 免疫試験において、タクロリムスが抗 TNP IgM 産生を抑制しなかったことは、このモデルにおける抗体産生が T 細胞非依存的であることを示している。一方、AS2541019 が抗 TNP IgM 産生を抑制したことから、AS2541019 は T 細胞依存的および T 細胞非依存的抗体産生の両方を抑制することが明らかとなった。T 細胞非依存的抗体産生は、脾臓辺縁帯 (marginal zone: MZ) に存在する B 細胞および B 細胞のサブタイプの 1 つである B1 細胞に依存することが示唆されている (Martin *et al.*, 2001; Martin and Kearney, 2002; Pillai *et al.*, 2005)。また、MZ-B 細胞を欠損したマウスは T 細胞非依存的抗原に対する反応が減弱し(Guinamard *et al.*, 2000)、p110δ 欠損マウスでは、MZ-B 細胞および B1 細胞の数が減少しており、T 細胞非依存的抗体産生が減弱する (Clayton *et al.*, 2002)。最初に上市された PI3Kδ 阻害剤であるイデラリシブをマウスに投与すると、MZ-B 細胞の数が減少することも報告されている (Durand *et al.*, 2009)。これらの報告は、PI3Kδ 阻害剤が MZ-B 細胞または B1 細胞の増殖・活性化を抑制することにより T 細胞非依存的抗体産生を阻害することを示唆しており、AS2541019 の T 細胞非依存的抗体産生抑制作用のメカニズムであると考えられる。

これまでの報告では、マウス病態モデルの抗体産生に対する選択的 PI3Kδ 阻害剤の効果は、結果が分かれていた。例えば、MRL/lpr マウスでは、PI3Kδ 阻害剤である GS-9829 の経口投与により、抗 dsDNA 抗体レベルは有意に低下するが、抗体産生は完全に抑制されず明らかに残存すると報告されている (Suarez-Fueyo *et al.*, 2014)。また、別の PI3Kδ 阻害剤である MSC2360844 の報告では、NZBW F1 マウスを用いた SLE 発症モデルにおいて腎機能障害を軽減するにもかかわらず、抗 dsDNA 抗体レベルを統計学的有意に抑制していない (Haselmayer *et al.*, 2014)。GS-9829 によるマウス脾細胞 pAkt の減少は、経口投与の 12 時間後でも検出され (Suarez-Fueyo *et al.*, 2014)、この長時間に渡る効果が、抗 dsDNA 産生の阻害に寄与している可能性がある。対照的に MSC2360844 では、投与後 4 時間で pAkt の減少は元に戻り、抗 dsDNA 抗体レベルを有意に減少させなかったと報告されている (Haselmayer *et al.*, 2014)。本研究においては、AS2541019 は、ラット抗体産生モデルの抗体産生をほぼ完全に阻害した。さらに AS2541019 の投与により MHC クラス II の発現低下が 16 時間後も維持され、抗体産生の強力な抑制効果がもたらされた。これらの結果から、PI3Kδ 阻害剤の薬物動態プロファイルが、各薬物の抗体産生に対する抑制効果の差異に寄与していることが考えられる。

臓器移植では、移植前からレシピエントの血清中に DSA が検出される場合があり、移植前 DSA は移植臓器生着率を悪化させるリスクファクターである (Lefaucheur *et al.*, 2010)。移植前 DSA に起因する急性 AMR を予防するために、PP、IVIG およびリ

ツキシマブ注射を含む脱感作療法が移植前に実施され、一定の生着率改善効果を示している (Montgomery *et al.*, 2011)。しかし近年の臨床報告では、これらの治療を行った場合でも、AMR がレシピエントの 20%に出現し、DSA が再度産生された場合には移植臓器生着期間が短縮することが報告されている (Vo *et al.*, 2015)。つまり、これらの脱感作療法は DSA 産生の完全阻害には不十分である。さらに、記憶 B 細胞がレシピエントに存在する場合、記憶 B 細胞活性化を介した DSA 産生がより頻繁に起こるため、AMR を発症するリスクが増大する (Lucia *et al.*, 2015)。これらの理由から、脱感作後の再度の DSA 生産は AMR の重要なリスクファクターであり、リコール応答による DSA 産生を防止することは、AMR の発症を回避するための方法の一つである。本研究では、AS2541019 がラット DNP-KLH 免疫モデルにおけるリコール応答による抗体産生を抑制したことから、AS2541019 が移植後のリコール応答による DSA 産生を抑制することで移植臓器の生着期間を延長する可能性が示された。さらに、MMF は B 細胞数を減少させたが、AS2541019 は B 細胞の数を変えずに IgG へのクラススイッチングを阻害し、MMF とは異なる機序で B 細胞活性化を阻害することが示された。AS2541019 および MMF は、リコール応答による抗体産生を同程度に抑制したが、異なる機序を有する薬物を使用することで、より効果的に B 細胞を阻害できるかもしれない。

