総 説

リウマチ性疾患における PI3 キナーゼに関する最近の知見

田村 直人

Recent findings on phosphoinositide-3 kinase in rheumatic diseases

Naoto TAMURA, M.D.

Department of Internal Medicine and Rheumatology Juntendo University School of Medicine

(Received November 21, 2011)

summary

Rheumatic diseases are chronic inflammatory disorders, and many of them are autoimmune diseases. Class I phosphatidylinositol-3 kinases (PI3Ks) are enzymes that phosphorylate phosphoinositides in response to extracellular stimuli and regulates cellular activation, proliferation, and migration, in a variety of cell types, suggesting that they play critical roles in the development of inflammation. In patients with rheumatic diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA), recent reports have shown convincing pathogenic evidence for the involvement of PI3K/Akt signaling pathways in chronic inflammation. Moreover, selective inhibition of PI3K γ reduced incidence and severity of the renal disease. More recently, the kinome array analysis revealed particular up-regulation of PI3K in B cells from patients with SLE in comparison with matched controls. Up-regulation of PI3K in T cells was also reported in patients with SLE. Further, we have demonstrated anti-rheumatic effects of a novel PI3K-specific inhibitor, ZSTK474, in mouse collagen-induced arthritis (CIA). Administration of ZSTK474, even if started after the development of arthritis, ameliorated CIA with no apparent adverse effect. Proliferation of B lymphocytes and synovial fibroblasts were inhibited by ZSTK474 *in vitro*. ZSTK474 suppressed osteoclast formation *in vitro* and also in the joints of CIA mice. These findings indicate that PI3K might be a potential therapeutic target of rheumatic diseases.

Key words—Phosphoinositide 3-kinase (PI3K); PI3K inhibitor; therapy; rheumatic disease

抄 録

リウマチ性疾患は全身性の慢性炎症性疾患であり、多くの疾患で自己免疫異常がみられる。ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase: PI3K) は細胞の増殖や生存をはじめ様々な細胞機能に関与するが、PI3K は免疫担当細胞においても重要な役割を示す。PI3K/Akt 経路は T 細胞や B 細胞の活性化や増殖、制御性 T 細胞誘導などに関与する。SLE では患者 B 細胞および T 細胞における PI3K/Akt 経路の活性化がみられ、またループモデルマウスでは PI3K 阻害薬が腎症を軽減させることなどから、病態への関与が示唆されている。また、関節リウマチ患者滑膜においても PI3K 活性化がみられるが、我々はコラーゲン誘発性関節炎マウスに PI3K 特異的阻害薬 ZSTK474 を投与すると関節炎が抑制されることを報告した。ZSTK474 は *in vitro* でリンパ球や滑膜細胞増殖を抑制し、さらに *in vitro* および *in vivo* における破骨細胞形成を阻害した。PI3K は様々なリウマチ性疾患の慢性炎症や自己免疫異常の病態形成に関わっており、その阻害薬の今後の治療への可能性が期待される。

はじめに

リウマチ性疾患は全身性の慢性炎症性疾患であり、多くの疾患で自己免疫異常が認められる。関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 治療では、メトトレキサートおよび主に TNF を標的とした生物学的製剤により炎症のコントロールが可能となり

つつある。また、全身性結合組織疾患のプロトタイプである全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) においても分子標的治療が試みられ、BlyS/BAFF に対するモノクローナル抗体は SLE 治療薬として欧米で承認された。一方で、生物学的製剤不応例の存在、注射薬であること、製造の高コストなどの面から、新たな経口低分子化合物の開発が盛んに行われている。細胞膜リン脂質に存在するホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ

(phosphoinositide 3-kinase : PI3K) は細胞の増殖・生存をはじめ、様々な細胞機能に関与する。PI3K 阻害薬の悪性腫瘍に対する治験が海外において複数進行中であるが、PI3K はリンパ球などの免疫担当細胞においても重要な役割を示し、リウマチ性疾患の病態との関連性が示唆されている。本項では、主に SLE と RA におけるリウマ PI3K に関する最近の知見について概説する。

PI3K とシグナル経路

細胞の脂質二重膜に存在する脂質成分は細胞内外の仕切りだけでなく、細胞内シグナル伝達にも寄与する。PI3K は植物、酵母からヒトまで種を超えて普遍的に存在する非常に保存された lipid signaling kinase で細胞膜の細胞質側に存在する。PI3K はクラス I, II および III に分類されるが、シグナル伝達に重要であるのはクラス I の PI3K である。クラス IA は触媒サブユニットである p110 α , p110 β , p110 γ と、制御サブユニットである p85 α (同じ遺伝子のスプライシングバリエーションである p55 α , p50 α) あるいは p85 β がヘテロ 2 量体を形成している。クラス IA の PI3K は、ホルモンや増殖因子の受容体、免疫系では T 細胞受容体, B 細胞受容体, Fc 受容体など種々の受容体からの刺激により、特異的チロシン残基がリン酸化され SH2 ドメインを

