

博士論文

ONO-4641 の新規適応症探索に関する研究
(Exploring for novel indications of ONO-4641)

2021年3月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

塩屋 裕樹

立命館大学審査博士論文

ONO-4641 の新規適応症探索に関する研究
(Exploring for novel indications of ONO-4641)

2021 年 3 月

March 2021

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy

Graduate School of Pharmacy

Ritsumeikan University

塩屋 裕樹

SHIOYA Hiroki

研究指導教員：浅野 真司教授

Supervisor : Professor ASANO Shinji

目次

緒言	1
方法	6
第一部 ONO-4641 の 1 型糖尿病モデルにおける有効性.....	12
結果	12
考察	16
第二部 ONO-4641 の再生不良性貧血モデルにおける有効性	21
結果	21
考察	26
結語	29
謝辞	30
参考文献	31
図表	38

緒言

Sphingosine 1-phosphate (S1P) は Ca^{2+} の細胞内取り込み、細胞骨格再構成、並びに細胞増殖・分化・生存及び運動性を含む、様々な生物学的プロセスの調節において重要な役割を果たすスフィンゴ脂質代謝産物である。スフィンゴ脂質は膜脂質のファミリーであり、当初、脂質二重層の構成要素として主に構造的役割を果たすと考えられていたが、現在ではスフィンゴ脂質代謝が ceramide、sphingosine、S1P などの細胞増殖、生存、及び死において必須の役割を果たす活性メディエーターを生み出すことが知られている (Figure 1, Spiegel and Kolesnick, 2002)。S1P は sphingosine kinase (SPHK) による sphingosine のリン酸化で生成される一方、S1P phosphatase により sphingosine に脱リン酸化、S1P lyase (SGPL) により hexadecanal と ethanolamine phosphate に分解される 2 つの経路により、その濃度が調整されている。

S1P は S1P 受容体 (S1PR) である S1PR1-S1PR5 を介してシグナル伝達することによって生理機能を媒介する (Figure 2, Anliker and Chun, 2004)。S1PR 作動薬の Fingolimod (FTY720) は再発寛解型の多発性硬化症 (Multiple Sclerosis、以下 MS) の予防薬として臨床試験で効果を示し (Cohen et al., 2010)、既に上市済みである。免疫抑制剤である FTY720 は、生体内では S1P が sphingosine から生成されるのと同様に SPHK2 によってリン酸化されることで活性代謝物である FTY720-phosphate (Paugh et al., 2003) となり、4 つの S1PR (S1PR1、S1PR3、S1PR4 及び S1PR5) の非選択的 S1PR 作動薬として働いて末梢血のリンパ球を減少させる (Figure 3; Brinkmann et al., 2002; Matloubian et al., 2004; Yanagawa et al., 1998)。S1PR1 欠損マウスを用いた試験 (Mandala et al., 2002) では、S1PR1 が血中へのリンパ球再循環に必要であることが示された。S1P は血中に高濃度 (100-300 nM) で存在し、その濃度勾配により S1PR1 発現リンパ球のリンパ系組織から血中への遊走が誘導される (Anliker and Chun, 2004; Lo et al., 2005; Pappu

et al., 2007; Pyne and Pyne, 2000)。S1PR5 は中枢神経系、特にオリゴデンドロサイト及び脳内皮細胞に高度に発現する。脳内皮細胞上の S1PR5 の活性化は *in vitro* においてバリア機能を増強し、単球の経内皮遊走を抑制した (van Doorn et al., 2012)。以上の背景から FTY720 の MS における効果は S1PR1 及び S1PR5 を介していると考えられている。一方で、げっ歯類を用いた試験では、S1PR3 活性が心拍数減少などの FTY720 の心血管系の副作用と関連することが示唆されている (Forrest et al., 2004; Sanna et al., 2004)。したがって、S1PR3 活性への選択性を向上させた S1PR 作動薬が副作用を軽減するためには有用であるという仮説を立てた。S1PR3 活性を持たない S1PR 作動薬を探索した結果見出した ONO-4641 (1-({6-[(2-methoxy-4-propylbenzyl)oxy]-1-methyl-3,4-dihydronaphthalen-2-yl}methyl)azetidione-3-carboxylic acid; ceralifimod; Figure 4) は、S1PR1 及び S1PR5 に選択的な第二世代 S1PR 作動薬であり、免疫、特にリンパ球が介在する疾患の治療薬として期待される (Figure 3; Kurata et al., 2017)。FTY720 や ONO-4641 などの S1PR 作動薬はリンパ球の S1PR1 ダウンレギュレーションを引き起こし、リンパ球を二次リンパ組織の S1P 濃度勾配に無反応にする (Figure 5)。その結果、S1PR 作動薬は二次リンパ組織からのリンパ球移出を阻害することにより末梢血リンパ球数を減少させる (Matloubian et al., 2004; Komiya et al., 2013; Kurata et al., 2017)。MS はリンパ球浸潤を特徴とし、MS 治療の第 II 相臨床試験において ONO-4641 の用量依存的な有効性が示された (Zipp et al., 2013)。このことは ONO-4641 が他のリンパ球介在性自己免疫疾患に対する有効性を示す可能性を示唆している。

なお、実際に ONO-4641 と同じ第二世代の S1PR 作動薬である siponimod (Kappos et al., 2018) 及び ozanimod (Cohen et al., 2019) は、S1PR1 及び S1PR5 に対して高い選択性を示し、MS の治療薬として承認されている。他にも近年多くの S1P に着目した薬剤候補の臨床開発が行われている (Table 1, Cartier and Hla, 2019) が、SPHK1、SPHK2 や SGPL1 といった S1P 生合成・代謝阻害を目的とし

た酵素阻害剤への着目は限定的であり、多くが S1PR を標的とした薬剤候補である。その理由として、S1P 関連酵素阻害は、S1P のみならず Figure 1 に示す様な他のスフィンゴ脂質、更に他のリン脂質の代謝にも影響を与えることが挙げられる。この非限定的な作用が、有効性を限定的にし、かつ副作用の発現に繋がると考えられている。いずれにせよ、S1PR1 への選択性を高めた S1PR 作動薬は、S1P にフォーカスした薬剤の中で最も注目されたカテゴリーであり、多くの薬剤候補が存在する。S1PR 作動薬は MS 以外にも、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、乾癬、アトピー性皮膚炎、リウマチといった多様な自己免疫疾患での開発が進められており (Cartier and Hla, 2019)、今後も更なる対象疾患の広がりが期待できる。

1 型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus、以下 T1DM) は組織特異的な慢性自己免疫疾患で、膵島内で血糖値に応じてインスリンを分泌する β 細胞の機能障害・喪失が観察されている。 β 細胞の喪失はインスリン欠乏や糖尿病の原因となるため、その早期診断による β 細胞の喪失予防、より良い治療選択肢の開発など、患者の生活の質や予後を改善するために相当な努力が必要である。現在の T1DM の治療法であるインスリン投与による血糖コントロールの有用性は限られていることから、2018 年に本邦で 2 型糖尿病治療薬の sodium glucose cotransporter 2 阻害剤がインスリン併用の条件付きで T1DM にも適応拡大されるなど、現在も新規の治療法が必要とされている。T1DM の病因は完全には解明されていないが、その発症には T リンパ球を介した β 細胞の破壊が関与していると考えられている (Katsarou et al., 2017)。FTY720 は T1DM モデル動物である非肥満糖尿病 (non-obese diabetic; NOD) マウスにおいて有効であることが報告されている (Maki et al., 2005)。そこで第一部では、S1PR3 活性に対する選択性を改善した ONO-4641 が、FTY720 と同様の有効性が得られると推測し、NOD マウスを用いて T1DM に対する第二世代 S1PR 作動薬 ONO-4641 の非臨床有効性を評価した。

再生不良性貧血 (aplastic anemia、以下 AA) は後天性の骨髄機能不全症候群である (Young et al., 2008)。AA では大半の症例にて自己寛容の破綻が傷害性ヘルパーT リンパ球 (Th1) の骨髄 (bone marrow; BM) への浸潤につながり、Th1 は造血幹細胞を標的として攻撃、バイスタンダー効果により間質細胞を危険にさらすことが示唆される (Chen et al., 2005; Young et al., 2008)。その結果、骨髄における造血幹細胞・前駆細胞 (hematopoietic stem and progenitor cells、以下 HSPC) の集団は破壊される。AA 患者では、血小板、赤血球及び白血球を補充する能力がないため、出血、低酸素症、及び感染のリスクが高くなる。無治療のまま放置すると AA は致命的となる (Dezern and Brodsky, 2011)。AA の病理は前述の様に十分に定義されているものの、疾患を進行させる分子機構は解明されていない。その原因は、MS などの他の自己免疫疾患とは異なり、T 細胞応答を誘発する自己抗原は未だ同定されていないからである (Young et al., 2018)。しかし、脾細胞もしくはリンパ節 (lymph node; LN) 細胞をマイナー組織適合性もしくは主要組織適合性の不適合レシピエントマウスに移植して骨髄細胞及び HSPC を標的とする免疫応答を誘導することにより、AA 症状が観察される免疫介在性骨髄機能不全マウスモデルが開発されている (Bloom et al., 2004; Chen, 2005; Chen et al., 2007)。この実験的 AA マウスモデルは AA の臨床的特徴の多くを示し、疾患の基礎となる機構を研究、治療薬候補の効果を試験するための優れたモデルであり、有用性は十分に確立されている (Bloom et al., 2004; Chen et al., 2007)。本モデルでは、骨髄における大量のリンパ球浸潤を原因として骨髄内の HSPC の深刻な破壊が引き起こされる。また、S1P は HSPC の化学遊走物質として作用、髄外組織からの HSPC の放出は S1PR1 に依存することが報告されている (Massberg et al., 2007)。そこで第二部では、LN 細胞を放射線照射レシピエントマウスに移入することにより作製した実験的 AA マウスモデルにおける第二世代 S1PR 作動薬 ONO-4641 の有効性を評価した。加えて、免疫抑制剤であり、

