

## 創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	免疫グロブリン製剤(IVIG)の抗冠動脈炎症の分子メカニズム解明に基づく、IVIG 不応川崎病症例に対する新規治療薬開発を目指した研究
代表機関名	国立研究開発法人国立成育医療研究センター
職名	室長
研究開発代表者名	松田 明生
全研究開発期間	平成 30 年度～令和 2 年度

### 1. 研究開発成果

#### 【背景・目的と進め方】

本研究開発は、乳幼児に好発する原因不明の血管炎症候群である川崎病に対する新規創薬ターゲットの同定を目指している。本邦における患者数は年間 1 万 8 千人を超え(2018 年のデータ)、なお増え続けている。臨床的な課題は、冠動脈の強い炎症を起因とする心障害(冠動脈瘤)の出現であり、急性期の治療ではこの予防が最も重要である。川崎病急性期の標準治療として、静注用免疫グロブリン製剤(IVIG)が定着して以来、IVIG は冠動脈炎症を顕著に抑制して心障害の発生率を激減させた。川崎病に対する IVIG の適応は、医薬品として最も成功した一例である。一方で、約 20%の川崎病患者は、IVIG 治療に不応であり、このような患者は心障害のリスクも高いため、IVIG に替わる効果的な治療薬開発が求められている。また、IVIG 製剤は健常成人血漿由来の血液製剤であり、ポリクローナルな免疫グロブリン(IgG)を含むため、IVIG 製剤が川崎病患者のどこに、どのように効いて優れた臨床効果を発揮しているのか、確固たる科学的エビデンスは存在しなかった。研究開発代表者はこの点に着目し、特に IVIG 製剤の冠動脈血管内皮細胞に対する抗炎症メカニズムおよび IVIG 不応メカニズムを明らかにしたうえで、IVIG 不応患者に対する新規創薬ターゲットの同定を試みた。

具体的な進め方としては、冠動脈血管内皮細胞に対する IVIG 製剤の抗炎症メカニズムを明らかにした後、IVIG 不応を獲得するメカニズムを解明し、その理解に基づいて IVIG 不応川崎病に対する新規創薬ターゲットのスクリーニングコンセプトを決定した。次に、AMED 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援のもと(課題番号 1366)、東北大学の化合物ライブラリーを提供いただき、新規創薬候補化合物のスクリーニングを実施し、有力な候補化合物を複数同定した。

#### 【研究成果1:IVIG 製剤の抗炎症メカニズムの解明】

これまでの研究成果により、IVIG 製剤は炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  で活性化したヒト冠動脈血管内皮細胞(HCAEC)の転写因子 CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBP $\delta$ )の顕著な抑制を介して、IL-6 や IL-1 $\beta$  等の炎症性サイトカイン発現を分子特異的かつ完全に抑制することで、

優れた抗炎症効果を発揮していることを明らかにしていた。そこで本研究ではさらにこの抗炎症メカニズムの詳細を生化学的手法、免疫染色、分子生物学的手法を駆使して明らかにした。具体的には、IVIG 製剤の HCAEC における作用標的分子 X を同定し、さらに IgG 構造の中に抗炎症効果の機能領域を明らかにした。

### 【研究成果2: IVIG 不応メカニズムの解明】

これまでの複数の臨床研究報告から、川崎病における IVIG 不応獲得には、炎症性サイトカイン IL-1 $\cdot$  や IL-17A が関与していることが明らかとなっている。この点に着目し、炎症刺激を TNF- $\cdot$  から IL-1 $\cdot$  あるいは IL-17A に変えることにより、IVIG による C/EBP $\cdot$  および C/EBP $\cdot$  抑制が解除され、IVIG 不応性を獲得した (in vitro における IVIG 不応川崎病モデルの確立)。この結果から、「IL-1 $\cdot$  刺激で活性化される C/EBP を抑制する物質が、IVIG 不応川崎病に対する新規創薬ターゲットになる」とのスクリーニングコンセプトを決定した (Inoue T. et al. Allergy 2020. 75(8):2102-2105)。

### 【研究成果3: 川崎病新規バイオマーカーの探索】

研究成果1で明らかにした IVIG 製剤の作用標的分子 X が、川崎病の診断・予後予測に役立つ新規バイオマーカーになるのではとの仮説をたて、川崎病患者血漿における分子 X の動態について解析した。IVIG 治療前の検体が採取できた 19 例 (IVIG 応答例 11 例、IVIG 不応例 8 例) で解析した結果、統計学的有意差はつかなかったものの、IVIG 応答例で血漿中の分子 X の値が高い傾向があった。今後症例数を増やしてさらに検討していく予定である。

