



BAFFシグナル経路を標的とした炎症性疾患に対する革新的治療薬の探索

吉本 桂子、鈴木 勝也、竹内 勤、慶應義塾大学医学部

B細胞活性化因子であるBAFF(tumor necrosis factor ligand superfamily, member 13b)はB細胞の増殖、分化、生存に関わり、B細胞や単球上の特異的受容体(BR3)と結合し、細胞を活性化するサイトカインの一つである。これまで多くの研究で、BAFFは自己抗体による炎症が原因の一つである自己免疫疾患の病態に深く関与することが報告されており、BR3を介したBAFFシグナル経路は有望な治療標的として着目されている。我々はこれまでBAFFシグナル阻害剤を探索する目的でハイスループットスクリーニング系を独自に開発し、化合物ライブラリーよりBAFFシグナル阻害剤の探索を実施してきた。その結果、BAFFとBR3の結合を阻害する作用を有する化合物A(特許第5628647号、特許第6544522号)の発見に至った。化合物AはBAFFにより刺激を受けた単球からの炎症性サイトカインの一つであるIL-6の産生を抑制し、BAFF刺激単球と共培養したB細胞からのIgG産生も抑制することが明らかになった。さらにB細胞を直接的に刺激し(抗IgM抗体、抗CD40抗体、IL-21、BAFF)亢進するIgG産生に対しても化合物Aは抑制作用を有することが見出された。また自己免疫疾患モデルマウスを用いた薬効試験では化合物Aが血清中IL-6、IL-10濃度および自己抗体価の上昇を抑制することが明らかになり、BAFFシグナルの抑制が病態改善に有効であることが示された。

そこでより強い薬効を有するBAFFシグナル阻害化合物の探索を続けたところ、化合物Xの発見に至った(PCT/JP2019/18710)。化合物Xはin vitroおよびin vivoでの薬効評価系において炎症性サイトカインおよび抗体産生に対して明らかに強い薬効を示した。これらの結果より化合物Xは炎症性疾患を対象としたBAFFシグナル阻害剤の開発研究において有望なリード化合物であると考えられる。

ハイスループットスクリーニング系の確立

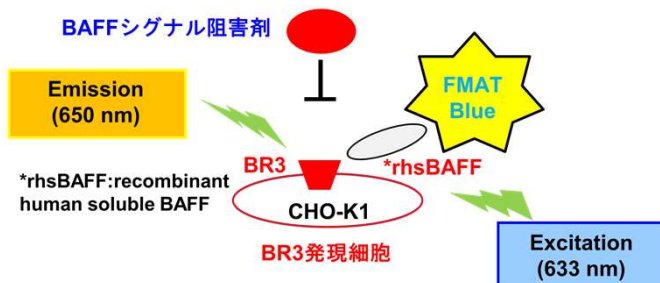


Figure 1: BR3を強制発現させたCHO-K1細胞をFMAT Blue-標識 rBsBAFFと候補化合物存在下で6時間培養した。化合物によるBAFFとBR3の結合阻害はApplied Biosystems 8200 Cellular Detection Systemを用いた蛍光強度測定にて判定した。

化合物XのBAFF刺激単球からのIL-6産生に対する抑制効果

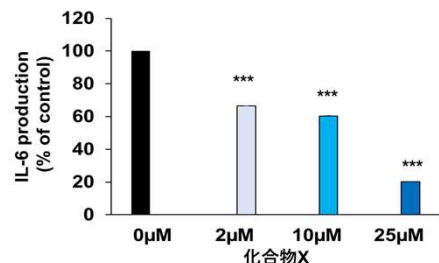


Figure 2: ヒト末梢血単球をBAFF (2μg/ml) および化合物X存在下で96時間培養した。培養上清中のIL-6濃度をELISAを用いて測定した。化合物X存在下でのIL-6産生量は化合物X非存在下(化合物濃度 0)でのIL-6産生量を100とした場合の割合で示す。*** p<0.001。