既存薬として使用されている cyclosporine と併用した場合の ONO-4641 の有効性についても検討した。

方法

化学物質

ONO-4641 は小野薬品工業株式会社から提供された。FTY720 は Cayman Chemical から、plerixafor は Sigma-Aldrich から、cyclosporine は Novartis から Neoral Oral Solution 100 mg/ml として入手した。

実験動物

雌性 NOD/ShiJcl マウス（以下、NOD マウス）は、日本クレア株式会社より入手した。雄性近交系 C57BL/6NCr マウス（以下、B6 マウス）及び雄性 hybrid (B6 and BALB/c) F1 マウス（以下、CBF1 マウス）を日本エスエルシー株式会社から入手した。すべてのマウスを温度（ $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）、湿度（ $55\pm 15\%$ ）、換気（100%新鮮外気にて 15 ± 5 回/時間）、照明（蛍光灯により明暗 12 時間サイクル）の環境で飼育した。

すべての動物実験は小野薬品工業株式会社「動物実験に関する規程」を遵守して実施し、国の規制及びガイドラインに基づき、動物実験等管理委員会で審議し、研究機関の長の承認を得た。

マウス末梢血リンパ球数の測定

NOD マウスもしくは CBF1 マウスに 0.01、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg の ONO-4641、媒体 (vehicle) として 0.5w/v% Methyl Cellulose 400 cP Solution (Wako、以下 0.5%MC) を単回経口投与した。投与後 24 時間にマウスの腹部大静脈より血液を採取し、末梢血リンパ球数を多項目自動血液分析装置 (SF-3000、シスメックス) で測定した。

NOD マウスを用いた糖尿病の予防効果の評価

糖尿病の発症は、2回の測定時点で血漿中グルコース濃度が 200 mg/dl 以上となった時点と定義した。ONO-4641 の予防効果を、糖尿病を発症したマウスの割合として糖尿病発症率により評価した。18 及び 19 週齢時の血漿中グルコース濃度を測定し、糖尿病を発症した動物の 19 週齢時の血漿中グルコース濃度に群間差がみられないように割り付けた。0.5%MC を媒体として調製した ONO-4641 (0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg)、FTY720 (1 mg/kg) もしくは 0.5%MC (対照) を群分け日 (19 週齢) から 43 週齢まで NOD マウスに 1 日 1 回 24 週間経口投与した。Kaplan-Meier 法による生存曲線を作成し、糖尿病発症率をログランク検定により対照群と各投与群とで比較し、P 値 5%未満で統計学的に有意とした。

NOD マウスを用いた糖尿病の治療効果の評価

ONO-4641 の治療効果は、糖尿病の有病率 (血漿中グルコース濃度が 200 mg/dl 以上のマウスの割合) によって評価した。20-26 週齢の間に糖尿病を発症した NOD マウスを選択して群分けし、0.5%MC を媒体として調製した ONO-4641 (0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg)、FTY720 (3 mg/kg)、及び 0.5%MC (対照) を各群に 1 日 1 回 12 週間連日経口投与した。有病率について、Fisher 直接確率検定を用いて対照群と各投与群を比較した結果、P 値 5%未満で統計学的に有意とした。なお、血漿中グルコース濃度が 200 mg/dl 以上の死亡例は、死亡後も糖尿病マウスとして取り扱った。

血漿中グルコース濃度及びインスリン濃度の測定

週 1 回 (午前中) に覚醒下にてヘパリン処理済キャピラリーチューブ (Drummond Scientific Company, 75 mm length, Heparinized) を用いて尾静脈から少なくとも 20 μ l の血液を採取した。被験物質投与期間中は、採血当日の投与前に採血を行った。採血した血液は遠心分離 (4°C、13,000g、3 分間) して血漿を調製し、測定まで氷冷保管した。グルコース CII Test Wako kit (Wako) にて血漿

中のグルコース濃度を測定し、残りの血漿を-80°Cで保存した。治療効果の評価では、群分け日及び投与開始 12 週後に採取した血漿中インスリン濃度を LBIS Mouse Insulin ELISA Kit (Wako) を用いて測定した。なお、血漿中インスリン濃度が定量限界未満 (0.156 ng/ml 未満) の試料については、その値を定量限界値 (0.156 ng/ml) として示した。評価指標として利用した残存インスリン分泌能 (residual insulin secretion ability) は、群分け日の血漿中インスリン濃度に対する投与開始 12 週後の血漿中インスリン濃度の比とした。

実験的 AA モデルを用いた評価

レシピエントである CBF1 マウスに、X 線照射装置 (MBR-1520R-3、日立パワーソリューションズ) から亜致死量の 4 Gy の全身照射 (Total body irradiation、以下 TBI) を行った。5-8 時間後、ドナーである B6 マウス由来の 5×10^6 LN 細胞の静脈内注射により骨髄不全を誘導した (病態惹起)。LN 細胞は B6 マウスの鼠径、上腕、腋窩及び腸間膜リンパ節から調製した。各実験では、LN 細胞注入なしで 4 Gy の TBI のみを受けたマウスを対照として使用した。LN 細胞注入 14 日後にマウスから血液を採取して、末梢血リンパ球数を多項目自動血液分析装置 (SF-3000) で、大腿骨中の骨髄細胞数を FACScalibur フローサイトメーター (BD Biosciences) で測定した。

0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg の ONO-4641 を TBI 処置及び LN 細胞注入の翌日 (病態惹起 1 日後) から 13 日間、1 日 1 回連日経口投与した。血小板数減少後である病態惹起 4 日後からマウスに投与した治療レジメン (delayed treatment) では、0.3 mg/kg の ONO-4641 を 10 日間連日経口投与した。6 及び 30 mg/kg の cyclosporine を 13 日間、1 日 2 回連日経口投与した。2 剤併用試験では、0.1 mg/kg の ONO-4641、15 mg/kg の cyclosporine を単独、もしくは併用で病態惹起 1 日後から 13 日間投与した。対照マウスには同容量の 0.5%MC を投与した。

フローサイトメトリー及び細胞内サイトカイン染色

骨髄細胞は、PBS (Phosphate Buffered Saline) 6 ml で大腿骨内を洗浄して調製し、ACK lysis buffer (Lonza) で溶解して赤血球を除去した後、洗浄して stain buffer (BD Biosciences) に懸濁した。その後、免疫グロブリン G の Fc 受容体を遮断するために anti-CD16/CD32 (BD Biosciences) と共に細胞をインキュベートし、続いてドナー由来 T リンパ球サブセットの染色のために PE-conjugated anti-H-2Kd、PerCP-conjugated anti-CD3、FITC-conjugated anti-CD4 及び APC-conjugated anti-CD8a (いずれも BD Biosciences) で表面を染色した。サイトカインを検出するために、骨髄細胞を brefeldin A (5 mg/ml) の存在下で PMA (50 ng/ml) と ionomycin (500 ng/ml) にて 37°C で 4 時間刺激した。細胞表面抗原の検出のため、PerCP-conjugated anti-CD4 及び APC-conjugated anti-CD8a (いずれも BD Biosciences) で染色した。細胞内サイトカインの検出のため、細胞を 2% Paraformaldehyde (PFA) で固定し、0.5% saponin (Sigma-Aldrich) で透過処理した後、Alexa fluor 647-conjugated anti-IFN- γ 及び PE-conjugated IL-17A (いずれも BD Biosciences) で染色した。HSPC を検出するために、CD3e、CD11b、CD45R、Ly-6G/Ly6C 及び TER-119 に対するビオチニル化抗マウス抗体の混合抗体カクテルで細胞を染色し、次いで、PerCP-conjugated streptavidin、FITC-conjugated anti-CD34、PE-conjugated anti-Sca-1(Ly-6A/E) 及び APC-conjugated anti-c-Kit (いずれも BD Biosciences) を使用して細胞を染色した。各染色/洗浄段階の後、400 g、4°C で遠心分離により細胞を回収した。すべての試料を FACSCalibur フローサイトメーターで分析した。