ラット同種間心臓移植モデルにおいて、タクロリムス 0.02 mg/kg および MMF15 mg/kg を含む併用療法により移植心臓生着期間は著しく延長され、生着期間の中央値

は実験期間である 21 日を超えた。ラット同種間心臓移植モデルの急性期の拒絶反応は T 細胞依存的な機序によって誘導されることから (Panther *et al.*, 2011)、タクロリムス/MMF の併用投与は急性拒絶を抑制するのに十分な T 細胞活性化抑制作用をもたらしたことが示唆される。しかし、両薬物の併用でも DSA 産生は完全には抑制されなかった。このことは、タクロリムス/MMF 併用療法では、T 細胞活性化を十分に阻害し急性拒絶を抑制するが、DSA を十分に抑制できない現在の臨床的治療法の状況を反映していることを示している。したがって、タクロリムス/MMF にさらに AS2541019 を併用した場合に DSA 産生が抑制されたという結果は、AS2541019 が臨床において免疫抑制剤による治療後に残存する DSA 産生を効果的に抑制できることを示唆している。

異種間臓器移植では、ドナーに存在する自然抗体により移植臓器が速やかに拒絶される場合があるが (超急性拒絶)、ハムスターからラットへの異種移植モデルでは、異種反応性の自然抗体を介した超急性拒絶は起こらず (Zhang *et al.*, 2000)、拒絶反応は T 細胞による直接的な作用と、新たな抗体産生に依存するとされている (Lin *et al.*, 1998)。T 細胞は移植臓器に急速に集積して急性拒絶を開始するため、T 細胞媒介拒絶は異種移植片拒絶の主因であるが (Sebille *et al.*, 2001)、移植片の生存時間を延長するには、T 細胞を除去するだけでは不十分であることが知られている (Zhang *et al.*, 2000)。本研究では、タクロリムス 0.1 mg/kg と MMF 15 mg/kg をレシピエントに投与することによって T 細胞を抑制し、B 細胞による抗体産生がより強く拒絶に寄与する状態を

作製した。この条件下では、DSA による AMR によって移植臓器が拒絶されるため、B 細胞を特異的に阻害する化合物の移植臓器生着延長効果を検討することができると考えられた。結果としてこの併用療法は、移植心臓生着期間をわずかに延長したが、異種反応性抗体レベルは低下させなかった。このタクロリムスと MMF の併用療法にさらに AS2541019 を併用すると、移植心臓の生着期間が延長し、用量依存的に異種反応性抗体の産生が抑制され、この効果は B 細胞活性化阻害の結果と考えられる。また、精製した異種反応性 IgM および IgG をドナーに移入すると、ハムスターの異種移植心臓生着期間が短縮すると報告されている (Miyatake *et al.*, 1998)。従って、異種反応性抗体産生の阻害が、本研究で観察された AS2541019 による異種移植臓器生着時間の延長の要因である可能性が高い。これらの結果は、AS2541019 による抗体産生の阻害が異種移植臓器の拒絶反応を防ぐのに十分に強力であることを示しており、AS2541019 は抗体による臓器障害、つまり AMR を防ぐことを目的として使用できることを示唆している。

霊長類の免疫系がげっ歯類の免疫系と著しく異なることから、非ヒト霊長類臓器移植モデルにおける DSA 産生抑制作用を証明することは、ヒトの臨床における効果を予測する上で重要である。サル腎臓移植モデルでは、タクロリムス 1 mg/kg および MMF 20 mg/kg の併用療法により、移植臓器の生着期間が延長することが示されている (Nakamura *et al.*, 2018)。しかし、本研究において、同じ用量のタクロリムスおよび MMF をカニクイザルに投与しても DSA 産生が残存し、さらに AS2541019 を併用す

