

## 論文の内容の要旨

論文題目      マクロファージコロニー刺激因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤を用いた骨破壊抑制、抗炎症作用に関する研究

氏 名          大野 宏明

### はじめに

マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)は骨芽細胞などの間葉系細胞や血管内皮細胞、繊維芽細胞等、多くの細胞で産生され、レセプターであるc-Fmsを介したシグナル伝達により単球系細胞の分化、増殖に作用する。マクロファージの分化、炎症性サイトカイン産生促進などの生理活性を有する一方、同じ単球系細胞に由来する破骨細胞の分化、生存維持に重要であることが知られている。これらM-CSF/c-Fmsシグナルに制御されるマクロファージや破骨細胞については、炎症や骨破壊を伴う様々な疾患への関与がモデル動物を用いた検討より明らかにされているが、M-CSF/c-Fmsシグナル選択的低分子抑制剤を用いた病態モデルでの薬効解析に関する報告は極めて少ない。本研究では、破骨細胞の骨破壊が病態進展に重要な、骨転移モデルにおける選択的c-Fms阻害剤の有効性を検証することで、その薬剤としての可能性のみならず、M-CSF/c-Fmsシグナルの疾患における重要性を明確にすることを試みた。加えて、破骨細胞の骨破壊と同時にマクロファージの炎症反応が病態進展に重要な関節炎モデルにおけるc-Fms阻害剤の薬効解析を実施し、新たなメカニズムを有する薬剤としての可能性についても検討を行なった。

### c-Fms 阻害剤 Ki20227 の活性プロファイルと骨転移モデルでの薬効解析

骨転移の病変部においては、骨転移腫瘍細胞の産生するPTHrPにより骨芽細胞におけるRANKL発現が促進され、このRANKLとM-CSFの刺激により破骨細胞の分化、骨吸収活性が亢進している。更に破骨細胞の骨破壊により骨基質中のTGF- $\beta$ が漏出し、これが転移腫瘍のPTHrP産生を亢進するといった悪循環を形成していると考えられている。

そのため、c-Fmsに対する阻害剤を用いることで破骨細胞分化を阻害し、転移腫瘍によって誘導さ

れる骨破壊を始めとした病態進展を抑制することが可能であると考えられる。

c-Fms 阻害剤の探索を行った結果、選択的な阻害活性を有する Ki20227 を得た。Ki20227(ラセミ体)の c-Fms に対する IC50 値は 2 nM であったが、同じ PDGF レセプターファミリーに属する KDR, c-Kit, PDGFR $\beta$  に対する IC50 値はそれぞれ、数倍~200 倍程度弱いものであった。なお別途合成した(R)-, (S)-Ki20227 を比較した結果、その阻害活性はほぼ同様であった。

細胞を用いた検討においては、Ki20227(ラセミ体)はマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 における c-Fms のリン酸化を 10 nM の濃度でほぼ完全に抑制することが確認された。また M-CSF 依存的な M-NFS-60 細胞の増殖と骨髄細胞の M-CSF、RANKL 依存的な破骨細胞分化を同程度の濃度で阻害すること、その一方で HUVEC 細胞の VEGF 依存的増殖や A375 の血清依存的な増殖は全く抑制しないことが明らかとなった。この阻害活性はラセミ体、(R)-, (S)-Ki20227 において同様であった。以上の結果より Ki20227 は c-Fms のリン酸化阻害により、M-CSF 依存的な細胞の増殖、分化を抑制することが示された。一方、ラセミ体、(R)-, (S)-Ki20227 で活性が同等であったことから、以下の検討についてはラセミ体 Ki20227 を用いることとした。

次に Ki20227 が骨転移腫瘍によって誘導される骨破壊を抑制するかどうかを検討した。ヒトメラノーマ細胞株 A375 を用いたヌードラット骨転移モデルにおいて、細胞移植翌日から Ki20227 を 1 日 1 回、20 日間の連投を行なった。X 線写真を用いた評価と組織学的解析の結果、Ki20227 の 50 mg/kg 投与群において、骨転移に伴う骨破壊が抑制されていること、また腫瘍細胞の浸潤、増殖の有意な減少と、病変部の骨表面における TRAP 陽性破骨細胞数の顕著な減少が確認された。加えて血清中の骨代謝マーカー、TRAP-5b レベルも Ki20227 投与群において有意に低下していることが確認された。一方、転移前後の A375 における c-fms 発現変化を解析するために、移植前の A375 細胞と骨転移モデルにおける脛骨骨端部の骨転移部位から回収した A375 細胞の遺伝子解析を実施した。その結果、骨転移の前後で c-Fms 発現に変化は認められなかったことから、Ki20227 による骨微小環境内に転移した A375 への直接的な増殖抑制作用は低いと考えられた。加えて腫瘍が関与しないラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいても Ki20227 の破骨細胞分化誘導抑制作用が確認されたことから、Ki20227 の骨破壊抑制作用は、腫瘍に対する抑制作用を介したのではなく、c-Fms 阻害を介した破骨細胞の分化に対する直接作用であると考えられた。