化合物XのB細胞からのIgG産生に対する抑制効果

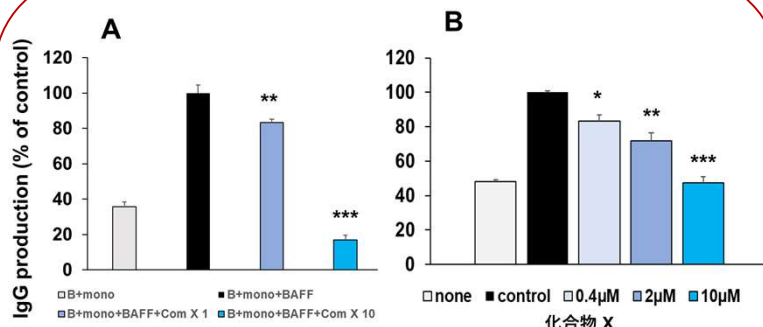


Figure 3: ヒト末梢血単球(PBMCs)とB細胞を化合物XおよびrBsBAFF(2μg/ml)存在下で96時間培養した。培養上清中のIgG量をELISAを用いて測定した(A)。PBMCsをB細胞刺激(anti-IgM and CD40 antibodies, rIL-21(30ng/ml) and rBsBAFF (30ng/ml) および化合物X存在下で7日間培養した。培養上清中のIgG量はELISA法を用いて測定した(B)。化合物X存在下でのIgG産生量は化合物X非存在下でのIgG産生量を100とした場合の割合で示す。

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001。

化合物Xの病態モデルマウスにおける自己抗体価および尿タンパクスコアに対する抑制効果

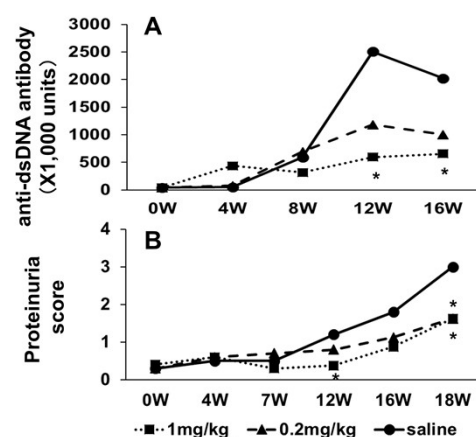


Figure 4: NZWBF1 mice (♀; n = 5/群, 15週齢)に対して化合物X (0.2 mg/kg or 1 mg/kg) を5回/週で18週間投与した。血中抗dsDNA抗体価と尿タンパクスコアはそれぞれELISA法および尿タンパク判定試験紙により測定した。* p<0.05。

結語

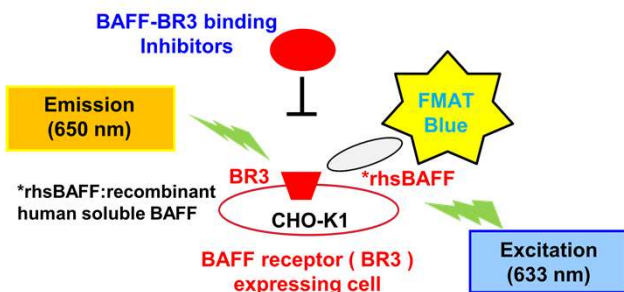
- BAFFシグナル阻害作用を有する化合物XはBAFFによるIL-6など炎症性サイトカイン産生亢進やB細胞の活性化を抑制し、その結果、B細胞からの抗体産生を抑制することが示唆された。
- 化合物XはB細胞活性化亢進が起因となる自己免疫疾患などの炎症性疾患治療薬として有望な候補化合物であると考えられる。

Innovative drug discovery for inflammatory diseases with low molecular weight compounds aiming at BAFF signaling pathways.

Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi
Keio University

BAFF (tumor necrosis factor ligand superfamily, member 13b) is a cytokine that promotes proliferation, differentiation and survival of B cells and binds its receptors on immune cells, such as B cells and monocytes, to activate the cells. Many lines of evidence showed that BAFF is closely involved in the pathogenesis of autoimmune diseases and BAFF signaling pathways through BR3, BAFF specific receptor, are possible therapeutic targets to treat the diseases. To search for specific inhibitors against BAFF signaling, we have established our original high throughput screening system and discovered a low molecular weight compound (Compound A) which inhibits BAFF binding to its receptor, BR3 (Patent No.: 5628647, 6544522). This compound suppressed production of inflammatory cytokines by BAFF-stimulated monocytes and IgG production by B cells stimulated with BAFF-stimulated monocytes and/or B cell stimulation cocktail, such as anti-IgM and CD40 antibodies, IL-21 and BAFF. In addition, Compound A suppressed titer of autoantibody and serum levels of inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-10, in autoimmune model mice. Then we continuously search BAFF signaling inhibitors which show higher efficacy than Compound A and finally discovered a low molecular weight compound, Compound X, which remarkably suppressed production of inflammatory cytokines and IgG *in vitro* and improved symptoms of autoimmune disease *in vivo* using autoimmune mice models (PCT/JP2019/ 18710).