免疫染色標本の調製

NOD マウスの治療効果を評価した全群のマウスの最終採血終了後、動物をペントバルビタールで麻酔し、開腹後、放血致死させて膵臓を摘出した。加えて、糖尿病未発症 (未発症群) 及び発症翌日 (発症直後群) のマウスも採血終了後に同様に膵臓を摘出した。摘出した膵臓は、IHC Zinc Fixative 溶液 (BD Bioscience)

にて固定した。膵臓のパラフィンブロックを作製し、膵臓全体が確認できるように長軸方向に3連続で薄切した。最初の切片を抗インスリン抗体 (DAKO) で免疫染色し、ヘマトキシリン (Polysciences) で免疫染色した (以下、抗インスリン抗体染色標本)。2枚目の切片を抗 CD3 抗体 (BD Bioscience) で免疫染色した後、ヘマトキシリン染色を行った (以下、抗 CD3 抗体染色標本)。残りの切片をヘマトキシリン及びエオシン (Polysciences) 染色した (以下、HE 染色標本)。

実験的 AA モデルでは病態惹起 14 日後に大腿骨を採取し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に 48 時間固定して脱灰した後、使用まで 70%エタノール中に 4°C で保存した。その後、パラフィンブロックを作製して切片化し、ヘマトキシリン及びエオシン染色した。

NOD マウスの免疫染色標本の解析

抗インスリン抗体染色標本、抗 CD3 抗体染色標本及び HE 染色標本について膵臓全体を網羅し、且つ画像の連続性を確認できるような重複箇所を含む複数枚の部分画像を撮影した。抗インスリン抗体染色標本の各膵島を拡大した画像から、画像解析ソフトウェア (Win Roof Ver.5.6) を用いてインスリン陽性面積 (mm^2) を算出した。

コロニー形成アッセイ

コロニー形成単位 (CFU) 数の評価のため、病態惹起 14 日後にマウスから大腿骨内の骨髓細胞を採取した。骨髓細胞は、Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) 及び Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) は含まずに recombinant IL-3、Stem cell factor (SCF) 及び IL-6 を含むメチルセルロース培地 (MethoCult M03434、Stem Cell Technologies) に懸濁した。TBI のみを実施したマウスから採取した骨髓細胞を 2×10^4 細胞/ml で播種し、顆粒球/マクロファージコロニー形成単位 (CFU-GM) を測定した。TBI 処置及び LN 細胞注入を

受けたマウス由来の骨髄細胞を、TBI 単独処置マウスと同じ希釈法で調製した。12 日間、37°Cで培養後、倒立顕微鏡を用いてコロニー形成の形態学的分析を行った。

マウス HSPC の末梢血動員

B6 マウスに PBS もしくは 3 mg/kg の plerixafor を皮下投与し、30 分後に 0.5% MC もしくは 0.3 mg/kg の ONO-4641 を経口投与することで 8 日間連日投与した。最終投与 3 時間後、マウスから採血し、前述の様に FACSCalibur フローサイトメーターを用いて大腿骨の HSPC 及び骨髄細胞、並びに血液中 HSPC を測定した。

統計解析

SAS System Release 9.2 TS 2 M 3 (SAS Institute Japan Inc.) 及びその連動システム EXSUS Version 7.7.1 (CAC Croit Corporation) を用いて統計解析を行った。特別に方法を明記した場合を除いて、統計学的な有意性は 2 群比較の実験では t 検定により、複数用量を投与した群と対照群を比較した実験では Dunnett 検定により判定した。P 値 5%未満を統計的有意とした。

第一部 ONO-4641 の 1 型糖尿病モデルにおける有効性

結果

ONO-4641 の T1DM モデル発症予防効果

T1DM モデル動物である NOD マウスを用いて ONO-4641 の発症予防効果を検討した。ONO-4641 は経口投与後 24 時間で用量依存的な末梢血リンパ球減少作用を示し、最高用量の 0.1 mg/kg で約 80% のリンパ球減少作用が認められた (Figure 6, Komiya et al., 2013)。本データに基づき、ONO-4641 は 3 用量 (0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg) を設定した。FTY720 は 1 mg/kg で NOD マウスにおける糖尿病発症を完全に予防することが報告されている (Maki et al., 2005) ことから、FTY720 の投与用量は 1 mg/kg とした。

対照群 (Control) の糖尿病発症率は投与開始 7 週後までは 0% であったが、投与開始 24 週後までには 40% まで徐々に上昇したのに対し、ONO-4641 投与群では群投与開始 24 週後でも低く、0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg の用量でそれぞれ 11%、10% 及び 0% であった。更に、ログランク検定により対照群と比較して 0.1 mg/kg の用量で ONO-4641 の有意な予防効果が示された (Figure 7)。なお、陽性対照である FTY720 も 1 mg/kg の用量で有意な予防効果を示した。

対照群の血漿中グルコース濃度は、投与開始 8 週後から上昇・変動し、投与開始 24 週後に 255.3 ± 73.65 mg/dl と緩やかに上昇した (Table 2)。0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群の血漿中グルコース濃度も投与開始 13 週後から増加し、投与開始 24 週後に 206.4 ± 75.44 mg/dl であった。一方、0.03 及び 0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群の血漿中グルコース濃度は、投与開始 24 週後においてそれぞれ 135.0 ± 9.21 mg/dl 及び 116.9 ± 6.71 mg/dl と、対照群と比較して低値を維持していた。しかし、各 ONO-4641 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。また、1 mg/kg の FTY720 投与群の血漿中グルコース濃度は、投与開始 24 週後

において 122.4 ± 6.07 mg/dl と、対照群と比較して低値で維持された。血漿中グルコース濃度について、FTY720 群と対照群との間に有意差は認められなかった。

各群の血漿中グルコース濃度の個別の推移 (Figure 8) では、対照群の 10 例中 2 例及び 0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群の 10 例中 1 例では血漿中グルコース濃度が 600 mg/dl 以上であった。一方、0.03 mg/kg の ONO-4641 投与群では発症が認められたマウスが存在したものの、血漿中グルコース濃度の有意な上昇は認められなかった。0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群及び 1 mg/kg の FTY720 投与群では発症が完全に抑制され、血漿中グルコース濃度が 200 mg/dl 以上に達したマウスは認められなかった。

ONO-4641 の T1DM モデルの治療効果

T1DM モデル動物である NOD マウスを用いて ONO-4641 の治療効果を評価した。前述の実験と同用量の ONO-4641 を用いた。3 mg/kg の FTY720 は NOD マウスの糖尿病に治療効果を示すことが報告された (Maki et al., 2005) ことから、FTY720 の投与用量を 3 mg/kg とした。

対照群 (Control) の糖尿病有病率は投与開始 1 週後に 67% を示すなど一時的に低下したが、その後上昇し、投与開始 8 週後には 100% となり、試験終了時まで持続した (Figure 9) 。0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群の糖尿病有病率は対照群と同程度であった。これらの群とは対照的に、0.03 及び 0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群では糖尿病有病率が投与開始 1 週後から 7 週後まで減少し、対照群と比較して低値のままであった。投与開始 12 週後の糖尿病有病率は対照群で 100% であったが、0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群で 100%、0.03 mg/kg 投与群で 50%、0.1 mg/kg 投与群で 13% であった。また、0.03 及び 0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群は対照群と比較して有意に低値を示し、ONO-4641 の T1DM に対する治療効果が確認された。3 mg/kg の FTY720 投与群の投与開始 12 週後の糖尿病有病率

も 22%と対照群に比べて有意に低値を示し、陽性対照の FTY720 も 3 mg/kg と高用量ではあるが T1DM への治療効果を有することが示された。

各群の血漿中グルコース濃度は対照群の血漿中グルコース濃度は投与開始 5 週後にかけて徐々に上昇し、投与開始 8 週後に最大 596.4 ± 96.98 mg/dl を示し、投与開始 12 週後には 525.9 ± 96.95 mg/dl を示した (Table 3)。0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群の血漿中グルコース濃度は、有意ではないものの対照群より高値を示し、対照群と同様の推移を示した。一方、0.03 mg/kg の ONO-4641 投与群の血漿中グルコース濃度は、有意ではないものの投与開始 2 週後から対照群に比べ低値で推移した。また、0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群の血漿中グルコース濃度は、投与開始 1 週後から対照群に比べ低値で推移し、投与開始 5 及び 8 週後において有意に低値であった。陽性対照の 3 mg/kg の FTY720 投与群の血漿中グルコース濃度は対照群に比べ低値で推移し、投与開始 7、8 及び 9 週後において有意に低値を示した。