### 【研究成果4: IVIG 不応川崎病患者に対する新規創薬ターゲットのスクリーニング】

研究成果2において確立したスクリーニングコンセプトに基づいて、6400 種の化合物が含まれる東北大学化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、目的の活性を有する新規創薬ターゲット候補を 15 種類同定することができた。これらの 15 種の化合物には、C/EBP 以外にも NF- $\cdot$  B や I $\cdot$  B $\cdot$  といった炎症性サイトカイン発現に重要な役割を果たす核内因子を抑制するものや、抗酸化ストレス応答に重要な役割を果たす Heme Oxygenase 1 (HO-1) を誘導するものなどが含まれていた。

### 【研究成果の意義】

本研究開発の背景にある必要性・社会的ニーズは、川崎病の標準治療薬が献血血液から作られた血液製剤であることによる。他の医薬品と異なり、ポリクローン抗体を含む IVIG 製剤は、多種多様な作用標的が想定され、川崎病に対する薬効メカニズムについても不明であった。また、以下の理由の相乗効果により、今後川崎病患者数と IVIG 製剤供給量とのバランスがとれなくなり、供給不足になることが懸念されている。

(理由1) 標準治療薬となっている川崎病患者の増加

(理由2)成人領域疾患における IVIG 製剤の適応拡大による使用量の増加

(理由3)コロナ禍による献血血液の不足

本研究成果により同定した 15 種類の新規創薬ターゲット候補の中から一つでも実用化が達成できれば、安定した供給量と安全性に懸念が残る血液製剤、IVIG に替わる、新しい治療戦略が可能となる。

### Summary of Research and Development

Kawasaki disease (KD) is an acute systemic vasculitis of unknown etiology that manifests in infants and young children, and the number of patients in Japan continues to increase. The most important clinical aspect of KD is a cardiac disorder (coronary aneurysm) caused by severe inflammation of the coronary arteries. Prevention of this complication is the most important goal of treatment of acute-phase KD. Since the release of treatment guidelines in 2003, intravenous immunoglobulin (IVIG) has become the standard treatment for acute KD. IVIG effectively suppresses coronary artery inflammation and has dramatically reduced the incidence of aneurysms. However, IVIG consists of multivalent immunoglobulins (IgG) from the plasma of thousands of healthy adults, and there has been no scientific evidence regarding the mechanism by which IVIG achieves its excellent clinical effect in KD patients. Because of the clinical evidence that IVIG significantly suppresses coronary artery inflammation, we have focused on the anti-inflammatory mechanism of IVIG's effects on coronary vascular endothelial cells. We have identified two *in vitro* models in this research and development: an IVIG-responsive model and an IVIG-refractory model. IVIG completely inhibited the inflammatory cytokine storm (excessive production of KD-associated cytokines such as IL-6, IL-1 $\beta$  and G-CSF) in the IVIG-responsive model, but not at all in the IVIG-refractory model. Consistent with those observations, IVIG completely inhibited C/EBP $\delta$ , a transcription factor for KD-associated cytokines such as IL-6, in the IVIG-responsive model but not in the IVIG-refractory model. Therefore, we think that, for development of a novel drug that can provide therapeutic benefit to IVIG-refractory KD, which occurs in approximately 20% of KD patients, it will be necessary to identify a compound that can effectively suppress C/EBP $\delta$  function even in the IVIG-refractory model. Our present study aimed to identify novel drug target(s) based on the above concept by using a 6,400-compound library that was constructed by Tohoku University.

Consequently, we have identified 15 promising novel drug targets for treatment of IVIG-refractory KD. If even one of those 15 candidates survives the development process, it will provide a new therapeutic strategy for patients with IVIG-refractory KD to replace the blood-origin product, IVIG.

## 2. 総合評価

良い

### 【評価コメント】

臨床検体を用いた検討については解析が不十分であり、当初想定していた結論が得られなかった。しかし、IVIGの抗冠動脈炎症の分子メカニズム解明成果に基づき、化合物スクリーニングを実施し、IVIGに代わる川崎病治療薬候補物質を見出し、特許出願に至ったことは評価できる。

今後、IVIGの作用因子のエビデンス構築と診断などに有用なバイオマーカー探索をさらに検討し、IVIG不応川崎病の新規治療薬開発につなげていくことを期待する。

以上