

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

**Spleen tyrosine kinase (Syk) 阻害薬
に関する免疫薬理学的研究**

加藤 俊伸

2018 年

目次

序論	1
第1章 JTE-852の基本特性に関する検討	
第1節 緒言	4
第2節 材料および方法	4
第3節 結果	9
第4節 考察	16
第2章 Syk阻害薬JTE-852のアレルギー疾患治療薬としての有用性に関する検討	
第1節 緒言	18
第2節 材料および方法	21
第3節 結果	30
第4節 考察	42
第3章 Syk阻害薬JTE-852の自己免疫疾患治療薬としての有用性に関する検討	
第1節 緒言	49
第2節 材料および方法	50
第3節 結果	61
第4節 考察	77
総括および結論	84
謝辞	87

引用文献 88

略語一覽 96

序論

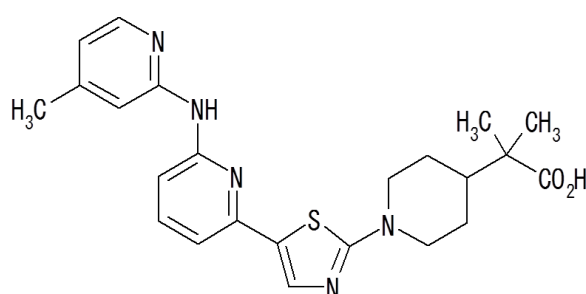
アレルギー性鼻炎，喘息，蕁麻疹などに代表されるアレルギー疾患は，I型過敏反応によって引き起こされる。すなわち，B細胞から産生された抗原特異的 immunoglobulin (Ig) E がマスト細胞上の IgE 受容体 FcεRI に結合し（感作），再度侵入した同一抗原がその IgE に結合するとマスト細胞に IgE 架橋刺激が入る。IgE 架橋によって刺激されたマスト細胞は，種々の細胞内シグナル伝達を経て，顆粒内容物，アラキドン酸代謝産物およびサイトカインの3群に大別されるメディエーターを分泌する^{1,2)}。これらのメディエーターが，血管拡張，血管透過性亢進，浮腫，粘液過分泌，平滑筋収縮，痛み，痒み，細胞浸潤，組織破壊などの様々な反応や症状を引き起こす^{1,3-6)}。以上がI型過敏反応の機序であるが，これから示される通り，IgE 架橋マスト細胞から分泌される3群のメディエーターは，アレルギー疾患の病態形成を担う主役と言える^{1,2)}。事実，これらメディエーターを標的とする多くの薬剤がアレルギー疾患治療薬として臨床的に使用され，ヒスタミン H1 受容体拮抗薬や cysteinyl leukotriene (LT) 1 受容体拮抗薬などはその例である^{1,2)}。一方，これら既存薬の多くは単一メディエーターの阻害薬であるため，幅広いアレルギー症状を抑えるためには，機序の異なる複数の薬剤を併用する必要がある^{2,7)}。ステロイド薬（合成グルココルチコイド）は，サイトカイン産生抑制を主たる作用機序とする薬剤であり，強力かつ広範な抗炎症作用を発揮する結果，幅広いアレルギー症状を抑制し得る^{1,3,8)}。一方で，ステロイド薬の副作用に不安を感じる患者は多く，また，投与経路が経口的でない（局所的）ことも多いため，アドヒアランスが低いことが本薬剤の問題点である^{9,10)}。以上を鑑みると，現行のアレルギー疾患治療のオプションは未だ十分ではないと言える。3群のメディエーターをいずれも抑制することで幅広いアレルギー症状に有効性を示し，かつ経口投与が可能な新規薬物に対してアンメットニーズが存在すると考えられる。

過剰な免疫応答が引き起こす疾患として、アレルギー疾患のほかに自己免疫疾患が挙げられる。アレルギー疾患は抗原が外来性であるのに対し、自己免疫疾患では内在性のタンパク等が抗原となる。自己免疫疾患の臨床に目を向けると、抗サイトカイン抗体や受容体デコイなどの生物学的製剤が登場して以来、当該疾患の治療はパラダイムシフトとも呼ばれるべき劇的な進展がもたらされている。関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA), 乾癬, 全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE), 多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS), クロウン病などの自己免疫疾患の治療において生物学的製剤が用いられているが¹¹⁻¹⁴⁾, 特に RA 治療における抗 tumor necrosis factor (TNF) - α 抗体の貢献は顕著とされる。一方で、生物学的製剤の問題点や不便さもまた指摘されている。主要な問題点は副作用であり、感染, 注射による合併症, 薬剤そのものに対する免疫反応等が問題視されている。生物学的製剤を用いた治療に対して、不応答あるいは応答が十分でない患者が相当割合で存在することも問題である。加えて、投与経路 (静脈内または皮下注射) の不快さを訴える患者, また高額な治療費を不満に感じる患者も多い。したがって、自己免疫疾患治療においてもアンメットニーズが存在し、高い有効性を有することに加えて、安全であること, 経口投与可能であること, 安価であることも兼ね備えた新規低分子薬物が求められている¹⁵⁻¹⁸⁾。

Spleen tyrosine kinase (Syk) は、マスト細胞, 単球, マクロファージ, 好中球, B 細胞等の免疫細胞に主として発現する非受容体型チロシンキナーゼで, Ig 架橋刺激によって誘導される細胞内シグナル伝達, さらにはその先の細胞反応において中心的な役割を担っている¹⁷⁾。マスト細胞においては, IgE 架橋刺激時の Fc ϵ RI に Syk が直接的に会合し, 細胞内シグナル伝達経路を最上流で調節する。結果として, IgE 架橋刺激による 3 群のメディエーター分泌に対しても不可欠な機能を果たす^{1,2)}。このことから Syk とアレルギーの関係性が示唆され, Syk を欠損したマスト細胞は IgE 架橋刺激によるメディエーター分泌を完全に欠失すること¹⁹⁾, Syk のアンチセンスはラットにおけるアレルギー性気道炎症を抑制すること²⁰⁾ が報告されている。以上の知見よ

り、Syk 阻害薬は、IgE 架橋マスト細胞からの 3 群すべてのメディエーター分泌を抑制し、上記アンメットニーズを満たし得る有望なアレルギー疾患治療薬となることが期待される。加えて、前述のように、Syk はマスト細胞以外の免疫細胞にも発現し、IgE のみならず IgG によって引き起こされる細胞反応においても重要な役割を果たす¹⁷⁾。Syk が寄与するこれら IgG の反応は、自己免疫疾患の病態形成に大きく関わっている^{17, 21, 22)} ため、Syk 阻害薬には自己免疫疾患治療薬としての可能性も期待される。

JTE-852 は、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所（大阪，日本）において見出された化合物である。JTE-852 の化学構造と化学名を Fig. 1 に示す。本研究では、JTE-852 の薬理学的な基本特性を把握するとともに、アレルギー疾患治療薬ならびに自己免疫疾患治療薬としての有用性を検討した。第 1 章では、JTE-852 の Syk 阻害作用、種差および選択性について検討を行った。第 2 章では、IgE を介する細胞反応および *in vivo* 反応、さらにはアレルギー疾患の動物モデルにおける JTE-852 の作用を検討し、JTE-852 のアレルギー疾患治療薬としての有用性を考察した。第 3 章では、IgG を介する細胞反応および *in vivo* 反応、さらには自己免疫疾患の動物モデルにおける JTE-852 の作用を検討し、JTE-852 の自己免疫疾患治療薬としての有用性を考察した。



2-Methyl-2-(1-{5-[6-(4-methylpyridin-2-ylamino)pyridin-2-yl]thiazol-2-yl}piperidin-4-yl)propanoic acid

Fig. 1 Chemical structure and chemical name of JTE-852

第1章 JTE-852の基本特性に関する検討

第1節 緒言

JTE-852は、Syk阻害薬の創製を目的としたスクリーニングおよび構造活性関連の過程で見出された化合物である。この段階で、JTE-852のSyk阻害作用ならびにマスト細胞からの顆粒内容物(β -hexosaminidase)分泌に対する抑制作用が確認されていたが、2濃度のみの大まかな阻害/抑制作用の成績が得られているのみであった。

本章では、JTE-852の基本的な特性を把握する目的で、Syk阻害作用、種差ならびに選択性について詳細な検討を行った。具体的には、ヒトおよびラットのリコンビナントSykを用いた酵素阻害作用の検討、ヒトのリコンビナントSykを用いた速度論的解析、ラットマスト細胞株を用いた細胞内Syk阻害作用の検討、Syk以外のヒトキナーゼを用いた選択性の検討を行った。

第2節 材料および方法

1.2.1. 被験物質および媒体

日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所において合成したJTE-852を被験物質として使用した。Dimethyl sulfoxide (DMSO)をナカライテスク株式会社(京都, 日本)から購入し、媒体として薬液調製に使用した。

1.2.2. ヒトSykのキナーゼ活性評価

リコンビナントヒト全長Sykは、バキュロウイルスを用いてSf21昆虫細胞に発現させたものをMillipore Co. (Burlington, MA, USA)から購入した。ビオチン標識したSyk特異的ペプチド基質(Biotin-EDPDYEWPSA)²³⁾は、Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis,

MO, USA) で委託合成した。Adenosine 5'-triphosphate (ATP) および $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP は、それぞれ Sigma-Aldrich, Co. および PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。

文献の方法^{24, 25)}を参考にキナーゼ活性評価を実施した。すなわち, JTE-852, ヒト Syk, ATP, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP, ペプチド基質を 96 ウェルプレートに添加し混和した。DMSO, ヒト Syk, ATP, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP, ペプチド基質のウェル中最終濃度は、それぞれ 0.5%, 3.0 nmol/L, 10 μ mol/L, 1.11 kBq/ μ L, 2.5 μ mol/L とした。JTE-852 のウェル中最終濃度は、0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/L とした。プレートを室温で 30 分間静置 (酵素反応) した後, 100 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 20% streptavidin sepharose beads 溶液を添加した。この溶液は、酵素反応を停止する目的とリン酸化ペプチド基質 (酵素反応生成物) を捕捉する目的で添加した。ハーベスター機器を用いてリン酸化ペプチド基質を UniFilter[®]-96, GF/B[®] (PerkinElmer, Inc.) に吸着させ、シンチレーションカクテル MicroScint-20 (PerkinElmer, Inc.) をフィルター各ウェルに添加した。MicroPlate Scintillation Luminescence Counter (PerkinElmer, Inc.) を用いて count per minute, channel A (CPMA) を測定し、反応速度 V (nmol/L/min) を算出した。測定は 2 ウェルずつ行い、3 回の独立した実験を行った。

1.2.3. ラット Syk のキナーゼ活性評価

リコンビナントラット全長 Syk は、バキュロウイルスを用いて Sf9 昆虫細胞に発現させたものを日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所において作製した。Lithium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (LDS-PAGE) 後の Coomassie blue 染色ならびに western blotting により、精製タンパクがラット Syk であることを確認した。

DMSO, ラット Syk, ATP, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP, ペプチド基質のウェル中最終濃度は、それぞれ 0.5%, 3.0 nmol/L, 50 μ mol/L, 1.11 kBq/ μ L, 3.0 μ mol/L とした。その他は、ヒト Syk のキナーゼ活性評価 (1.2.2.項参照) と同様に行った。

1.2.4. ヒト Syk 酵素を用いた速度論的解析

ATP のウェル中最終濃度を 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$ と変化させた。JTE-852 は、最終濃度 0.5, 1, 2 nmol/L とした。その他の反応組成は、ヒト Syk のキナーゼ活性評価 (1.2.2.項参照) と同様に行った。GraphPad Prism ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて Michaelis-Menten 曲線への当てはめを行い、最大反応速度 (maximum velocity; V_{max}) ならびにミカエリス定数 (Michaelis constant; K_m) を算出した。また、Lineweaver-Burk 直線を作製して JTE-852 の阻害様式を推定した。さらに、Lineweaver-Burk の 2 次プロットから JTE-852 の阻害定数 (inhibition constant; K_i) を算出した。測定は 2 ウェルずつ行い、3 回の独立した実験を行った。

1.2.5. 各種キナーゼの活性評価

ヒト lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck), ヒト zeta-chain associated protein kinase (ZAP) 70, ヒト mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAP-K) 2, ヒト mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 1, ヒト v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (c-Kit), ヒト epidermal growth factor (EGF) receptor に対するキナーゼ活性評価を Millipore Co.にて実施した。上記の Syk キナーゼ活性評価 (1.2.2.項, 1.2.3.項および 1.2.4.項参照) と同じく, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}] \text{ATP}$ を用いた放射性同位体 (radioisotope; RI) 法により酵素活性を評価した。

まず、JTE-852 の最終濃度を一律 300 nmol/L に設定し、スクリーニング (KinaseProfilerTM) を行った。各測定を 4 ウェルずつとした 1 回の実験を行った。その結果、Lck に対しては 50%以上の阻害が認められたため、JTE-852 の最終濃度を 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 nmol/L とした濃度依存性実験 (IC₅₀ExpressTM) を行った。各測定を 2 ウェルずつとした 1 回の実験を行った。

1.2.6. 細胞内 Syk 活性の評価

ラットマスト細胞株 rat basophilic leukemia (RBL) -2H3 細胞は、ヒューマンサイエンス振興財団/研究資源バンク (大阪, 日本) より購入し、継代数 12 代目の細胞を使用した。培養培地として 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含む EAGLE-MEM (EMEM) を用いた。モノクローナルマウス抗 dinitrophenyl (DNP) IgE は、ヤマサ醤油株式会社 (東京, 日本) から購入した。DNP-bovine serum albumin (BSA) は LSL Co., Ltd (東京, 日本) より購入し、抗原として使用した。抗リン酸化 linker for activation of T cell (LAT) 抗体 (Tyr191) および抗 Syk 抗体は、Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) より購入し、それぞれリン酸化 LAT 検出用 1 次抗体および Syk の免疫沈降用抗体として使用した。抗リン酸化チロシン抗体 clone 4G10[®] は、Millipore Co. から購入し、免疫沈降後のリン酸化 Syk を検出するための 1 次抗体として使用した。抗 α tubulin 抗体 B-7 は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA) より購入し、 α tubulin 検出用 1 次抗体として使用した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体ならびに HRP 標識抗マウス IgG 抗体は、GE Healthcare UK Ltd. (Little Chalfont, UK) より購入し、それぞれリン酸化 LAT 検出用 2 次抗体ならびにリン酸化 Syk および α tubulin 検出用 2 次抗体として使用した。

IgE 架橋刺激: 培養培地で 2×10^7 cells/mL に調製した細胞懸濁液に、モノクローナルマウス抗 DNP IgE を最終濃度 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、室温で 1 時間転倒混和した。洗浄後、感作細胞をアッセイ培地 (0.1% FBS, 100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含む EMEM) にて再度 2×10^7 cells/mL に調製し、 2.4×10^7 cells/1.2 mL/tube で播種した。JTE-852 を最終濃度 0.03, 0.3, 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ となるように添加し、37°C 設定温浴中で 10 分間静置した。DNP-BSA を最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、37°C 設定温浴中で正確に 1 分間インキュベーションした後、

細胞を溶解した。

Syk の免疫沈降 (*immunoprecipitation; IP*) : IP 用ビーズ懸濁液 (Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) に抗 *Syk* 抗体を添加し、4°C 下で 2 時間転倒混和した。遠心後のペレットを抗 *Syk* 抗体結合 IP 用ビーズとした。これと並行して、細胞溶解液の予備洗浄 (IP 用ビーズに非特異的に結合するタンパク質の除去) を行った。すなわち、IP 用ビーズ懸濁液と細胞溶解液を混合し、4°C 下で 1 時間転倒混和した。遠心後の上清を予備洗浄液とした。次に、抗 *Syk* 抗体結合 IP 用ビーズと予備洗浄液を混合し、4°C 下で 2 時間転倒混和した。遠心後、ペレットを回収し IP サンプルとした。

LDS-PAGE : IP サンプルおよび非 IP 細胞溶解液に対して、LDS 含有緩衝液と還元剤を添加し、70°C 下で 10 分間加熱した。遠心後の上清を用い、200 ボルト定電圧の条件下で *PAGE* を行った。泳動装置として PowerPac HC™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を用いた。

Western blotting : *LDS-PAGE* により分離したタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写はトランスブロットシステム TRANS-BLOT® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い、25 ボルト定電圧 1 時間の条件で行った。タンパク質を転写した PVDF 膜をブロッキングし、500 倍に希釈した各種 1 次抗体 (抗リン酸化 LAT 抗体 (Tyr191), 抗リン酸化チロシン抗体 clone 4G10® または抗 α tubulin 抗体 B-7) を滴下した。室温で 2 時間静置した後、PVDF 膜を洗浄し、2,000 倍に希釈した各種 2 次抗体 (HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体または HRP 標識抗マウス IgG 抗体) に浸した。室温で 1 時間振盪した後、PVDF 膜を洗浄し、発光試薬 (HRP を検出) に浸した。ルミノイメージアナライザー LAS-3000 (富士写真フィルム株式会社, 東京, 日本) を用いて化学発光を検出した。

実験概略を Fig. 2 に示す。1 回の実験を行い、各測定は 1 チューブずつとした。

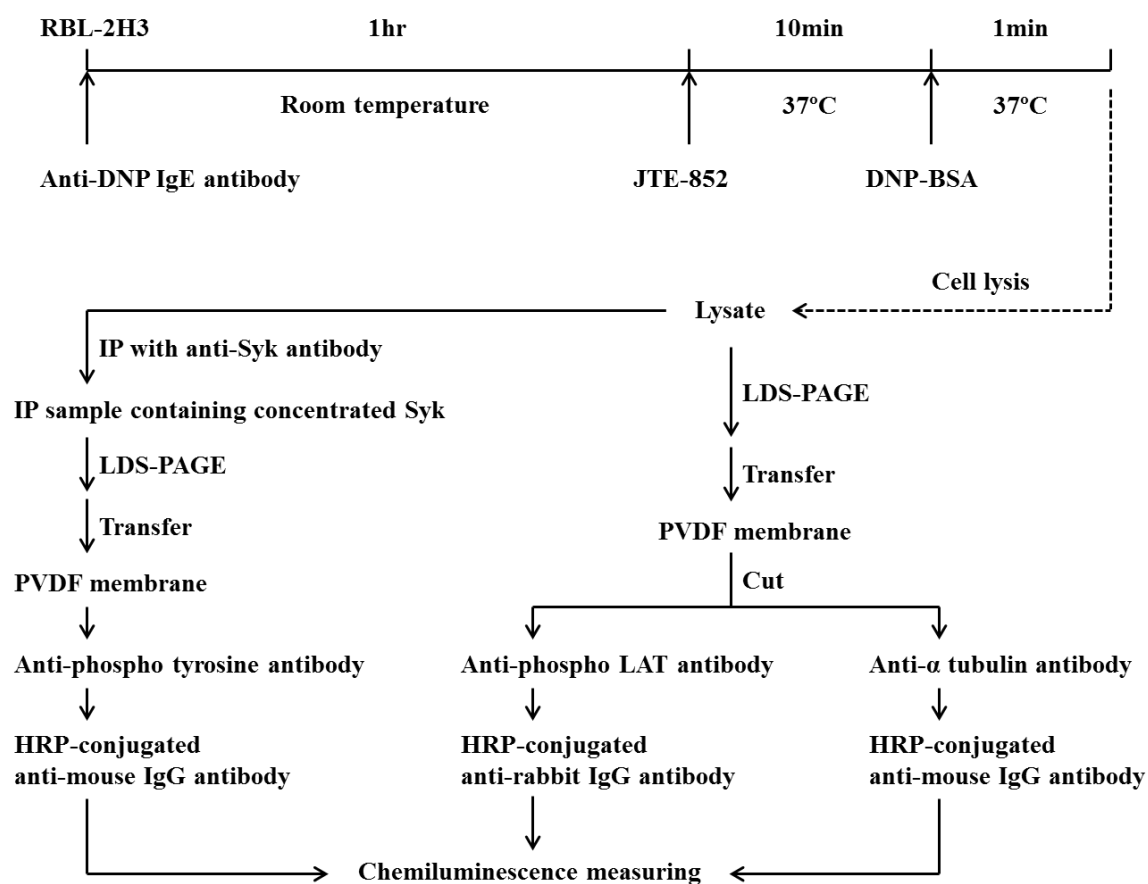


Fig. 2 Experimental outline for the evaluation of intracellular Syk activity

BSA, bovine serum albumin; DNP, dinitrophenyl; HRP, horseradish peroxidase;

IP, immunoprecipitation; Ig, immunoglobulin; LAT, linker for activation of T cell;

LDS-PAGE, lithium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis;

PVDF, polyvinylidene difluoride; RBL, rat basophilic leukemia; Syk, spleen tyrosine kinase

第3節 結果

1.3.1. Syk のキナーゼ活性に対する JTE-852 の作用

ヒトおよびラットのリコンビナント Syk を用いて、JTE-852 の Syk キナーゼ活性に対する阻害作用ならびにその種差について検討を行った。JTE-852 は、添加濃度に応

じて両種の Syk キナーゼ活性を阻害した (Fig. 3)。それぞれの阻害曲線は、ほぼ重なる形状を示した。JTE-852 の 50% 阻害濃度 (50% inhibitory concentration; IC₅₀) 値は、ヒト Syk に対して 1.25 ± 0.14 nmol/L, ラット Syk に対して 1.28 ± 0.22 nmol/L であった (Table 1)。

なお、ヒト Syk およびラット Syk の媒体群における反応速度は、それぞれ 24 および 43 nmol/L/min であった。

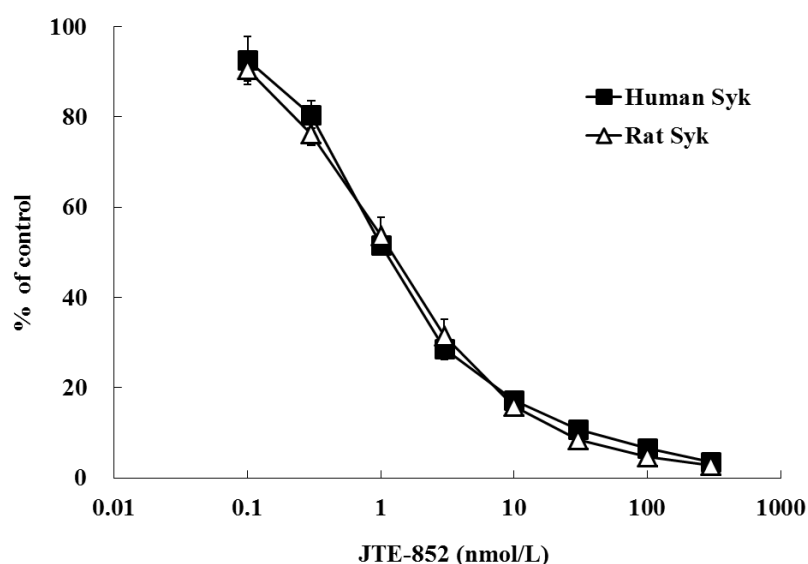


Fig. 3 Inhibitory effects of JTE-852 on kinase activities of human and rat Syk

The kinase activity of Syk was determined by RI method with [γ -³³P] ATP. In brief, JTE-852, Syk, ATP, [γ -³³P] ATP, and substrate peptide were mixed and kept at room temperature for 30 min. Radioactivity of the phosphorylated substrate was measured with scintillation luminescence counter. Data express the mean ± standard error of the mean (SEM), which were calculated from three experiments.

1.3.2. JTE-852 の Syk 阻害作用に関する速度論的解析

JTE-852 は Syk のキナーゼ活性を阻害したが (1.3.1.項参照), その阻害作用をさらに詳細に確認するため, リコンビナントヒト Syk を用いた速度論的解析を行った。JTE-852 の濃度ごとに Lineweaver-Burk 直線を作成したところ, 各直線はグラフの Y 軸上で交差した (Fig. 4A)。したがって, JTE-852 は ATP に対して拮抗型の阻害様式を示すと推定された。次に, Lineweaver-Burk の 2 次プロットを作成し, その回帰直線の X 切片から JTE-852 の ATP に対する K_i 値を算出した。JTE-852 の K_i 値は 0.40 ± 0.04 nmol/L であった (Fig. 4B および Table 1)。

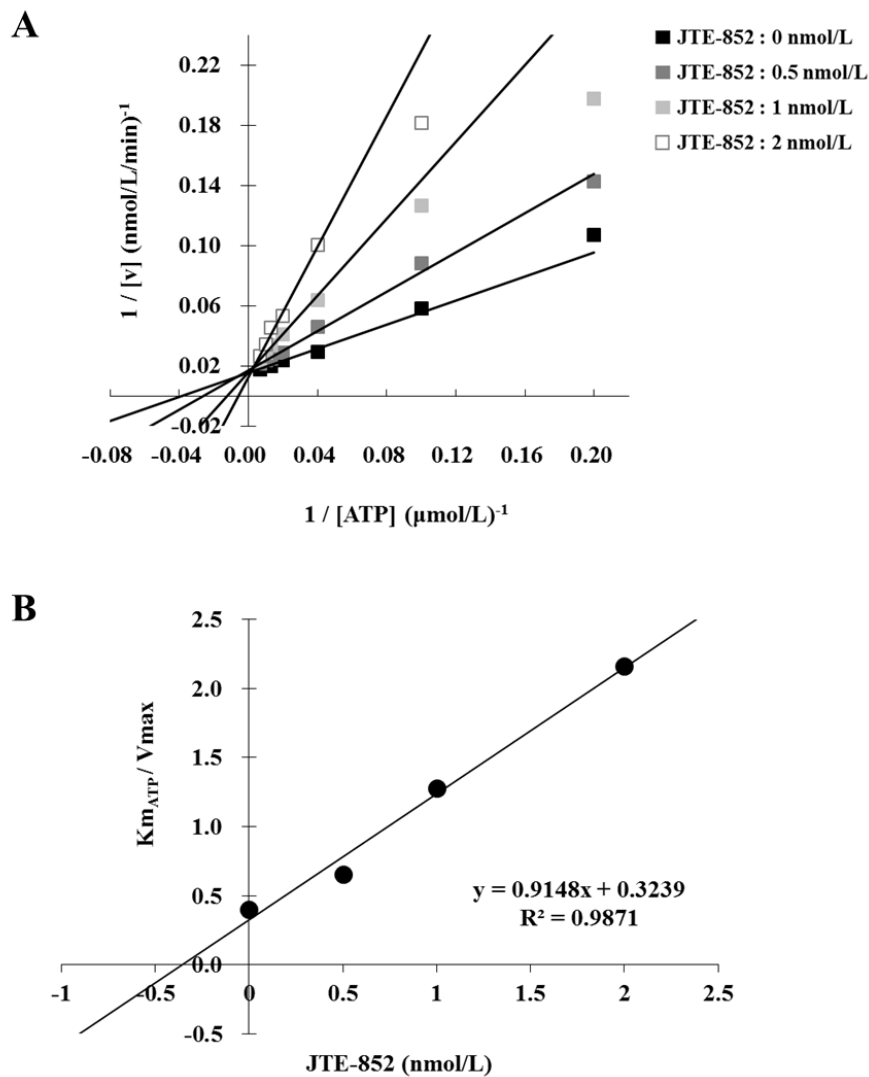


Fig. 4 Kinetic assay of JTE-852 with human Syk

The kinase activity of Syk was determined by RI method with $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP. (A) is the Lineweaver-Burk plot. (B) is the Lineweaver-Burk secondary plot. Both are the results of experiment No. 3, a representative of the three experiments.