血漿中グルコース濃度の個別の推移 (Figure 10) では、対照群の投与開始 1 週後から投与開始 7 週後にかけて血漿中グルコース濃度が 200 mg/dl 未満を示す例も散見されたが、投与開始 12 週後までに全例が 200 mg/dl 以上となった。0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群は、対照群と同様の推移を示した。一方で、0.03、0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群、及び 3 mg/kg の FTY720 投与群における血漿中グルコース濃度は、いずれも投与開始 2 週後にかけて血漿中グルコース濃度が低下する動物が多数みられ、ほとんどのマウスで 200 mg/dl 未満となった。しかし、一部のマウスでは濃度が緩徐に上昇して最終的に 600 mg/dl を超えたように、有効性には個体差が認められた。

ONO-4641 の T1DM モデルにおける膵島保護作用

治療効果の評価終了後に各群の膵臓内インスリン陽性面積を比較した (Figure 11)。未発症群 (No Onset) のインスリン陽性面積は 0.128 ± 0.0472 mm² であった。

発症直後群 (Immediately after onset) のインスリン陽性面積は $0.074 \pm 0.0325 \text{ mm}^2$ であり、未発症群と比較して低値であった。対照群 (Control) のインスリン陽性面積は $0.015 \pm 0.0075 \text{ mm}^2$ であり、未発症群と比較して有意に低かったが、発症直後群では有意ではなかった。0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群のインスリン陽性面積は $0.002 \pm 0.0011 \text{ mm}^2$ であり、対照群と比較して低値を示した。しかし、0.03、0.1 mg/kg ONO-4641 投与群及び 3 mg/kg の FTY720 投与群のインスリン陽性面積はそれぞれ $0.027 \pm 0.0174 \text{ mm}^2$ 、 $0.039 \pm 0.0352 \text{ mm}^2$ 及び $0.040 \pm 0.0225 \text{ mm}^2$ であり、対照群に比べて高値を示した。

また、群分け日の血漿中インスリン濃度に対する投与開始 12 週後の血漿中インスリン濃度の割合として残存インスリン分泌能を算出し、対照群、ONO-4641 投与群、FTY720 投与群で比較した (Figure 12)。0.01 mg/kg の ONO-4641 投与群の残存インスリン分泌能は 4% であり、対照群の 17% と比較して 13 ポイント低下した。一方、0.03、0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群及び 3 mg/kg の FTY720 投与群の残存インスリン分泌能は、対照群と比較して高値を示し、それぞれ 33%、53% 及び 33% であった。血漿中インスリン濃度は ONO-4641 の高用量投与で高い傾向が示された。本傾向は Figure 11 に示した膵島におけるインスリン陽性領域の傾向と類似している。また、投与開始 12 週後の各個体の血漿中インスリン及びグルコース濃度の相関 (Figure 13) では、糖尿病が寛解したすべてのマウス (血漿中グルコース濃度 $< 200 \text{ mg/dl}$) が、血漿中インスリン濃度 0.7 ng/ml 以上を維持した。一方、血漿中インスリン濃度が定量下限 (0.156 ng/ml) 以下であった低インスリンレベルのマウスは、すべて血漿中グルコース濃度が 600 mg/dl 以上の重度の糖尿病であった。

各群の膵臓のインスリン及び CD3 陽性領域の典型的な個別染色像 (Figure 14) において、CD3 陽性細胞の浸潤は全ての群のインスリン陽性領域の周囲で認められた。各群間の膵臓に浸潤した CD3 陽性細胞 (T リンパ球) には明らかな差は認められなかった。

考察

第一部では、T1DM モデルにおける ONO-4641 の *in vivo* 試験での有効性を評価した。

S1PR1 及び S1PR5 の選択的作動薬である ONO-4641 は、FTY720 とは S1PR3 に対する選択性で異なる (Figure 3; Brinkmann et al., 2002; Komiya et al., 2013)。ONO-4641 を 0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg の用量で単回投与 24 時間後に、NOD マウスの末梢血中のリンパ球数がそれぞれ約 20%、60% 及び 80% 減少した (Komiya et al., 2013)。ONO-4641 は、この末梢血リンパ球減少作用同様に T1DM モデルの発症を用量に応じて抑制し、0.1 mg/kg の用量で発症を完全に抑制した。なお、本試験において、対照群の発症率は 43 週齢において 40% であり、動物のブリーダーから入手した 39 週齢での発症率は 68% との情報と比べると低い発症率であった。事前に実施した発症確認のための予備試験でも、投与開始 21 週後にあたる 40 週齢で 42% (59 例中 25 例発症) になるという類似データを得ており、この違いは、動物のロット差及び飼育環境の違いによる可能性が考えられた。本試験では 43 週齢まで評価したが、陽性対照である 1 mg/kg の FTY720 投与群で糖尿病発症が完全に抑制され、統計学的有意な差であったことから、本試験における発症抑制の評価は成立したと判断した。

また、投与開始 24 週後の血漿中グルコース濃度は、対照群が最も高く、次いで 0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg の ONO-4641 投与群の順であった。0.1 mg/kg の ONO-4641 投与による有意な予防効果と合わせ、血漿グルコース濃度の低下は、ONO-4641 が末梢血リンパ球数を低下させ、糖尿病の発症を抑制したことを示唆する。ONO-4641 はマウス MS モデルにおいて末梢血リンパ球の減少及び病変部への浸潤を抑制することにより疾患進行を抑制したことから (Komiya et al., 2013)、本試験においても ONO-4641 が脾臓へのリンパ球浸潤を抑制したものと推察さ

れ、先行試験 (Penaranda et al., 2010) における FTY720 の抑制作用と類似したメカニズムと考える。

治療効果の評価においても ONO-4641 は用量に応じて血中グルコース濃度を低下させ、糖尿病を寛解状態に導いた。T1DM は MS 同様に再発寛解型の傾向がヒトで報告されており、そのメカニズムとしては、膵島内 β 細胞を攻撃するエフェクター T リンパ球が膵臓内で増加して発症、その後に制御性 T リンパ球が増加することでそのエフェクター作用を抑制して寛解すると考察されている (von Herrath et al., 2007) ことから、マウスに限らずヒトにおいても発症後からの治療開始でも ONO-4641 の有効性が期待できる。また、膵島細胞の再生によるインスリン機能の回復がヒト及びげっ歯類で確認されており (Couri et al., 2006)、ONO-4641 の治療的投与によって病態の進行並びに更なる β 細胞の破壊を止めることにより、インスリン療法を必要としない患者が増える可能性がある。

本治療効果の評価における病理組織学的検査では、いずれの群でも膵島周囲に CD3 陽性細胞 (T リンパ球) の浸潤が認められた。これは NOD マウスの特徴的な膵島炎であり、本試験においても T リンパ球の T1DM 発症への関与が確認された。NOD マウスでは発症前の 3-4 週齢で膵島周囲のリンパ球浸潤が観察される (Jansen et al., 1994) ため、未発症群で膵島周囲に観察された T リンパ球浸潤は発症前に起こったものと考えられた。過去の報告 (Penaranda et al., 2010) から、FTY720 投与後、NOD マウスの膵島に既に浸潤していたリンパ球は除去されず、FTY720 の予防効果は膵島への新たなリンパ球の浸潤の抑制に関連することが示唆されている。本試験では、ONO-4641 投与群及び FTY720 投与群における糖尿病寛解例の膵島周囲にも T リンパ球浸潤が認められ、ONO-4641 及び FTY720 が膵島へのリンパ球のさらなる浸潤を抑制することにより治療効果を示したと考えられた。0.03 及び 0.1 mg/kg の ONO-4641 を投与したとき、インスリン陽性面積は対照群に比べて高値であった。このことから、ONO-4641 は膵島への T リンパ球浸潤を抑制し、それによって膵島のインスリン陽性細胞を保護

することが示唆された。しかしながら、今回の治療効果の評価では、ONO-4641 投与群と FTY720 投与群の T リンパ球浸潤の程度に対照群との明確な差は認められなかった。FTY720 の予防的投与における NOD マウスの膵臓に浸潤している T リンパ球サブセット解析 (Penaranda et al., 2010) では、FTY720 がヘルパー T リンパ球をわずかに減少させたが、制御性 T リンパ球を増加させる傾向があった。このことから、膵島における CD3 陽性細胞全体の組成変化の検出には限界があることが示唆された。NOD マウスの膵島では腫瘍壊死因子 (TNF- α) やインターフェロン γ (IFN- γ) などのサイトカインレベルが上昇すると報告されている (van Belle et al., 2011)。したがって、ONO-4641 の作用機序から、新たな T リンパ球の膵島へのさらなる浸潤を抑制し、IFN- γ の産生を抑制することが期待される。しかしながら、ONO-4641 による膵島でのサイトカイン産生の抑制を検証するためには更なる研究が必要であり、膵臓に浸潤している T リンパ球サブセットを明らかにする必要がある。さらに、ONO-4641 を 0.03 及び 0.1 mg/kg の用量で治療的に投与した場合、インスリン陽性面積及び残存インスリン分泌能は対照群よりも高かったが、その差は統計的に有意ではなかった。加えて、実験終了時の血漿中グルコース濃度に対する個々の血漿中インスリン濃度を比較した。低グルコース濃度であった糖尿病寛解マウスは末梢血中のインスリン濃度を 0.7 ng/ml 以上に維持したが、高グルコース濃度であった糖尿病マウスのインスリン濃度はほとんど検出限界以下であった。これは、保存された膵島細胞からのインスリン分泌の保持に基づいて ONO-4641 は治療効果を示した可能性を意味する。これらの結果は、ONO-4641 が膵島に浸潤する末梢リンパ球数を減少させ、それにより膵島のインスリン陽性細胞を保護することを示唆する。したがって、T1DM モデルにおける ONO-4641 の効果に関連する作用機序には、T リンパ球の膵島への浸潤抑制が関与している可能性がある。