High throughput screening system



Inhibitory effect of Compound X on IL-6 production by BAFF-stimulated monocytes *in vitro*.

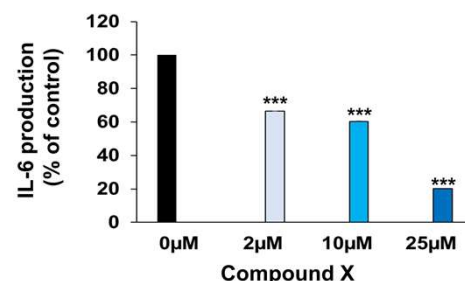


Figure 2: Peripheral monocytes were stimulated with rhBAFF in the presence of various concentrations of Compound X for 96 hr. Concentration of IL-6 in the culture supernatants was measured by ELISA and normalized against the control (i.e., +BAFF/-inhibitors). *** p<0.001.

Inhibitory effect of Compound X on IgG production by B cells *in vitro*.

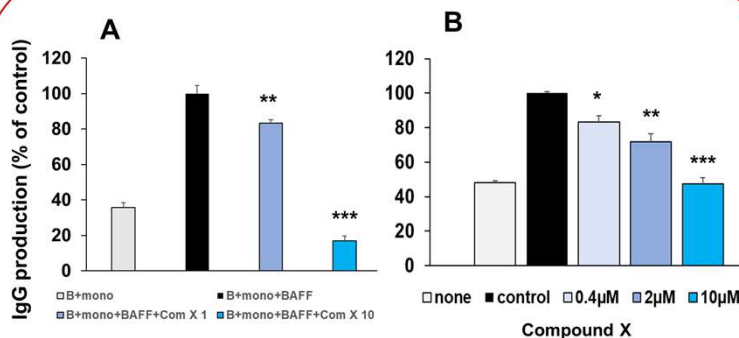


Figure 3: Peripheral monocytes and B cells were cultured in with various concentrations of Compound X in the presence of rhBAFF(2μg/ml) for 96hr. The amount of IgG in the culture supernatants was measured by ELISA (A). PBMCs were cultured upon the stimulation with anti-IgM and CD40 antibodies, rhIL-21(30ng/ml) and rhBAFF (30ng/ml) in the presence of various concentrations of Compound X for 7 days. IgG in the culture supernatants was measured by ELISA (B). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Inhibitory effect of Compound X on anti-dsDNA antibody titer and proteinuria score *in vivo*.

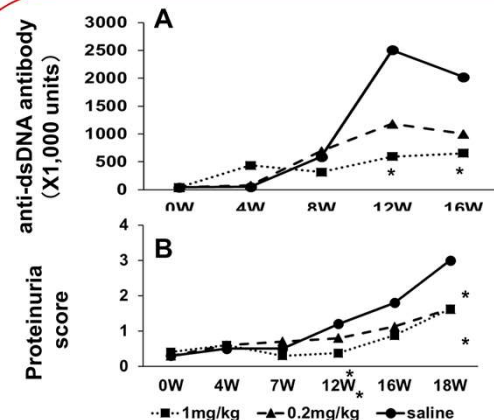


Figure 4: NZBWF1 mice (♀; n = 5/group, 15 weeks old) were treated with Compound X (0.2 mg/kg or 1 mg/kg) 5 times/week for 18 weeks. Serum level of an anti-dsDNA antibody (A) and proteinuria score (B) were measured by ELISA and urine testing paper, respectively. * p<0.05.

Conclusions

- Our data collectively suggest that Compound X, a low molecular weight BAFF-signaling inhibitor, suppresses production of inflammatory cytokines, such as IL-6 and B cell activation and consequently decreases production of IgG.
- Compound X may provide a novel therapeutic possibility to treat inflammatory diseases, such as hyper-activated B cell-related autoimmune diseases.