Table 1 IC₅₀ and Ki values of JTE-852 on kinase activities of human and rat Syk

Enzyme	IC ₅₀ value (nmol/L)	Ki value (nmol/L)
human Syk	1.25 ± 0.14	0.40 ± 0.04
rat Syk	1.28 ± 0.22	--

The IC₅₀ values were calculated by sigmoid-curve fitting with SAS System version 8.2 and SAS Preclinical Package version 5.0 (SAS Institute Japan Inc., Tokyo, Japan). The Ki value was exhibited as a crossing point between regression line in the Lineweaver-Burk secondary plot and the horizontal axis. All values show the mean ± SEM (n = 3).

1.3.3. 各種キナーゼの活性に対する JTE-852 の作用

JTE-852 のキナーゼ選択性を検討する目的で、ヒト Lck, ZAP70, MAPKAP-K2, MEK1, c-Kit および EGF receptor のキナーゼ活性に対する JTE-852 の阻害作用を評価した。JTE-852 の IC₅₀ 値は、Lck に対して 80 nmol/L, その他のキナーゼに対してはすべて 300 nmol/L 以上であった (Table 2)。

Table 2 Effects of JTE-852 on various human kinases

Enzyme	IC ₅₀ value (nmol/L)
human Lck	80
human ZAP70	> 300
human MAPKAP-K2	> 300
human MEK1	> 300
human c-Kit	> 300
human EGF receptor	> 300

The enzyme assays were based on RI method with [γ -³³P] ATP. The values show the mean of two or four measurements in one experiment.

1.3.4. 細胞内 Syk のキナーゼ活性に対する JTE-852 の作用

JTE-852 は、リコンビナント Syk のキナーゼ活性を阻害したが (1.3.1.項参照), その阻害作用が細胞内の環境においても, また native な Syk に対しても認められることを検証する目的で, IgE 架橋刺激マスト細胞を用いた実験を行った。

Fig. 5A に, IgE 架橋によって刺激されたマスト細胞内における Syk の機能を図示した。すなわち, IgE が抗原によって架橋されるとその受容体である FcεRI が凝集し, immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 領域を持つ β 鎖に Proto-oncogene tyrosine-protein kinase (Src) ファミリーのチロシンキナーゼである Lck/yes-related novel tyrosine kinase (Lyn) が会合する。同じく ITAM 領域を持つ FcεRI の γ 鎖に会合した Syk は, Lyn によってリン酸化される。これによって活性化した Syk は, LAT などのアダプタータンパク質をリン酸化し, シグナルがさらに下流へと伝達される¹⁾。

本実験では, 細胞内 Syk のキナーゼ活性を評価するため, IgE 架橋刺激による Syk および LAT のリン酸化を検出した。無刺激 (spontaneous) 群に対して IgE 架橋刺激 (control) 群では, リン酸化 Syk およびリン酸化 LAT のバンドが検出された (Fig. 5B)。JTE-852 は, 添加濃度に応じてリン酸化 LAT の発現強度を低下させたが, リン酸化 Syk に対しては影響を及ぼさなかった。ローディングコントロールとして用いた α tubulin の発現強度は, すべての群においてほぼ同等であった。

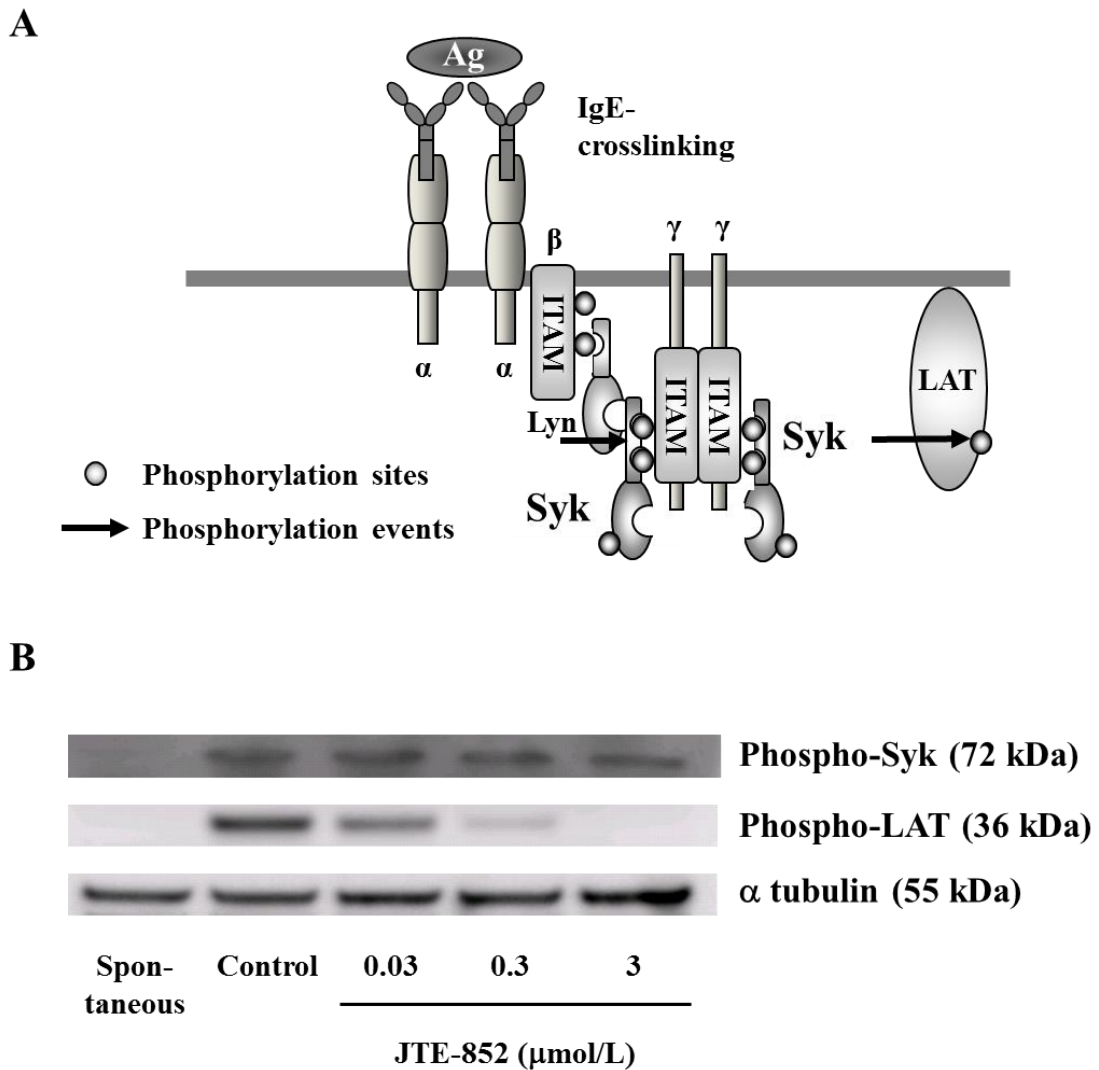


Fig. 5 Inhibitory effect of JTE-852 on intracellular Syk activity

(A) displays phosphorylation events just under Fc ϵ RI following IgE-crosslinking. Syk is phosphorylated by Lyn and phosphorylates LAT. (B) shows the bands of phosphorylated Syk, phosphorylated LAT, and α tubulin. RBL-2H3 cells were sensitized with anti-DNP IgE antibody and were challenged with DNP-BSA for 1 min. JTE-852 was added 10 min before challenge. For detection of phosphorylated LAT and α tubulin, PAGE and western blotting were performed according to standard procedures. For detection of phosphorylated Syk, Syk was concentrated from cell lysate by immunoprecipitation; subsequently, PAGE and western

blotting were performed.

第4節 考察

本章では、JTE-852の基本的な特性を把握する目的で、Syk阻害作用、種差ならびに選択性について検討を行った。

JTE-852は、Sykのキナーゼ活性を強力に阻害した。Syk阻害薬は臨床試験ステージに進んだものも含めて他にも報告（R112やR406など）されているが²⁶⁾、JTE-852のKi値0.40 nmol/Lは、それらの中でも最も強い効力（ポテンシー）と思われる。このJTE-852の強力なSyk阻害作用は、ATP拮抗型の様式により発揮されていると考えられた。また、ヒトSykとラットSykの全長アミノ酸配列の相同性は94%であるが、本章における実験結果からも、JTE-852のSyk阻害作用は、ヒトとラットの間に種差がないことが示唆された。

IgE架橋刺激マスト細胞において、JTE-852はSykの基質であるLATのリン酸化を阻害した。一方、Syk自身のリン酸化に対しては影響を及ぼさなかった。この結果は、JTE-852がLynのキナーゼ活性を阻害せず、Sykのキナーゼ活性を阻害することを示している。したがって、リコンビナントSykを用いたcell-free評価に加え、細胞内の環境においても、JTE-852はSyk阻害作用を示すと考えられた。Sykにはリン酸化を受けるチロシンが複数あり、Lynがリン酸化するチロシンとSykが自己リン酸化するチロシンは別であることが報告されている²⁷⁾。今回、JTE-852がSykのリン酸化を阻害しなかったのは、Lynによってリン酸化されたチロシン（Tyr346）を検出したためと考えられた。R112、R406、BAY61-3606などの他のSyk阻害薬でも同様の結果（Sykの基質のリン酸化を阻害し、Syk自身のリン酸化を阻害しない）が報告されている^{2, 24, 27)}。

Syk以外の各種ヒトキナーゼを用いて、JTE-852のキナーゼ選択性を検討した。評

価対象の1つである ZAP70 は, Syk との構造的相同性が最も高いチロシンキナーゼで, T 細胞においては Syk のカウンターパートとしての機能を果たす^{2,29,30)}。また, Lck は Lyn と同じく Src ファミリーに属し, T 細胞において ZAP70 をリン酸化するチロシンキナーゼである²⁸⁾。Syk に近い構造や機能を有するこれらキナーゼも含めて, 評価した各種キナーゼに対する JTE-852 の阻害作用は, Syk 阻害作用に比して弱いものであった。上述した通り, Lyn は Src ファミリーに所属するチロシンキナーゼで²⁸⁾, IgE 架橋刺激マスト細胞内で FcεRI に会合しながら Syk をリン酸化する¹⁾。本章では, マスト細胞内リン酸化 Syk を検出することで Lyn に対する JTE-852 の阻害作用を検討した。JTE-852 はリン酸化 Syk に対して阻害を示さなかったことから, Lyn のキナーゼ活性を阻害しないと考えられた。R112 および R406 は, 臨床試験ステージにも進んだ Syk 阻害薬であるが, 今回の JTE-852 と同様の方法で Lyn に対する阻害作用を評価し, ともに Lyn を阻害しないことが報告されている^{2,24)}。JTE-852 の Lyn に対する選択性は, これら他の Syk 阻害薬と同様であると考えられた。また, 各種の受容体, 非キナーゼ酵素, イオンチャネル, トランスポーターを含む cell-free 系スクリーニングにおいて, JTE-852 の IC₅₀ 値はいずれも 10 μmol/L 以上であった (data not shown)。これらの結果から, JTE-852 の作用は Syk 選択的と考えられた。

以上の知見を総合すると, JTE-852 は強力かつ選択的な Syk 阻害薬であると考えられた。

第2章 Syk 阻害薬 JTE-852 のアレルギー疾患治療薬としての有用性に関する検討

第1節 緒言

序論に記載したように、アレルギー疾患はI型過敏反応の結果として発症、増悪するが、その主役はIgE 架橋刺激マスト細胞から分泌される3群のメディエーター（顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカイン）が担っていると考えられる^{1,2)}。具体的なメディエーターとしては、顆粒内容物の代表であるヒスタミン（histamine; hist），アラキドン酸代謝産物の代表である cysteinyl LT (LTC₄/D₄/E₄; LTs)，thromboxane (TX) A₂ および prostaglandin (PG) D₂，サイトカインの代表である interleukin (IL) -13 などが挙げられる。臨床においては、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬，cysteinyl LT1 受容体拮抗薬，TXA₂ 合成酵素阻害薬，TXA₂ 受容体拮抗薬，TXA₂ 受容体と PGD₂ 受容体の dual 拮抗薬，IgE に対するヒト型中和抗体（omalizumab），マスト細胞安定化薬（disodium cromoglycate (DSCG) や tranilast）などがアレルギー疾患の治療に用いられ^{1,2,5,31-34)}，このことから「IgE 架橋刺激マスト細胞から分泌される3群のメディエーター」がアレルギーの病態形成に重要であることが窺える。これらの既存薬の多くは単一メディエーターに対する阻害薬であるため、幅広いアレルギー症状を抑えるためには、作用機序の異なる複数の薬剤を併用する必要がある^{2,7)}。ステロイド薬は、マスト細胞のみならず多くの免疫細胞からのサイトカイン産生に対して抑制作用を示し、強力かつ広範な抗炎症作用を発揮する結果、幅広いアレルギー症状を抑制し得る^{1,3,8)}。一方、ステロイド薬はその副作用に不安を抱く患者が多く、また、経口的ではなく局所的に投与されることが多いため、アドヒアランスが低いという問題を有している^{9,10)}。以上のように、現行のアレルギー疾患治療のオプションは十分ではなく、アンメットニーズが存在すると考えられる。すなわち、3群のメディエーター（顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカイン）をいずれも抑制することで幅

広いアレルギー症状に有効性を示すこと、および経口投与可能であることの2点が新規薬物に求められる特長と考えられる。

マスト細胞において、SykはIgE架橋刺激による細胞内シグナル伝達経路の最上流に位置し、3群のメディエーター分泌に対して不可欠な機能を果たす^{1,2)}。したがって、Sykを阻害する薬物はIgE架橋マスト細胞からの3群すべてのメディエーター分泌を抑制できる可能性があり、上記アンメットニーズを満たし得る有望なアレルギー疾患治療薬となることが期待される。

第1章より、JTE-852は強力かつ選択的な新規Syk阻害薬であることが示された。本章では、JTE-852のアレルギー疾患治療薬としての有用性を検証した。はじめに、JTE-852が3群のメディエーター分泌を抑制するかどうかを検討するため、ヒトおよびラットのマスト細胞を用いて、IgE架橋刺激による顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカインの分泌に対するJTE-852の作用を評価した。続いて、JTE-852がメディエーター関与の*in vivo*アレルギー反応を抑制するかどうかを検討するため、ラット passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応に対するJTE-852の作用を評価した。さらに、JTE-852が幅広いアレルギー症状に有効性を示すかどうかを検討するため、複数のアレルギー疾患動物モデルにおけるJTE-852の作用を評価した。今回、アレルギー疾患動物モデルの代表として、ラットを用いた4種のモデル（くしゃみ、鼻漏、気道収縮、気道炎症）を設定した。くしゃみおよび鼻漏はアレルギー性鼻炎の症状であり、気道収縮および気道炎症は喘息の特徴である。

アレルギー性鼻炎は、鼻粘膜上で起こるI型過敏反応に基づく疾患であり、主要症状としてくしゃみ、鼻漏、鼻の痒み、鼻閉が挙げられる^{1,35)}。これらの症状は、鼻のマスト細胞がダニや花粉などの抗原によってIgE架橋刺激された際に分泌する3群のメディエーターによって引き起こされる⁷⁾。臨床においては、ヒスタミンH1受容体拮抗薬、cysteinyl LT1受容体拮抗薬、TXA₂受容体とPGD₂受容体のdual拮抗薬 (ramatroban)、ステロイド薬などがアレルギー性鼻炎の治療に用いられる^{1,33)}。

喘息は、気道収縮、気道炎症ならびに気道過敏性に特徴づけられる呼吸器疾患である^{10,31)}。喘息患者の肺にはマスト細胞が認められ、また抗原特異的 IgE も検出される^{3,36)} ことから、上記の気道所見には、IgE 架橋マスト細胞から分泌されたメディエーターが関与することが示唆される^{1,3,10)}。事実、cysteinyl LT1 受容体拮抗薬や DSCG などのマスト細胞安定化薬が、臨床における喘息治療に使用されている^{3,32)}。

Omalizumab (XOLAIR[®]) もまた臨床的に使用される^{1,10)}。非臨床動物モデルにおいては、FcεRI 欠損マウスが IgE 架橋マスト細胞からのメディエーター分泌を欠失すること、またアレルギー性気道炎症の顕著な低下を認めることが報告されている³⁷⁾。以上より、喘息の病態形成には、IgE 架橋マスト細胞由来のメディエーターが重要な役割を担っていると考えられる。

本章では、これらアレルギー疾患の動物モデル 4 種に加え、PCA 反応の評価も実施した。*In vivo* 実験における JTE-852 の用量について、以下のように設定した。PCA 反応に対しては、JTE-852 の用量依存性を確認するため 1, 3, 10, 30 mg/kg の 4 用量を設定した。くしゃみモデルにおいては、JTE-852 の用量依存的な作用を再度確認するため、PCA 反応と同様の 4 用量を評価した。鼻漏モデル、気道収縮モデルおよび気道炎症モデルでは、JTE-852 の用量依存性の代わりに既存のアレルギー疾患治療薬を評価し、各薬物の最大効果（エフィカシー）比較を行った。この時の JTE-852 の用量としては、JTE-852 がその作用機序である Syk 阻害を最大限に発揮できる用量と考えられる 30 mg/kg（本章第 4 節に後述）を採用した。既存薬は、ketotifen, pranlukast および prednisolone の 3 薬物を用いたが、これらの評価用量も同様の視点で選択した。すなわち、それぞれの作用機序であるヒスタミン拮抗作用、LTC₄/D₄/E₄ 拮抗作用および抗炎症作用を最大限発揮できる用量を過去の予備的試験結果や文献情報を参考に考慮し、いずれも 30 mg/kg とした³⁸⁻⁴¹⁾。JTE-852 を含めた 4 薬物いずれも各作用機序を最大限発揮できる用量を用いることにより、各薬物の最大効果比較を行った。

第2節 材料および方法

2.2.1. 被験物質, 対照物質および媒体

1.2.1.項記載の JTE-852 を被験物質として使用した。Cysteinyll LT1 受容体拮抗薬である pranlukast は, 日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所において ONON[®]カプセル (小野薬品工業株式会社, 大阪, 日本) から抽出し, 対照物質として使用した。ヒスタミン H1 受容体拮抗薬 ketotifen およびステロイド薬 prednisolone は, Sigma-Aldrich, Co.から購入し, 対照物質として使用した。

In vitro 試験では, 1.2.1.項記載の DMSO を媒体として薬液調製に使用した。メチルセルロース (methylcellulose; MC) Metolose[®] SM-1500 を信越化学工業株式会社 (東京, 日本) より購入し, その 0.5%水溶液を *in vivo* 試験における媒体として薬液調製に使用した。

2.2.2. 動物

Sprague-Dawley (SD) ラットおよび Brown-Norway (BN) ラットを日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川, 日本) より購入した。動物は温度 $23.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$, 照明時間 12 時間 (8:00 点灯 20:00 消灯) の環境下で飼育し, 固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) および紫外線照射水道水を自由摂取させた。各 *in vivo* 試験は, 実施前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所の動物実験委員会の承認を受け, 「動物の愛護および管理に関する法律」に準拠して実施した。

2.2.3. ヒトマスト細胞からのメディエーター分泌の評価

ヒト CD34 陽性細胞単離キットは Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch Gladbach, Germany) より購入した。リコンビナントヒト stem cell factor (SCF) およびリコンビナントヒト IL-6 は, PeproTech, Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) より購入し, ヒトマスト細胞への分化

因子として使用した。リコンビナントヒト IL-4 は R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) より購入し、ヒトマスト細胞の FcεRI 発現を増強させるために使用した。ヒト IgE は Millipore Co.より購入し、感作用抗体として使用した。ポリクローナル抗ヒト IgE 抗体は、Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, USA) より購入し、ヒト IgE を架橋する抗体 (抗原の代替) として使用した。カルシウムイオノフォア A23187 は、Sigma-Aldrich, Co.から購入した。ヒスタミン enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット, LTC₄/D₄/E₄ enzyme immunoassay (EIA) キット, TXB₂ ELISA キット, PGD₂ EIA キットおよびヒト IL-13 EIA キットは、それぞれ Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (愛知, 日本), GE Healthcare UK Ltd., Neogen Co. (Lansing, MI, USA), Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) および Beckman Coulter Company (Pasadena, CA, USA) より購入した。

ヒトマスト細胞の取得: 斎藤らの方法⁴²⁾を参考に、臍帯血由来ヒトマスト細胞 (cord blood mast cells; CBMCs) を調製した。すなわち、ヒト CD34 陽性細胞単離キットを用いた細胞磁気分離法により、ヒト臍帯血から CD34 陽性造血幹細胞を単離した。この細胞を培養培地 1 (100 ng/mL リコンビナントヒト SCF, 50 ng/mL リコンビナントヒト IL-6, 0.1% BSA, 1% insulin-transferrin-selenium-G supplement (ITS), 55 μmol/L 2-mercaptoethanol (ME), 100 units/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシンを含む Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)) 中で 6 週間培養した。その後、細胞を培養培地 2 (10% FBS を含む培養培地 1) 中でさらに 4 週間培養した。得られた細胞中のトリプターゼおよびキマーゼの発現を免疫染色法にて検出し、ほぼ 100% がトリプターゼ陽性およびキマーゼ陰性であることを確認した。この細胞を CBMCs として実験に使用した。なお、臍帯血の入手に当たっては、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所の研究倫理審査委員会の承認を受け、ドナーのインフォームドコンセントを得た上で入手した。

IgE 架橋刺激: FcεRI の発現増強ならびに当該受容体への IgE の結合 (感作) を目

的として、10 ng/mL リコンビナントヒト IL-4 および 1 µg/mL ヒト IgE 存在下で CBMCs を 5 日間培養した⁴³⁾。培養は 37°C、5% CO₂ 設定のインキュベーター内で行った。感作した CBMCs を洗浄後、アッセイ培地 (0.1% BSA, 1% ITS, 55 µmol/L 2-ME, 100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを含む IMDM) にて 1×10⁶ cells/mL に懸濁し、96 ウェル丸底プレートに 1.2×10⁵ cells/well となるように播種した。JTE-852 を最終濃度 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 µmol/L となるように添加し、インキュベーター内で 10 分間静置した。ヒスタミン、LTC₄/D₄/E₄、TXA₂ および PGD₂ 分泌の実験では、ポリクローナル抗ヒト IgE 抗体を最終濃度 3 µg/mL となるように添加し、30 分間インキュベーションした。IL-13 分泌の実験では、最終濃度 1 µg/mL で 5 時間インキュベーションした。各時間のインキュベーションの後、上清を回収し、上清中のメディエーター濃度を EIA 法により測定した。測定には、市販のキットおよびマイクロプレートリーダー VERSAmax (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA) を用いた。なお、本実験では物性的に不安定な TXA₂ の代わりにその安定代謝物 (加水分解体) である TXB₂ 濃度を測定し、TXA₂ 濃度とした。この手法は EIA キットの説明書にも記載されており、確立された TXA₂ の定量法である。7 ドナーの臍帯血から分化誘導した 7 ロットの CBMCs を用いて実験を行い (7 回の実験)、各実験の測定は 2 ウェルずつで行った。

A23187 刺激: CBMCs をアッセイ培地で 1×10⁶ cells/mL となるように懸濁し、96 ウェル丸底プレートに 1.2×10⁵ cells/well で播種した。JTE-852 を最終濃度 10 µmol/L となるように添加し、10 分間インキュベーションした。その後、A23187 を最終濃度 10 µg/mL となるように添加し、30 分間インキュベーションした。上清を回収し、上清中のヒスタミン濃度を EIA 法により測定した。IgE 架橋刺激と同様に、2 ウェルずつの測定と 7 回の実験を行った。

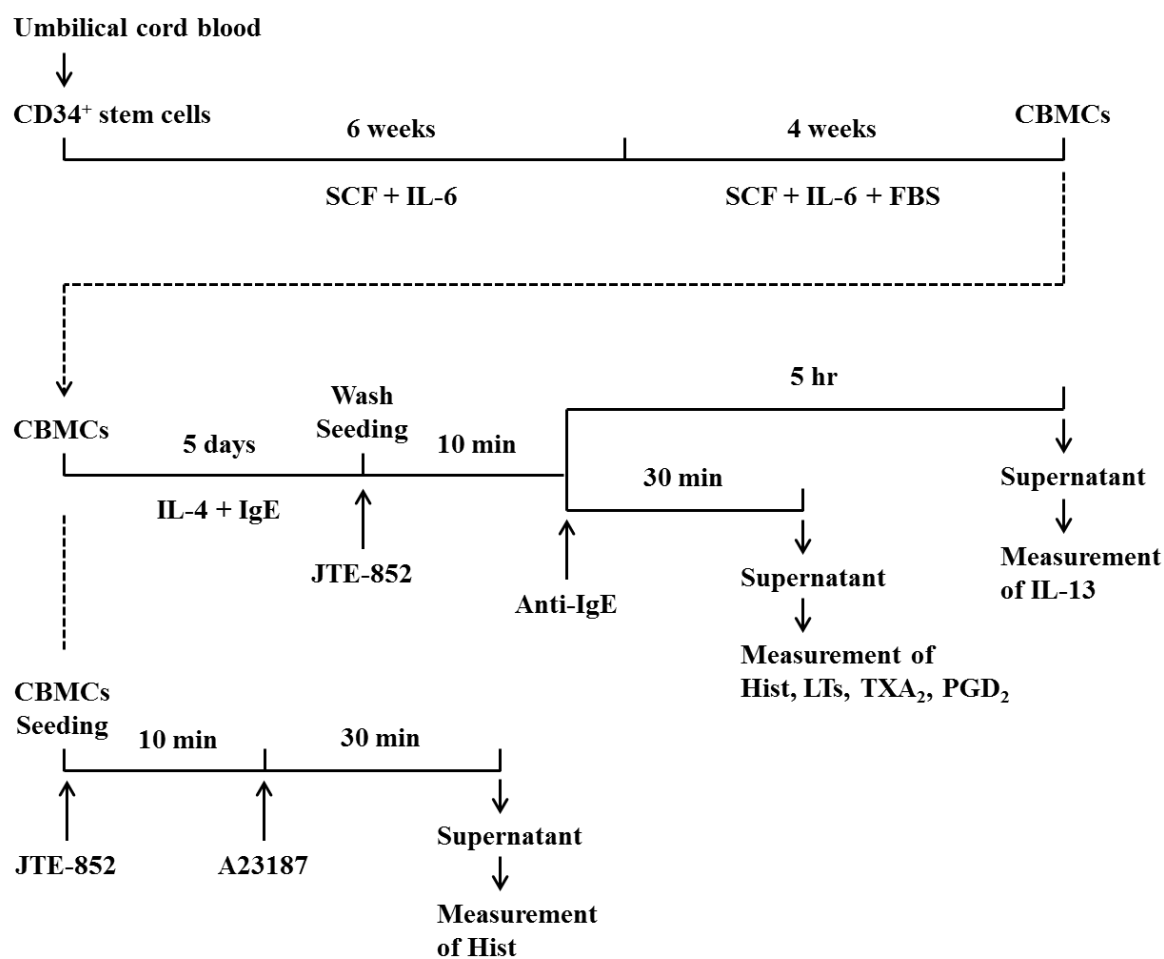


Fig. 6 Experimental outlines for the evaluation of mediator secretion from human mast cells