以上のように経口投与可能な低分子 c-Fms 阻害剤が骨転移に伴う骨破壊に対する新規メカニズムを有する薬剤として有用であること、さらにその薬効からは、骨転移の病態進行時における破骨細胞分化、骨破壊に対して M-CSF/c-Fms シグナルが重要な役割を果たすことが明らかになった。

#### マウス II 型コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデルにおける薬効解析

関節リウマチにおいては炎症反応とそれに伴う骨破壊が病態進行に関与する。M-CSF はマクロファージの分化誘導に加え、LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生を増強するなど、炎症反応を促進することが知られている。また関節炎病変部においては、マクロファージが産生する TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインが骨芽細胞などの M-CSF 産生を誘導し、更なる炎症反応、炎症性骨破壊進展を誘導していると考えられる。これら知見と、骨転移モデルでの評価で得られたデータより、骨破壊抑制、抗炎症の観点から c-Fms 阻害剤 Ki20227 の関節炎における薬効が期待される。

In vitro における検討においては、DBA/1J マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養することで得られる、骨髄マクロファージの M-CSF 依存的な c-Fms リン酸化や細胞増殖、加えて M-CSF による TNF- $\alpha$  産生誘導も用量依存的に抑制することが確認された。

次にマウス CIA モデルにおける、Ki20227 の病態進行抑制効果を予防的、及び治療的見地から検討した。DBA/1J マウスに bovine type II collagen (CII) を免疫し、その 21 日後に再度 CII の免疫を実施し、関節炎の病態を惹起した。予防的検討については、2 回目免疫当日から 15 日間、治療的検討については 2 回目免疫 5 日後から 25 日間、0.02% Ki20227 となるよう調製した餌を用いて混餌投与を行った。その結果、予防的検討では、Ki20227 投与により病態の進行は顕著に抑制され、治療的検討においても投与直後から病態進行が遅延し、更なる病態の進行が抑制されることが明らかとなった。以下、予防的効果検討終了時の後肢足首関節炎病変部の組織学的解析からは、CIA マウスにおいて認められる炎症細胞浸潤が Ki20227 投与群において顕著に抑制されていること、加えて、これら浸潤細胞の多くが F4/80 陽性マクロファージであり、この陽性領域は Ki20227 により顕著に減少することも確認された。更に、TRAP 染色を用いた組織解析からは、Ki20227 投与による病変部の TRAP 陽性破骨細胞数の顕著な減少と骨破壊抑制作用も確認された。また血中の TRAP-5b レベルも Ki20227 投与群で低下しており、炎症性骨破壊の抑制が再確認された。CIA マウスの脾臓細胞の解析では、関節炎進行時の炎症反応と骨破壊に関与し、c-Fms の発現が報告されている CD11b 陽性細胞数の Ki20227 投与による顕著な抑制が確認された。更に、Ki20227 投与マウス由来の脾臓細胞においては CII 依存的な TNF- $\alpha$ 、IL-6 等のサイトカイン産生量の顕著な減少も確認された。この結果より、これら炎症性サイトカイン産生抑制も Ki20227 の薬効発現に寄与していると考えられた。

以上より Ki20227 が骨破壊抑制に加え、抗炎症の観点からも関節炎の病態進行を抑制することから、低分子 c-Fms 阻害剤の関節リウマチに対する新規薬剤としての可能性が示された。

#### まとめ

c-Fms チロシンキナーゼに対し高い選択性を有する阻害剤 Ki20227 は、M-CSF のシグナルを抑制することにより *in vitro* においては M-CSF 依存的な増殖やサイトカイン産生を抑制し、加えて M-CSF、RANKL 刺激による TRAP 陽性破骨細胞の分化を抑制することを明らかにすることができた。骨転移モデルを用いた検討からは Ki20227 が *in vitro* 同様、破骨細胞の分化、骨吸収活性を抑制することで骨転移に伴う骨破壊などの病変を抑制することが明らかとなり、同時にその薬効から骨転移の病態進行に対する M-CSF/ c-Fms シグナルの重要性を明らかにすることができた。一方、関節炎モデルを用いた検討からも、Ki20227 投与による病態進行抑制効果が確認され、その薬効発現は破骨細胞の分化のみならず、炎症細胞の増殖や浸潤、サイトカイン産生抑制作用等を介したものであると考えられた。低分子選択的 c-Fms 阻害剤を用いた、これらモデル動物における抗炎症、骨破壊抑制作用を介した病態進展抑制作用はこれまで報告がないことから、Ki20227 の薬効メカニズムの新規性、薬剤としての有用性は高いと考えられた。