ONO-4641 は投与中に末梢血リンパ球数の減少を維持することができるが、過去のラットを用いた研究 (Komiya et al., 2013) では ONO-4641 を 0.1 mg/kg とい

うリンパ球減少作用を十分に示す用量を経口投与しても、投与 96 時間後に完全に回復、その末梢血リンパ球数減少作用は可逆的であることが示されている。また、代謝を必要とするプロドラックではなく、そのものが活性本体であることから、生体における代謝に依存することなく活性本体量を調整しやすいことが推察できる。また、ヒト T リンパ球及び B リンパ球の *in vitro* 細胞機能評価に関して、ONO-4641 の抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による T リンパ球増殖及び IFN- γ 産生、並びに抗免疫グロブリン M 抗体及びインターロイキン 4 による B リンパ球増殖及び免疫グロブリン G 産生に対する作用を検討し、ONO-4641 は 1000 nM の濃度でもいずれのリンパ球の機能に対しても明らかな作用を示さなかった (Komiya et al., 2013)。本濃度は、*in vitro* Ca²⁺流入試験もしくは S1PR1 に対する cAMP 蓄積試験の 50%効果濃度 (EC50) (Kurata et al., 2017) の少なくとも 1000 倍以上である。これらの結果から、ONO-4641 は、リンパ球の機能に影響を及ぼすことなく再循環のみを調節することにより、病変部へのリンパ球浸潤を抑制して免疫調節作用を発揮することが示唆され、典型的な免疫抑制剤よりも安全性が高いと考えられる。したがって、T1DM 治療として薬物治療以外で行われている膵島移植に対して、術後の組織生着のために使用される免疫抑制療法としてより安全な治療法として ONO-4641 を使用する可能性も今後探っていきたい。

T1DM 患者は心血管疾患及び死亡のリスクがあり、非 T1DM の人々よりもそのリスクは 2-8 倍高い。慢性糖尿病の合併症は、細小血管症（糖尿病に特異的な腎症、神経障害、網膜症）と大血管症（冠動脈性心疾患、脳血管疾患、末梢動脈疾患）に分けられる。T1DM 患者の大血管疾患は、糖尿病ではない人々よりも進行が速く、T1DM が心不全を発症するリスクが非常に高いことを示すエビデンスが蓄積されつつある。T1DM における心血管疾患は主として冠動脈性心疾患であり、これは亢進したアテローム硬化過程を反映している。T1DM 患者における先天性心疾患の発症リスクは、一般集団と比較して男性で約 3 倍、女性で約 7

倍であり、脳卒中のリスクも増加する (Katsarou et al., 2017)。FTY720 は T1DM モデルにおいて有効性を示すが (Maki et al., 2005)、ヒトでは臨床試験で有害事象として報告されている高血圧を誘発する可能性がある (Kappos et al., 2006)。高血圧は T1DM の合併症発現の危険因子であり、また一般集団と比較して T1DM 患者では心疾患や脳卒中などの合併症のリスクが高いことから、高血圧を引き起こすような副作用の発現を避けるべきである。ONO-4641 は S1PR3 活性を持たないため、循環器系には影響しない可能性が考えられた。本試験の結果から、1 型糖尿病治療において、S1PR1/S1PR5 に選択的な ONO-4641 は有効性を示し、インスリン投与や非選択的 S1PR 作動薬よりも有用である可能性が示されたが、ONO-4641 と既存治療との心毒性の差異については、今後直接比較する臨床試験を実施し、検証していく必要があると考える。

以上、ONO-4641 は、マウス T1DM モデルにおいて、糖尿病の発症抑制、ならびに治療上の有用性を示した。そのメカニズムは、リンパ節からのリンパ球の移出を抑え、免疫反応を引き起こす末梢血リンパ球を減少させることで脾臓におけるインスリン産生細胞保護作用を示すものと考えられた (Figure 15)。

第二部 ONO-4641 の再生不良性貧血モデルにおける有効性

結果

ONO-4641 の CBF1 マウスにおけるリンパ球減少作用

ONO-4641 は、二次リンパ組織からのリンパ球移出を阻害することにより、各種動物の末梢血リンパ球数を減少させる (Komiya et al., 2013)。ONO-4641 によるリンパ球減少効果は MS 患者で認められている (Krösser et al., 2015)。そこで、最初にレシピエントである CBF1 マウスにおける ONO-4641 のリンパ球減少作用を評価した。ONO-4641 を 0.01、0.03、0.1 もしくは 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与した 24 時間後、末梢血リンパ球数は用量依存的にそれぞれ 6%、34%、62%及び 86%減少した (Figure 16)。

マウス骨髄不全モデルマウスにおける疾患表現型

実験的 AA モデルは、TBI した CBF1 マウスに B6 マウス由来の主要組織適合遺伝子複合体不適合 LN 細胞を注入することにより作製 (Chen et al., 2005) し、本モデルを用いて ONO-4641 の治療効果を検討した。レシピエント CBF1 マウスは、4 Gy の TBI と 5×10^6 の LN 細胞の注入 14 日後に、TBI 単独処置マウスと比較して、赤血球 (RBC)、血小板 (PLT)、白血球 (WBC)、及び末梢血好中球の消失を示した。ONO-4641 は 0.03 mg/kg 以上で正常 CBF1 マウスの末梢血リンパ球を有意に減少させた (Figure 16) ため、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg の用量を本モデルの評価に用いた。ONO-4641 もしくは 0.5%MC (Vehicle) を 13 日間連日経口投与した。投与は病態惹起 1 日後に相当する LN 細胞移入翌日から開始した (Figure 17A)。ONO-4641 は病態惹起 14 日後に RBC、PLT 及び好中球数を用量依存的に有意に増加させた一方、ONO-4641 は白血球数を増加させなかった (Figure 17B)。また、ONO-4641 を 0.3 mg/kg の用量での治療効果を評価するために、PLT 数の減少が認められた病態惹起 4 日後から投与を開始した (Figure

17A)。ONO-4641 の病態惹起 4 日後からの投与では、Vehicle 投与と比較して有意に高い PLT 数が認められたが、RBC 数及び好中球数は高値を示さなかった (Figure 17C)。

次に、骨髓異形成症候群及びヒト後天性 AA の治療に広く使用されている薬剤、cyclosporine の実験的 AA モデルにおける効果を評価した。cyclosporine の 6 及び 30 mg/kg を病態惹起 1 日後から 13 日間、1 日 2 回経口投与した。病態惹起マウスに cyclosporine を投与したところ、病態惹起 14 日後に PLT と好中球数が有意に高値を示した。cyclosporine 投与群の RBC 数は、Vehicle 群の RBC 数と比較して差はなく、低値であった (Figure 17D)。さらに、30 mg/kg の cyclosporine 投与群のマウスは、評価期間中に最大 18%まで体重が減少したが、これは cyclosporine の治療毒性の結果である可能性がある。ONO-4641 と cyclosporine において、いずれも最大有効投与量以下の用量を用いて 2 剤の併用効果を検討した。病態惹起 14 日後に 15 mg/kg の cyclosporine で引き起こされる RBC の減少は 0.1 mg/kg の ONO-4641 の併用で改善された。加えて、0.1 mg/kg の ONO-4641 と 15 mg/kg の cyclosporine を併用投与した結果、病態惹起 14 日後の WBC、PLT 及び好中球数は Vehicle 投与と比べて高値であった (Figure 17E)。

ドナー由来の T リンパ球の骨髓への浸潤阻害による骨髓細胞密度

TBI 処置及び LN 細胞注入により誘導された汎血球減少症の重症度は、骨髓細胞を攻撃し、破壊する免疫応答の関与を示唆した。TBI 単独処置マウスで TBI 処置 6 日後に大腿骨の骨髓細胞密度の中等度の消失を示した。しかし、その骨髓細胞密度はその後自然に回復した。対照的に、TBI 処置に加えて B6 マウスから採取した LN 細胞を注入したマウスは、TBI 処置 14 日後に骨髓腔に多数の空洞を伴う骨髓細胞密度の進行性の消失を示した (Figure 18A 及び B)。TBI 処置及び LN 細胞注入を受けたマウスにおいて、ONO-4641 もしくは 0.5%MC (Vehicle)