CBMCs, cord blood mast cells; FBS, fetal bovine serum; Hist, histamine; IL, interleukin; Ig, immunoglobulin; LTs, leukotriene C₄/D₄/E₄; PG, prostaglandin; SCF, stem cell factor; TX, thromboxane

2.2.4. ラットマスト細胞からのメディエーター分泌の評価

継代数 12 代目の RBL-2H3 細胞を使用した。モノクローナルマウス抗 DNP IgE および DNP-BSA は、1.2.6.項記載のものを使用した。ヒスタミン ELISA キットおよび LTC₄/D₄/E₄ EIA キットは、2.2.3.項記載のものを使用した。ラット IL-13 ELISA キット

は、Biosource International, Inc. (Camarillo, CA, USA) から購入した。

IgE 架橋刺激: RBL-2H3 細胞を培養培地 (1.2.6.項参照) で 8×10^5 cells/mL に懸濁し、モノクローナルマウス抗 DNP IgE を最終濃度 50 ng/mL となるように添加した。これを 96 ウェル平底プレートに 8×10^4 cells/well となるように播種し、インキュベーター内で 2 時間静置した。接着および感作した RBL-2H3 細胞を洗浄し、EMEM と JTE-852 を順次添加した。JTE-852 の最終濃度は 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ mol/L とした。10 分間のインキュベーションの後、DNP-BSA を最終濃度 30 ng/mL で添加し、ヒスタミンおよび LTC₄/D₄/E₄ 分泌の実験では 30 分間、IL-13 分泌の実験では 4 時間インキュベーションした。30 分あるいは 4 時間後、上清を回収し、上清中のメディエーター濃度を EIA 法により測定した。測定は 2 ウェルずつ行い、3 回の独立した実験を行った。

2.2.5. PCA 反応の評価

JTE-852 を被験物質として、pranlukast および prednisolone を比較対照物質として使用した。Ketotifen は陽性対照物質として使用した。モノクローナルマウス抗 DNP IgE および DNP-BSA は、1.2.6.項記載のものを使用した。Evans blue および formamide は、和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入し、それぞれ色素および色素抽出用溶媒として使用した。

8 週齢の雄性 SD ラットを麻酔し、毛刈りした背部に 30 ng/mL のモノクローナルマウス抗 DNP IgE を 100 μ L/site で皮内投与した。翌日、感作ラットの一般状態を観察し体重を測定した。一般状態に問題のないラットを、体重が均等になるように各群 8 匹 9 群に割り付けた。

被験物質および対照物質を 5 mL/kg の容量で経口投与した。JTE-852 の投与用量は 1, 3, 10, 30 mg/kg とし、pranlukast, prednisolone および ketotifen の投与用量は 30 mg/kg とした。経口投与の 1 時間後、0.3 mg/mL DNP-BSA と 5 mg/mL Evans blue の混合液を

覚醒ラットの尾静脈内に 1 mL の容量で投与した。偽処置群のラットに対しては、DNP-BSA を含まない 5 mg/mL Evans blue 溶液を同様に静脈内投与した。30 分後、頸椎脱臼によりラットを安楽死させ、biopsy punch を用いて背部の色素漏出部位を摘出した。摘出した皮膚を 2 mL の formamide に浸漬し、37°C 温度下で 6 日間振盪することにより色素を抽出した。抽出液を濾過し、波長 620 nm における濾液の吸光度をマイクロプレートリーダー VERSAmax で測定した。

Evans blue と formamide を用いて作製した標準直線からサンプル中の色素濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を換算し、この濃度に formamide の容量 2 mL を乗じることで漏出色素量 ($\mu\text{g/site}$) を算出した。さらに、JTE-852 に関しては、用量反応をシグモイド曲線に当てはめ、50%有効用量 (50% effective dose; ED_{50}) を算出した。算出には、SAS システム version 8.2 および SAS 前臨床パッケージ version 5.0 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

2.2.6. くしゃみモデルの評価

Toluene 2,4-diisocyanate (TDI) は Honeywell International Inc. (Morris Plains, NJ, USA) より購入し、ハプテンとして使用した。

Day 1 に、6 週齢の雄性 BN ラットの両鼻孔に対して、10% TDI 溶液を 5 μL ずつ点鼻投与した。この処置を Day 2 から Day 5、Day 8 から Day 12 にも行い、計 10 回の点鼻投与により動物を感作した。Day 22 に、一般状態に問題のないラットの体重を測定し、体重が均等になるように各群 14 匹 6 群に割り付けた。

翌日の Day 23 に、JTE-852 を 1, 3, 10, 30 mg/kg の投与用量となるように 5 mL/kg の容量で経口投与した。1 時間後、5% TDI 溶液をラットの両鼻孔に対して 5 μL ずつ点鼻投与した。偽処置群のラットには、TDI の溶媒である酢酸エチルを同様に点鼻投与した。この惹起操作の直後の 30 分間について、くしゃみの回数を計測した。計測はブラインド下で行った。

2.2.7. 鼻漏モデルの評価

JTE-852 を被験物質として、pranlukast および prednisolone を比較対照物質として使用した。Ketotifen は陽性対照物質として使用した。卵白アルブミン (albumin from chicken egg white; OVA) は、Sigma-Aldrich, Co.から購入し、抗原として使用した。Imject[®] Alum (40 mg/mL 水酸化アルミニウムおよび水酸化マグネシウム) は、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA) より購入し、アジュバントとして使用した。Chicago sky blue 6B は Alfa Aesar (Heysham, UK) より購入し、色素として使用した。

10 µg/mL OVA と 10 mg/mL Alum を含む生理食塩液 (OVA/Alum 懸濁液) を調製し、7 週齢の雄性 SD ラットに 1 mL の容量で腹腔内投与した。この処置を 3 日間連続で行い、動物を感作した。初回腹腔内投与の 15 日後、ラットの一般状態を観察し、体重が均等になるように各群 12 匹 5 群に割り付けた。

被験物質および対照物質を、投与用量 30 mg/kg となるように 5 mL/kg の容量で経口投与した。1 時間後、ペントバルビタールの静脈内投与によりラットを麻酔し、40 mg/mL の Chicago sky blue 6B を 3 mL/kg の容量で尾静脈内に投与した。5 分後、ラットの気管を露出させ、そこから鼻腔の方向へカニューレを挿入した。別途、肺方向へもカニューレを挿入し、自発呼吸を確保した。鼻腔方向へのカニューレにシリンジポンプ EICOM EP-60 (Eicom Co., 京都, 日本) を接続し、37°C に加温した生理食塩液を 20 分間かん流させて鼻腔内を洗浄した。かん流は 0.1 mL/min の流速で行い、鼻孔から排出された洗浄液は廃棄した。続いて、同様のかん流を 10 分間行い、排出液を「0 分サンプル」として回収した。次に、6 mg/mL の OVA 溶液を 10 分間かん流させ、排出液を「10 分サンプル」として回収した。各サンプルを遠心後、波長 620 nm における上清の吸光度をマイクロプレートリーダー VERSAmax で測定した。

Chicago sky blue 6B と生理食塩液を用いて作製した標準直線からサンプル中の色素濃度を換算した。個体ごとに「10 分サンプル」の色素濃度から「0 分サンプル」の色

素濃度を差し引き、10 分間の OVA 惹起による色素漏出を算出した。

2.2.8. 気道収縮モデルの評価

JTE-852 を被験物質として、ketotifen および prednisolone を比較対照物質として使用した。Pranlukast は陽性対照物質として使用した。OVA および Alum は 2.2.7.項記載のものを使用した。

6 週齢の雄性 BN ラットに 2.2.7.項と同様の OVA/Alum 懸濁液を 1 mL の容量で腹腔内投与した。この処置を 3 日間連続で行い、動物を感作した。初回腹腔内投与の 10 日後、ラットの一般状態観察と体重測定を行い、体重が均等になるように各群 8 匹 6 群に割り付けた。

翌日、被験物質および対照物質を 30 mg/kg の投与用量となるように 5 mL/kg の容量で経口投与した。1 時間後、超音波式ネブライザー NE-U17 (OMRON Co., 京都, 日本) を用いて 2% OVA 溶液を 15 分間ラットに吸入させた。偽処置群のラットに対しては、生理食塩液を同様に吸入させた。吸入惹起の 1 時間後、無拘束呼吸機能測定装置 whole body plethysmograph PLY3215 (Buxco Electronics, Inc., Wilmington, NC, USA) を用いて enhanced pause (Penh) を測定した⁴⁴⁾。

2.2.9. 気道炎症モデルの評価

JTE-852 を被験物質として、ketotifen および pranlukast を比較対照物質として使用した。Prednisolone は陽性対照物質として使用した。OVA および Alum は 2.2.7.項記載のものを使用した。ラット IL-13 ELISA キットは、2.2.4.項記載のものを使用した。

生理食塩液に OVA と Alum をともに 10 mg/mL となるように添加し、OVA/Alum 懸濁液を調製した。これを 6 週齢の雄性 BN ラットに 1 mL の容量で腹腔内投与した。この処置を 3 日間連続で行い、動物を感作した。初回腹腔内投与の 2 週間後、ラットの一般状態を観察し、体重が均等になるように各群 12 匹 6 群に割り付けた。

被験物質および対照物質を 5 mL/kg の容量で経口投与した。投与用量はいずれも 30 mg/kg とした。1 時間後、ネブライザーを用いて 0.5% OVA 溶液をラットに 15 分間吸入させた。偽処置群のラットには、生理食塩液を同様に吸入させた。吸入惹起 24 時間後、ラットをペントバルビタール麻酔下で放血致死させた。ラットの気管を露出させ、そこから気管支の方向へカニューレを挿入した。続いて、以下の手順で気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) を回収した。すなわち、洗浄用緩衝液として 2 mmol/L EDTA および 0.5% BSA を含む phosphate-buffered saline (PBS) を調製し、その 2.5 mL を気道および肺胞に送達して回収した。この操作をさらに 5 回行い、計 6 回の洗浄を行った。

BALF 中の総白血球濃度を血液学検査装置 ADVIA120 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) により測定した。また、集細胞遠心装置 Cytospin 2 cytocentrifuge (Thermo Fisher Scientific K.K., 神奈川, 日本) を用いて BALF から細胞塗沫標本を作製し、Diff-Quik stain™ キット (Funakoshi Co., Ltd., 東京, 日本) を用いた Wright-Giemsa 染色を行った。その後、塗沫標本上の好酸球、好中球ならびに単核球数をブラインド下で計測した。残りの BALF を遠心し、上清中の IL-13 濃度を EIA 法により測定した。

総白血球濃度および IL-13 濃度に回収した BALF 容量を乗じ、総白血球数および IL-13 量を算出した。計数した好酸球および好中球の比率を計算し、それぞれの比率に総白血球数を乗じることで好酸球数および好中球数を算出した。

2.2.10. 統計解析

各 *in vivo* 試験の群分け時の体重について、以下の有意差検定を実施した。Bartlett の検定により等分散性を確認した後、1 元配置分散分析 (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) により群間に有意な差がないことを確認した。有意水準は両側 5% とした。

各 *in vivo* 試験の評価項目について、以下の有意差検定を実施した。2 群間の比較においては、まず F 検定により分散性を確認し、等分散データに対しては Student の t 検定を、不等分散データに対しては Aspin-Welch の t 検定を実施した。3 群以上の群間比較においては、まず Bartlett の検定により分散性を確認した。その結果、いずれのデータも不等分散であったため、次いで Steel の検定を実施した。検定の有意水準は両側 5% とした。

検定には、SAS システム version 8.2 および SAS 前臨床パッケージ version 5.0 を用いた。

第 3 節 結果

2.3.1. ヒトマスト細胞からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用

Syk は、IgE 架橋刺激によるマスト細胞内シグナル伝達経路の最上流に位置し、顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカインの分泌に対しても不可欠な機能を果たす^{1,2)}。第 1 章において、JTE-852 は Syk を阻害することが示されたため、上記 3 群のメディエーター分泌に対しても JTE-852 が抑制作用を示すことが期待される。この仮説を検証するため、CBMCs からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用を検討した。

顆粒内容物の代表としてヒスタミン、アラキドン酸代謝産物の代表として LTC₄/D₄/E₄、TXA₂ および PGD₂、サイトカインの代表として IL-13 をそれぞれ測定した。IgE 架橋刺激によって CBMCs からヒスタミン、LTC₄/D₄/E₄、TXA₂、PGD₂ および IL-13 が分泌された。JTE-852 は、これらすべてのメディエーター分泌を抑制し (Fig. 7)、その IC₅₀ 値はそれぞれ 0.044 ± 0.005 、 0.044 ± 0.007 、 0.069 ± 0.007 、 0.088 ± 0.015 および $0.063 \pm 0.006 \mu\text{mol/L}$ であった (Table 3)。JTE-852 の抑制作用は濃度依存的であり、 $1 \mu\text{mol/L}$ の濃度でほぼ完全な抑制が認められた (Fig. 7)。

IgE 架橋刺激によるメディエーター分泌に加えて、カルシウムイオノフォア A23187 刺激によるメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用もあわせて検討した。メディエーターの代表として、ヒスタミンを測定した。JTE-852 は、10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度においても A23187 刺激 CBMCs からのヒスタミン分泌を抑制しなかった (Fig. 7 および Table 3)。JTE-852 の 10 $\mu\text{mol/L}$ は、IgE 架橋刺激によるメディエーター分泌を完全に抑制すると思われる濃度である (Fig. 7)。

なお、IgE 架橋刺激の実験における媒体群のメディエーター濃度は、ヒスタミンが 38 $\mu\text{mol/L}$ 、 $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ が 339 pg/mL 、 TXA_2 が 9.9 ng/mL 、 PGD_2 が 638 ng/mL 、IL-13 が 307 pg/mL であった。A23187 刺激の実験における媒体群のヒスタミン濃度は、46 $\mu\text{mol/L}$ であった。

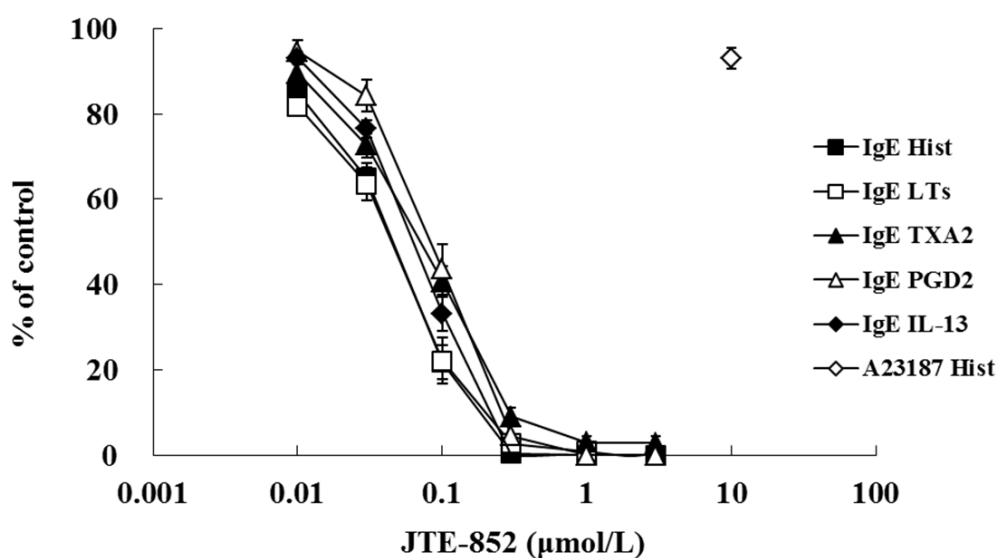


Fig. 7 Effects of JTE-852 on mediator secretion from human mast cells

CBMCs were primed with recombinant human IL-4 and human IgE; subsequently, the cells were challenged with anti-human IgE for 30 min (histamine, $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$, TXA_2 , and PGD_2) or 5 hr (IL-13). Meanwhile, non-primed plain CBMCs were stimulated with A23187 for 30

min (histamine). JTE-852 was added 10 min before challenge or stimulation. The concentrations of mediators in the supernatants were measured by EIA. Data express the mean \pm SEM, which were calculated from seven experiments (seven donors).

2.3.2. ラットマスト細胞からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用

RBL-2H3 細胞を用いて同様の検討を行った。顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカインの代表として、それぞれヒスタミン、LTC₄/D₄/E₄ および IL-13 を測定した。IgE 架橋刺激 RBL-2H3 細胞から分泌されたこれらメディエーターに対し、JTE-852 は濃度依存的な抑制作用を示し、1 μ mol/L の濃度で完全な抑制が認められた (Fig. 8)。IC₅₀ 値はそれぞれ 0.064 ± 0.004 , 0.047 ± 0.011 および 0.034 ± 0.006 μ mol/L であった (Table 3)。

なお、媒体群におけるヒスタミン、LTC₄/D₄/E₄ および IL-13 濃度は、それぞれ 1.8 μ mol/L, 181 pg/mL および 483 pg/mL であった。

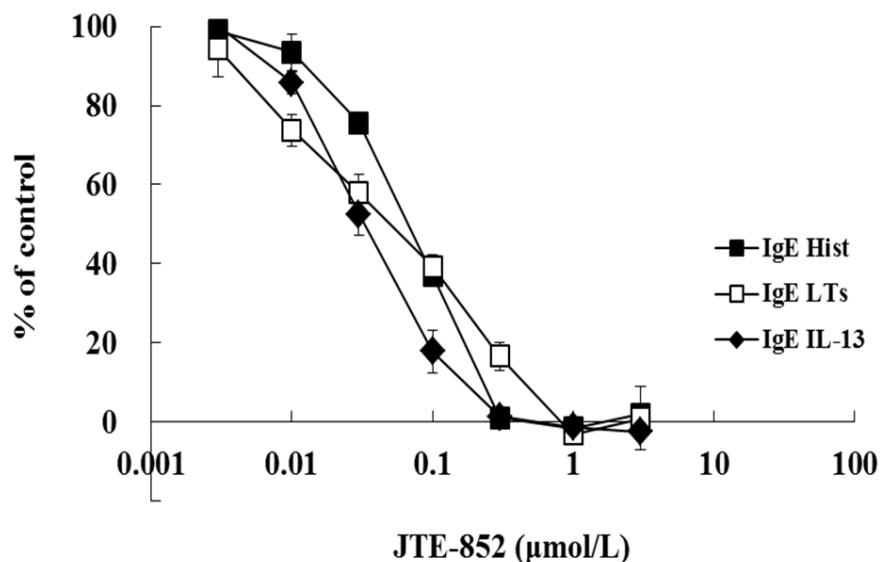


Fig. 8 Suppressive effects of JTE-852 on mediator secretion from rat mast cells

RBL-2H3 cells were sensitized with anti-DNP IgE antibody and were challenged with DNP-BSA for 30 min (histamine and LTC₄/D₄/E₄) or 4 hr (IL-13). JTE-852 was added 10 min before challenge. The concentrations of mediators in the supernatants were measured by EIA. Data express the mean ± SEM, which were calculated from three experiments.

Table 3 Effects of JTE-852 on mediator secretion from human and rat mast cells

Cell	Stimulation	Mediator	IC ₅₀ value (μmol/L)
CBMCs	IgE-crosslinking	Histamine	0.044 ± 0.005
CBMCs	IgE-crosslinking	LTC ₄ /D ₄ /E ₄	0.044 ± 0.007
CBMCs	IgE-crosslinking	TXA ₂	0.069 ± 0.007
CBMCs	IgE-crosslinking	PGD ₂	0.088 ± 0.015
CBMCs	IgE-crosslinking	IL-13	0.063 ± 0.006
CBMCs	A23187	Histamine	>10
RBL-2H3	IgE-crosslinking	Histamine	0.064 ± 0.004
RBL-2H3	IgE-crosslinking	LTC ₄ /D ₄ /E ₄	0.047 ± 0.011
RBL-2H3	IgE-crosslinking	IL-13	0.034 ± 0.006

CBMCs or RBL-2H3 cells were sensitized with IgE; they were challenged with anti-IgE antibody or antigen, respectively. CBMCs were also stimulated with A23187. Concentrations of the secreted mediators were measured by EIA. The IC₅₀ values were calculated by a sigmoid-curve fitting with SAS System version 8.2 and SAS Preclinical Package version 5.0 (SAS Institute Japan Inc.). The values show the mean ± SEM (n = 7, CBMCs; n = 3, RBL-2H3 cells).

2.3.3. PCA 反応に対する JTE-852 の作用

JTE-852 は、IgE 架橋刺激マスト細胞からの顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物お

よびサイトカイン分泌を抑制した (2.3.1.項および 2.3.2.項参照)。これらメディエーターが関与する *in vivo* アレルギー反応を JTE-852 が抑制するかどうかを検証するため、本項では、メディエーターの 1 つであるヒスタミンが寄与する PCA 反応⁴⁵⁾ を用いて JTE-852 の作用を検討した。加えて、既存のアレルギー疾患治療薬である ketotifen, pranlukast および prednisolone の作用も同時に検討した。

結果を Fig. 9 に示す。媒体群における漏出色素量 ($\mu\text{g}/\text{site}$) は、偽処置群に比して有意に高値であった。陽性対照物質である ketotifen (ヒスタミン H1 受容体拮抗薬) は、色素漏出を有意に抑制し、その抑制率は 97.6%であった。JTE-852 は用量依存的かつ有意に色素漏出を抑制し、ED₅₀ 値は 3.1 mg/kg であった。ステロイド薬 prednisolone も有意な抑制作用を示したが、その抑制割合は部分的であった。Cysteinyl LT1 受容体拮抗薬 pranlukast は、明らかな作用を示さなかった。

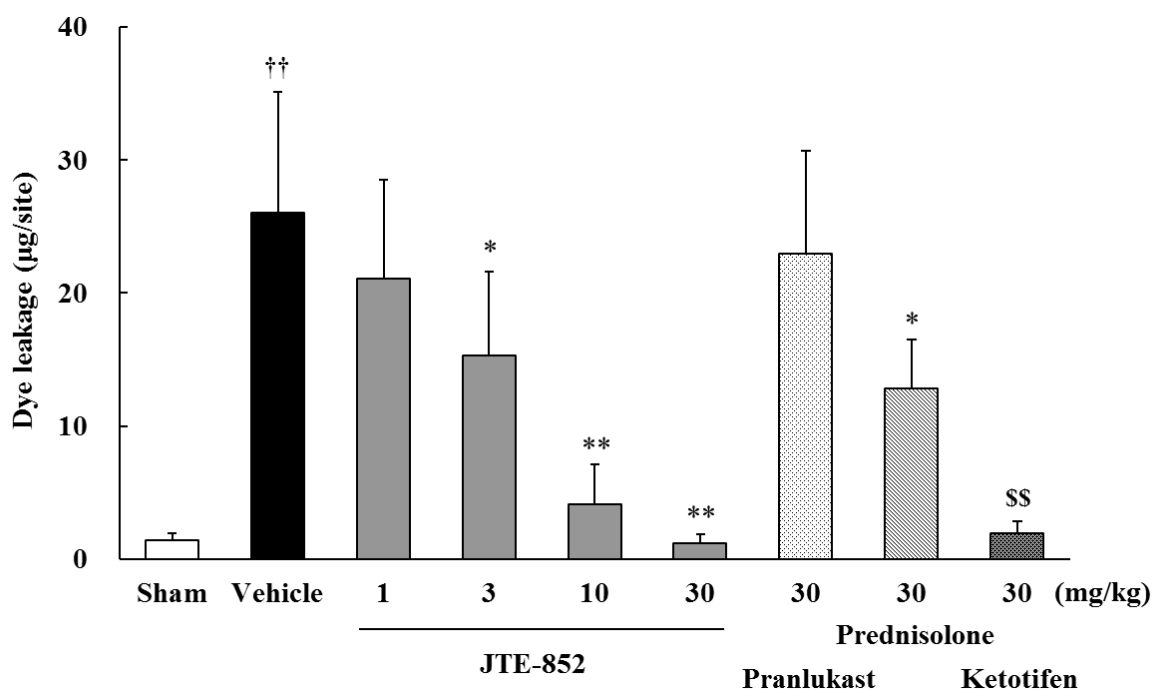


Fig. 9 Effects of JTE-852 and anti-allergic drugs on PCA reaction in rats

SD rats were sensitized by intradermal injection of anti-DNP IgE antibody and were

challenged by intravenous injection of DNP-BSA and Evans blue mixture. In the sham group, Evans blue without DNP-BSA was dosed intravenously. After 30 min, the rats were euthanized; the region skins were extirpated. All compounds were administered orally 1 hr before challenge. Evans blue was extracted from the region skins, and its absorbance was measured. Data express the mean + standard deviation (SD); n = 8 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. sham group (Aspin-Welch's t -test): \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Aspin-Welch's t -test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

2.3.4. くしゃみモデルにおける JTE-852 の作用

JTE-852 は, IgE 架橋マスト細胞からの 3 群のメディエーター分泌をすべて抑制し (2.3.1.項および 2.3.2.項参照), さらに, これらメディエーターが関与する *in vivo* アレルギー反応も抑制する (2.3.3.項参照) ことが示された。これらの知見より, JTE-852 は幅広いアレルギー症状を抑制し得る可能性が期待され, このことを検証する目的で, 複数のアレルギー疾患動物モデルにおける JTE-852 の作用を検討した。はじめに, ラットくしゃみモデルの評価を行った。

結果を Fig. 10 に示す。媒体群において約 100 回のくしゃみが観察され, 偽処置群に比して有意に高値であった。JTE-852 は, このくしゃみ回数を用量依存的に抑制した。その抑制作用は 3, 10, 30 mg/kg の用量において有意であり, ED₅₀ 値は 2.4 mg/kg であった。