ると DSA 産生が顕著に抑制された。従って、AS2541019 が、ラットのみならずサル臓器移植モデルにおいても、標準的な免疫抑制療法では残存する DSA 産生を阻害することが示された。また、AS2541019 はヒト B 細胞活性化を *in vitro* で阻害したことから、AS2541019 が臨床的にも DSA 産生を阻害することが予測される。

臓器移植において B 細胞の機能を制御することによりもたらされる利点は、DSA 産生を阻害することに留まらない。いくつかの報告は、メモリーT 細胞の分化および維持が、B 細胞からの抗原提示に依存することを示唆している。B 細胞欠損マウスのメモリー$CD4^+$ T 細胞では、T 細胞依存的抗原に対するインターロイキン-2 の産生レベルが低下しており、これは B 細胞がメモリー$CD4^+$ T 細胞機能と関連していることを示している (Linton *et al.*, 2000)。また、B 細胞上の MHC クラス II を欠損させたマウスではメモリー$CD4^+$ T 細胞が少なく、MHC クラス II 発現 B 細胞がメモリー$CD4^+$ T 細胞の分化にとって重要であることが示されている (Crawford *et al.*, 2006)。メモリー$CD4^+$ T 細胞はドナー特異的免疫の維持に重要であり、ドナー抗原に対する早期応答を開始するために迅速に動員される(Bingaman and Farber, 2004; Su and Fairchild, 2014; Lin *et al.*, 2015)。さらに、マウス腎臓移植モデルでは、ドナー特異的メモリー$CD4^+$ T 細胞をレシピエントに移入すると、より高頻度に DSA 産生および AMR 発症が誘導されると報告されている (Gorbacheva *et al.*, 2016)。本研究において、AS2541019 による B 細胞上の MHC クラス II 発現低下が、メモリーCD4+ T 細胞を介した免疫記憶応答の低下につながった可能性がある。従って、本研究にて確認された PI3Kδ 阻害

剤による DSA 産生抑制効果は、B 細胞増殖に対する直接的阻害効果に加え、MHC クラス II 発現抑制作用による CD4+T 細胞の抑制効果を介してもたらされたと考えられる (図 14)。

AMR の発症を予防するため、DSA レベルをコントロールすることを目的とした治療が行われている。例えば、既に血清中に存在している DSA を減少させるために、PP および IVIG を含む非免疫抑制治療が行われる (Rocha *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2009; Ruangkanchanasetr *et al.*, 2014)。しかし、PP や IVIG といった非免疫抑制的治療は免疫細胞の活性化を抑制できないため、新規またはリコール応答による DSA 産生を阻害できず、長期の移植臓器生着効果を誘導するのに十分な治療法ではない (Matignon *et al.*, 2017)。現在利用可能な薬物の中で、抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブは、CD20 発現 B 細胞を枯渇させ、AMR の発症を阻害する (Faguer *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2014)。抗体産生は B 細胞から分化する形質細胞によって起こるが、CD20 は形質細胞に分化した段階では細胞表面上に発現しないため (Chen-Kiang, 2005)、リツキシマブは抗体産生細胞を制御できない。従って、リツキシマブは移植前に使用した場合に DSA 産生を予防するのには有効であるが、AMR 発症後に投与された場合には有意な効果は得られない (Sautenet *et al.*, 2016)。さらに、リツキシマブで治療された患者は感染症のリスクが高いことも後ろ向き研究から明らかにされている (Kamar *et al.*, 2010)。低分子薬の中では、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブが、DSA 産生を防ぐためにオフラベルで使用されている (Sureshkumar *et al.*, 2012; Ejaz *et al.*,