を病態惹起 1 日後から 13 日間連日経口投与し、ONO-4641 投与が骨髄細胞密度を増加させることを見出した (Figure 18B 及び C)。

ONO-4641 はリンパ球の再循環調整により、病変部へのリンパ球浸潤を阻害することが示されている (Komiya et al., 2013)。骨髄不全モデルにおける ONO-4641 の作用機序を理解するために、異なる T リンパ球のポピュレーションの関与と骨髄中 T リンパ球マーカーの解析による活性化機構の解明を試みた。B6 マウス由来の LN 細胞 (H2^{b/b}) を CBF1 マウス (H2^{b/d}) に注入した際の、フローサイトメトリー解析により移植した T リンパ球を同定するためにドナーマウスとレシピエントマウスの H-2Kd ハプロタイプの違いを利用した。すなわち、一定の骨髄細胞の中からレシピエント由来の H-2Kd 陽性細胞を除き、ドナー由来の CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球における IFN- γ 及びインターロイキン 17A (IL-17A) の発現を示した (Figure 18D)。ドナー由来の CD4 陽性 T リンパ球と CD8 陽性 T リンパ球の著しい骨髄への浸潤が、病態惹起 14 日後のマウスで観察された。ONO-4641 投与群では、ドナー由来の CD4 陽性及び CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が減少した (Figure 18D 及び E)。次に、骨髄中 CD4 陽性 T リンパ球において、Th1 及び Th17 免疫反応の代表的マーカーとして細胞内 IFN- γ 及び IL-17A の発現を分析した。Vehicle 群の骨髄でドナー由来の CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) リンパ球及び CD8 陽性 T リンパ球数は増加し、ONO-4641 を投与したマウスでは Th1 リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球サブセットの減少が認められた (Figure 18D 及び E)。CD4⁺IL-17A⁺ (Th17) リンパ球についても同様な傾向を示すものの、病態における骨髄での浸潤量がわずかであり、明確な結果ではなかった。ここで示されたドナー由来の T リンパ球浸潤の阻害は、ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用と関連している可能性がある。以上の結果から、ONO-4641 はドナー由来の CD4 陽性及び CD8 陽性 T リンパ球の骨髄への浸潤を阻害することにより、骨髄の細胞密度の破壊を抑制することが示唆された。

ONO-4641 投与後の HSPC 輸送の調節

S1PR1 は造血幹細胞にも発現しており、S1P は骨髄から血液への HSPC の放出を促進することが知られている (Massberg et al., 2007)。次に、ONO-4641 が本 AA モデルで骨髄中 HSPC 数に影響するかを検討した。続いて、Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ マーカー表現型に骨髄細胞を分析し、更にそれらを CD34 陽性と CD34 陰性分画に分けた。マウス骨髄 Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ 細胞は大部分が HSPC からなるが、骨髄 Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁻細胞は長期造血幹細胞を含むことが報告されている (Osawa et al., 1996)。

骨髄における Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺細胞及び Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁻細胞の数は、TBI 単独処置マウスと比較して、TBI 処置及び LN 細胞注入を受けたマウスで減少した (Figure 19A)。更に 0.3 mg/kg の ONO-4641 投与群では、TBI 処置及び LN 細胞注入での Vehicle 投与群及び TBI 単独の Vehicle 投与群と比較して、両細胞集団の数が有意に増加した (Figure 19A 及び B)。これらの変化の機能的役割を明らかにするために、CFU を定量化して造血活性を評価した。Vehicle 投与の TBI 処置及び LN 細胞注入群では、TBI 単独処置群と比較して、TBI 実施 14 日後の骨髄に存在する CFU-GM コロニー数が減少した。0.3 mg/kg の ONO-4641 投与群では、Vehicle 投与 TBI 処置及び LN 細胞注入群と比較して有意な増加が認められた (Figure 19C)。これらの結果は、ONO-4641 が AA モデルマウスの骨髄において HSPC 蓄積を誘導することを示唆する。

ONO-4641 と併用した場合の plerixafor 誘発 HSPC の末梢血動員の調節

plerixafor (AMD3100) は SDF-1 の受容体 CXCR4 への拮抗作用により、CXCR4 依存性 HSPC の末梢血動員を増強する (Broxmeyer et al., 2005)。S1P と SDF-1 の間のクロストークは骨髄の間質細胞と造血前駆細胞の運動性を調節する (Golan et al., 2012)。HSPC の調節における ONO-4641 の関与をさらに検討するため、plerixafor 誘発性前駆細胞動員モデルを用いた。正常マウスに ONO-4641、

plerixafor もしくは両剤を 1 日 1 回 8 日間投与し、HSPC の変化を評価した。骨髄での HSPC の顕著な変化は、ONO-4641、plerixafor もしくは併用のいずれも観察されなかったが、骨髄細胞は plerixafor 処理で減少した (Figure 20A)。既報 (Golan et al., 2012) のように、plerixafor 治療後の HSPC 数の増加が血液中に検出された。これとは異なり、血液中の HSPC 数は、ONO-4641 処理により低下した。マウスを plerixafor と ONO-4641 の併用により、plerixafor による血中 HSPC 増加は ONO-4641 により阻害され (Figure 20B)、ONO-4641 は CXCR4 依存性的機序による HSPC の末梢血動員を阻害することが示唆された。

考察

第二部では、実験的 AA マウスモデルを用いて、ONO-4641 の *in vivo* 作用の特徴を明らかにした。

これまでにヒト疾患のモデルマウスで示された S1PR 作動薬の作用は、様々なメカニズムに起因している。主な機構は、細胞表面での薬剤誘導 S1PR1 ダウンレギュレーションと考えられている。この S1PR1 のダウンレギュレーションは機能的拮抗作用 (Figure 3) と呼ばれ、二次リンパ組織からのリンパ球の放出を抑制することにより末梢血中のリンパ球の減少を引き起こす (Mandala et al., 2002; Schwab and Cyster, 2007)。ONO-4641 は、S1PR1 及び S1PR5 に選択的な第二世代の S1PR 作動薬であり、同様に細胞表面で S1PR1 のダウンレギュレーションを誘導することを確認している (Komiya et al., 2013)。その作用に基づき、ONO-4641 投与によりレシピエントの CBF1 マウスにおいても末梢血リンパ球数が用量依存的に減少した。なお、S1PR5 は中枢神経系にほぼ排他的に発現し、主にオリゴデンドロサイトに発現している (Jaillard et al., 2005) ことから、AA マウスモデルで認められた有効性に ONO-4641 の S1PR5 制御が寄与していない可能性が示唆される。

Chen らは、TBI を受けたレシピエントマウスに同種 LN 細胞を注入することによる免疫介在性骨髄機能不全マウスモデルを開発した (Chen et al., 2005)。その実験的 AA モデルで、最初に S1PR 作動薬 ONO-4641 が免疫介在病態を緩和することを示した。TBI 処置及び LN 細胞注入の翌日から投与開始した ONO-4641 は、用量依存的に RBC、PLT 及び好中球数を増加させた。一方、ONO-4641 はマウスの末梢血リンパ球が大部分を構成する白血球数を増加させなかった。Vehicle を投与した正常マウスのリンパ球数/白血球数比は 81% であり、0.3 mg/kg の ONO-4641 はリンパ球を減少させることにより 43% に減少させた (Figure 16)。この ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用は、白血球数の変動が僅かとなった

ことに関連していると考えられる。さらに、PLT 数の減少が観察される病態惹起 4 日後からの ONO-4641 の治療レジメン (delayed treatment) においても有効性を示した。しかし、その効果は低く、Vehicle 投与と比較して PLT 数は増加したが、RBC 数及び好中球数は増加しなかった。ただし、この治療レジメンでも ONO-4641 投与により骨髄細胞数が増加したことから、RBC 及び好中球のレベルを回復させるにはより長い治療期間が必要であることが示唆される。

cyclosporine は抗胸腺細胞グロブリンと共に AA の標準治療に広く使用されている (Peslak et al., 2017) 。この AA モデルマウスでは、30 mg/kg の用量の cyclosporine が RBC 数を減少させたが、これは溶血性貧血のような臨床的に観察される副作用に似ているかもしれない。cyclosporine と併用したときの ONO-4641 の有効性を評価したところ、本モデルにおける ONO-4641 の最適用量 (0.3 mg/kg) 以下の 0.1 mg/kg で、同様に cyclosporine の最適用量 (30 mg/kg) 以下の 15 mg/kg を併用したとき、WBC、PLT 及び好中球数が増加した。この結果は、ONO-4641 のリンパ球循環抑制機構及び cyclosporine の免疫抑制機構に基づく効果がそれぞれ得られたことによるものだと考えられた。