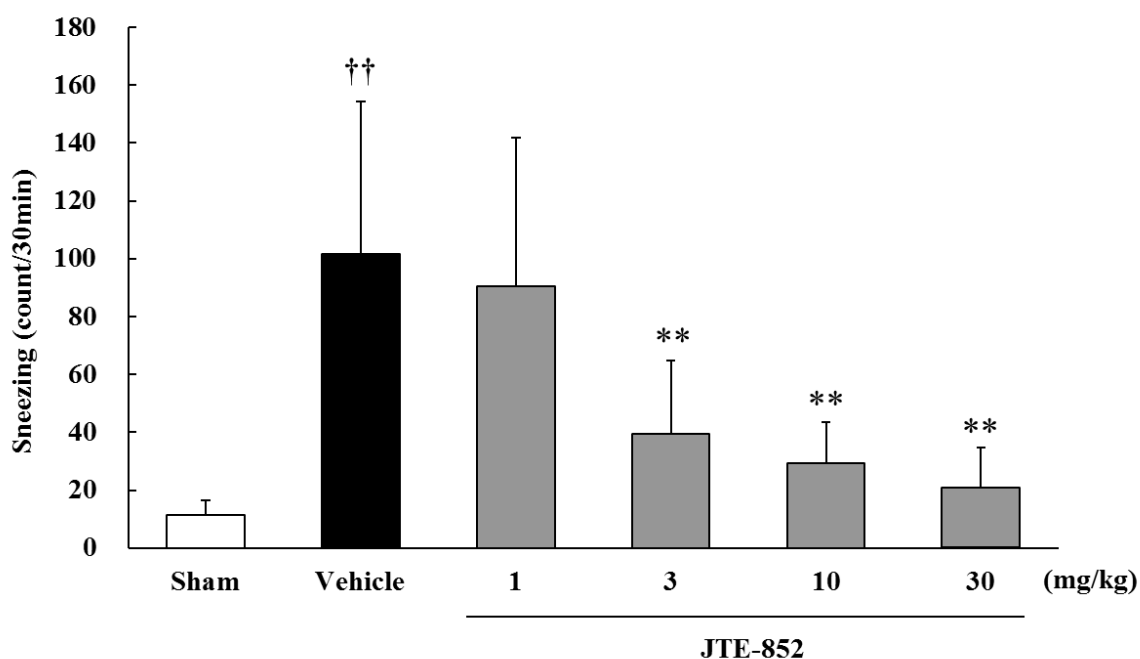


Fig. 10 Suppressive effect of JTE-852 on sneezing in rats

TDI was administered intranasally to BN rats at a volume of 5 μ L/each nose, once daily from Day 1 to Day 5 and from Day 8 to Day 12. On Day 23, the sensitized rats were challenged by intranasal administration of TDI. Ethyl acetate was administered to rats in the sham group. Immediately after challenge, the number of sneezes in 30 min was counted in a blind manner. JTE-852 was administered orally 1 hr before challenge. Data express the mean + SD; n = 14 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. sham group (Aspin-Welch's t -test): ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

2.3.5. 鼻漏モデルにおける JTE-852 の作用

次に、ラット鼻漏モデルの評価を行った。第 1 節に記載した通り、本モデルでは、JTE-852 に加えて ketotifen, pranlukast および prednisolone の評価を行い、各薬物の最大効果比較を行った。

陽性対照物質として設定した ketotifen は、媒体群で認められた色素漏出を有意に抑

制した (Fig. 11)。JTE-852 も色素漏出を有意に抑制し、その抑制度合いは ketotifen に匹敵した。Prednisolone も有意な抑制作用を示し、ketotifen および JTE-852 と同等の抑制度合いを示した。一方、pranlukast は有意な作用を示さなかった。

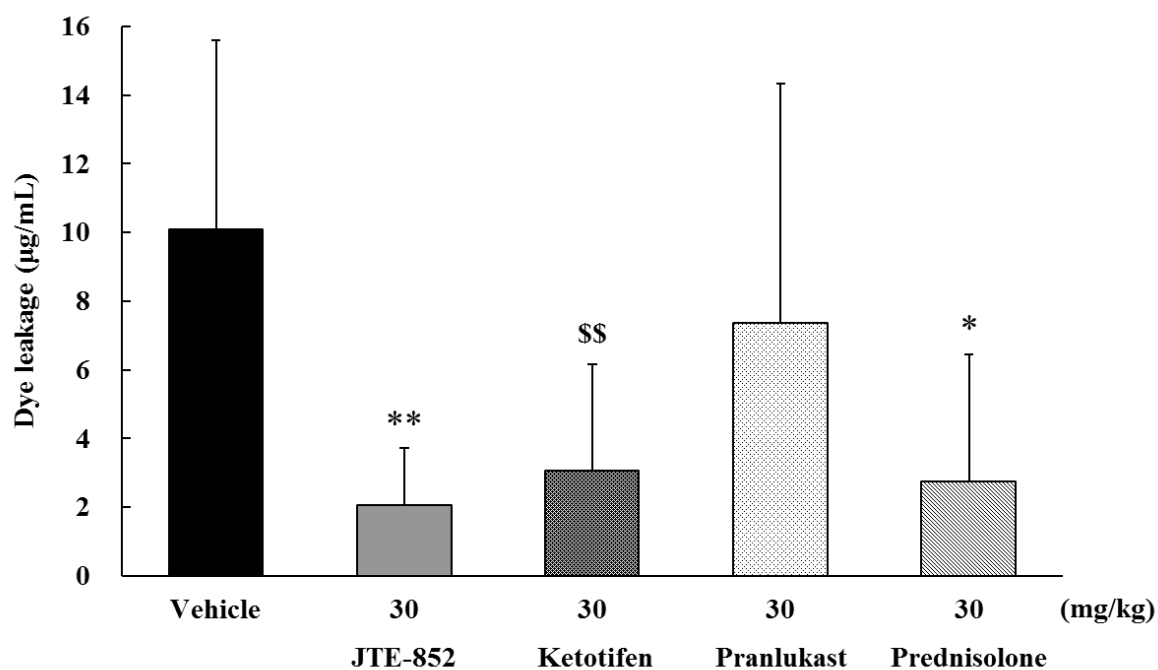


Fig. 11 Effects of JTE-852 and anti-allergic drugs on rhinorrhea in rats

SD rats were sensitized by intraperitoneal injection of OVA/Alum for 3 consecutive days. Fifteen days after the first intraperitoneal injection, the rats were given intravenous injection of Chicago sky blue 6B dye and were then challenged by intranasal perfusion with OVA for 10 min. The fluid drained from rat nares was collected, and absorbance of the dye was measured. All compounds were orally administered approximately 2 hr before challenge. Data express the mean + SD; n = 12 rats per group. \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's *t*-test); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

2.3.6. 気道収縮モデルにおける JTE-852 の作用

続いて、ラット気道収縮モデルの評価を行った。Fig. 12 に示す通り、媒体群における Penh は偽処置群に比して有意に高値であった。陽性対照物質として設定した pranlukast は、Penh の上昇を有意に抑制した。JTE-852 も Penh の上昇を有意に抑制したが、その抑制度合いは pranlukast よりも高く、ほぼ完全な抑制作用が認められた。Prednisolone は Penh 上昇を抑制する傾向を示したものの、統計学的な有意差は認められなかった。Ketotifen は、この反応に対して影響を及ぼさなかった。

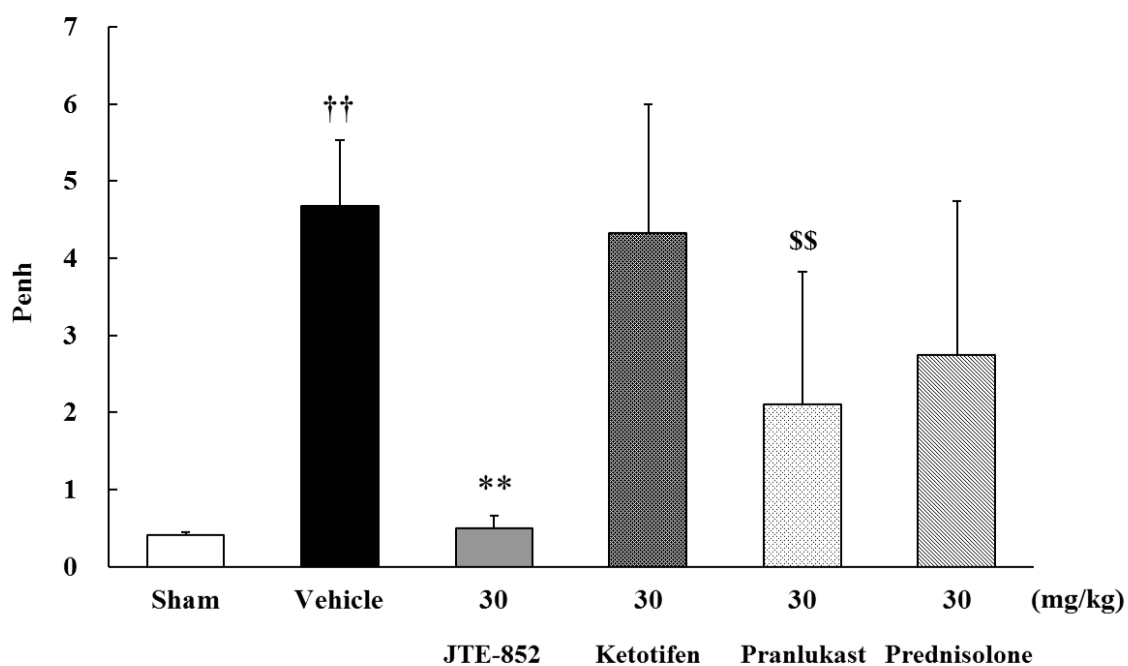


Fig. 12 Effects of JTE-852 and anti-allergic drugs on airway constriction in rats

BN rats were sensitized by intraperitoneal injection of OVA/Alum for 3 consecutive days.

Eleven days after the first intraperitoneal injection, the rats were challenged by inhalation of OVA. In the sham group, rats inhaled saline. After 1 hr, Penh of each rat was measured. All

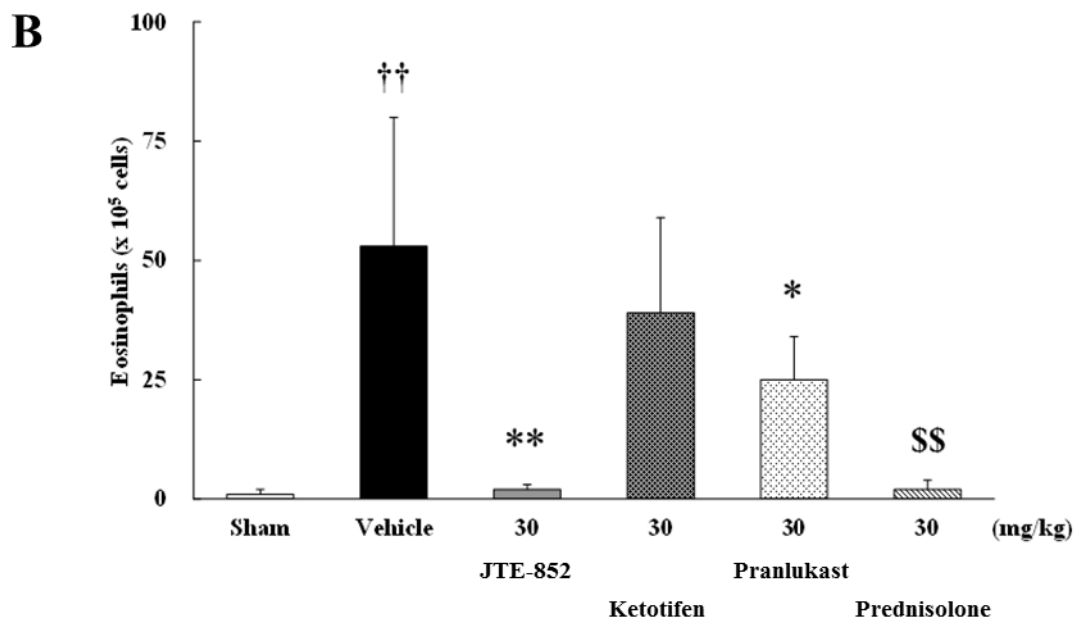
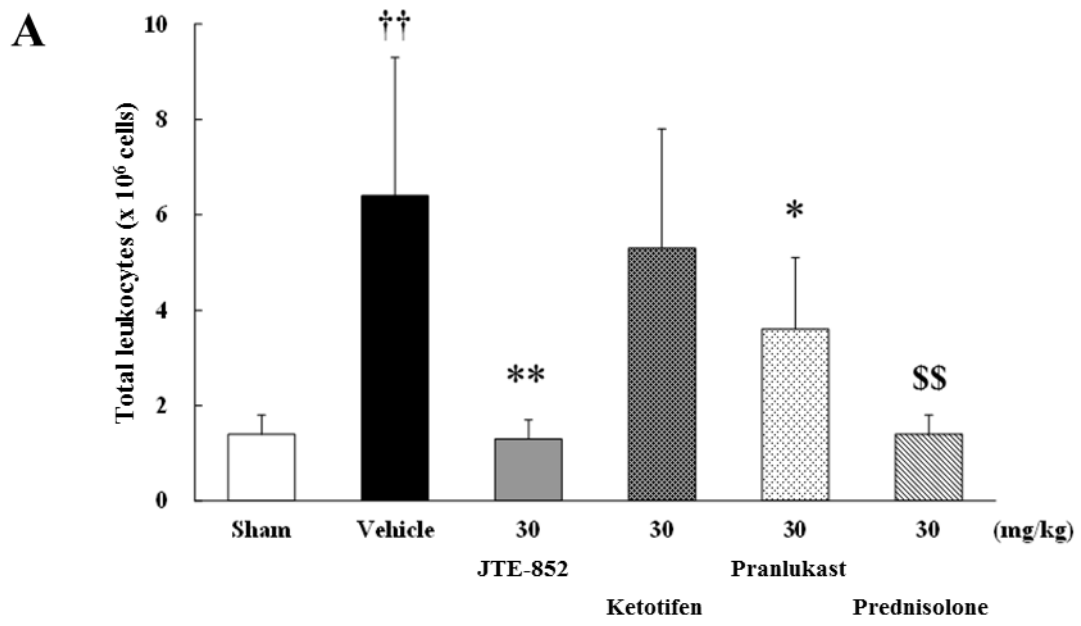
compounds were administered orally 1 hr before challenge. Data express the mean + SD; n =

8 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. sham group (Aspin-Welch's t -test): \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's t -test): ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

2.3.7. 気道炎症モデルにおける JTE-852 の作用

最後に、ラット気道炎症モデルの評価を行った。本モデルでは、BALF 中の総白血球数、好酸球数、好中球数および IL-13 量を解析し、気道への炎症性細胞浸潤ならびにサイトカイン分泌の指標とした。

Fig. 13 に結果を示す。媒体群において、BALF 中総白血球数 (A)、好酸球数 (B)、好中球数 (C) および IL-13 量 (D) の有意な増加が認められた。陽性対照物質である prednisolone は、すべての指標を有意かつほぼ完全に抑制した。JTE-852 も prednisolone と同様に、有意かつほぼ完全な抑制作用を示した。Pranlukast は、総白血球数と好酸球数に対してのみ有意な抑制を示したが、その作用は JTE-852 や prednisolone よりも軽微であった。Ketotifen は、いずれの指標に対しても有意な抑制を示さなかった。



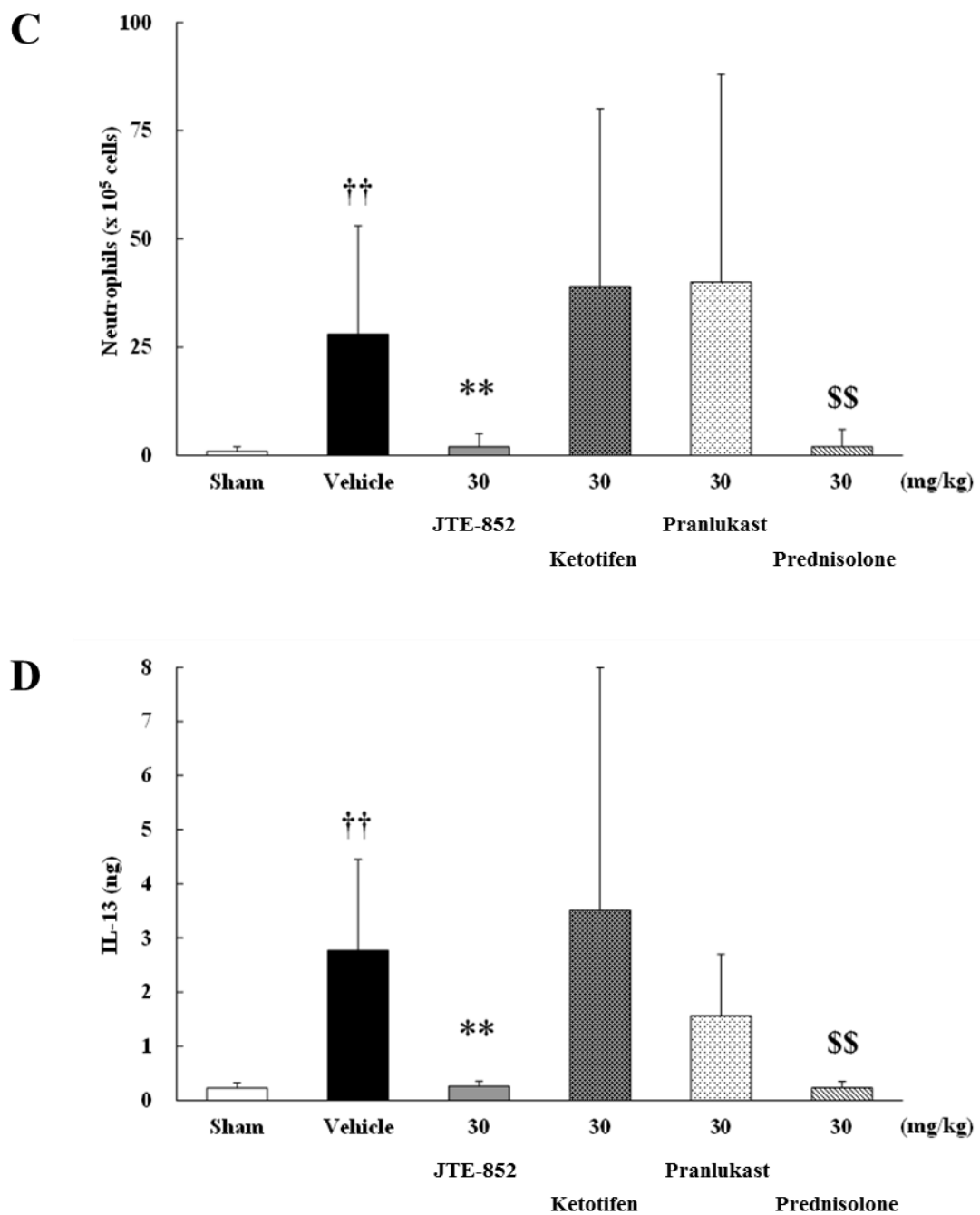


Fig. 13 Effects of JTE-852 and anti-allergic drugs on airway inflammation in rats

BN rats were sensitized by intraperitoneal injection of OVA/Alum for 3 consecutive days.

Two weeks after the first intraperitoneal injection, the rats were challenged by inhalation of

OVA. In the sham group, rats inhaled saline. After 24 hr, BALF was collected from the rats.

The numbers of total leukocytes (A), eosinophils (B), and neutrophils (C) in the BALF were determined. The amount of IL-13 (D) in the BALF was also determined. All compounds were administered orally 1 hr before challenge. Data express the mean + SD; n = 12 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. sham group (Aspin-Welch's t -test): \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Aspin-Welch's t -test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

第4節 考察

第1章において、JTE-852は強力かつ選択的なSyk阻害薬であることが示された。そこで本章では、JTE-852のアレルギー疾患治療薬としての有用性を検証した。すなわち、新規薬物に求められる特長である①マスト細胞からの3群のメディエーター(顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカイン)分泌をいずれも抑制することで幅広いアレルギー症状に有効性を示すか、②経口投与可能であるか、の2点についてJTE-852の可能性を検討した。

はじめに、マスト細胞からのIgE架橋刺激による3群のメディエーター分泌に対するJTE-852の作用を検討した。JTE-852は、CBMCsからのヒスタミン、LTC₄/D₄/E₄、TXA₂、PGD₂およびIL-13分泌、RBL-2H3細胞からのヒスタミン、LTC₄/D₄/E₄およびIL-13分泌をほぼ同等のIC₅₀値で抑制した。同一条件下における直接的な横並び比較ではないものの、JTE-852のメディエーター分泌抑制作用は、治験段階にも進んだSyk阻害薬R112やR406よりも強い効力と思われた^{2,24)}。例えば、CBMCsからのLTC₄/D₄/E₄分泌に対するJTE-852、R112およびR406のIC₅₀値は、それぞれ44、115および93 nmol/Lである。また、IgE架橋刺激マスト細胞からのTXA₂およびIL-13分泌に対するSyk阻害薬の抑制作用はこれまでに報告されておらず、今回のJTE-852の結果が初めての報告と思われる。TXA₂は複数の既存抗アレルギー薬の標的メディエーターであり^{5,31,33,34)}、アレルギーの病態形成に重要な役割を果たす。したがって、TXA₂の分泌抑制

作用は、JTE-852 の魅力的な特徴と考えられる。IL-13 も IgE クラススイッチ^{46,47)} や FcεRI の発現増強⁴³⁾ などの作用を有し、アレルギーの発症、増悪に寄与するメディエーターである。したがって、IL-13 分泌に対する抑制作用も JTE-852 の興味深い特徴と言える。

感作したマスト細胞に対する IgE 架橋の手法について、CBMCs の実験では抗 IgE 抗体を用いて、RBL-2H3 細胞の実験では抗原を用いて IgE 架橋を誘導した。本検討の結果より、JTE-852 はいずれの IgE 架橋刺激によるメディエーター分泌も抑制することが確認された。また、JTE-852 の Syk 阻害作用は、ヒトとラットの間に種差がないことが 1.3.1.項で示唆されたが、これと矛盾のない結果が CBMCs および RBL-2H3 細胞からのメディエーター分泌においても示された。

今回、CBMCs を用いた検討においては、カルシウムイオノフォア A23187 刺激によるヒスタミン分泌もあわせて評価した。ヒスタミンは、IgE 架橋刺激実験でも測定したメディエーターである。IgE 架橋刺激によるマスト細胞内シグナル伝達経路において、カルシウム流入は Syk より下流に位置し、さらなるシグナル伝達を経て最終的にメディエーター分泌が引き起こされる^{1,48)}。したがって、カルシウム流入を直接的に誘導するカルシウムイオノフォア刺激によるメディエーター分泌は、Syk を介さない反応である (Fig. 14)。JTE-852 は 10 μmol/L の高濃度においても、A23187 刺激 CBMCs からのヒスタミン分泌を抑制しなかった。このことから、JTE-852 は、Syk が関与しないメディエーター分泌に対しては抑制を示さないと考えられた。

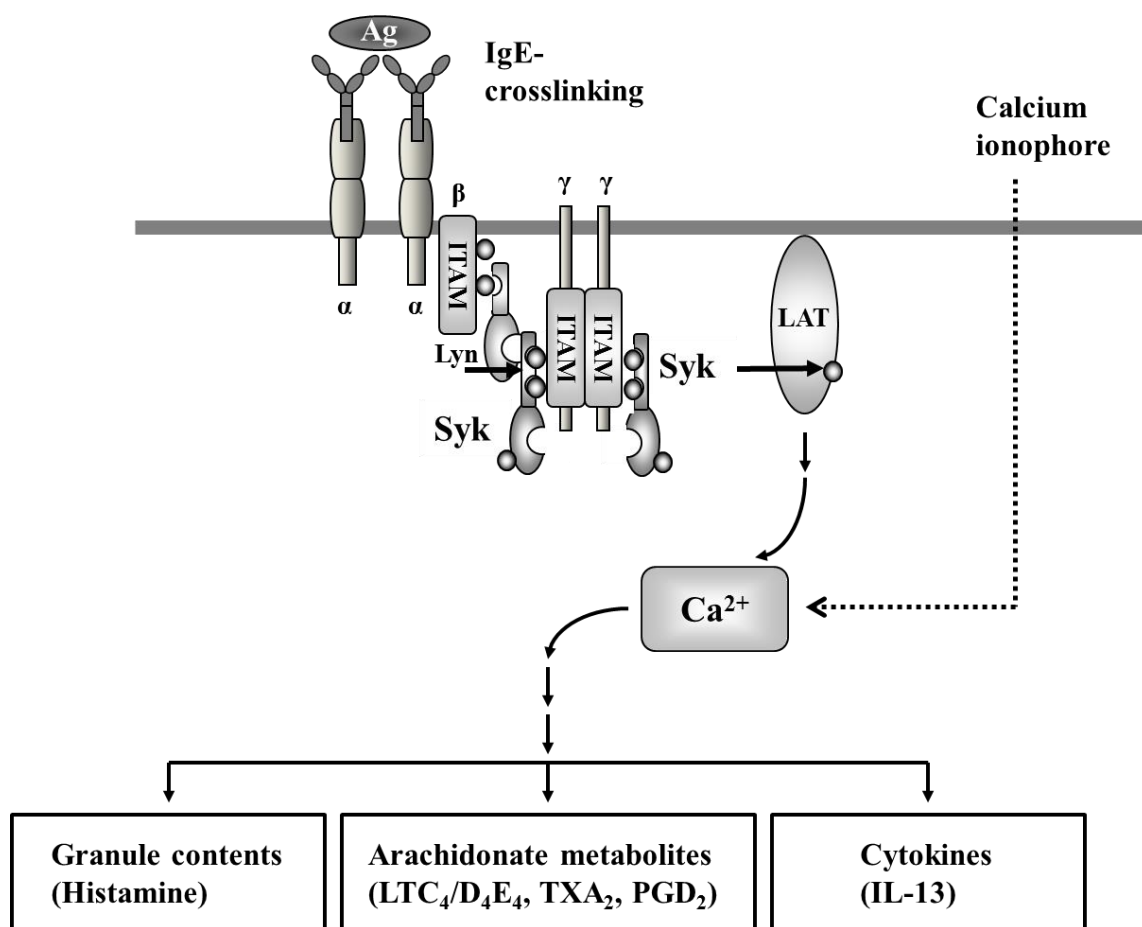


Fig. 14 Mediator secretion from mast cells stimulated by IgE-crosslinking or calcium ionophore

以上の検討結果より, JTE-852はマスト細胞からのIgE架橋刺激による顆粒内容物, アラキドン酸代謝産物およびサイトカインの分泌をいずれも強力に抑制することが明らかとなった。

次に, これらメディエーターが関与する *in vivo* のアレルギー反応を JTE-852 が抑制するかどうかの検討を行った。メディエーターの代表としてヒスタミンを取り上げ, PCA 反応に対する JTE-852 の作用を評価した。PCA は, IgE 架橋マスト細胞から分泌されたヒスタミンによって引き起こされる皮膚の血管透過性亢進反応である⁴⁵⁾。ヒス

タミン H1 受容体拮抗薬 ketotifen は、この PCA 反応を抑制することが報告されており⁴⁵⁾、今回の実験においても報告と同様の ketotifen の抑制作用が確認された。

Prednisolone は PCA 反応を部分的に抑制したが、この結果も文献報告⁴⁹⁾と一致する。ステロイド薬は、血管内皮への直接的な作用を介して血管透過性亢進を非特異的に抑制する作用を有しており、この作用がステロイド薬による PCA 反応抑制の機序と考えられる。JTE-852 は、経口投与により PCA 反応を用量依存的かつ有意に抑制した。マスト細胞を用いた *in vitro* 実験の結果と合わせ考えると、JTE-852 は、IgE 架橋マスト細胞からのヒスタミン分泌を抑制することにより、PCA 反応を抑制すると考えられた。