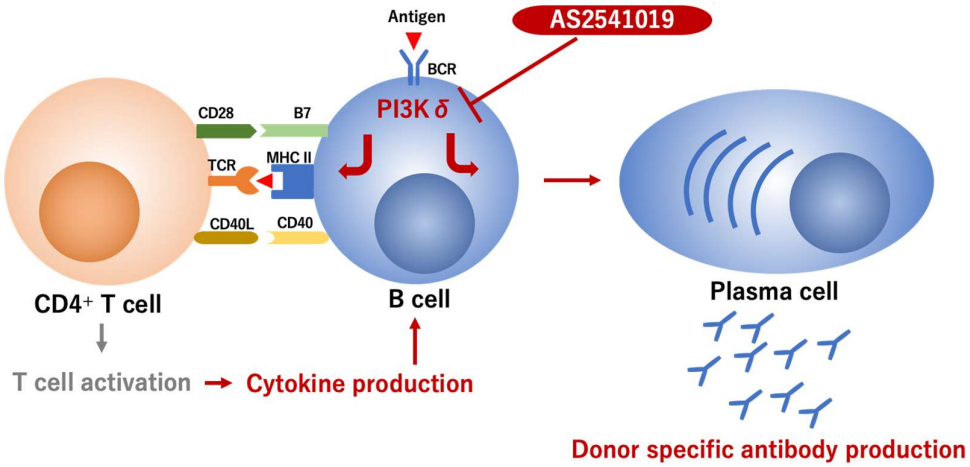


図 14 AS2541019 の抗ドナー抗体産生抑制機序

B 細胞受容体 (B cell receptor) 刺激は PI3Kδ を介して抗ドナー抗体産生を誘導する。PI3Kδ 選択的阻害剤である AS2541019 により、B 細胞の増殖は阻害され、抗ドナー抗体産生は抑制される。また AS2541019 は B 細胞の MHC クラス II 発現を阻害し、$CD4^+$ T 細胞への抗原提示が行われなくなることで helper T 細胞による B 細胞の活性化は抑制されると考えられる。

2014)。もともと悪性形質細胞によって形成されるがんの一種である多発性骨髄腫の治療に用いられるボルテゾミブは、プロテアソームの活性化を阻害することによって抗体産生細胞を枯渇させる (Richardson *et al.*, 2003)。しかし、ボルテゾミブには、肺炎を含む副作用が発生するリスクがある (Knopf *et al.*, 2014) 。さらに、ボルテゾミブ投与がマウスの体重を有意に減少させることが報告されている (Redfield *et al.*, 2013)。対照的に、AS2541019 投与は、ラット同種間心臓移植モデルにおいて、体重減少または他の重度の副作用を発生させず、AS2541019 がボルテゾミブと比較して安全な化合物であることが示唆された。本研究では、AS2541019 が新規の DSA 産生を阻害することが示されたが、形質細胞はその表面に B 細胞受容体を発現しないので、PI3Kδ 阻害剤である AS2541019 は抗体産生細胞を枯渇させることはできないと考えられる。対照的にボルテゾミブは、形質細胞の枯渇により DSA レベルを低下させるため (Walsh *et al.*, 2012)、新規 DSA 産生を阻害する目的で AS2541019 用い、また移植後の既存の DSA レベルを低下させる目的でボルテゾミブを使用することが、AMR の発症を阻害するためには有効な薬物治療戦略であると考えられる。

獣医学領域において、ネコの死因として 30-50%を占める慢性腎臓病は臨床的に問題となる疾患であり、腎臓移植を行うことが根本的治療法となり得る。ネコの腎臓移植後には、CNI であるシクロスポリンとプレドニゾロンが生着期間を延長させる目的で使用されている (Schmiedt *et al.*, 2008)。一方で、タクロリムスを実験的に使用すると中間生存日数を 23 日から 44 日に延長したと報告されている (Kyles *et al.*, 2003)。

タクロリムスの臨床での使用は標準化されておらず、投与用量や target trough level は研究段階である。今回の研究で、タクロリムスと MMF の併用により、ラット同種間心臓移植モデルにおいて生着延長効果が認められ (表 3)、またタクロリムスと MMF はヒトの臨床においても標準的免疫抑制剤として使用されることから、獣医療においても著効する可能性がある。また、拒絶反応を起こしたネコの移植腎臓の 30 %に AMR の所見が認められたため (De Cock *et al.*, 2004)、DSA 産生が生着率低下に起因していると考えられる。そのため、タクロリムスおよび MMF に加えて、DSA 産生を抑制できる PI3Kδ 阻害剤により、移植腎臓の生着期間が延長されることが期待される。

V 結論

本研究では、A2541019 の PI3Kδ 選択的阻害作用を検討すると共に、PI3Kδ を抑制することによる B 細胞の免疫応答への影響について検討した。また、B 細胞は抗体産生細胞に分化するため、PI3Kδ を阻害することによる抗体産生能への影響を検討した。さらに、種々の移植モデルを用い、DSA 産生に対する PI3Kδ 阻害剤の効果を検討した。