介して制御サブユニットが触媒サブユニットに結合し、制御サブユニットの抑制作用が減弱し酵素活性を示す。クラス IB は触媒サブユニット p110 γ と制御サブユニット p101 あるいは p84 のヘテロ 2 量体で形成され、ケモカイン受容体に代表される G-coupled protein receptor (GPCR) 下流で活性化される。PI3K α , PI3K β が種々の細胞に広く存在するのに対し、PI3K δ , PI3K γ は主に血液・免疫系の細胞への局在がみられる (表 1)¹⁾。

活性化した PI3K は、ホスファチジルイノシトール 2-リン酸 [PtdIns(4,5)P2] のイノシトール環第 3 位をリン酸化してホスファチジルイノシトール 3-

表 1 PI3K isoform とその発現

	触媒サブユニット		調節サブユニット	
	分子	発現	分子	発現
Class IA	p110 α	Broad, high in B cells	p85 α p55 α p50 α	Broad
	p110 β	Broad, low in B cells	p85 β	Broad
	p110 δ	Hematopoietic cells		
Class IB	p110 γ	Hematopoietic cells	p55 γ	Broad
			p101	Hematopoietic cells
			p84	High in heart

図 1 PI3K/Akt 経路と機能

リン酸 [PtdIns (3,4,5) P3 : PIP3] を産生する。PI3K 下流の主要なシグナル伝達蛋白として, Akt (別名 protein kinase B : PKB) があり, さらに下流の様々な分子を介して, 細胞の活性化や生存, 分化・増殖, 物質の輸送や分泌などの代謝, 細胞骨格の調節を介した運動性や形態の変化など様々な機能に関与する。PI3K の制御機構として, PTEN や SHIP が知られている (図 1)。

リンパ球における PI3K の役割

1. B 細胞

B 細胞は RA や SLE, ANCA 関連血管炎などの疾患における治療標的として注目されているが, PI3K を介したシグナルは B 細胞分化および生存・増殖に必要であり, V(D)J 遺伝子再構成やスラススイッチにも関与する。Pro-B 細胞における IL-7 受容体や, pre-B 細胞における B 細胞受容体を介した刺激において, PI3K を介したシグナルにより分化・増殖が起こる。p85 α 欠損マウスでは成熟 B 細胞減少, B 細胞増殖能低下が認められる。また, p110 δ が正常に発現しないマウスでは, 骨髄での B 細胞分化障害が認められ, B 細胞, T 細胞ともに抗原刺激における活性化・増殖能の低下がみられる²⁾。B 細胞分化には p85 α , p110 δ と p110 α が必要であり, p110 β は必須ではない^{3,4)}。また, B 細胞分化に強く関与している核内転写因子である FoxO1 のリン酸化による核内から排除に, PI3K/Akt 経路からのシグナルが関与している⁵⁾。さらに, 成熟 B 細胞においても CD19, BCAP, TC21 などのアダプター蛋白との相互作用により増殖などの細胞機能に関与する。

2. T 細胞

PI3K を阻害すると抗原刺激による T 細胞の活性化, CD69 や CD40L の発現, 細胞増殖などが抑制される。また, 最近では制御性 T 細胞 (Treg) の誘導における PI3K の関与が報告されている。CD4 陽性 T 細胞から TGF β によって誘導される Foxp3 の発現は, PI3K/Akt/mTORC1 経路の阻害により増加し, FoxO3a および FoxO1 が転写因子として重要であることが示されている⁶⁾。さらに, CD4T 細胞において mTOR を欠損させると, Th1, Th2 および Th17 細胞に分化できず, すべてが Treg に分化すること⁷⁾, mTORC2 構成分子である rictor を欠損させると Th1, Th2 細胞への分化が抑制され, Th17 と Treg への分化は正常であること⁸⁾が報告さ