JTE-852 は経口投与の条件において、ヒスタミンが関与する *in vivo* アレルギー反応を抑制することが明らかとなった。加えて、JTE-852 はマスト細胞からの 3 群すべてのメディエーター分泌を抑制するため、ヒスタミンのみならず他のメディエーターが関与する *in vivo* アレルギー反応も抑制できる可能性が示唆された。

そこで次に、JTE-852 が幅広いアレルギー症状を抑制し得るかどうかを検討するため、複数のアレルギー疾患動物モデルにおける JTE-852 の作用を評価した。1 つ目のモデルとして、ラットくしゃみモデルを用いた。第 1 節に記載した通り、くしゃみはアレルギー性鼻炎の主要症状の 1 つである。IgE 架橋や substance P などの神経ペプチドによって刺激されたマスト細胞がヒスタミンを分泌し、これが三叉神経に作用することで引き起こされる反射反応がくしゃみである³⁵⁾。今回評価したくしゃみモデルにおいて、経口投与した JTE-852 は、抗原誘発くしゃみ反応を用量依存的かつ有意に抑制した。

2 つ目のモデルとして、ラット鼻漏モデルを用いた。鼻漏もアレルギー性鼻炎の主要な症状の 1 つである。鼻漏は、IgE 架橋マスト細胞から分泌されたヒスタミンが鼻粘膜の血管透過性を亢進させる反応であり、治療にはヒスタミン H1 受容体拮抗薬が用いられる^{1, 35, 49, 50)}。本モデルにおける JTE-852 の評価用量は、その作用機序を最大

限発揮できる用量を考慮し 30 mg/kg とした。すなわち、JTE-852 の作用機序である Syk 阻害を *in vivo* で計る最も適当な評価系として PCA 反応を考え、この反応をほぼ完全に抑制する用量である 30 mg/kg を設定した。経口投与した 30 mg/kg の JTE-852 は、抗原誘発の鼻漏反応を有意に抑制した。

3 つ目のモデルとして、ラット気道収縮モデルを用いた。第 1 節に記載した通り、気道収縮は喘息の主要な特徴の 1 つである。JTE-852 は、同じく 30 mg/kg の用量を経口投与した。その結果、JTE-852 は抗原誘発気道収縮反応を有意に抑制した。

4 つ目のモデルとして、ラット気道炎症モデルを用いた。気道炎症も喘息の主要な特徴の 1 つである。炎症は、サイトカインと炎症性細胞の間の相互作用が重要である。すなわち、炎症局所で分泌されたサイトカインが炎症性細胞を引き寄せ、その炎症性細胞がサイトカインを含むさらなるメディエーターを分泌し、さらに多くの炎症性細胞を引き寄せるというサイクルが、炎症の増悪と持続化を引き起こす^{1,8,35)}。IL-5 と好酸球の相互作用が、この増悪サイクルの 1 例として挙げられる^{3,35)}。今回のラット気道炎症モデルでは、BALF 中の炎症性細胞数とサイトカイン量を評価したが、JTE-852 は経口投与により抗原誘発気道炎症を有意に抑制した。ラット BALF 中のサイトカイン量に対する JTE-852 の抑制作用は、Syk 阻害薬の当該作用に関する初めての報告と思われる。

今回、アレルギー性鼻炎や喘息の症状を発現する 4 つの動物モデルを用いて JTE-852 の作用を評価した。JTE-852 は、いずれのモデルにおいても有意な抑制作用を示した。アレルギー性鼻炎の動物モデルにおける Syk 阻害薬の抑制作用はこれまでに報告されておらず、今回の JTE-852 の結果は、それを示す初めての報告と思われる。

鼻漏、気道収縮ならびに気道炎症の 3 モデルにおいては、JTE-852 に加えて、既存のアレルギー疾患治療薬である ketotifen, pranlukast および prednisolone の評価も行った。本検討の目的は 4 薬物の最大効果比較であるため、各薬物の投与用量は、それぞれが作用機序を最大限に発揮できる用量を設定した（本節および第 1 節参照）。上記

の3モデルにくしゃみモデルも合わせて、4つの動物モデルの結果を Table 4 にまとめた。

Table 4 Effects of JTE-852 and anti-allergic drugs in animal models of allergy

Model	Suppression of reaction (%) by each compound				
	JTE-852	Ketotifen	Pranlukast	Prednisolone	
Sneezing	90 ^{§§}	NE	NE	NE	
Rhinorrhea	80 ^{§§}	70 ^{§§}	27	73 [§]	
Airway constriction	98 ^{§§}	8	60 ^{§§}	45	
Airway inflammation	Total leukocyte	102 ^{§§}	22	56 [§]	100 ^{§§}
	Eosinophil	98 ^{§§}	27	54 [§]	98 ^{§§}
	Neutrophil	96 ^{§§}	-41	-44	96 ^{§§}
	IL-13	99 ^{§§}	-29	48	100 ^{§§}

Rats were sensitized and challenged with hapten or antigen. Allergic reactions displayed by the rats were measured and analyzed. Percent suppression values (%) and statistical significances at 30 mg/kg of each compound are shown in this table. § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$; vs. vehicle group. NE, not examined

3種の既存薬物 (ketotifen, pranlukast および prednisolone) は、いくつかのモデルにおいて有意な抑制を示さなかった。一方, JTE-852 はすべてのモデルにおいて有意な抑制作用を示した。これらのモデルで認められるアレルギー反応にはマスト細胞由来のメディエーターが関与すると考えられるが, Syk 阻害薬 JTE-852 は, そのメディエーター分泌をすべて抑制する結果, すべてのアレルギー反応を抑制したと考えられた。一方, ketotifen および pranlukast はそれぞれヒスタミンおよび LTC₄/D₄/E₄ を阻害する薬物であり, prednisolone はサイトカイン阻害作用を有する薬物である。すなわち,

これらの薬物は、単独ではすべてのメディエーターの作用を抑制することはできないと考えられる。Table 4 に示す抑制作用の違いは、それぞれの薬物の作用機序の違いを反映した結果と思われる。

序論、本章第 1 節および本節冒頭にも記載した通り、アレルギー疾患の新規治療薬に求められる特長は、①マスト細胞からの 3 群のメディエーター（顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカイン）分泌をいずれも抑制することで幅広いアレルギー症状に有効性を示すこと、②経口投与可能であること、の 2 点と考えられる。本章における検討により、JTE-852 はマスト細胞からの 3 群のメディエーター分泌をいずれも抑制し、経口投与により既存薬よりも幅広いアレルギー反応を抑制することが明らかとなった。このことは、JTE-852 が新規薬物に求められる 2 つの特長を満たす可能性を示唆している。これまでに、アレルギー疾患を対象とした臨床試験を実施した Syk 阻害薬が報告されているが、現状、上市には至っていない²⁶⁾。臨床試験撤退の理由は化合物固有の問題と考えられ、また、早期の臨床試験において有効性が検証されたものもある。したがって、アレルギー疾患治療における Syk 阻害の戦略は否定されておらず、Syk は依然として有望な創薬標的と考えられる。JTE-852 も臨床試験における検証は必須であるが、本章で得られた知見を総合すると、JTE-852 は現状のアンメットニーズを満たし、既存薬よりも優れた有望な新規アレルギー疾患治療薬となる可能性が期待される。

第3章 Syk 阻害薬 JTE-852 の自己免疫疾患治療薬としての有用性に関する検討

第1節 緒言

序論にも記載した通り、自己免疫疾患は、本来寛容されるべき内在性タンパク等に対して不必要な免疫応答が誘導される結果引き起こされる炎症性の疾患である。これまで、自己免疫疾患の病態生理や病態形成機序を解明するために多くの研究や取り組みがなされ、その成果の一部として開発された生物学的製剤は、自己免疫疾患の治療に劇的な進展をもたらした。一方、生物学的製剤にも、不応答患者の存在、易感染性等の副作用、タンパク製剤であるが故の問題点（投与経路や治療費）、などが指摘されており、したがって、自己免疫疾患治療のオプションは現状においても依然充足されていないと考えられる。すなわち、自己免疫疾患治療においてもアンメットニーズが存在し、高い有効性を有することに加えて、安全であること、経口投与可能であること、安価であることも兼ね備えた新規低分子薬物が求められている¹⁵⁻¹⁸⁾。

Syk はマスト細胞、単球、マクロファージ、好中球、B 細胞などの免疫細胞に主として発現する非受容体型チロシンキナーゼで、IgE や IgG によって誘導される細胞内シグナル伝達、ひいてはその先の細胞反応において中心的な役割を担っている^{17, 21, 22)}。Syk が寄与する IgG の反応は、自己免疫疾患の病態形成に大きく関わっている^{17, 21, 22)}ため、Syk の阻害は自己免疫疾患に対する有望な治療戦略となることが期待される。

第1章より、JTE-852 は強力かつ選択的な新規 Syk 阻害薬であることが示された。また、第2章における検討により、JTE-852 は IgE を介する *in vitro* および *in vivo* の反応を抑制し、アレルギー疾患の動物モデルにおいて有効性を示すことが確認された。本章では、JTE-852 の自己免疫疾患治療薬としての有用性を検証した。はじめに、JTE-852 が IgG によって誘導される細胞反応を抑制するかどうかを検討するため、ヒトのマスト細胞および単球からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用を評価

した。ヒト単球を用いた実験では、Syk を介さない機序によるメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用もあわせて評価した。続いて、JTE-852 が IgG 関与の *in vivo* 反応を抑制するかどうかを検討するため、II 型過敏反応であるラット reversed cutaneous anaphylaxis (RCA) 反応ならびに III 型過敏反応であるラット reversed passive Arthus (RPA) 反応に対する JTE-852 の作用を評価した。これら 2 つの反応に加え、ラット遅発型過敏 (delayed-type hypersensitivity; DTH) 反応の評価も行い、Syk を介さないと考えられる IV 型過敏反応に対する JTE-852 の作用を考察した。さらに、JTE-852 が自己免疫疾患の病態に有効性を示すかどうかを検討するため、自己免疫疾患の動物モデルにおける JTE-852 の作用を評価した。今回、自己免疫疾患動物モデルの代表として、ラットコラーゲン誘発関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA) モデルを用いた。CIA モデルにおいては、JTE-852 に加えて、methotrexate (MTX) の評価も行った。MTX は、RA や乾癬などの自己免疫疾患治療に使用される主要な低分子薬物である^{51, 52)}。

第 2 節 材料および方法

3.2.1. 被験物質, 対照物質および媒体

1.2.1.項記載の JTE-852 を被験物質として使用した。Prednisolone は 2.2.1.項記載のものを使用し、cyclosporin A および MTX は、それぞれ和光純薬工業株式会社および Sigma-Aldrich, Co.から購入した。Prednisolone, cyclosporin A および MTX は、対照物質として使用した。

1.2.1.項記載の DMSO を *in vitro* 試験における媒体、2.2.1.項記載の 0.5% MC 水溶液を *in vivo* 試験における媒体として薬液調製に使用した。

3.2.2. 動物

SD ラット, Wistar ラットおよび Lewis ラットを日本チャールス・リバー株式会社

より購入した。飼育条件ならびに動物福祉は、2.2.2.項の記載と同様に行った。

3.2.3. ヒトマスト細胞からのメディエーター分泌の評価

ヒトマスト細胞は、2.2.3.項で取得した7ロットのCBMCsを用いた。ミエローマ由来ヒトIgGはEMD Biosciences, Inc. (Madison, WI, USA)より購入し、感作用抗体として使用した。抗ヒトIgG抗体はBethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)より購入し、ヒトIgGを架橋する抗体(抗原の代替)として使用した。ヒスタミンELISAキットは、2.2.3.項記載のものを使用した。

CBMCsを10 µg/mLヒトIgG存在下で3日間培養した。培養は37°C, 5% CO₂設定のインキュベーター内で行った。感作したCBMCsを洗浄後、アッセイ培地(2.2.3.項参照)にて1×10⁶ cells/mLに懸濁し、96ウェル丸底プレートに1.2×10⁵ cells/wellとなるように播種した。JTE-852を最終濃度0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 µmol/Lとなるように添加し、インキュベーター内で10分間静置した。次いで、抗ヒトIgG抗体を最終濃度10 µg/mLとなるように添加し、30分間インキュベーションした。プレートを4°C設定下で遠心した後、上清を回収し、上清中のヒスタミン濃度をELISAキットおよびマイクロプレートリーダーVERSAmixを用いて測定した。7ドナーの臍帯血から分化誘導した7ロットのCBMCsを用いて実験を行い(7回の実験)、各実験の測定は2ウェルずつで行った。

3.2.4. ヒト単球からのメディエーター分泌の評価

ヒトIgG, *Escherichia coli*由来lipopolysaccharide (LPS), rhodamine 123は、いずれもSigma-Aldrich, Co.より購入した。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), dihydrorhodamine 123, ヒトTNF-α EIAキットは、それぞれ和光純薬工業株式会社, Biotium, Inc. (Fremont, CA, USA), Invitrogen Co. (Waltham, MA, USA)より購入した。LymphoprepTM (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)を用いた密度勾配遠心法により、

社内ボランティア末梢血からヒト末梢血由来単核球（peripheral blood mononuclear cells; PBMCs）を単離した。なお、ヒト末梢血の入手に当たっては、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所の研究倫理審査委員会の承認を受け、ボランティアのインフォームドコンセントを得た上で入手した。

IgG 架橋刺激による活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）分泌：96 ウェル平底黒プレートに、ヒト *IgG* を 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{well}$ の濃度で添加した。無刺激群のウェルには、PBS を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加した。プレートをインキュベーター内で 1 時間静置し、その後 PBS で洗浄した。これを *IgG* コーティングプレートとし、dihydrorhodamine 123 および JTE-852 を 10 分間前処置した PBMCs 懸濁液を播種した。PBMCs および dihydrorhodamine 123 の最終濃度は、それぞれ $1 \times 10^6 \text{ cells}/100 \mu\text{L}/\text{well}$ および 300 nmol/L とした。JTE-852 の最終濃度は 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ とした。細胞播種後、プレートを 2 時間インキュベーションし、波長 505 nm の励起光に対する 534 nm の蛍光を測定した。測定にはマイクロプレートリーダー SpectraMax Gemini XPS（Molecular Devices Co.）を使用した。Rhodamine 123 を用いて検量線を作製し、これから換算したサンプル中の rhodamine 123 濃度を ROS 濃度とした。

IgG 架橋刺激による *TNF- α* 分泌：JTE-852 を前処置した PBMCs 懸濁液を *IgG* コーティングプレートに播種した。コーティングプレートの作製、前処置および播種は、「*IgG* 架橋刺激による ROS 分泌」実験と同様に行った。細胞播種後、プレートを 6 時間インキュベーションし、上清を回収した。上清中の *TNF- α* 濃度を EIA キットおよびマイクロプレートリーダー VERSAmax を用いて測定した。

PMA 刺激による ROS 分泌：Dihydrorhodamine 123 および JTE-852 を前処置した PBMCs 懸濁液を 96 ウェル平底黒プレートに播種し、直ちに *PMA* を添加した。前処置および播種は、「*IgG* 架橋刺激による ROS 分泌」実験と同様に行った。*PMA* の最終濃度は 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ とした。*PMA* 添加後、プレートを 1 時間インキュベーションし、蛍光を測定した。

LPS 刺激による *TNF- α* 分泌: JTE-852 を前処置した PBMCs 懸濁液を 96 ウェル平底黒プレートに播種し, 直ちに *LPS* を添加した。前処置および播種は, 「IgG 架橋刺激による ROS 分泌」実験と同様に行った。*LPS* の最終濃度は 0.1 ng/mL とした。6 時間のインキュベーション後, 上清を回収し, 上清中の *TNF- α* 濃度を測定した。

実験概略を Fig. 15 に示す。3 ドナーの末梢血から調製した 3 ロットの PBMCs を用いて実験を行い (3 回の実験), 各実験の測定は 2 ウェルずつで行った。

monocytes

Ig, immunoglobulin; LPS, lipopolysaccharide; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells;

PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; ROS, reactive oxygen species;

TNF, tumor necrosis factor

3.2.5. RCA 反応の評価

JTE-852 を被験物質として、prednisolone を陽性対照物質⁵³⁾として使用した。Prednisolone の用量は、抗炎症作用を十分に発揮できる 30 mg/kg を設定した³⁸⁾。抗ラット血清は、Nordic Immunological Laboratories (Bergen, Norway) から購入した。ラットの血清を免疫したウサギの血清であり、ラット血清に対する特異性が確認されている。2.2.5.項記載の Evans blue を色素として使用した。

6 週齢雄性 SD ラットの背部を麻酔下で毛刈りした。翌日、ラットの一般状態観察と体重測定を行い、体重が均等になるように各群 9 匹 6 群に割り付けた。

被験物質および対照物質を 5 mL/kg の容量で経口投与した。JTE-852 の投与用量は 1, 3, 10, 30 mg/kg とし、prednisolone の投与用量は 30 mg/kg とした。1 時間後、8 倍希釈抗ラット血清と 1 mg/mL Evans blue の混合液を、麻酔ラットの背部に 100 μ L/site の容量で皮内投与した。同一個体に対して、抗ラット血清を含まない 1 mg/mL Evans blue 溶液を同様に皮内投与した。2 時間後、ラットを麻酔下で放血致死させ、直径 14 mm の biopsy punch を用いて背部の皮内投与部位を摘出した。摘出部位の重量を測定し、以下の式により浮腫率を算出した。

A : 抗ラット血清と Evans blue の混合液を投与した部位の重量

B : Evans blue のみを投与した部位の重量

式 : % swelling = (A - B) / B \times 100

2.2.5.項記載の方法により、JTE-852 の ED₅₀ 値を算出した。

3.2.6. RPA 反応の評価

JTE-852 を被験物質として、prednisolone を陽性対照物質⁵⁴⁾ として使用した。Prednisolone の用量は、3.2.5.項と同じく 30 mg/kg を設定した³⁸⁾。2.2.7.項記載の OVA を抗原として使用した。抗 OVA 抗体は Sigma-Aldrich, Co.より購入した。2.2.5.項記載の Evans blue および formamide を、それぞれ色素および色素抽出用溶媒として使用した。

6 週齢の雄性 Wistar ラットを麻酔し、背部を毛刈りした。翌日、ラットの一般状態観察と体重測定を行い、体重が均等になるように各群 8 匹 7 群に割り付けた。

12.5 mg/mL OVA と 4 mg/mL Evans blue の混合液を、2 mL/kg の容量でラットに静脈内投与した。偽処置群のラットには、OVA を含まない 4 mg/mL Evans blue 溶液を同様に投与した。30 分後、被験物質および対照物質を 5 mL/kg の容量で経口投与した。JTE-852 の投与用量は 1, 3, 10, 30 mg/kg とし、prednisolone の投与用量は 30 mg/kg とした。1 時間後、麻酔したラットの背部に、4 倍希釈した抗 OVA 抗体を 100 μ L/site の容量で皮内投与した。さらに 4 時間後、頸椎脱臼によりラットを安楽死させ、直径 14 mm の biopsy punch を用いて背部の色素漏出部位を採取した。

色素の抽出、色素濃度 (μ g/mL) の測定、色素量 (μ g/site) の算出ならびに JTE-852 の ED₅₀ 値の算出は、2.2.5.項と同様の方法で行った。

3.2.7. DTH 反応の評価

JTE-852 を被験物質として、cyclosporin A を陽性対照物質として使用した。Cyclosporin A の用量は、T 細胞抑制作用を十分に発揮できる 15 mg/kg を設定した⁵⁵⁾。4-Ethoxymethylene-2-Phenyl-2-Oxazolin-5-One (oxazolone) は、Sigma-Aldrich, Co.から購入し、ハプテンとして使用した。

Day 1 に、8 週齢雌性 Lewis ラットの一般状態観察と体重測定を行い、体重が均等になるように各群 6 匹 5 群に割り付けた。

同日、アセトンとオリーブオイルの 4:1 混合液を溶媒として 1% oxazolone 溶液を調製し、除毛したラットの腹部に 100 μ L の容量で塗布した。Day 8 に、0.2% oxazolone 溶液を同様に調製し、感作ラットの左耳介外側に 25 μ L の容量で塗布した。偽処置群のラットに対しては、oxazolone を含まないアセトンとオリーブオイルの 4:1 混合液を同様に塗布した。翌日の Day 9 にラットを頸椎脱臼死させ、ブラインド下で左耳介を切除した後、その重量を測定した。被験物質（10 および 30 mg/kg の JTE-852）ならびに対照物質（15 mg/kg の cyclosporin A）は、Day 1 から Day 9 までの 9 日間、5 mL/kg の容量で 1 日 1 回経口投与した。なお、Day 1、Day 8 および Day 9 の経口投与は、それぞれ腹部塗布、左耳介塗布および左耳介切除の 1 時間前に行った。

3.2.8. CIA モデルの評価（発症前投与）

JTE-852 を被験物質として、MTX を陽性対照物質として使用した。MTX の用量は 0.1 mg/kg とした。過去の予備的検討において、0.1 mg/kg の MTX は忍容性があること、また、後肢の腫脹を十分に抑制することが確認されている。コラーゲン技術研修会（東京、日本）より II 型コラーゲンを購入し、抗原として使用した。Freund's incomplete adjuvant (FIA) は Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) より購入し、アジュバントとして使用した。

7 週齢の雌性 Lewis ラットの一般状態を観察し、体重を測定した。次いで、体重が均等になるように各群 8 匹 7 群に割り付けた。

翌日 (Day 1)、II 型コラーゲン乳濁液を調製した。すなわち、0.01 mol/L 酢酸に II 型コラーゲンを 2 mg/mL となるように溶解し、さらに等量の FIA と混合、乳化させることで II 型コラーゲン乳濁液を調製した。正常群以外の 48 匹のラットについて背部を毛刈りし、さらに麻酔下で II 型コラーゲン乳濁液を 0.1 mL ずつ計 10 か所に皮内投与した。1 匹あたり 1 mL の乳濁液（1 mg の II 型コラーゲン）を投与したことになる。Day 8 に、感作ラット 48 匹の尾根部を毛刈りし、新しく調製した II 型コラーゲ

ン乳濁液を麻酔下で左右2か所に0.1 mLずつ皮内投与した。

Day 1, 8, 11, 14, 16, 18 および 22 に, 56 匹すべてのラットの後肢容積を測定した。測定はプレシズモメーターTK-101 (Unicom, 千葉, 日本) を用いた水置換法で行った。被験物質および対照物質は, Day 1 から Day 22 までの 22 日間, 5 mL/kg の容量で1日1回経口投与した。JTE-852 の投与用量は 0.3, 1, 3, 10 mg/kg とし, MTX の投与用量は 0.1 mg/kg とした。

Day 22 に, 各群から後肢容積の平均値に近い6匹のラットを選抜し, 麻酔下で放血致死させた。これらラットの右後肢を切除し, その足根骨骨密度を実験動物用 X 線 computed tomography (CT) 装置 LCT-100 (日立アロカメディカル株式会社, 東京, 日本) で測定した。さらに, 各群の足根骨骨密度の平均値に最も近い後肢について, X 線画像を撮影した。撮影には, マイクロフォーカスコーンビーム X 線 CT 装置 MCT-CB100MF (株式会社日立メディコ, 東京, 日本) を用いた。

実験概略を Fig. 16 に示す。

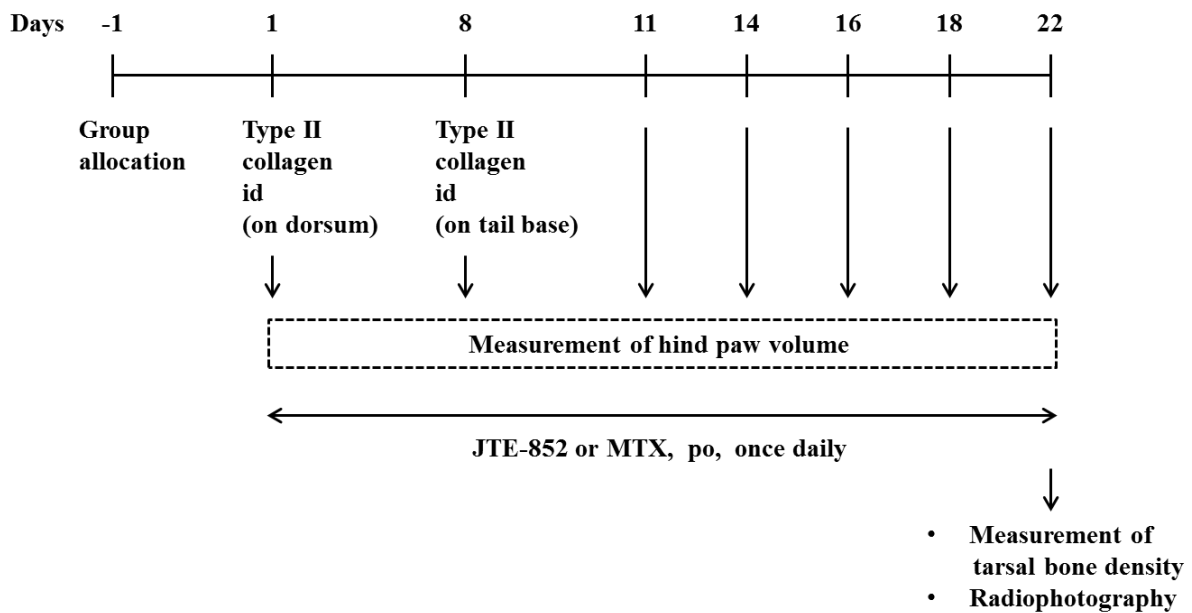


Fig. 16 Experimental outline for rat CIA model (before-onset treatment)

id, intradermal (ly); MTX, methotrexate; po, per os

3.2.9. CIA モデルの評価（発症後投与）

3.2.8.項記載の方法を一部改変して実施した（Fig. 17）。

7週齢の雌性 Lewis ラットに対して、II型コラーゲン乳濁液を Day 1 および Day 8 に皮内投与した。Day 18 にラットの後肢容積を測定し、その容積が均等になるように各群 8 匹 6 群に割り付けた。II型コラーゲン乳濁液を投与していない 8 匹を正常群とした。

Day 8, 11, 15, 18, 22, 25 および 29 に後肢容積を測定し、被験物質および対照物質を Day 18 から Day 29 までの 12 日間経口投与した。JTE-852 の投与用量は 0.3, 1, 3, 10 mg/kg とし、MTX の投与用量は 0.3 mg/kg とした。MTX の 0.3 mg/kg は、発症前投与実験で有意な抑制作用を示した 0.1 mg/kg（3.3.6.項参照）の 3 倍用量であり、また、過去の探索的実験において、連日投与で忍容性を示す最大用量であることが確

認されている。MTX は、発症後投与で作用が減弱することが予想されたため、本実験では投与可能な最大用量である 0.3 mg/kg で評価を行った。Day 29 に、各群から 6 匹のラットを選抜し、足根骨骨密度の測定ならびに X 線画像の撮影を行った。

