

2. 公募研究

研究課題名：マクロファージにおける PD-L2 発現機構における BTK の役割解明

研究代表者：水野 夏実(北海道医療大学 薬学部 薬理学講座)

研究分担者：柳川 芳毅(北海道医療大学 薬学部 薬理学講座)

志賀 咲紀(北海道医療大学 薬学部 薬理学講座)

【研究の背景と目的】

マクロファージは機能的に M1 と M2 の 2 つに大別される。M1 マクロファージは、1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 産生サイトカインの IFN- γ により誘導され、炎症促進に寄与する。M2 マクロファージは、Th2 産生サイトカインの IL-4 により誘導され、組織修復に寄与する。炎症局所では初期に IFN- γ 、後期には IL-4 の増加が観察される。このようなサイトカインシフトが存在する環境では、IFN- γ と IL-4 が同時マクロファージに作用することが推測される。Programmed cell death 1 ligand (PD-L) 1 及び PD-L2 は免疫チェックポイント分子として知られており、過剰な免疫に対して抑制する作用をもつ。PD-L1 の発現は様々な細胞で見られるのに対して PD-L2 の発現はマクロファージなどの抗原提示細胞に限局する。マクロファージにおける PD-L2 発現機構については未解明である。申請者らは、IFN- γ /IL-4 同時刺激が PD-L2 発現を相乗的に増加させることを見出したがメカニズムについては不明であり、解明を試みている。その一端として、IFN- γ /IL-4 同時刺激による PD-L2 発現を抗悪性腫瘍剤イブルチニブが抑制する可能性を見出した。イブルチニブは、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) 阻害剤であり、B 細胞による自己抗体産生を抑制することから B 細胞性腫瘍の治療薬として承認を得ている。本研究では、IFN- γ /IL-4 同時刺激による PD-L2 発現における BTK の役割を解明することを目的とした。

【実験方法】

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いて実験を行った。BTK 阻害剤として、イブルチニブのほか、フェネブルチニブ及び BMS-986142 を用いて前処置し、2 時間後、IFN- γ 及び IL-4 各 40 ng/mL で 24 時間刺激した。解析は、フローサイトメトリー及びリアルタイム qRT-PCR 法を用いた。

【結果と考察】

各 BTK 阻害剤で 24 時間処置し、MTT アッセイにより細胞毒性を評価した。その結果より細胞生存率に影響を与えない濃度範囲を検討した。イブルチニブ 0.3125-10 μ M、フェネブルチニブ 0.78-12.5 μ M、及び BMS-986142 0.78-3.125 μ M は何も細胞生存率が 100 %付近を推移したことから、本研究で用いる最高濃度をそれぞれ、イブル

チニブ 10 μM , フェネブルチニブ 10 μM , 及び BMS-986142 3 μM に設定した.

IFN- γ /IL-4 同時刺激により PD-L1 及び PD-L2 発現はコントロールと比較して増加させ, IFN- γ /IL-4 同時刺激による PD-L2 発現に対してイブルチニブの前処置は濃度依存的に減少させた. 一方, IFN- γ /IL-4 同時刺激による PD-L1 発現に対してイブルチニブは影響を与えなかった (図 1).

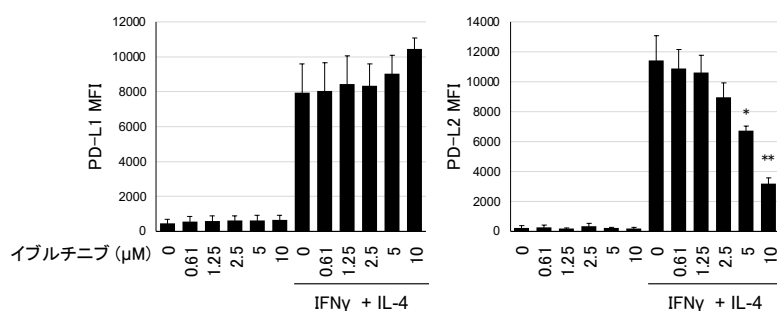


図 1. PD-L1/PD-L2 発現に対するイブルチニブの影響

フローサイトメトリーにより, PD-L1 及び PD-L2 の発現量を mean fluorescence intensity (MFI) として算出した. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs IFN γ + IL-4 (Tukey's HSD test)

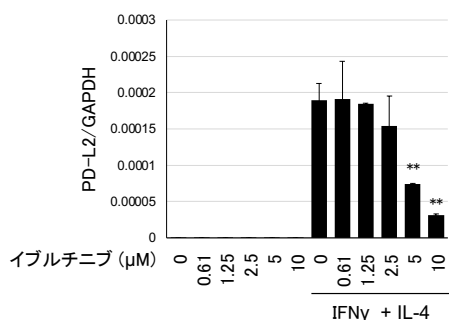


図 2. PD-L2 mRNA 発現に対するイブルチニブの影響

qRT-PCR により, PD-L2 の発現量を解析した. グラフは GAPDH mRNA に対する相対発現量. ** $p < 0.01$ vs IFN γ + IL-4 (Tukey's HSD test)

さらに, イブルチニブは IFN- γ /IL-4 同時刺激による PD-L2 発現を転写レベルで抑制することを確認した (図 2).

フェネブルチニブ及び BMS-986142 をそれぞれ 0.1-10 μM 及び 0.03-3 μM で前処置し, PD-L1 及び PD-L2 発現をフローサイトメトリーで解析した結果, 両 BTK 阻害剤はいずれの濃度においても, IFN- γ /IL-4 同時刺激による PD-L1 及び PD-L2 の発現増加に影響を及ぼさなかった.

PD-L1, -L2 阻害薬による免疫疾患治療の研究は, 発現する標的細胞の広さから PD-L2 と比較して PD-L1 に対する研究が先行している. また,

PD-L1 と PD-L2 では制御する T 細胞亜群が異なり, これに関連した副作用が PD-L1 選択的阻害薬で問題となった. そのため PD-L2 選択的阻害薬の開発が望まれている. IFN- γ /IL-4 同時刺激下において第 1 世代 BTK 阻害剤であるイブルチニブは PD-L2 の発現を選択的に抑制したことから, PD-L2 選択的阻害薬の候補としての可能性が示唆された. しかし, 第 2 世代 BTK 阻害剤であるフェネブルチニブ及び BMS-986142 は抑制作用を示さなかった. イブルチニブは他の 2 剤と比較してオフターゲットが多いことが報告されており, BTK 以外のキナーゼの関与が示唆された. 今後は新たにイブルチニブによるオフターゲット分子への作用に着目し, イブルチニブによる PD-L2 発現抑制機構の詳細なメカニズムを明らかにしたい.