新規に合成された AS2541019 は、各 PI3K サブタイプのキナーゼアッセイにより、選択的 PI3Kδ 阻害剤であることが示された。AS2541019 は、*in vitro* で B 細胞上の B 細胞受容体シグナル誘導 Akt リン酸化、B 細胞増殖および MHC クラス II 発現を阻害した。この阻害作用は動物種間での大きな差異を認められず、ラット、サルおよびヒト由来 B 細胞の増殖および MHC クラス II 発現が同様に抑制された。さらに AS2541019 の投与により、ラットにおける T 細胞依存的抗体産生および T 細胞非依存的抗体産生が抑制された。抗体産生抑制作用についても動物種間で大きな差は認められず、サルにおいても、抗破傷風トキソイド抗体産生を抑制した。

臓器移植モデルを用いた検討ではまず、ACI to Lewis ラット心臓移植モデルにおいて、AS2541019 はタクロリムスおよび MMF とさらに併用することにより、DSA 産生を顕著に抑制した。次に、ハムスターからラットへの異種間心臓移植モデルにおいて、AS2541019 はタクロリムス/MMF との併用で、DSA 産生を阻害することにより移植

臓器の生着期間を延長した。この結果は、AS2541019 が B 細胞活性化に対する強力な阻害効果により抗体産生を阻害し、機能障害から移植臓器を保護できることを示している。さらに AS2541019 の臨床的有用性を検討するため、免疫系がヒトに比較的近いサルを用いて検討を行った。結果として、サル腎臓移植モデルにおいて、AS2541019 は DSA 産生を同様に抑制した。以上より、AS2541019 が PI3Kδ を選択的に阻害することにより臓器移植における抗ドナー抗体産生を抑制することが明らかとなった。

AS2541019 は、ヒト B 細胞活性化をラットおよびサルと同様に阻害したことから、本研究で得られた AS2541019 の DSA 産生阻害効果は、臨床的有用性を示している。現在の医療において、DSA による AMR が移植臓器生着期間の短縮につながる大きな問題であり、AS2541019 は DSA 産生を阻害することにより移植臓器生着期間を延長させる臨床的に有効な治療薬候補であることが示された。

VI 謝辞

本論文の発表および作成に際し、終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学分野薬理学教室、乙黒兼一教授に深く感謝申し上げます。また、本論文を御高閲頂きました北海道大学大学院獣医学研究院病態制御学分野感染症学教室、大橋和彦教授、北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学分野解剖学教室、市居修准教授、北海道大学大学院獣医学研究院臨床獣医科学分野動物分子医学教室、高田健介准教授に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を実施するにあたり多大なるご協力を頂きましたアステラス製薬株式会社の上司、同僚に深く感謝申し上げます。

VII 引用文献

Abu Jawdeh BG, Cuffy MC, Alloway RR, Shields AR, Woodle ES (2014). Desensitization in kidney transplantation: review and future perspectives. *Clin Transplant* 28(4): 494-507.

Allison AC, Eugui EM (2000). Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47(2-3): 85-118.

Arias M, Seron D, Moreso F, Bestard O, Praga M (2011). Chronic renal allograft damage: existing challenges. *Transplantation* 91(9 Suppl): S4-25.

Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG (2013). Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *J Immunol* 191(12): 5785-5791.

Behrend M (1998). Mycophenolate mofetil (Cellcept). *Expert Opin Investig Drugs* 7(9): 1509-1519.

Bingaman AW, Farber DL (2004). Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant* 4(6): 846-852.

Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW, Brown SA (2016). Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. *Vet Pathol* 53(2): 309-326.

Brown CM, Abraham KA, O'Kelly P, Conlon PJ, Walshe JJ (2009). Long-term experience of plasmapheresis in antibody-mediated rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 41(9): 3690-3692.

Cai J, Terasaki PI (2005). Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum immunol* 66(4): 334-342

Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573): 1655-1657.

Chen-Kiang S (2005). Biology of plasma cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 18(4): 493-507.

Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A*, et al.* (2002). A crucial role for

the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* 196(6): 753-763.

Crawford A, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D (2006). Primary T cell expansion and differentiation *in vivo* requires antigen presentation by B cells. *J Immunol* 176(6): 3498-3506.

De Cock HE, Kyles AE, Griffey SM, Bernsteen L, Gregory CR (2004). Histopathologic findings and classification of feline renal transplants. *Vet Pathol* 41(3): 244-256.

Do B, Mace M, Rexwinkle A (2016). Idelalisib for treatment of B-cell malignancies. *Am J Health Syst Pharm* 73(8): 547-555.