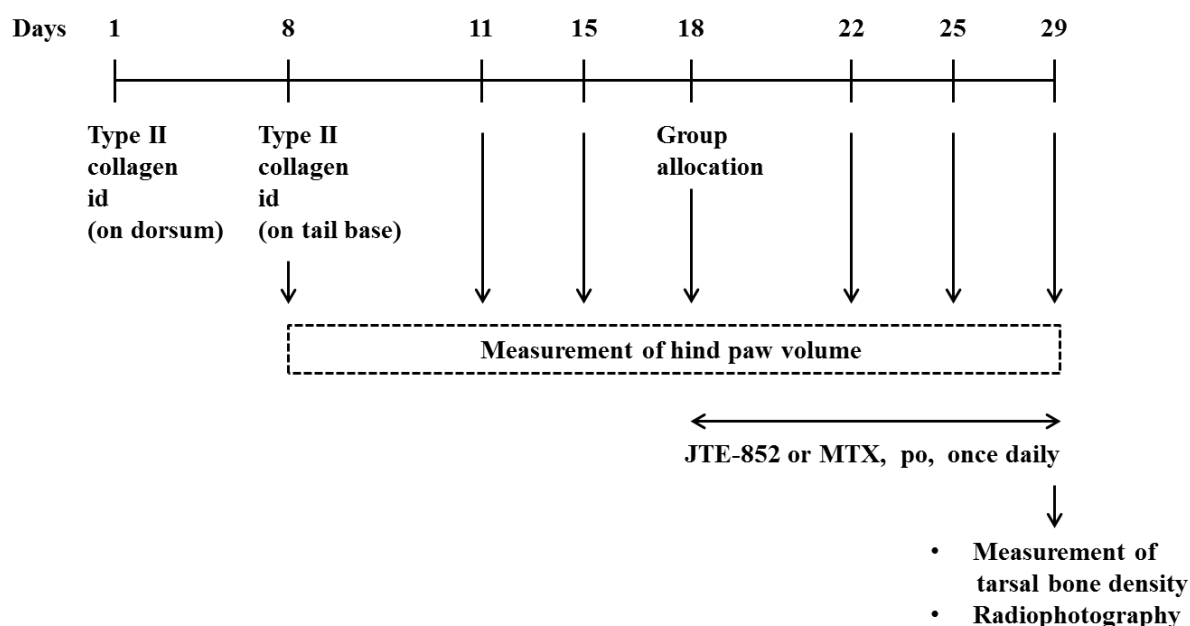


Fig. 17 Experimental outline for rat CIA model (after-onset treatment)

id, intradermal (ly); MTX, methotrexate; po, per os

3.2.10. 統計解析

In vivo 試験における群分け時の体重あるいは後肢容積について、以下の有意差検定を実施した。Bartlett の検定により等分散性を確認した後、one-way ANOVA により群間に有意な差がないことを確認した。有意水準は両側 5% とした。

In vivo 試験の各評価項目について、以下の有意差検定を実施した。2 群間の比較においては、まず F 検定により分散性を確認し、等分散データに対しては Student の t 検定を、不等分散データに対しては Aspin-Welch の t 検定を実施した。3 群以上の群間

比較においては、まず Bartlett の検定により分散性を確認し、等分散データに対しては Dunnett の検定を、不等分散データに対しては Steel の検定を実施した。いずれの検定も有意水準を両側 5%とした。

検定には、SAS システム version 8.2 および SAS 前臨床パッケージ version 5.0 を用いた。

第3節 結果

3.3.1. ヒトマスト細胞からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用

JTE-852 は、マスト細胞からの IgE 架橋刺激によるメディエーター分泌を抑制した (2.3.1.項および 2.3.2.項参照)。Syk は、IgE 架橋のみならず IgG 架橋によって誘導される細胞内シグナル伝達においても不可欠な機能を果たす^{17,21,22)} ため、JTE-852 は、IgG 架橋刺激による細胞反応も抑制する可能性が示唆される。この仮説を検証するため、CBMCs からの IgG 架橋刺激によるメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用を検討した。メディエーターの代表としてヒスタミンを測定した。

IgG 架橋刺激によって CBMCs からヒスタミンが分泌された。このヒスタミン分泌に対して、JTE-852 は濃度依存的な抑制作用を示した (Fig. 18)。1 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で完全な抑制が認められ、 IC_{50} 値は $0.064 \pm 0.009 \mu\text{mol/L}$ であった (Table 5)。

IgE 架橋刺激 CBMCs からのヒスタミン分泌に対する JTE-852 の抑制作用 (2.3.1.項) を、再度 Fig. 18 および Table 5 に掲載した。当該反応に対する JTE-852 の IC_{50} 値は、 $0.044 \pm 0.005 \mu\text{mol/L}$ であった。

なお、媒体群のヒスタミン濃度は、IgG 架橋刺激および IgE 架橋刺激それぞれの実験において 9.0 および 38 $\mu\text{mol/L}$ であった。

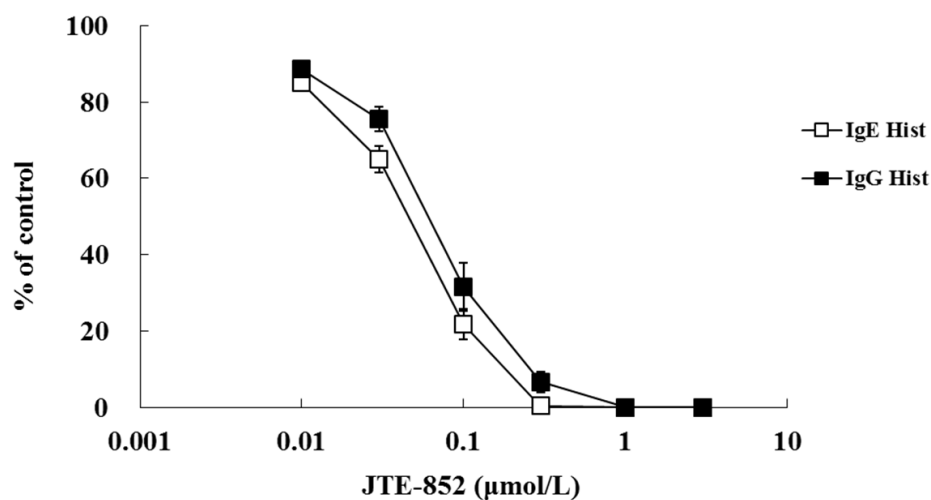


Fig. 18 Suppressive effects of JTE-852 on histamine secretion from human mast cells

CBMCs were sensitized with human IgG and challenged with anti-human IgG. After 30 min, the supernatants were collected; and concentrations of histamine were measured by EIA.

JTE-852 was added 10 min before challenge. Data of histamine secretion mediated by IgE-crosslinking are adapted from the results in section 2.3.1. All data express the mean \pm SEM, which were calculated from seven experiments (seven donors).

3.3.2. ヒト単球からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用

CBMCs を用いた検討 (3.3.1.項参照) に加え, PBMCs からの IgG 架橋刺激によるメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用を検討した。メディエーターの代表として, ROS および TNF- α を測定した。

IgG 架橋刺激によって, PBMCs から ROS および TNF- α が分泌された。JTE-852 はこれらの分泌をともに抑制し (Fig. 19), IC₅₀ 値はそれぞれ 0.077 ± 0.009 および 0.083 ± 0.019 $\mu\text{mol/L}$ であった (Table 5)。JTE-852 の抑制作用は濃度依存的であり, 1 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でほぼ完全な抑制が認められた。

上記の IgG 架橋刺激に加えて, PMA 刺激による ROS 分泌ならびに LPS 刺激による

TNF- α 分泌に対する JTE-852 の作用もあわせて検討した。JTE-852 は、3 $\mu\text{mol/L}$ の濃度までこれら2つの分泌を抑制しなかった (Fig. 19 および Table 5)。JTE-852 の3 $\mu\text{mol/L}$ は、IgG 架橋刺激による ROS および TNF- α の分泌を完全に抑制した濃度である (Fig. 19)。

なお、媒体群におけるメディエーター濃度は、IgG 架橋刺激による ROS が 170 nmol/L, IgG 架橋刺激による TNF- α が 12 ng/mL, PMA 刺激による ROS が 378 nmol/L, LPS 刺激による TNF- α が 1.8 ng/mL であった。

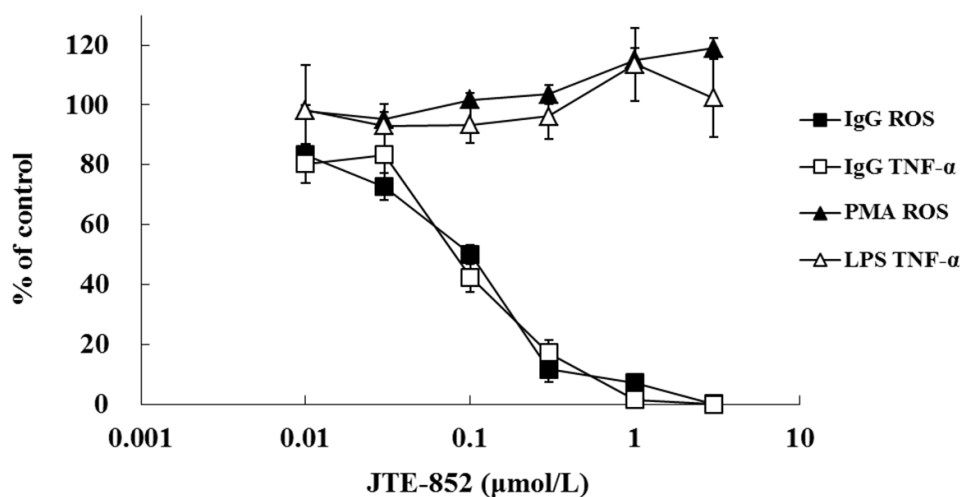


Fig. 19 Effects of JTE-852 on mediator secretion from human monocytes

PBMCs were seeded into a plate that was coated with human IgG. Two hours after seeding, concentrations of ROS were determined by measuring the fluorescence of rhodamine 123.

The supernatants were collected 6 hr after seeding and concentrations of TNF- α were measured by EIA. JTE-852 was added 10 min before seeding.

PBMCs were also seeded into a plain plate and stimulated with PMA or LPS for 1 hr or 6 hr to elicit secretion of ROS or TNF- α , respectively. The mediators were detected in a same way as described above. JTE-852 was added 10 min before stimulation.

Data express the mean \pm SEM, which were calculated from three experiments (three donors).

Table 5 Effects of JTE-852 on mediator secretion from human mast cells and monocytes

Cell	Stimulation	Mediator	IC ₅₀ value (μ mol/L)
CBMCs	IgE-crosslinking	Histamine	0.044 \pm 0.005 [#]
CBMCs	IgG-crosslinking	Histamine	0.064 \pm 0.009
PBMCs	IgG-crosslinking	ROS	0.077 \pm 0.009
PBMCs	IgG-crosslinking	TNF- α	0.083 \pm 0.019
PBMCs	PMA	ROS	>3
PBMCs	LPS	TNF- α	>3

CBMCs or PBMCs were stimulated by IgG-crosslinking. PBMCs were also stimulated with PMA or LPS. Concentrations of the secreted histamine and TNF- α were measured by EIA. Concentrations of the secreted ROS were determined by measuring the fluorescence of rhodamine 123. The IC₅₀ values were calculated by a sigmoid-curve fitting with SAS System version 8.2 and SAS Preclinical Package version 5.0 (SAS Institute Japan Inc.). The values show the mean \pm SEM (n = 7, CBMCs; n = 3, PBMCs).

The IC₅₀ value for histamine secretion from CBMCs with IgE-crosslinking is quoted from the results in section 2.3.1. for comparison.

3.3.3. RCA 反応に対する JTE-852 の作用

JTE-852 は IgG を介する細胞反応を抑制した (3.3.1.項および 3.3.2.項参照) ため、次に、IgG が関与する *in vivo* 反応を JTE-852 が抑制するかどうかの検討を行った。はじめに、II 型過敏反応である RCA 反応⁵³⁾ に対する JTE-852 の作用を評価した。

陽性対照物質である prednisolone は、浮腫を有意に抑制した。JTE-852 は用量に応

じて浮腫を抑制し、ED₅₀ 値は 3.5 mg/kg であった (Fig. 20 および Table 6)。JTE-852 の抑制作用は 3, 10, 30 mg/kg において有意であり, その抑制度合いは prednisolone に匹敵した。

なお, 媒体群における皮膚の重量増加 (3.2.5.項における A - B の値) は, 87 mg であった。

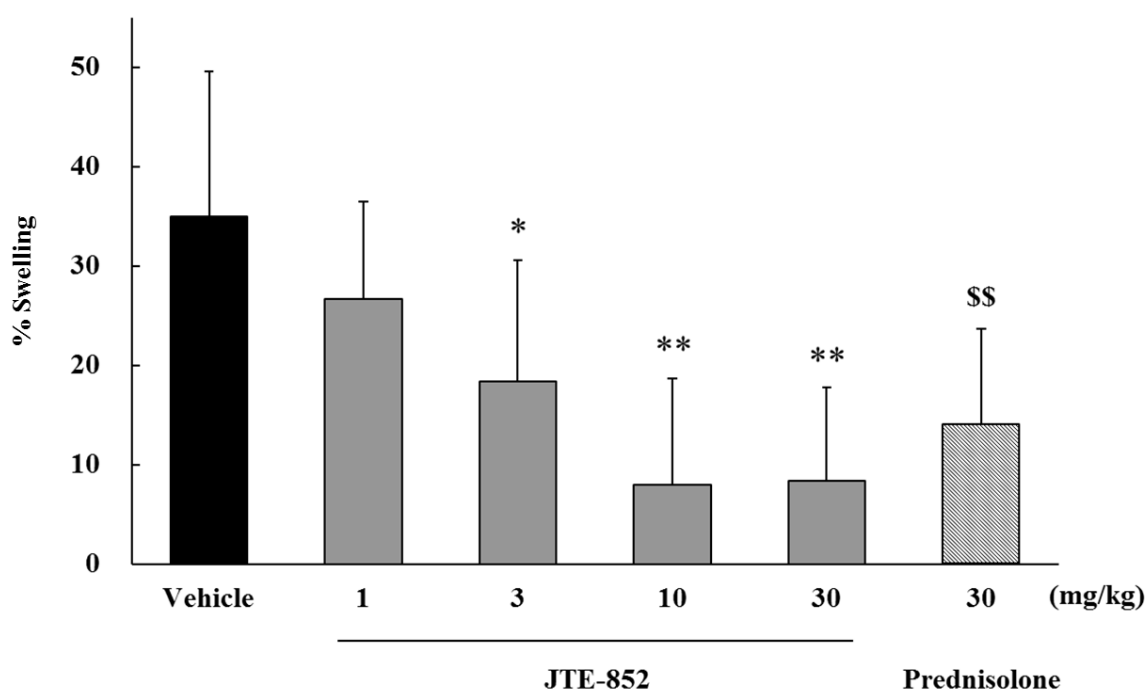


Fig. 20 Suppressive effect of JTE-852 on RCA reaction in rats

A mixture of anti-rat serum and Evans blue was injected into clipped dorsal skins of SD rats. Evans blue without anti-rat serum was also injected to the same rats. After 2 hr, regions on the dorsum were harvested and weighed. JTE-852 or prednisolone was administered orally 1 hr before intradermal injection. Data express the mean + SD; n = 9 rats per group. \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's *t*-test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Dunnett's test).

3.3.4. RPA 反応に対する JTE-852 の作用

IgG 関与の *in vivo* 反応を JTE-852 が抑制するかどうかを検討するため、続いて、III 型過敏反応である RPA 反応⁵⁴⁾ に対する JTE-852 の作用を評価した。

Fig. 21 に示す通り、媒体群における漏出色素量 ($\mu\text{g}/\text{site}$) は、偽処置群に比して有意に高値であった。陽性対照物質である prednisolone は、この色素漏出を有意に抑制した。JTE-852 も 3, 10, 30 mg/kg の用量において、色素漏出を有意に抑制した。JTE-852 の ED₅₀ 値は、3.5 mg/kg であった (Table 6)。

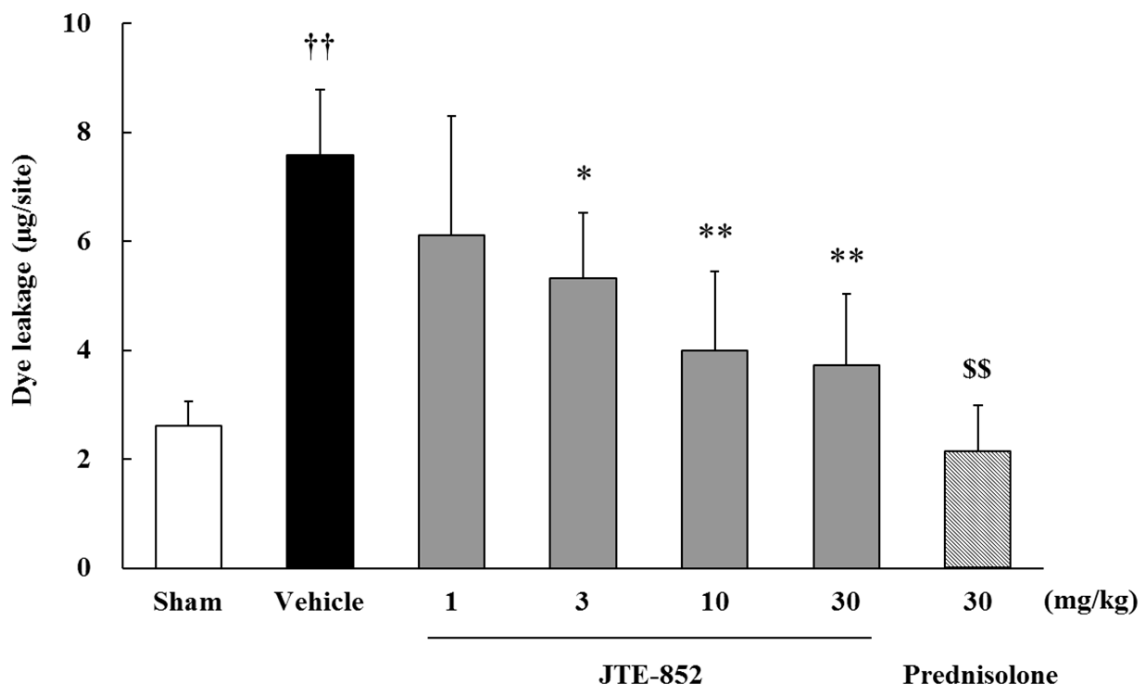


Fig. 21 Suppressive effect of JTE-852 on RPA reaction in rats

A mixture of OVA and Evans blue was injected to the tail vein of Wistar rats. Evans blue without OVA was injected to rats in the sham group. After 1.5 hr, anti-OVA antibody was

injected into clipped dorsal skins of all rats. After 4 hr, dye-leaked regions on the dorsum were extirpated; and absorbance of dye that was extracted from the regions was measured. JTE-852 or prednisolone was administered orally 1 hr before intradermal injection. Data express the mean + SD; n = 8 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. sham group (Aspin-Welch's t -test): \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's t -test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Dunnett's test).

3.3.5. DTH 反応に対する JTE-852 の作用

JTE-852 が IV 型過敏反応を抑制するかどうかを検討する目的で、DTH 反応^{56,57)} に対する JTE-852 の作用を評価した。

結果を Fig. 22 および Table 6 に示す。媒体群における耳介重量は、偽処置群に比して有意に高値であった。陽性対照物質として設定した cyclosporin A は、この耳介重量増加を有意に抑制した。一方、JTE-852 は、30 mg/kg の用量においても影響を及ぼさなかった。JTE-852 の 30 mg/kg は、PCA 反応、RCA 反応、RPA 反応いずれに対しても有意な抑制を示した用量である (2.3.3.項, 3.3.3.項, 3.3.4.項参照)。

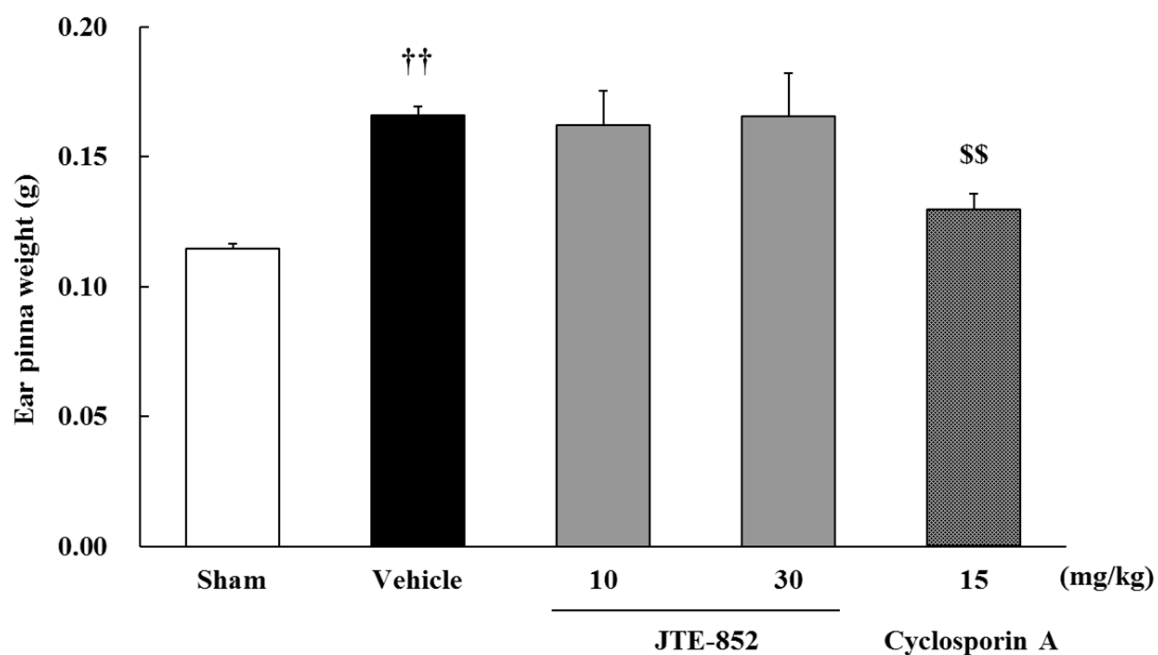


Fig. 22 Effect of JTE-852 on DTH reaction in rats

Lewis rats were applied with oxazolone on the depilated abdomen on Day 1. On Day 8, the rats were again applied with oxazolone on the outer face of the left ear. An acetone/olive oil mixture was applied to the ears of rats in the sham group. On Day 9, the left ears of the rats were removed in a blinded manner and weighed. JTE-852 or cyclosporin A was administered orally once daily from Day 1 to Day 9. Data express the mean + SD; n = 6 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. sham group (Student's *t*-test); \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's *t*-test).

Table 6 Effects of JTE-852 on type I to type IV hypersensitivities in rats

Type of hypersensitivity	Reaction	ED ₅₀ value (mg/kg)
Type I	PCA	3.1 #
Type II	RCA	3.5
Type III	RPA	3.5
Type IV	DTH	>30

Each reaction was elicited in rats. JTE-852 was administered orally to the rats. Repeated administration of JTE-852 was performed only in DTH evaluation. The ED₅₀ values were calculated by a sigmoid-curve fitting with SAS System version 8.2 and SAS Preclinical Package version 5.0 (SAS Institute Japan Inc.).

The ED₅₀ value for PCA reaction is quoted from the result in section 2.3.3. for comparison.