れており, これから制御性 T 細胞の誘導における経路の解明が進んでいくと思われる。

全身性エリテマトーデスにおける PI3K

SLE の病因は不明であるが, その発症には複数の感受性遺伝子や免疫系の機能異常, 性ホルモン, 環境因子などが関与している。自己抗体は SLE 発症の数年前からすでに検出される⁹⁾。SLE では死細胞や免疫複合体の貪食能, クリアランス低下が知られており, 核酸など自己抗原に長期間暴露され, 自己反応性 B 細胞が高親和性の自己抗体を産生するようになりやがて発病に至るが, これには自己反応性 T 細胞の共刺激分子, 刺激に対する B 細胞自体の異常, 自然免疫系の関与などの機序が考えられている。シグナル伝達経路では, B 細胞受容体から抑制性シグナルを供給する Lyn, CD22, Fc γ R2, CD72 などの欠損マウスでは自己抗体が産生され腎炎を発症する。SLE 患者 B 細胞においてもこれらの分子を介したシグナル伝達が低下していることが知られている¹⁰⁾。

PI3K の制御サブユニットである p85 α の変異マウスや PTEN 欠損マウスでは, 胸腺や末梢での CD4 陽性 T 細胞増加がみられ, SLE 類似のリンパ増殖性病態を呈する¹¹⁾。ループス類似の MRL-*lpr* マウスでは, CD4 陽性細胞において Akt リン酸化がみられるが, PI3K γ 選択的阻害薬である AS-605240 の投与により CD4 陽性メモリー細胞減少および腎症の軽減が認められ, 生存期間が延長することが示されている^{12,21)}。Taher らは, SLE 患者 88 名と健常人 72 名の B 細胞を用いて細胞内蛋白のチロシンリン酸化を比較した。SLE では活動性に関わらず, より多くの細胞内蛋白がリン酸化されており, 成熟 B 細胞よりもメモリー B 細胞, 未熟 B 細胞で強く認められた¹³⁾。さらに, kimome array にて細胞内キナーゼ活性を解析したところ, SLE の B 細胞では 61 種類の protein kinase の活性化が健常人と有意に異なっており, PI3K, MAP, Rho, FAK, CDK-1, PKC などの活性増強, ATR などの活性減弱がみられた。実際に SLE 患者の末梢血 B 細胞では, Akt-1 のリン酸化が増強していることが示され, SLE では B 細胞における PI3K/Akt や Btk 経路が自己反応性 B 細胞の活性化や生存に関与していることが示唆されている。さらに別の報告でも SLE の末梢血単核球や T 細胞において PI3K の活性化が高頻度にみられること, SLE のメモリー

T 細胞におけるアポトーシス抵抗性および生存に PI3K δ が関与していることが示されている¹⁴⁾。

関節リウマチと PI3K

RA の病態における PI3K の関与を示す報告は今までに多くなされている。RA 患者の滑膜においては Akt など PI3K 下流のシグナル伝達分子が強くリン酸化し、逆に PTEN の発現は減弱している^{15,16)}。また、RA 患者末梢リンパ球刺激時の IL-17 産生は PI3K 阻害薬により抑制される¹⁷⁾。

我々は、コラーゲン誘発性関節炎 (collagen induced arthritis : CIA) マウスに PI3K 特異的アイソフォーム非選択的阻害薬である ZSTK474 を投与

し、関節炎抑制効果を検討した。ZSTK474 は、抗腫瘍効果を示すトリアジン系化合物としてスクリーニングされ¹⁸⁾、その後の解析で PI3K 特異的阻害薬と同定された高い特異性および阻害活性を有する薬剤で、マウスでは重篤な副作用なしに抗腫瘍活性を示す¹⁹⁾。約半数のマウスが関節炎を発症した day 28, すべてのマウスが関節炎を発症した day 31 の 2 通りの時期に ZSTK474 の 1 日 1 回経口投与を開始した。関節炎スコアおよび関節の病理所見を検討したところ、溶媒投与群に比べ ZSTK474 投与群では用量依存性に関節炎の抑がみられ、関節炎発症後の投与でも同様の効果が認められた (図 2)²⁰⁾。病理学的にも、炎症細胞浸潤の減少、滑膜増殖および

図2 ZSTK474 によるマウス CIA に対する効果

CIA マウスにおいて、A. 約半数のマウスが関節炎を発症した day 28, B. すべてのマウスが関節炎を発症した day 31, に ZSTK474 の 1 日 1 回、経口投与を開始した。

図3 ZSTK474 による破骨細胞形成抑制

	Histological score			The number of osteoclasts
	Synovium	Leukocyte	Cartilage / Bone	
Vehicle (n=6)	2.3 ± 0.8	1.7 ± 0.9	2.7 ± 0.6	62.0 ± 38.6
ZSTK474 (n=6, 50 mg/kg)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.3	0.3 ± 0.2
P value	0.009	0.073	0.036	0.024