Durand CA, Hartvigsen K, Fogelstrand L, Kim S, Iritani S, Vanhaesebroeck B*, et al.* (2009). Phosphoinositide 3-kinase p110 delta regulates natural antibody production, marginal zone and B-1 B cell function, and autoantibody responses. *J Immunol* 183(9): 5673-5684.

Ejaz NS, Alloway RR, Halleck F, Durr M, Budde K, Woodle ES (2014). Review of bortezomib treatment of antibody-mediated rejection in renal transplantation. *Antioxid Redox Signal* 21(17): 2401-2418.

Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP*, et al.* (2013). Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* 95(3): 410-417.

Faguer S, Kamar N, Guilbeaud-Frugier C, Fort M, Modesto A, Mari A*, et al.* (2007). Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 83(9): 1277-1280.

Fung-Leung WP (2011). Phosphoinositide 3-kinase delta (PI3Kdelta) in leukocyte signaling and function. *Cell Signal* 23(4): 603-608.

Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD (2008). The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am J Transplant* 8(7): 1367-1373.

Gorbacheva V, Fan R, Fairchild RL, Baldwin WM, 3rd, Valujskikh A (2016). Memory CD4 T Cells Induce Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts. *J Am Soc Nephrol* 27(11):

3299-3307.

Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1(1): 31-36.

Halloran PF (1996). Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transplant* 10(1 Pt 2): 118-123.

Haselmayer P, Camps M, Muzerelle M, El Bawab S, Waltzinger C, Bruns L*, et al.* (2014). Characterization of Novel PI3Kdelta Inhibitors as Potential Therapeutics for SLE and Lupus Nephritis in Pre-Clinical Studies. *Front Immunol* 5: 233.

Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM*, et al.* (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116(12): 2078-2088.

Jiang B, Li T, Guo L, Shen H, Ye S, Chen S (2015). Efficacy and Safety of Rituximab in Systemic Lupus Erythematosus and Sjogren Syndrome Patients With Refractory Thrombocytopenia: A Retrospective Study of 21 Cases. *J Clin Rheumatol* 21(5): 244-250.

Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Carpino N*, et al.* (2002). Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* 22(24): 8580-8591.

Kamar N, Milioto O, Puissant-Lubrano B, Esposito L, Pierre MC, Mohamed AO*, et al.* (2010). Incidence and predictive factors for infectious disease after rituximab therapy in kidney-transplant patients. *Am J Transplant* 10(1): 89-98.

Kinugasa F, Nagatomi I, Ishikawa H, Nakanishi T, Maeda M, Hirose J*, et al.* (2008). Efficacy of oral treatment with tacrolimus in the renal transplant model in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Sci* 108(4): 529-534.

Knopf KB, Duh MS, Lafeuille MH, Gravel J, Lefebvre P, Niculescu L*, et al.* (2014). Meta-analysis of the efficacy and safety of bortezomib re-treatment in patients with multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 14(5): 380-388.

Kreis HA, Ponticelli C (2001). Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 71(11 Suppl): Ss5-9.

Kyles AE, Gregory CR, Craigmill AL, Griffey SM, Jackson J, Stanley SD (2003). Pharmacokinetics of tacrolimus after multidose oral administration and efficacy in the prevention of allograft rejection in cats with renal transplants. *Am J Vet Res* 64(7): 926-934.

Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C*, et al.* (2010). Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 21(8): 1398-1406.

Lin K, Chen S, Chen G (2015). Role of Memory T Cells and Perspectives for Intervention in Organ Transplantation. *Front Immunol* 6: 473.

Lin Y, Vandeputte M, Waer M (1998). Suppression of T-independent IgM xenoantibody formation by leflunomide during xenografting of hamster hearts in rats. *Transplantation* 65(3): 332-339.

Linton PJ, Harbertson J, Bradley LM (2000). A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. *J Immunol* 165(10): 5558-5565.

Lucia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J*, et al.* (2015). Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int* 88(4): 874-887.

Mao Q, Terasaki PI, Cai J, Briley K, Catrou P, Haisch C*, et al.* (2007). Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* 7(4): 864-871.

Martin F, Kearney JF (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2(5): 323-335.

Martin F, Oliver AM, Kearney JF (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14(5): 617-629.

Matignon M, Pilon C, Commereuc M, Grondin C, Leibler C, Kofman T*, et al.* (2017). Intravenous immunoglobulin therapy in kidney transplant recipients with de novo DSA:

Results of an observational study. *PLoS One* 12(6): e0178572.