3.3.6. CIA モデルにおける JTE-852 の作用（発症前投与）

JTE-852 は、RCA 反応および RPA 反応を抑制した（3.3.3.項および 3.3.4.項参照）。これらを含む IgG 関与の反応は、自己免疫疾患の病態形成に大きく寄与する^{17, 21, 22}ため、JTE-852 は当該疾患の病態に対して有効性を示す可能性が示唆される。この仮説を検証するため、自己免疫疾患の病態モデルにおける JTE-852 の作用を評価した。今回、自己免疫疾患モデルの代表として、ラット CIA モデルを検討した。はじめに、JTE-852 を関節炎発症前から投与する実験を行った。

媒体群の後肢容積は、Day 14 以降に顕著に増加した。JTE-852 は、この後肢容積の増加を用量依存的に抑制した（Fig. 23A）。最終日 Day 22 の各群の後肢容積を棒グラフで表したものが Fig. 23B であるが、媒体群で有意に増加した後肢容積に対して、JTE-852 は用量依存的な抑制作用を示した。その作用は 1, 3, 10 mg/kg において有意であり、10 mg/kg 群の後肢容積は正常群とほぼ同等であった。

Day 22 における足根骨骨密度は，正常群に比して媒体群で有意に低値であった。JTE-852 はこの骨密度低下を用量依存的に抑制し，3 および 10 mg/kg において有意な作用が認められた (Fig. 24A)。JTE-852 10 mg/kg 群における骨密度は，正常群とほぼ同等であった。骨破壊に対する JTE-852 の有効性は，後肢の X 線画像から視覚的にも確認された (Fig. 24B)。

JTE-852 と同様に発症前から投与した MTX は，後肢容積ならびに骨密度に対して有意な抑制作用を示した (Fig. 23 および Fig. 24)。

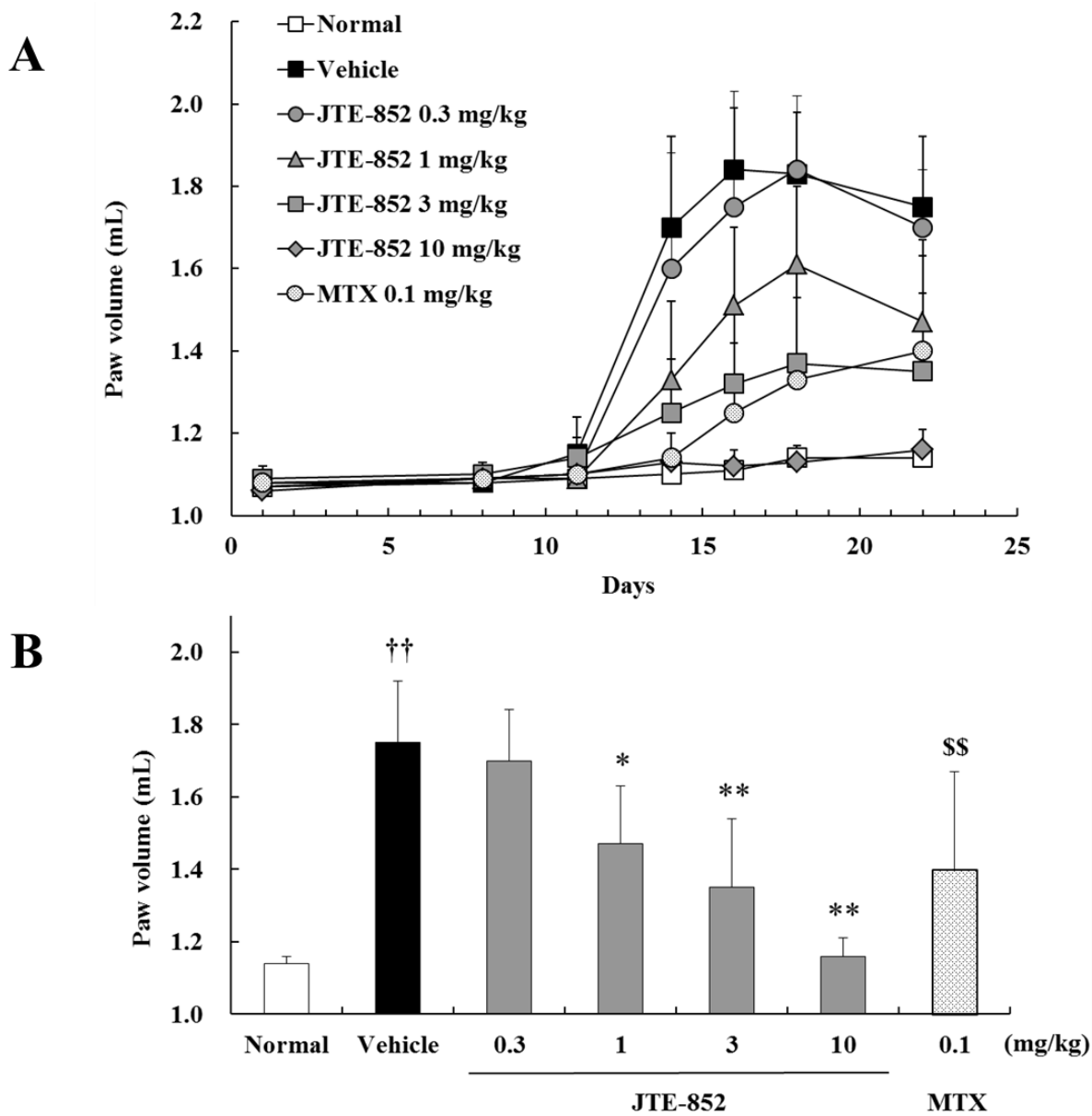


Fig. 23 Preventive effect of JTE-852 on hind paw swelling in CIA rats

On Day 1, Lewis rats (except for the normal group) were given intradermally an emulsion of type II collagen and FIA into 10 sites on the clipped dorsal skin. On Day 8, the same rats were again dosed intradermally with the emulsion into 2 sites on the clipped tail base. Hind paw volume of all rats were measured on Days 1, 8, 11, 14, 16, 18, and 22. JTE-852 or MTX was administered orally once daily from Day 1 to Day 22. (A) shows the time-course changes in

hind paw volume and (B) shows the hind paw volume on Day 22. Data express the mean + SD; n = 8 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. normal group (Aspin-Welch's t -test): \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's t -test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

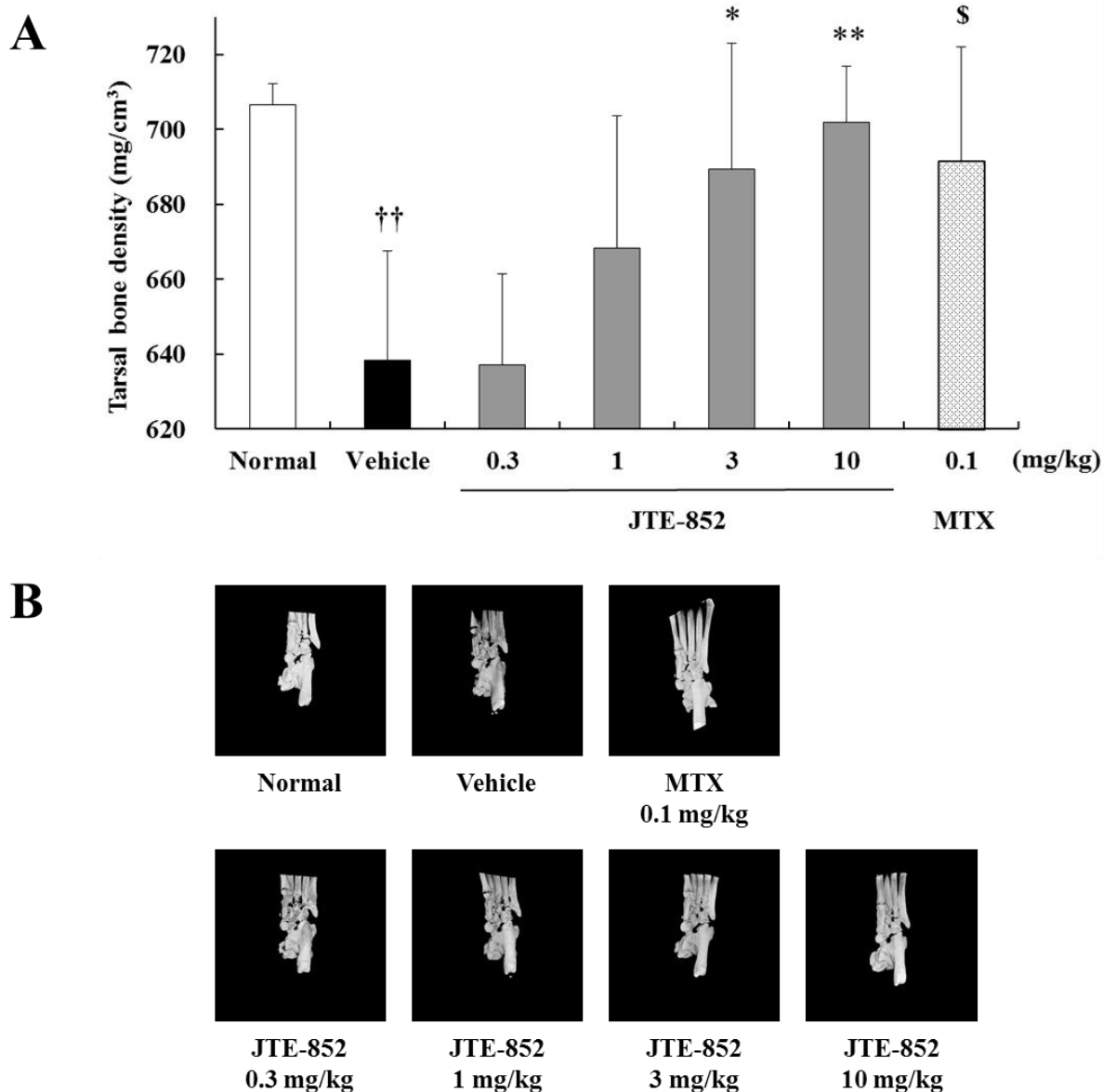


Fig. 24 Preventive effect of JTE-852 on bone erosion in CIA rats

On Day 1, Lewis rats (except for the normal group) were given intradermally an emulsion of

type II collagen and FIA into 10 sites on the clipped dorsal skin. On Day 8, the same rats were again dosed intradermally with the emulsion into 2 sites on the clipped tail base. On Day 22, the right hind paws of the rats were excised and their tarsal bone densities were measured. Radiographs of the hind limbs were also taken. JTE-852 or MTX was administered orally once daily from Day 1 to Day 22. (A) shows the tarsal bone densities on Day 22 and (B) shows the radiographs of hind limbs that were most representative of the mean tarsal bone density in each group. Data express the mean + SD; n = 6 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. normal group (Aspin-Welch's t -test): \$ $P < 0.05$; vs. vehicle group (Student's t -test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Dunnett's test).

3.3.7. CIA モデルにおける JTE-852 の作用（発症後投与）

次に、同じくラット CIA モデルを用いて、JTE-852 を関節炎発症後から投与する実験を行った。

本実験では、Day 18 に群分けを実施し、投与を開始した（3.2.9.項参照）。Day 18 における正常群以外の各群の後肢容積は、正常群に比して高値であった。媒体群の後肢容積は、その後 Day 18 から Day 29 まで高値のまま推移した。JTE-852 はこの後肢容積の増加を用量依存的に抑制し、投与開始 4 日後（Day 22）の早期より顕著な抑制作用が認められた（Fig. 25A）。最終日 Day 29 の各群の後肢容積を Fig. 25B に示す。媒体群の後肢容積は正常群に比して有意に増加し、JTE-852 はこれを用量依存的に抑制した。JTE-852 の抑制作用は 1, 3, 10 mg/kg において有意であった。

Day 29 における足根骨骨密度は、正常群に比して媒体群で有意に低値であった。この骨密度低下に対して、JTE-852 は用量依存的な抑制作用を示し、その作用は 1, 3, 10 mg/kg において有意であった（Fig. 26A）。骨破壊に対する JTE-852 の有効性は、後肢の X 線画像においても確認された（Fig. 26B）。

関節炎発症後から投与した MTX は、後肢容積、骨密度いずれに対しても抑制作用

を示さなかった (Fig. 25 および Fig. 26)。評価に用いた 0.3 mg/kg の用量は、発症前投与で有意な抑制作用を示した 0.1 mg/kg の 3 倍用量である。

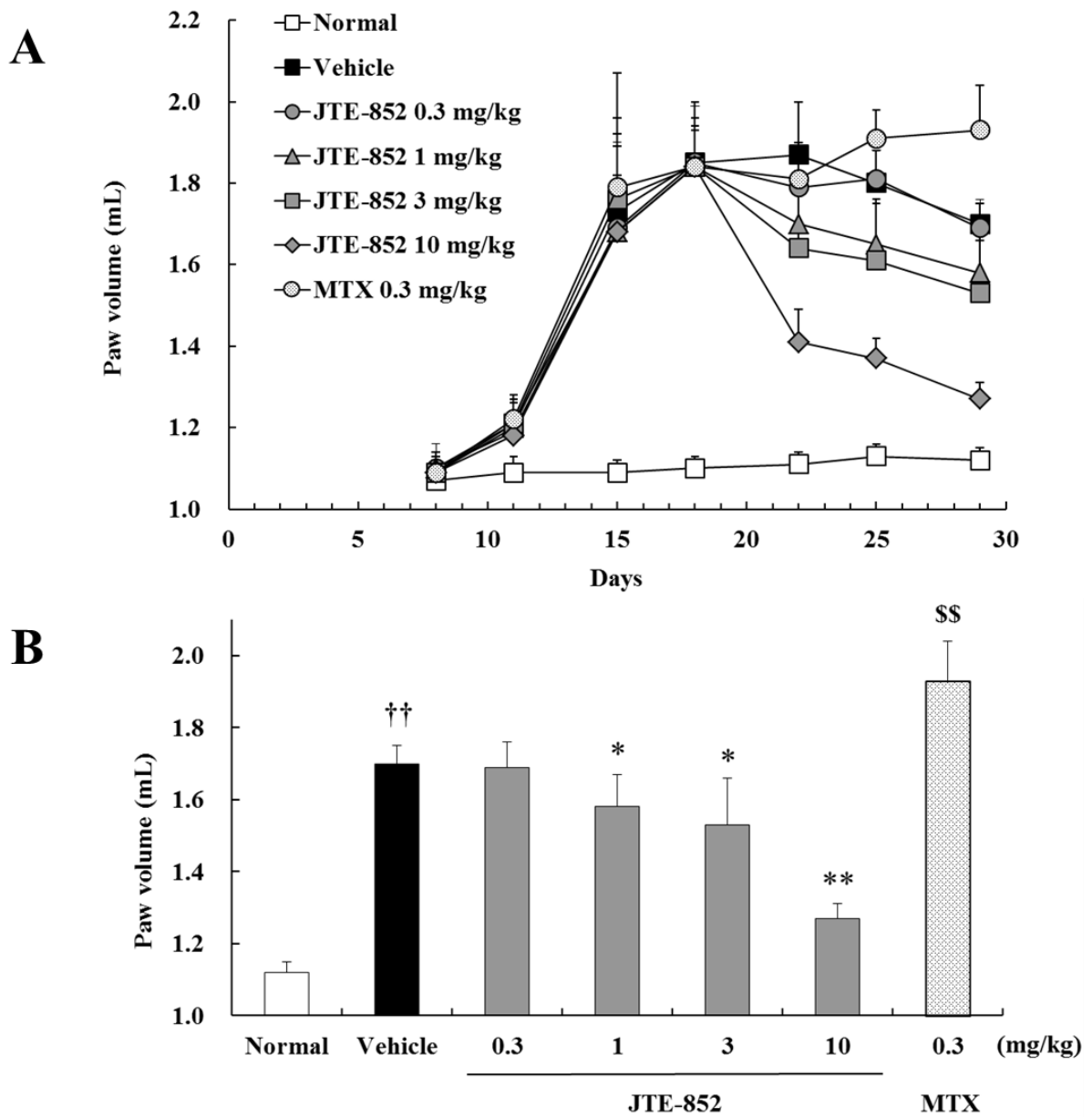


Fig. 25 Therapeutic effect of JTE-852 on hind paw swelling in CIA rats

On Day 1, Lewis rats (except for the normal group) were given intradermally an emulsion of type II collagen and FIA into 10 sites on the clipped dorsal skin. On Day 8, the same rats were

again dosed intradermally with the emulsion into 2 sites on the clipped tail base. Hind paw volume of all rats were measured on Days 8, 11, 15, 18, 22, 25, and 29. JTE-852 or MTX was administered orally once daily from Day 18 to Day 29. (A) shows the time-course changes in hind paw volume and (B) shows the hind paw volume on Day 29. Data express the mean + SD; n = 8 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. normal group (Student's t -test): \$\$ $P < 0.01$; vs. vehicle group (Student's t -test): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. vehicle group (Steel test).

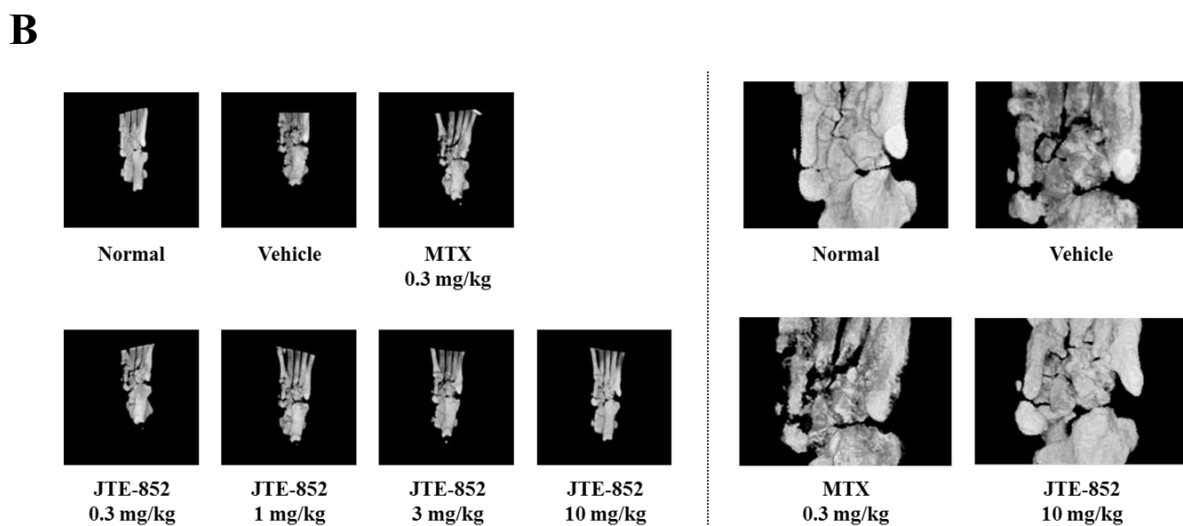
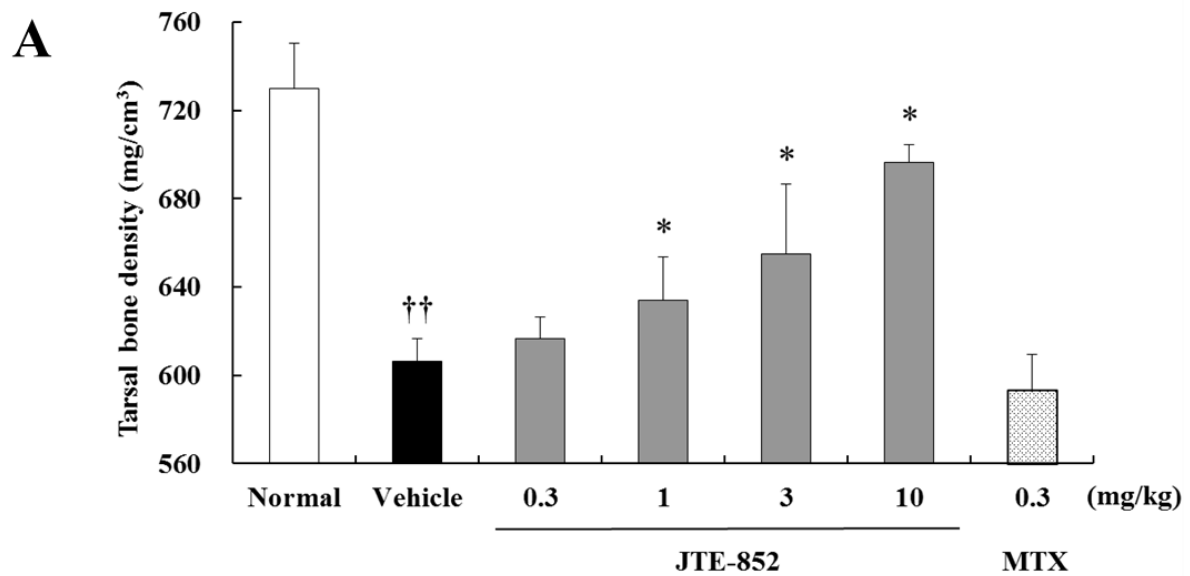


Fig. 26 Therapeutic effect of JTE-852 on bone erosion in CIA rats

On Day 1, Lewis rats (except for the normal group) were given intradermally an emulsion of type II collagen and FIA into 10 sites on the clipped dorsal skin. On Day 8, the same rats were again dosed intradermally with the emulsion into 2 sites on the clipped tail base. On Day 29, the right hind paws of the rats were excised and their tarsal bone densities were measured. Radiographs of the hind limbs were also taken. JTE-852 or MTX was administered orally

once daily from Day 18 to Day 29. (A) shows the tarsal bone densities on Day 29. (B) shows the radiographs of hind limbs that were most representative of the mean tarsal bone density in each group. The left panel is low magnification and the right panel is high magnification. Data express the mean + SD; n = 6 rats per group. †† $P < 0.01$; vs. normal group (student's t -test):
* $P < 0.05$; vs. vehicle group (Steel test).

第4節 考察

第1節に記載した通り、自己免疫疾患治療のアンメットニーズを満たす薬物は、高い有効性を有することに加えて、安全であること、経口投与可能であること、安価であることも兼ね備えた新規低分子薬物であると考えられる¹⁵⁻¹⁸⁾。第1章において、JTE-852は強力かつ選択的な Syk 阻害薬であることが示された。本章では、JTE-852の自己免疫疾患治療薬としての有用性を検証した。

はじめに、IgG 架橋刺激マスト細胞からのメディエーター分泌に対する JTE-852 の作用を検討した。JTE-852 は、マスト細胞からの IgG 架橋刺激によるヒスタミン分泌を抑制し、その作用は IgE 架橋刺激によるヒスタミン分泌の抑制作用（第2章）とほぼ同等であった。次に、単球を用いて同様の実験を行った。JTE-852 は、IgG 架橋刺激単球からの ROS および TNF- α 分泌をほぼ同等に抑制した。これらの結果ならびに第2章の結果より、JTE-852 は、IgE 架橋刺激のみならず IgG 架橋刺激によるメディエーター分泌も抑制することが明らかとなった。抑制作用の効力 (IC₅₀ 値) は、細胞の種類、架橋刺激の種類、またメディエーターの種類に依らず、いずれもほぼ同等であることが示された。

今回、単球を用いた検討においては、PMA 刺激による ROS 分泌および LPS 刺激による TNF- α 分泌もあわせて評価した。ROS および TNF- α は、IgG 架橋刺激実験でも測定したメディエーターである。JTE-852 は、3 $\mu\text{mol/L}$ の高濃度においても両メデイ

エーターの分泌を抑制しなかった。PMA は protein kinase C を直接的に刺激する試薬であるが、このキナーゼは IgG 架橋刺激による細胞内シグナル伝達経路において、Syk より下流に位置する^{24,58)}。したがって、PMA 刺激によるメディエーター分泌は、Syk を介さない反応である。LPS は toll-like receptor (TLR) 4 のリガンドであるが、TLR4 刺激による細胞内シグナル伝達に Syk は関与しない²⁴⁾。したがって、LPS 刺激によるメディエーター分泌も Syk を介さない反応である。マスト細胞においても同様の検討を第2章で実施しており、JTE-852 は、Syk を介さないカルシウムイオノフォア A23187 刺激によるヒスタミン分泌を抑制しなかった。これらのことから、JTE-852 は Syk が関与しないメディエーター分泌に対して抑制を示さないと考えられた。

細胞を用いた以上の検討結果より、JTE-852 は IgG を介した細胞反応を Syk 依存的に抑制することが示唆された。

自己組織の障害および破壊は、自己免疫疾患の病態形成の最終過程であるが、この段階において主要な機序を担うのが IgG 関与の細胞反応である (Fig. 27)^{17, 21, 22, 56)}。例えば RA においては、自己抗原と免疫複合体を形成した IgG が関節に沈着し、マクロファージや好中球などのエフェクター細胞を活性化する。こうして活性化したエフェクター細胞は、ROS や炎症性サイトカインを分泌し、結果として重篤な関節破壊を引き起こす²¹⁾。II 型および III 型過敏反応は IgG が中心的役割を果たし、自己免疫疾患の組織障害を象徴する反応である^{21, 22, 56)}。すなわち、II 型過敏反応は自己反応性 IgG を認識したエフェクター細胞の活性化に基づく組織障害であり、III 型過敏反応は自己抗原-IgG から成る免疫複合体を認識したエフェクター細胞の活性化に基づく組織障害である⁵⁶⁾。今回、II 型過敏反応である RCA 反応ならびに III 型過敏反応である RPA 反応に対する JTE-852 の作用を検討した。JTE-852 は経口投与により、RCA 反応ならびに RPA 反応をともに抑制した。細胞を用いた *in vitro* 実験の結果と合わせ考えると、JTE-852 は IgG を介する細胞反応を抑制する結果、これらの *in vivo* 過敏反応を抑制すると考えられた。

第2章に記述した通り、JTE-852はIgE関与の細胞反応を抑制し、またI型過敏反応（PCA反応）を抑制した。本章では、上記II型およびIII型過敏反応に加えて、IV型過敏反応に対するJTE-852の作用も評価した。I型、II型およびIII型過敏反応と異なり、JTE-852はIV型過敏反応であるDTH反応に対して影響を及ぼさなかった。IV型過敏反応は、抗原特異的T細胞によって引き起こされる反応であり^{56,59)}、T細胞の活性化においては、SykではなくそのカウンターパートであるZAP70が中心的役割を担う^{2,21,22,60)}。JTE-852はZAP70のキナーゼ活性を阻害しないため（第1章参照）、IV型過敏反応に対しても抑制作用を示さなかったものと考えられる。

本研究で実施したI型～IV型過敏反応の検討結果より、JTE-852は経口投与の条件において、IgEが関与する*in vivo*反応、IgGが関与する*in vivo*反応を抑制する一方、T細胞が関与する*in vivo*反応を抑制しないことが明らかとなった。

JTE-852は、IgGが関与する*in vitro*および*in vivo*の反応を抑制することが示された。このことは、JTE-852が自己免疫疾患の病態に対しても有効性を示す可能性を示唆している。この可能性を検証するため、自己免疫疾患の動物モデルにおけるJTE-852の作用を評価した。自己免疫疾患動物モデルの代表として、CIAモデルを用いた。JTE-852は発症前投与、発症後投与いずれの実験においても、後肢の腫脹および骨密度低下を抑制した。発症後投与の実験においては、後肢腫脹に対するJTE-852の速やかな改善作用が確認された。また、本検討では、JTE-852に加えてMTXの評価も行った。MTXは自己免疫疾患治療に使用される主要な低分子薬物である^{51,52)}が、特にRA治療においてはアンカードラッグとして使用され⁶¹⁾、生物学的製剤が登場した現在もなお、その位置づけは変わっていない。CIAモデルにおいて、発症前投与のMTXは後肢の腫脹および骨密度低下を抑制した。一方、発症後投与の条件では、いずれの評価指標に対しても抑制作用を示さなかった。今回、発症後投与の実験においてJTE-852とMTXの作用に違いが認められたが、過去に実施した探索的検討（肢組織および血清中のメディエーター量に関する発症後投与実験）でも同様の差異が認められた。すな

わち, JTE-852 は肢組織中 IL-1 β , 肢組織中 IL-6 および血清中 cartilage oligomeric matrix protein (COMP) の各メディエーター量を有意に低下させたが, MTX はいずれに対しても低下作用を示さなかった。これらの結果より, CIA モデルの発症後投与において, JTE-852 と MTX の作用には明確な違いがあることが示唆された。

JTE-852 と MTX の作用の違いは, 各薬物の作用機序の違いに依るものと思われる。MTX は増殖が活発な細胞において葉酸代謝を阻害し, プリンおよびピリミジンの *de novo* 合成を阻害する⁶²⁾。自己免疫疾患においては, MTX の免疫抑制作用および抗炎症作用に対して幾つかの薬理的機序が考察されているが, T 細胞の増殖抑制がその作用の主要機序とされている^{62, 63)}。また, カルシニューリン阻害剤である tacrolimus も T 細胞の増殖を抑制する一方, CIA モデルの発症後投与において薬効を示さないことが報告されている⁶⁴⁾。これらの知見は, T 細胞抑制を機序とする抗炎症薬は, CIA 発症後の投与ではその病態を抑制できないことを示している。発症後投与実験の投与期間は, CIA の病態形成ステップの後半であり, T 細胞活性化ステップの経過後であることがその理由と考えられる。一方, JTE-852 は発症前投与, 発症後投与いずれの実験においても, CIA 病態を抑制した。CIA の病態形成の最終段階(エフェクター相)には, IgG 関与の反応が大きく寄与していると考えられ, JTE-852 はこの反応を抑制する結果, 発症後投与においても関節炎を抑制し得たと考察される。

RA を対象とした臨床試験において, 他社の Syk 阻害薬 R788 (R406 のプロドラッグ) は MTX 応答不十分患者の疾患活動性を低下させ, その有効性は投与開始 1 週間ですでに認められたことが報告されている⁶⁵⁻⁶⁷⁾。CIA モデル発症後投与実験で認められた JTE-852 の速やかな関節炎抑制作用は, この R788 の報告と一致する。JTE-852 は MTX 応答不十分な RA 患者に対して, 投与後早期より有効性を示す可能性が示唆された。一方, JTE-852 と R788/R406 の比較に関しては, 以下のように考えられる。まず, 酵素および細胞において, JTE-852 は R406 よりも効力が強いと思われた(第 1 章第 4 節および第 2 章第 4 節)。また, *in vivo* の PCA 反応および CIA モデルにおいて