図3 ZSTK474 による破骨細胞形成抑制

A. 単球系破骨細胞前駆細胞を、骨芽細胞および $1\alpha, 25-(OH)2D3$ (左), M-CSF および RANKL (右) 存在下で 5 日間培養し、破骨細胞数を測定し ZSTK474 の効果を検討した。

B. CIA マウスの炎症関節における組織スコアおよび破骨細胞数を測定し、ZSTK474 投与の *in vivo* における効果を検討した。

軟骨・骨破壊の抑制が認められた。ZSTK474 投与群での体重や脾重量の減少はなく、重篤な臓器傷害は認めなかった。また、ZSTK は *in vitro* における T 細胞, B 細胞, ヒト滑膜細胞の増殖を抑制し、さらに *in vitro* および *in vivo* において破骨細胞形成を阻害した (図 3)²⁰⁾。ZSTK474 の抗リウマチ作用はラットのアジュバント関節炎においてもみられ、MTX 併用により効果の増強が認められた。

その他のリウマチ性疾患

PI3K は線維芽細胞においても、EGF 刺激による TGF β 受容体の発現増強などに関与しており、強皮症の病態にも関与している可能性が示唆されている²¹⁾。さらには、脊椎関節炎のモデルマウスで PI3K 阻害薬は腱付着部炎による骨強直を抑制することが報告されており²²⁾、脊椎関節炎の骨増殖性病変に対して有効性が期待される。

おわりに

PI3K は様々な細胞において、リウマチ性疾患の慢性炎症や自己免疫異常の病態形成に関わっていると考えられる。その阻害薬は投与時期、アイソフォーム選択性、他の免疫抑制薬との併用などを検討することにより、今後の治療薬としての可能性が高まると考えられる。

文 献

- 1) Cantley LC.: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* ; **296** : 1655, 2002.
- 2) Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, et al. : Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* ; **297** : 1031, 2002.
- 3) Ramadani F, Bolland DJ, Garcon F, et al. : The PI3K isoform p110alpha and P110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal* ; **3** : ra50, 2010.
- 4) Suzuki H, Terauchi Y, Fujiwara M, et al. : Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* ; **283** : 390–392, 1999.
- 5) Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, et al. : Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr Opin Immunol* ; **23** : 178–183, 2011.
- 6) Harada Y, Harada Y, Elly C, et al. : Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med* ; **207** : 1381–1391, 2010.
- 7) Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al. : The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* ; **30** : 832–844, 2009.
- 8) Lee K, Gudapati P, Dragovic S, et al. : Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* ; **32** : 743–753, 2010.
- 9) Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. : Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* ; **349** : 1526–1533, 2003.
- 10) Flores-Borja F, Kabouridis PS, Jury EC, et al. : Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* ; **52** : 3955–3966, 2005.
- 11) Borlado LR, Redondo C, Alvarez B, et al. : Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* ; **14** : 895–903, 2000.
- 12) Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, et al. : PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* ; **11** : 933–935, 2005.
- 13) Taher TE, Parikh K, Flores-Borja F, et al. : Protein phosphorylation and kinome profiling reveal altered regulation of multiple signaling pathways in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* ; **62** : 2412–2423, 2010.
- 14) Suárez-Fueyo A, Barber DF, Martinez-Ara J, et al. : Enhanced phosphoinositide 3-kinase δ activity is a frequent event in systemic lupus erythematosus that confers resistance to activation-induced T cell death. *J Immunol* ; **187** : 2376–2385, 2011.
- 15) Zhang H, Wang Y, Xie J, et al. : Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt. *Arthritis Rheum* **44** : 1555–1567, 2001.
- 16) PAP T, Franz JK, Hummel KM, et al. : Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid

- arthritis : lack of expression of the murine tumor suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *2* : 59–64, 2002.
- 17) Kim KW, Cho ML, Park MK, et al. : Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **7** : 139, 2005.
- 18) Yaguchi S, Izumisawa Y, Sato M, et al. : In vitro cytotoxicity of imidazolyl-1,3,5-triazine derivatives. *Biol Pharm Bull* **20** : 698, 1997.
- 19) Yaguchi S, Fukui Y, Koshimizu I, et al. : Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst* **98** : 545, 2006.
- 20) Toyama S, Tamura N, Haruta K, et al. : Inhibitory effects of ZSTK474, a novel phosphoinositide-3 kinase on osteoclasts and collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* **12** : R92, 2010.
- 21) Yamane K, Ihn H, Tamaki K. : Epidermal growth factor up-regulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in human dermal fibroblasts by phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway : Resistance to epidermal growth factor stimulation in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **48** : 1652–1666, 2003.
- 22) Mori S, Kamachi F, Sasaki A, et al. : ZSTK474, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, ameliorates ankylosing enthesitis in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* **60** (Suppl 10) : 1442, 2009.