Miyatake T, Sato K, Takigami K, Koyamada N, Hancock WW, Bazin H*, et al.* (1998). Complement-fixing elicited antibodies are a major component in the pathogenesis of xenograft rejection. *J Immunol* 160(8): 4114-4123.

Montgomery RA, Lonze BE, King KE, Kraus ES, Kucirka LM, Locke JE*, et al.* (2011). Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *The N Engl J Med* 365(4): 318-326.

Nakamura K, Oshima S, Maeda M, Morio H, Fukahori H, Nakanishi T*, et al.* (2018). Replacement of mycophenolate mofetil with a JAK inhibitor, AS2553627, in combination with low-dose tacrolimus, for renal allograft rejection in non-human primates. *Int Immunopharmacol* 64: 201-207.

Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E*, et al.* (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297(5583): 1031-1034.

Ono K, Lindsey ES (1969). Improved technique of heart transplantation in rats. *The J Thorac Cardiovasc Surg* 57(2): 225-229.

Oshima S, Fujii Y, Karrer EE, Takamura F, Chapin SJ, Neighbors M*, et al.* (2016). Immunosuppressive effect of ASP2408, a novel CD86-selective variant of CTLA4-Ig, in rats and cynomolgus monkeys. *Int Immunopharmacol* 40: 310-317.

Panther F, Strasen J, Czolbe M, Lazariotou M, Burkard N, Williams T*, et al.* (2011). Inhibition of nuclear translocation of calcineurin suppresses T-cell activation and prevents acute rejection of donor hearts. *Transplantation* 91(6): 597-604.

Pillai S, Cariappa A, Moran ST (2005). Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23: 161-196.

Racusen LC, Haas M (2006). Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 1(3): 415-420.

Randall KL (2016). Rituximab in autoimmune diseases. *Aust Prescr* 39(4): 131-134.

Redfield RR, Lou Y, Rodriguez E, Rostami S, Parsons RF, Noorchashm H*, et al.* (2013). Sustained reduction of alloantibody secreting plasma cells and donor specific antibody with proteasome inhibition in mice. *Transpl Immunol* 29(1-4): 11-16.

Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2003). Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer control* 10(5): 361-369.

Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, Tuttle-Newhall J, Collins BH*, et al.* (2003). Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation* 75(9): 1490-1495.

Ron Y, Sprent J (1985). Prolonged survival *in vivo* of unprimed B cells responsive to a T-independent antigen. *J Exp Med* 161(6): 1581-1586.

Ruangkanchanasetr P, Satirapoj B, Termmathurapoj S, Namkhanisorn K, Suaywan K, Nimkietkajorn V*, et al.* (2014). Intensive plasmapheresis and intravenous immunoglobulin for treatment of antibody-mediated rejection after kidney transplant. *Exp Clin Transplant* 12(4): 328-333.

Ruhlmann A, Nordheim A (1997). Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology* 198(1-3): 192-206.

Sautenet B, Blancho G, Buchler M, Morelon E, Toupance O, Barrou B*, et al.* (2016). One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial. *Transplantation* 100(2): 391-399.

Schmiedt CW, Holzman G, Schwarz T, McAnulty JF (2008). Survival, complications, and analysis of risk factors after renal transplantation in cats. *Vet Surg* 37(7): 683-695.

Sebille F, Guillet M, Brouard S, Gagne K, Petzold T, Blancho G*, et al.* (2001). T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am J Transplant* 1(1): 21-28.

Singh N, Pirsch J, Samaniego M (2009). Antibody-mediated rejection: treatment alternatives and outcomes. *Transplant Rev* 23(1): 34-46.

Stegall MD, Dean PG, Gloor J (2009). Mechanisms of alloantibody production in sensitized renal allograft recipients. *Am J Transplant* 9(5): 998-1005.

Stegall MD, Gloor JM (2010). Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment. *Curr Opin Organ Transplant* 15(1): 8-10.

Su CA, Fairchild RL (2014). Memory T Cells in Transplantation. *Curr Transplant Rep* 1(3): 137-146.

Suarez-Fueyo A, Rojas JM, Cariaga AE, Garcia E, Steiner BH, Barber DF*, et al.* (2014). Inhibition of PI3Kdelta reduces kidney infiltration by macrophages and ameliorates systemic lupus in the mouse. *J Immunol* 193(2): 544-554.