も、JTE-852はR788よりも強い効力を示した（data not shown）。このことは、JTE-852がより低い投与用量で有効性を発揮できる可能性を示しており、それに伴い安全性リスクも低減する可能性が示唆される。アレルギー疾患や自己免疫疾患の治療薬は長期にわたり服用する必要があるため、効力の強さ、投与用量の低さ、安全性の高さは大きなメリットと考えられる。

本章における検討により、JTE-852は、IgGを介する *in vitro* 細胞反応および *in vivo* 反応を抑制することが明らかとなった。さらに、JTE-852はCIAモデルの病態に対しても抑制作用を示すことが明らかとなった。CIAは、RAのみならず自己免疫疾患の代表モデルとしても汎用されるモデルであり、今回もCIAモデルの結果をもとに自己免疫疾患に対するJTE-852の有効性を考察した。

抗原の種類や傷害される組織は、自己免疫疾患ごとに様々であるが、疾患の病態形成過程は概ね Fig. 27 に示す同様の免疫学的プロセスを経るものと考えられる⁵⁶⁾。すなわち、自己免疫疾患の病態は抗原認識相、リンパ球活性化相およびエフェクター相の3相によって形成される⁵⁶⁾。

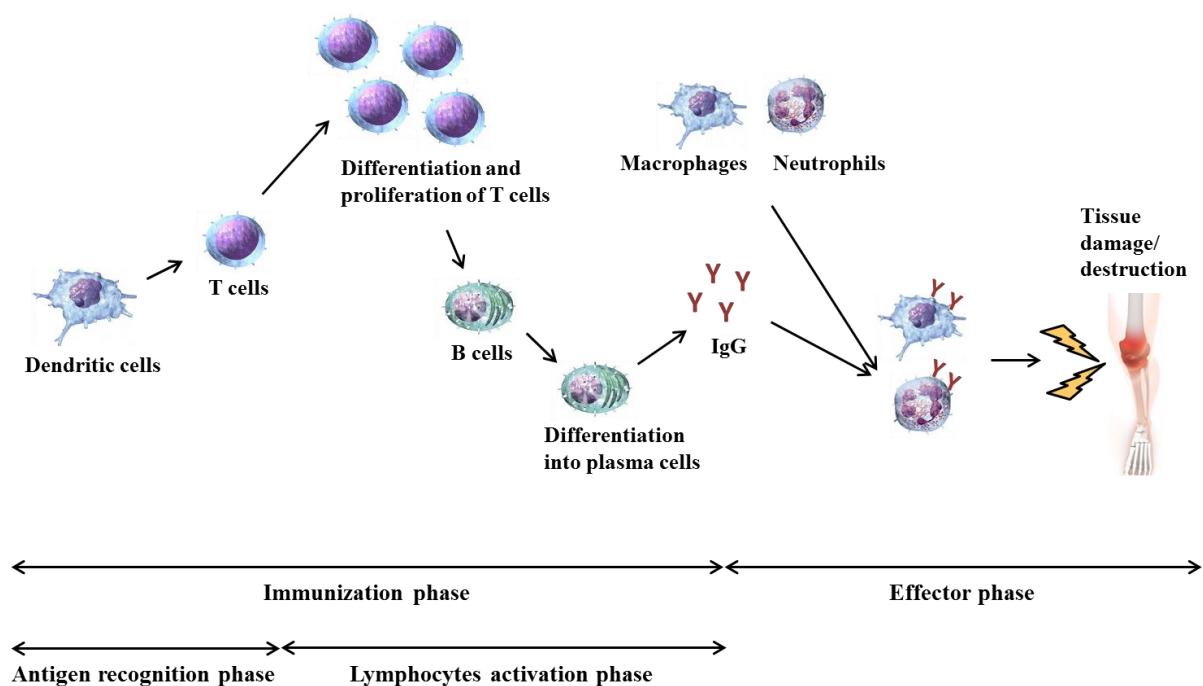


Fig. 27 Immunological process in pathogenesis of autoimmune diseases (brief illustration)

Syk は IgG 関与の細胞反応において中心的役割を担うが、当該反応には、エフェクター細胞による組織障害のみならず樹状細胞による抗原提示の反応も含まれる¹⁷⁾。加えて、Syk は B 細胞受容体を介した B 細胞活性化にも重要な役割を果たす¹⁷⁾。すなわち、Syk は自己免疫疾患の病態形成における多様な反応に深く関与することが示唆される。事実、SLE 患者の B 細胞では健常人に比して Syk のリン酸化が有意に増強しており、Syk のリン酸化は SLE の疾患活動性と有意に相関することが報告されている⁶⁸⁾。

これらの知見より、Syk 阻害薬 JTE-852 は、複数の細胞機能を抑制することで3相すべての病態形成プロセスを抑制し、結果として自己免疫疾患に対して高い有効性を示す可能性が示唆される。

序論、本章第 1 節および本節冒頭にも記載した通り、自己免疫疾患治療のアンメットニーズを満たす薬物は、高い有効性を有することに加えて、安全であること、経口

投与可能であること、安価であることも兼ね備えた新規低分子薬物であると考えられる。本章における検討により、JTE-852 は IgG 関与の細胞反応を抑制し、また、経口投与により IgG 関与の *in vivo* 反応も抑制することが明らかとなった。自己免疫疾患の動物モデルを用いた検討では、病態の発症前から JTE-852 を経口投与する実験と、病態の発症後から JTE-852 を経口投与する実験を行い、いずれにおいても JTE-852 の明確な有効性が認められた。多くの自己免疫疾患は、増悪と寛解を繰り返しながら病態が進行していくため、予防効果と治療効果をともに発揮し得る JTE-852 は、寛解維持薬（コントローラー）として、また寛解導入薬（レリーバー）として、幅広い用途が期待できる。

安全性に関して、本研究の中で JTE-852 30 mg/kg の 9 日間連投ならびに 10 mg/kg の 22 日間連投を実施したが、体重低下を含めて特筆すべき副作用は認められなかった。また、JTE-852 は LPS に対する免疫応答や T 細胞が関与する免疫反応に影響を及ぼさなかった。このことから JTE-852 は、非特異的な免疫抑制を誘導しない可能性が示唆されるが、易感染性等のリスクについては今後精査する必要があると考えられる。Good laboratory practice (GLP) に準拠した非臨床毒性試験や good clinical practice (GCP) に則った臨床試験での安全性検証についても、今後の課題である。コストに関して、JTE-852 は分子量 450 以下の低分子薬であり、生物学的製剤に比べて安価に製造できる可能性が高い。

本章で得られた知見を総合すると、JTE-852 は自己免疫疾患治療のアンメットニーズを満たし、当該疾患の有望な新規治療薬となることが期待される。

総括および結論

アレルギー疾患の病態形成には、IgE 架橋刺激マスト細胞から分泌される 3 群のメディエーター（顆粒内容物、アラキドン酸代謝産物およびサイトカイン）が重要な役割を果たす。自己免疫疾患においては、自己組織の障害および破壊がその病態形成の最終過程であるが、この段階において主要な役割を担うのが IgG 関与の細胞反応である。

Syk は、マスト細胞、マクロファージ、好中球等の免疫細胞に発現するチロシンキナーゼで、IgE や IgG 架橋刺激によって誘導される細胞反応において中心的役割を担う。したがって、Syk を阻害する薬物は、これら細胞反応を抑制し、ひいてはアレルギー疾患ならびに自己免疫疾患の病態に有効性を示す可能性が考えられる。本研究では、JTE-852 の薬理学的な基本特性を把握するとともに、アレルギー疾患治療薬ならびに自己免疫疾患治療薬としての有用性を検討した。

第 1 章では、JTE-852 の基本的な特性を把握する目的で、Syk 阻害作用、種差ならびに選択性について検討を行った。

リコンビナント Syk を用いた評価の結果、JTE-852 は Syk のキナーゼ活性を強力に阻害することが明らかとなり、その阻害作用は ATP 拮抗型の様式により発揮されると考えられた。また、JTE-852 の Syk 阻害作用はヒトとラットの間に種差がないことが示唆された。次に、IgE 架橋刺激マスト細胞を用いて細胞内の Syk キナーゼ活性を評価したところ、JTE-852 は、Syk のリン酸化を阻害せずに Syk の基質である LAT のリン酸化を阻害した。したがって、JTE-852 は細胞内の環境においても Syk のキナーゼ活性を阻害することが示された。さらに、Syk 以外のヒトキナーゼを用いて JTE-852 のキナーゼ選択性を検討した。評価対象には、Syk に近い構造や機能を有する Lck および ZAP70 も含まれていたが、評価した各種キナーゼに対する JTE-852 の阻害作用

は Syk 阻害作用に比して弱いものであった。

以上の成績より, JTE-852 は強力かつ選択的な Syk 阻害薬であることが示唆された。

第 2 章では, JTE-852 のアレルギー疾患治療薬としての有用性を検討する目的で, IgE 架橋刺激マスト細胞からのメディエーター分泌, IgE を介する *in vivo* 反応, さらにアレルギー疾患の動物モデルにおける JTE-852 の作用を検討した。

JTE-852 は, マスト細胞からの IgE 架橋刺激によるヒスタミン, LTC₄/D₄/E₄, TXA₂, PGD₂ および IL-13 分泌をほぼ同等の IC₅₀ 値で抑制した。また, JTE-852 は経口投与により, PCA 反応を用量依存的かつ有意に抑制した。これらの結果より, JTE-852 はマスト細胞からの IgE 架橋刺激による 3 群のメディエーター (顆粒内容物, アラキドン酸代謝産物およびサイトカイン) 分泌を抑制し, これらメディエーターが関与する *in vivo* アレルギー反応も抑制できることが示唆された。次に, 4 種のアレルギー疾患動物モデル (くしゃみ, 鼻漏, 気道収縮, 気道炎症) について評価したところ, 経口投与した JTE-852 は, 各モデルのアレルギー症状をいずれも有意に抑制した。鼻漏, 気道収縮ならびに気道炎症の 3 モデルにおいては, JTE-852 に加えて, 既存のアレルギー疾患治療薬である ketotifen, pranlukast および prednisolone の評価も行った。JTE-852 と異なり, 既存の 3 薬物は, すべてのモデルにおいて有意な抑制作用を示すことはできなかった。これらの結果より, JTE-852 は既存薬よりも幅広いアレルギー症状を抑制可能であることが示唆された。

以上の成績より, JTE-852 は IgE 架橋刺激マスト細胞からの 3 群のメディエーター分泌をいずれも抑制し, 既存薬よりも幅広いアレルギー症状に有効性を示すことが示唆された。したがって, JTE-852 は, 既存薬よりも優れた有望な新規アレルギー疾患治療薬となる可能性が期待される。

第 3 章では, JTE-852 の自己免疫疾患治療薬としての有用性を検討する目的で, IgG

を介する細胞反応および *in vivo* 反応，加えて自己免疫疾患の動物モデルにおける JTE-852 の作用を検討した。

JTE-852 は，IgG 架橋刺激マスト細胞からのヒスタミン分泌，IgG 架橋刺激単球からの ROS および TNF- α 分泌を抑制した。また，JTE-852 は経口投与により，RCA 反応ならびに RPA 反応を用量依存的かつ有意に抑制した。これらの結果より，JTE-852 は IgG 関与の細胞反応を抑制し，IgG が寄与する II 型および III 型過敏反応を抑制することが明らかとなった。次に，自己免疫疾患動物モデルの代表として CIA モデルを用い，関節炎発症前から投与する実験と発症後から投与する実験の 2 種類の実験を行った。JTE-852 は発症前投与，発症後投与いずれの実験においても，経口投与により後肢の腫脹および骨密度低下を用量依存的かつ有意に抑制した。一方，同様に評価した MTX は，発症前投与の条件では有意な抑制を示したものの，発症後投与の条件ではいずれの評価指標に対しても抑制作用を示さなかった。これらの結果より，JTE-852 は自己免疫疾患の病態に有効性を示し，MTX 不応答あるいは応答不十分な病態に対しても薬効を示す可能性が示唆された。

以上の成績より，JTE-852 は IgG 関与の細胞反応ならびに *in vivo* 反応を抑制し，自己免疫疾患の病態を強力に抑制し得ることが示唆された。したがって，JTE-852 は，自己免疫疾患の有望な新規治療薬となる可能性が期待される。

本研究では，JTE-852 の Syk 阻害薬としての特性を明らかにするとともに，そのアレルギー疾患治療薬ならびに自己免疫疾患治療薬としての有用性を示した。臨床試験におけるさらなる検証は必須であるが，本研究で明らかにした JTE-852 の薬理作用を総合すると，JTE-852 は，既存治療では不十分なアレルギー疾患患者ならびに自己免疫疾患患者に対して新たな治療の選択肢を提供し，両疾患患者の quality of life (QOL) 向上に貢献できる可能性が期待される。

謝辞

稿を終えるに臨み、本研究に際して終始御指導と御鞭撻を賜りました恩師，岐阜薬科大学 機能分子学大講座 薬理学研究室 稲垣直樹 教授に深甚なる謝意を表します。また，本稿の御高閲を賜りました岐阜薬科大学 生態機能解析学大講座 薬効解析学研究室 原英彰 教授，岐阜薬科大学 生命薬学大講座 感染制御学研究室 井上直樹 教授，岐阜薬科大学 生命薬学大講座 生化学研究室 五十里彰 教授に深謝いたします。岐阜薬科大学 機能分子学大講座 薬理学研究室 田中宏幸 准教授，山下弘高 講師には，本稿の作成ならびに発表に関して御指導と御鞭撻を賜りました。深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，懇切なるご協力とご助言を賜りました日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 生物研究所 松下睦佳 所長，畑貴広 副所長をはじめ，松尾明 研究員，宮川直樹 研究員，小林初枝 研究員，岩崎秀典 研究員，太田毅 研究員に深謝いたします。さらに，公表主論文の投稿に際して，ご校閲と多大なご助言を賜りました同研究所 古川昇 研究員，植田嘉文 研究員，坂田薫 研究員に心より感謝いたします。

引用文献

1. Masuda ES, Schmitz J. Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 461-467.
2. Rossi AB, Herlaar E, Braselmann S, Huynh S, Taylor V, Frances R, Issakani SD, Argade A, Singh R, Payan DG, Masuda ES. Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 749-755.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immediate Hypersensitivity, in: *Cellular and Molecular Immunology*, fourth ed. WB Saunders Company, Philadelphia 2000; pp. 424-444.
4. Hein R. Chronic urticaria: impact of allergic inflammation. *Allergy* 2002; 57 (Suppl 75): 19-24.
5. Rolin S, Masereel B, Dogne JM. Prostanoids as pharmacological targets in COPD and asthma. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 89-100.
6. Udem BJ, Taylor-Clark T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 1521-1534.
7. AI Suleimani YM, Walker MJ. Allergic rhinitis and its pharmacology. *Pharmacol Ther* 2007; 114: 233-260.
8. Schwiebert LM, Beck LA, Stellato C, Bickel CA, Bochner BS, Schleimer RP. Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production: relevance to antiallergic actions. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 143-152.
9. Engelkes M, Janssens HM, de Jongste JC, Sturkenboom MC, Verhamme KM. Medication adherence and the risk of severe asthma exacerbations: a systematic review. *Eur Respir J* 2015; 45: 396-407.
10. Walsh GM. Novel cytokine-directed therapies for asthma. *Discov Med* 2011; 11:

283-291.

11. Gibofsky A. Current therapeutic agents and treatment paradigms for the management of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2014; 20 (Suppl 7): S136–S144.
12. Rustin MH. Long-term safety of biologics in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: review of current data. *Br J Dermatol* 2012; 167 (Suppl 3): 3–11.
13. Sciascia S, Talavera-Garcia E, Roccatello D, Baldovino S, Mengatti E, Cuadrado MJ. Upcoming biological therapies in systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* 2015; 27: 189–193.
14. Toussiroit É, Bereau M. The risk of progressive multifocal leukoencephalopathy under biological agents used in the treatment of chronic inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2014; 13: 121–127.
15. Kyttaris VC, Tsokos GC. Syk kinase as a treatment target for therapy in autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2007; 124: 235–237.
16. Kyttaris VC. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6: 245–250.
17. Wong BR, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13: 743–762.
18. Kurdekar VD, Jadhav HR. Small molecular inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis: progress so far. *Mini Rev Med Chem* 2015; 15: 123–144.
19. Costello PS, Turner M, Walters AE, Cunningham CN, Bauer PH, Downward J, Tybulewicz VL. Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 1996; 13: 2595-2605.
20. Stenton GR, Ulanova M, Dery RE, Merani S, Kim MK, Gilchrist M, Puttagunta L, Musat-Marcu S, James D, Schreiber AD, Befus AD. Inhibition of allergic inflammation in the airways using aerosolized antisense of Syk kinase. *J Immunol* 2002; 169: 1028-1036.

21. Geahlen RL. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35: 414–422.
22. Deng GM, Kyttaris VC, Tsokos GC. Targeting Syk in autoimmune rheumatic diseases. *Front Immunol* 2016; 7: 78.
23. Schmitz R, Baumann G, Gram H. Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *J Mol Biol* 1996; 260: 664-677.
24. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 998-1008.
25. Dinh M, Grunberger D, Ho H, Tsing SY, Shaw D, Lee S, Barnett J, Hill RJ, Swinney DC, Bradshaw JM. Activation mechanism and steady state kinetics of Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2007; 282: 8768-8776.
26. Harvima IT, Levi-Schaffer F, Draber P, Friedman S, Polakovicova I, Gibbs BF, Blank U, Nilsson G, Maurer M. Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 530-544.
27. Sanderson MP, Wex E, Kono T, Uto K, Schnapp A. Syk and Lyn mediate distinct Syk phosphorylation events in FcεRI-signal transduction: implications for regulation of IgE-mediated degranulation. *Mol Immunol* 2010; 48: 171-178.
28. Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004; 23: 7918-7927.
29. Chu DH, Morita CT, Weiss A. The Syk family of protein kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 1998; 165: 167-180.
30. Wang H, Kadlecsek TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HE, Hsu LY, Freedman TS, Weiss A.

- ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a002279.
31. Dogne JM, de Leval X, Benoit P, Delarge J, Masereel B. Thromboxane A2 inhibition: therapeutic potential in bronchial asthma. *Am J Respir Med* 2002; 1: 11-17.
 32. Finn DF, Walsh JJ. Twenty-first century mast cell stabilizers. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 23-37.
 33. Ishizuka T, Matsui T, Okamoto Y, Ohta A, Shichijo M. Ramatroban (BAY u 3405): a novel dual antagonist of TXA2 receptor and CRTh2, a newly identified prostaglandin D2 receptor. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 71-90.
 34. Pettipher R, Whittaker M. Update on the development of antagonists of chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2). From lead optimization to clinical proof-of-concept in asthma and allergic rhinitis. *J Med Chem* 2012; 55: 2915-2931.
 35. Sin B, Togias A. Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. *Proc Am Thorac Soc* 2011; 8: 106–114.
 36. Brightling CE, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID, Bradding P. Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1711–1716.
 37. Mayr SI, Zuberi RI, Zhang M, de Sousa-Hitzler J, Ngo K, Kuwabara Y, Yu L, Fung-Leung WP, Liu FT. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol* 2002; 169: 2061–2068.
 38. Ishimura M, Maeda T, Kataoka S, Suda M, Kurokawa S, Hiyama Y. Effects of KP-496, a novel dual antagonist for cysteinyl leukotriene receptor 1 and thromboxane A2 receptor, on Sephadex-induced airway inflammation in rats. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 1057–1061.

39. Mizutani N, Nabe T, Imai A, Sakurai H, Takenaka H, Kohno S. Markedly increased nasal blockage by intranasal leukotriene D4 in an experimental allergic rhinitis model: contribution of dilated mucosal blood vessels. *Jpn J Pharmacol* 2001; 86: 170–182.
40. Nakagawa N, Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nambu F, Terawaki T, Aishita H. In vivo pharmacologic profile of ONO-1078: a potent, selective and orally active peptide leukotriene (LT) antagonist. *Jpn J Pharmacol* 1992; 60: 217–225.
41. Watanabe A, Tominaga T, Shutoh H, Hayashi H, Tsuji J, Koda A, Nagai H, Kumazawa Y, Shimada H. Effect of TYB-2285 on passive cutaneous anaphylaxis in rats. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 311–315.
42. Saito H, Ebisawa M, Tachimoto H, Shichijo M, Fukagawa K, Matsumoto K, Iikura Y, Awaji T, Tsujimoto G, Yanagida M, Uzumaki H, Takahashi G, Tsuji K, Nakahata T. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. *J Immunol* 1996; 157: 343-350.
43. Toru H, Pawankar R, Ra C, Yata J, Nakahata T. Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 491-502.
44. Shimoda T, Obase Y, Matsuse H, Asai S, Iwanaga T. The pathogenesis of alcohol-induced airflow limitation in acetaldehyde dehydrogenase 2-deficient mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; 171: 276–284.
45. Watanabe A, Tominaga T, Shutoh H, Hayashi H, Tsuji J, Koda A, Nagai H, Kumazawa Y, Shimada H. Effect of TYB-2285 on passive cutaneous anaphylaxis in rats. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 311-315.
46. Emson CL, Bell SE, Jones A, Wisden W, McKenzie AN. Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig) E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. *J Exp Med* 1998; 188: 399-404.

47. Poulsen LK, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* 2007; 39: 440-456.
48. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Ca²⁺ and protein kinase C signaling for histamine and sulfidoleukotrienes released from human cultured mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 895-900.
49. Inagaki N, Miura T, Nagai H, Koda A. Inhibitory effects of glucocorticoids on increased vascular permeability caused by passive cutaneous anaphylaxis and some chemical mediators in rats. *Jpn J Pharmacol* 1988; 46: 189-192.
50. Togias A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(Suppl 4): S60–S68.
51. Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10: 1519–1530.
52. Miheller P, Kiss LS, Mandel M, Lakatos PL. Methotrexate: should we start using it in clinical practice? *Curr Drug Targets* 2013; 14: 1480–1489.
53. Aibara S, Mori M, Iwamoto T, Tsubokawa M, Takamori H, Tsukada W. Effects of DS-4574, a new orally active antiallergic agent, in experimental allergic and inflammatory models. *Jpn J Pharmacol* 1993; 61: 267–276.
54. Okamoto H, Iwahisa Y, Terasawa M. Suppression of the Arthus reaction by Y-24180, a potent and specific antagonist of platelet-activating factor. *Agents Actions* 1992; 35: 149–158.
55. Kaibara N, Hotokebuchi T, Takagishi K, Katsuki I. Paradoxical effects of cyclosporin A on collagen arthritis in rats. *J Exp Med* 1983; 158: 2007–2015.
56. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Diseases caused by immune responses: hypersensitivity and autoimmunity, in: *Cellular and Molecular Immunology*, fourth ed. WB Saunders Company, Philadelphia 2000; pp. 404-423.

57. Azam P, Sankaranarayanan A, Homerick D, Griffey S, Wulff H. Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1419–1429.
58. Yamamoto N, Shichijo M, Kokubo T. Establishment of the superoxide production assay with human monocytic cell line, U937, for the evaluation of Syk kinase inhibitors. *J Immunol Methods* 2002; 268: 123–130.
59. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004; 14: 131–138.
60. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Activation of T lymphocytes, in: *Cellular and Molecular Immunology*, fourth ed. WB Saunders Company, Philadelphia 2000; pp. 161–181.
61. Weinblatt ME. Efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34 (Suppl 2): 43–48.
62. Lange F, Bajtner E, Rintisch C, Nandakumar KS, Sack U, Holmdahl R. Methotrexate ameliorates T cell dependent autoimmune arthritis and encephalomyelitis but not antibody induced or fibroblast induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 599–605.
63. Nielsen CH, Albertsen L, Bendtzen K, Baslund B. Methotrexate induces poly(ADP-ribose) polymerase-dependent, caspase 3-independent apoptosis in subsets of proliferating CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 288–295.
64. Sasakawa T, Sasakawa Y, Ohkubo Y, Mutoh S. FK506 ameliorates spontaneous locomotor activity in collagen-induced arthritis: implication of distinct effect from suppression of inflammation. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 503–510.
65. Nijjar JS, Tindell A, McInnes IB, Siebert S. Inhibition of spleen tyrosine kinase in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 66: 1556–1562.

66. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2010; 363: 1303–1312.
67. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, Grossbard E. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3309–3318.
68. Iwata S, Yamaoka K, Niino H, Nakano K, Wang SP, Saito K, Akashi K, Tanaka Y. Involvement of Syk in pathology of systemic autoimmune disease. *Jpn J Clin Immunol* 2012; 35: 56-61.

略語一覽

ANOVA: analysis of variance

ATP: adenosine 5'-triphosphate

Ag: antigen

BALF: bronchoalveolar lavage fluid

BN: Brown-Norway

BSA: bovine serum albumin

CBMCs: cord blood mast cells

CIA: collagen-induced arthritis

c-Kit: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

COMP: cartilage oligomeric matrix protein

CPMA: count per minute, channel A

CT: computed tomography

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNP: dinitrophenyl

DSCG: disodium cromoglycate

DTH: delayed-type hypersensitivity

Da: dalton

ED₅₀: 50% effective dose

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: epidermal growth factor

EIA: enzyme immunoassay

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMEM: EAGLE-MEM

FBS: fetal bovine serum

FIA: Freund's incomplete adjuvant

GCP: good clinical practice

GLP: good laboratory practice

HRP: horseradish peroxidase

Hist: histamine

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

id: intradermal

IL: interleukin

IMDM: Iscove's modified Dulbecco's medium

IP: immunoprecipitation

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITS: insulin-transferrin-selenium-G supplement

Ig: immunoglobulin

K_i: inhibition constant

K_m: Michaelis constant

LAT: linker for activation of T cell

LDS-PAGE: lithium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

LPS: lipopolysaccharide

LT: leukotriene

LTs: LTC₄/D₄/E₄

Lck: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

Lyn: Lck/yes-related novel tyrosine kinase

MAPKAP-K: mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase

MC: methylcellulose

ME: mercaptethanol

MEK: mitogen-activated protein kinase kinase

MS: multiple sclerosis

MTX: methotrexate

NE: not examined

OVA: albumin from chicken egg white

PBMCs: peripheral blood mononuclear cells

PBS: phosphate-buffered saline

PCA: passive cutaneous anaphylaxis

Penh: enhanced pause

PG: prostaglandin

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

po: per os

PVDF: polyvinylidene difluoride

QOL: quality of life

RA: rheumatoid arthritis

RBL: rat basophilic leukemia

RCA: reversed cutaneous anaphylaxis

RI: radioisotope

ROS: reactive oxygen species

RPA: reversed passive Arthus

SCF: stem cell factor

SD: Sprague-Dawley

SD: standard deviation

SEM: standard error of the mean

SLE: systemic lupus erythematosus

Src: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

Syk: spleen tyrosine kinase

TDI: toluene 2,4-diisocyanate

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

TX: thromboxane

V_{max}: maximum velocity

ZAP: zeta-chain associated protein kinase