Sureshkumar KK, Hussain SM, Marcus RJ, Ko TY, Khan AS, Tom K*, et al.* (2012). Proteasome inhibition with bortezomib: an effective therapy for severe antibody mediated rejection after renal transplantation. *Clin Nephrol* 77(3): 246-253.

Valenzuela NM, Reed EF (2017). Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. *J Clin Invest* 127(7): 2492-2504.

Vanhaesebroeck B, Whitehead MA, Pineiro R (2016). Molecules in medicine mini-review: isoforms of PI3K in biology and disease. *J Mol Med* 94(1): 5-11.

Vo AA, Sinha A, Haas M, Choi J, Mirocha J, Kahwaji J*, et al.* (2015). Factors Predicting Risk for Antibody-mediated Rejection and Graft Loss in Highly Human Leukocyte Antigen Sensitized Patients Transplanted After Desensitization. *Transplantation* 99(7): 1423-1430.

Walsh RC, Alloway RR, Girnita AL, Woodle ES (2012). Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 81(11): 1067-1074.

Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Pochinco D, Birk PE, Ho J*, et al.* (2015). Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am J Transplant* 15(11): 2921-2930.

Zhang Z, Bedard E, Luo Y, Wang H, Deng S, Kelvin D*, et al.* (2000). Animal models in xenotransplantation. *Expert Opin Investig Drugs* 9(9): 2051-2068.

Zhao YG, Shi BY, Qian YY, Bai HW, Xiao L, He XY (2014). Clinical efficacy of rituximab for acute rejection in kidney transplantation: a meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 46(6): 1225-1230.

VIII　英文抄録

Inhibitory effects of PI3Kδ selective inhibitor on the donor specific antibody production in organ transplantation

Takanori Marui

Candidate discovery science labs., Drug discovery research, Astellas Pharma, Inc.

21, Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan.

Long-term graft survival after organ transplantation is difficult to achieve because of the development of chronic rejection. One cause of chronic rejection arises from antibody-mediated rejection (AMR), which is dependent on the production of donor-specific antibodies (DSA). Current immunosuppression in organ transplantation is effective in preventing acute T cell-mediated rejection, but the risk of DSA production and graft loss due to AMR remains unchanged. B cell-mediated antibodies play a critical role in protecting the body from infections, however, excessive antibody production is involved in the transplanted organ rejection through DSA production. Regulation of antibody production is therefore crucial for preventing AMR.

Phosphatidylinositol-3-kinase p110δ (PI3Kδ), a member of the family of PI3K lipid kinases, is a key mediator of B cell activation and proliferation, with a small molecule PI3Kδ inhibitor having been approved for the treatment of B cell lymphoma. However, the effect of PI3Kδ inhibitors on antibody production has not been clearly elucidated. In this study, the effect of the selective PI3Kδ inhibitor, AS2541019, on B cell immunity and antibody production were investigated. Further, the inhibitory effect of AS2541019 on DSA production was evaluated in preclinical rodent and non-human primate transplant models.

Present results show that AS2541019 effectively prevented B cell proliferation and MHC class II expression *in vitro*, and the effects were observed in rats, cynomolgus monkeys and humans without significant species differences.

Oral administration of AS2541019 resulted in significant inhibition of both T-dependent and T-independent *de novo* antibody production on rat antibody production models. Concomitant administration of AS2541019 with tacrolimus and mycophenolate mofetil (MMF) inhibited de novo DSA production in an ACI-to-Lewis rat cardiac allotransplant model. Further, in a hamster to rat concordant xenotransplant model, AS2541019 significantly prolonged graft survival time by inhibiting xenoreactive antibody production.

To predict the efficacy of AS2541019 in clinical practice, its effects in cynomolgus monkeys were evaluated. Oral administration of AS2541019 inhibited MHC class II expression on peripheral B cells and anti-tetanus toxoid antibody production. In cynomolgus

monkey renal allotransplant model, concomitant administration of AS2541019 with tacrolimus and MMF significantly inhibited de novo DSA production.

Therefore, this study demonstrates that the selective PI3Kδ inhibitor AS2541019 inhibits antibody production through potent inhibitory effects on B cell activation. Together, present findings indicate that the PI3Kδ selective inhibitor is a potential candidate for preventing AMR development by inhibiting DSA production. Furthermore, considering no significant species difference existed among rats, monkeys and humans, AS2541019 can inhibit DSA production clinically, indicating the possibility of suppressing AMR and chronic rejection, which are important issues in current transplantation.