ONO-4641 は、ドナー由来の T リンパ球の骨髄への浸潤を抑制することにより、骨髄細胞の破壊を有意に軽減することが示されており、ONO-4641 の末梢血リンパ球減少作用には、ドナー由来のリンパ球浸潤の抑制が関与していると推察される。また、ONO-4641 は、 $IFN\gamma^+ CD4^+$ T リンパ球 (Th1) 及び $IL17^+ CD4^+$ T リンパ球 (Th17) 並びに CD8 陽性 T リンパ球を骨髄において減少傾向であった。Th1 及び Th17 免疫応答は、AA 及び AA マウスモデルで骨髄不全の発症に関与することが報告されており (de Latour et al., 2010) 、ONO-4641 によるリンパ球減少作用は T リンパ球浸潤の減少に伴い、疾患における骨髄細胞密度の維持による有益な効果を示すことが示唆された。

興味深いことに、今回得られたデータは ONO-4641 が AA モデルマウスの骨髄において HSPC の蓄積をもたらすことを示唆する。髄外組織からの HSPC の

放出は S1PR1 に依存し、HSPC はより高い S1P 濃度に向かって末梢血中に移動する (Massberg et al., 2007)。ケモカイン SDF-1 は、HSPC のもう一つの強力な化学誘引物質であり、その受容体 CXCR4 は、HSPC の末梢血動員に重要な役割をする。以前に報告されたように、採取及びその後の自家移植のために造血幹細胞を末梢血に動員するために使用される薬剤である CXCR4 拮抗薬 plerixafor は、正常マウスでは HSPC の末梢血動員を誘導した (Golan et al., 2012)。対照的に、ONO-4641 は血液中の HSPC 数を減少させ、plerixafor 誘発の HSPC 末梢血動員を遮断した。このデータは HSPC の移出と末梢血動員において S1P/S1PR1 及び SDF-1/CXCR4 シグナルの間のクロストークを明らかにした。ONO-4641 は細胞表面の S1PR1 をダウンレギュレートして、S1P に対する不応答性を誘導する (Komiya et al., 2013) ことで骨髄から血液への HSPC の放出を遮断し、その下流の HSPC 末梢血動員の誘導に SDF-1/CXCR4 のシグナル遮断が関与することを示した。さらに、マウスモデルでは、血中で S1P を産生する RBC と PLT 数が減少したため、血液中の S1P 濃度が定常状態よりも低くなったことにも起因するかもしれない。いずれにせよ、この ONO-4641 の HSPC 末梢血動員遮断作用により、骨髄内の HSPC が減少した病態惹起マウスは勿論、TBI 単独処置マウスと比較しても ONO-4641 を投与した病態惹起マウスでは骨髄内 HSPC 数が有意に高値であった。注目すべきは、ONO-4641 が骨髄における HSPC の蓄積を顕著に誘導したことだが、ONO-4641 が示した本 AA モデルでの治療効果に対するその潜在的な寄与は現状不明である。

以上の結果から、ONO-4641 はドナー由来の T リンパ球の浸潤を抑制し、骨髄に造血幹細胞を蓄積させることで、汎血球減少症や骨髄の破壊を軽減することが示された (Figure 21)。S1PR 作動薬は AA の進行を改善することを目的とした、有望な新規治療薬となる可能性がある。

結語

本研究では第二世代 S1PR 作動薬 ONO-4641 に関する以下の知見を得た。

1. ONO-4641 は、マウス 1 型糖尿病モデルにおいて、糖尿病の発症抑制、ならびに治療上の有用性を示した。またそのメカニズムは、末梢血のリンパ球減少に伴う膵臓内のインスリン産生細胞の保護作用によるものと推察された。これらの結果から、ONO-4641 の 1 型糖尿病に対する新規治療薬としての可能性を示唆した。
2. ONO-4641 は実験的再生不良性貧血マウスモデルにおいて T リンパ球及び HSPC の輸送を調節し、汎血球減少症及び骨髄破壊を軽減することを示した。本結果は、ONO-4641 の再生不良性貧血に対する新規治療薬としての可能性を示唆した。

以上、我々は ONO-4641 がリンパ球介在性の組織炎症に起因すると考えられる自己免疫疾患における新たな治療選択肢となり得ることを見出した。既に多発性硬化症の治療薬として第二相臨床試験を実施した経緯を持つ ONO-4641 は、ヒトでの投与の安全性が確立している。今後、本研究を元に、新規の適応疾患に対して既存薬と比較した有用性・安全性における利益を見出すことで、ONO-4641 の新規治療薬として可能性が示されることを期待する。

なお、本学位論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

1. **Shioya H**, Inagaki Y, Hiraizumi K, Hoshino T, Kurata H, Habashita H, Sato K, Nakade S. Preventive and therapeutic efficacy of ONO-4641, a selective agonist for sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 5, in preclinical models of type 1 diabetes mellitus. *Biol Pharm Bul.* in press
2. Komiya T, Gohda M, **Shioya H**, Katsumata S. Sphingosine 1-phosphate Receptor Modulator ONO-4641 Regulates Trafficking of T Lymphocytes and Hematopoietic Stem Cells and Alleviates Immune-Mediated Aplastic Anemia in a Mouse Model. *J Pharmacol Exp Ther.* in press

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始親切なるご指導を賜りました指導教員である浅野真司教授、ならびにご助言を賜りました免疫微生物学研究室 中山勝文教授にこの場を借りて心より感謝申し上げます。

また、本研究は小野薬品工業株式会社 水無瀬研究所にて行われました。本研究並びに論文作成の機会を与えて下さり、ご激励を賜りました滝野十一博士、巾下広博士、川瀬和一十博士、山本浩史氏、勝又清至博士、吉田隆雄氏に心から感謝申し上げます。また、本研究に関する論文投稿及び作成にあたり、終始懇切なご助言、ご協力を頂きました中出眞嗣博士、佐藤加寿豊氏、倉田晴登博士、小宮貴樹博士、稲垣裕一博士に感謝申し上げます。本研究の推進に当たり、多くの実験を行って頂いた平泉健志氏、星野智洋氏、合田昌史博士に感謝致します。また、本研究はその他の多くの諸先輩、同僚、後輩研究員の皆様のご尽力の結果として得られました。皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、就業と就学の両立を支えてくれた家族・友人・関係者、特に多大な負担を掛けた妻 有美子、寂しい思いを我慢してくれた娘達 柚希・茉希に心から感謝します。

参考文献

- Anliker B, Chun J (2004) Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **279**: 20555-20558.
- Bloom ML, Wolk AG, Simon-Stoos KL, Bard JS, Chen J, Young NS (2004) A mouse model of lymphocyte infusion-induced bone marrow failure. *Exp. Hematol.* **32**: 1163-1172.
- Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR (2002) The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **277**: 21453-21457.
- Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hango G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srouf EF (2005) Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* **201**: 1307-1318.
- Cartier A, Hla T (2019) Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science.* **366**: eaar5551.
- Chen J (2005) Animal models for acquired bone marrow failure syndromes. *Clin. Med. Res.* **3**: 102-108.
- Chen J, Brandt JS, Ellison FM, Calado RT, Young NS (2005) Defective stromal cell function in a mouse model of infusion-induced bone marrow failure. *Exp. Hematol.* **33**: 901-908.
- Chen J, Ellison FM, Eckhaus MA, Smith AL, Keyvanfar K, Calado RT, Young NS (2007) Minor antigen h60-mediated aplastic anemia is ameliorated by

immunosuppression and the infusion of regulatory T cells. *J. Immunol.* **178**: 4159-4168.

Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L; TRANSFORMS Study Group (2010) Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **362**: 402-415.

Cohen JA, Comi G, Selmaj KW, Bar-Or A, Arnold DL, Steinman L, Hartung HP, Montalban X, Kubala Havrdová E, Cree BAC, Sheffield JK, Minton N, Raghupathi K, Huang V, Kappos L; RADIANCE Trial Investigators (2019) Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a multicentre, randomised, 24-month, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* **18**: 1021-1033.

Couri CEB, Foss MC, Voltarelli JC (2006) Secondary prevention of type 1 diabetes mellitus: stopping immune destruction and promoting beta-cell regeneration. *Braz J Med Biol Res.* **39**: 1271-1280.

Dezern AE, Brodsky RA (2011) Clinical management of aplastic anemia. *Expert Rev. Hematol.* **4**: 221-230.

de Latour RP, Visconte V, Takaku T, Wu C, Erie AJ, Sarcon AK, Desierto MJ, Scheinberg P, Keyvanfar K, Nunez O, Chen J, Young NS (2010) Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood.* **116**: 4175-4184.

Forrest M, Sun SY, Hajdu R, Bergstrom J, Card D, Doherty G, Hale J, Keohane C, Meyers C, Milligan J, Mills S, Nomura N, Rosen H, Rosenbach M, Shei GJ, Singer II, Tian M, West S, White V, Xie J, Proia RL, Mandala S (2004) Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor

agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**: 758-768.

Golan K, Vagima Y, Ludin A, Itkin T, Cohen-Gur S, Kalinkovich A, Kollet O, Kim C, Schajnovitz A, Ovadya Y, Lapid K, Shivtiel S, Morris AJ, Ratajczak MZ, Lapidot T (2012) S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. *Blood.* **119**: 2478-2488.

Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C (2005) Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* **25**: 1459-1469.

Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA (1994) Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes.* **43**: 667-675.

Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW; FTY720 D2201 Study Group (2006) Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **355**: 1124-1140.

Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, Vermersch P, Arnold DL, Arnould S, Scherz T, Wolf C, Wallström E, Dahlke F; EXPAND Clinical Investigators (2018) Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet.* **391**: 1263-1273.

Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å (2017) Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **3**: 17016.

- Komiya T, Sato K, Shioya H, Inagaki Y, Hagiya H, Kozaki R, Imai M, Takada Y, Maeda T, Kurata H, Kurono M, Suzuki R, Otsuki K, Habashita H, Nakade S (2013) Efficacy and immunomodulatory actions of ONO-4641, a novel selective agonist for sphingosine 1-phosphate receptors 1 and 5, in preclinical models of multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **171**: 54-62.
- Krösser S, Wolna P, Fischer TZ, Boschert U, Stoltz R, Zhou M, Darpo B (2015) Effect of ceralifimod (ONO-4641) on lymphocytes and cardiac function: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label fingolimod arm. *J Clin Pharmacol.* **55**: 1051-1060.
- Kurata H, Kusumi K, Otsuki K, Suzuki R, Kurono M, Komiya T, Hagiya H, Mizuno H, Shioya H, Ono T, Takada Y, Maeda T, Matsunaga N, Kondo T, Tominaga S, Nunoya K, Kiyoshi H, Komeno M, Nakade S, Habashita H (2017) Discovery of a 1-methyl-3,4-dihydronaphthalene-based sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist ceralifimod (ONO-4641). A S1P1 and S1P5 selective agonist for the treatment of autoimmune diseases. *J. Med. Chem.* **60**: 9508-9530.
- Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG (2005) Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* **201**: 291-301.
- Maki T, Gottschalk R, Ogawa N, Monaco AP (2005) Prevention and cure of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by continuous administration of FTY720. *Transplantation.* **79**: 1051-1055.
- Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H (2002) Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science.* **296**: 346-349.

- Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA, Huff IV, Junt T, Wagers AJ, Mazo IB, von Andrian UH (2007) Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*. **131**: 994-1008.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. **427**: 355-360.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. **273**: 242-245.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR (2007) Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. **316**: 295-298.
- Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S (2003) The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett*. **554**: 189-193.
- Penaranda C, Tang Q, Ruddle NH, Bluestone JA (2010) Prevention of diabetes by FTY720-mediated stabilization of peri-islet tertiary lymphoid organs. *Diabetes*. **59**: 1461-1468.
- Peslak SA, Olson T, Babushok DV (2017) Diagnosis and Treatment of Aplastic Anemia. *Curr Treat Options Oncol*. **18**: 70.
- Pyne S, Pyne NJ (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J*. **349**: 385-402.
- Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, Webb B, Lefebvre S, Chun J, Gray N, Rosen H (2004) Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes

- S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* **279**: 13839-13848.
- Schwab SR, Cyster JG (2007) Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* **8**: 1295-1301.
- Spiegel S, Kolesnick R (2002) Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia.* **16**: 1596-1602.
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG (2011) Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* **91**: 79-118.
- van Doorn R, Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Lakeman K, van het Hof B, van der Pol SM, Geerts D, van Horssen J, van der Valk P, van der Kam E, Ronken E, Reijkerkerk A, de Vries HE (2012) Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *J. Neuroinflammation.* **9**: 133.
- von Herrath M, Sanda S, Herold K (2007) Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol.* **7**: 988-994.
- Yanagawa Y, Masubuchi Y, Chiba K (1998) FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. *Immunology.* **95**: 591-594.
- Young NS (2018) Aplastic anemia. *N Engl J Med.* **379**: 1643-1658.
- Young NS, Scheinberg P, Calado RT (2008) Aplastic anemia. *Curr. Opin. Hematol.* **15**: 162-168.
- Zipp F, Vollmer T, Bar-Or A, Due B, Thangavelu K, Fischer TZ, Selmaj K, on behalf of the DreaMS study investigators (2013) Relapse rates in patients with multiple sclerosis receiving ONO-4641, a sphingosine-1-phosphate receptor-1 and -5

agonist: interim results from an extension of the DreaMS study. *Mult. Scler. J.* **19:**

(S1) 74–558, P992.

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1352458513502429> (accessed 29

March 2020).

图表

Molecule name	Drug name	Targeted protein	Sponsor	Proposed or approved use	Current trial phase	CT ID
				RRMS	Marketed	
				Transplant	III	NCT00099801
				CIPD	III	NCT01625182
	Fingolimod (Gilenya)	S1PR1, -3, -4, and -5	Novartis	PPMS	III	NCT00731692 (INFORMS)
				ALS	II	NCT01786174
				Asthma	II	NCT00785083
				SPMS	FDA approved	NCT01665144 (EXPAND)
				RRMS	II	NCT01185821
	Siponimod (Mayzent)	S1PR1 and -5	Novartis	Active dermatomyositis	II	NCT02029274
				Hemorrhagic stroke, ICH	II	NCT03338998
				Hepatic impairment	I	NCT01565902
				UC	II	NCT01375179
				SCLE	II	NCT01294774
				Hematological malignancies	I	NCT01830010
				MS	III	NCT03232073 (OPTIMUM-LT)
	Ponesimod	S1PR1, -3, and -5	Actelion	Psoriasis	II	NCT01208090
	Cerenimod	S1PR1 and -5	Actelion	SLE	II	NCT02472795
	Etrasimod	S1PR1	Arena Pharmaceuticals	UC	III	NCT03945188
				Crohn	III	NCT03440372
				UC	III	NCT03440385
				UC	III	NCT02435992
				RMS	III	NCT02531126
				RMS	III	NCT02576717
				RRMS	II	NCT01081782 (DreaMS)
				RRMS	II	NCT01742052
				Crohn	II	NCT02389790
				Psoriasis	II	NCT01987843
				SLE	I	NCT02307643
				Atopic dermatitis	II	ACTRN12617000763347
				RA	II	ACTRN12617001223325
				RRMS	I	NCT01431937 (PIA114347)
				RA	I	NCT02211469
				MS	I	NCT00616733
				Renal cell carcinoma	II	NCT01762033
	ASOPNEP (Sonepcizumab)	S1P antibody	Lpath Inc / Pfizer	AMD	II	NCT01414153 (Nexus)
				Cholangiocarcinoma	II	NCT0337179
				Hepatocellular carcinoma	II	NCT02939807
				Solid Tumor	I	NCT01488513 (ABC-101)
				Locally advanced or metastatic solid tumors	1	NCT00084812
	DHS (L-threo-dihydrosphingosine)	SphK1	MSKCC/NCI	RA	II	NCT00903383
				RA	II	NCT00903383

Table 1 S1P modulators under development or in clinical testing

Table 1, Cartier A, Hla T (2019) *Science*. **366**: eaar5551.

RRMS, relapsing remitting multiple sclerosis; PPMS, primary progressive multiple sclerosis; SPMS, secondary progressive multiple sclerosis; RMS, relapsing multiple sclerosis; UC, ulcerative colitis; CIPD, chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; SLE, systemic lupus erythematosus; SCLE, subacute cutaneous lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis; AMD, age-related macular degeneration.

Group	Grouping	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks
Control	118.3 ± 4.68	118.0 ± 3.65	118.2 ± 4.71	123.1 ± 5.67	117.2 ± 4.78	114.0 ± 3.79	116.8 ± 5.02	124.0 ± 9.35	143.6 ± 35.38
ONO-4641 0.01 mg/kg	116.3 ± 4.27	115.4 ± 2.83	120.4 ± 5.02	120.3 ± 4.95	121.7 ± 4.96	112.4 ± 3.99	122.1 ± 5.70	115.6 ± 3.80	119.5 ± 5.68
ONO-4641 0.03 mg/kg	117.6 ± 4.24	116.8 ± 5.86	116.4 ± 3.54	133.2 ± 17.96	122.0 ± 9.26	115.3 ± 4.55	122.4 ± 7.24	117.1 ± 6.77	118.1 ± 6.86
ONO-4641 0.1 mg/kg	116.3 ± 3.18	114.9 ± 4.68	117.3 ± 2.83	119.5 ± 7.36	113.5 ± 6.04	109.9 ± 5.20	109.3 ± 3.81	103.0 ± 4.30	109.0 ± 5.04
FTY720 1 mg/kg	116.1 ± 4.79	118.6 ± 2.86	113.9 ± 4.48	120.2 ± 5.73	114.8 ± 4.50	113.8 ± 4.12	120.1 ± 3.39	111.2 ± 2.40	115.4 ± 2.85
Group	9 weeks	10 weeks	11 weeks	12 weeks	13 weeks	14 weeks	15 weeks	16 weeks	
Control	153.0 ± 30.40	123.5 ± 15.92	132.1 ± 20.53	146.9 ± 23.98	147.5 ± 27.81	182.7 ± 58.01	172.3 ± 53.09	206.3 ± 78.02	
ONO-4641 0.01 mg/kg	127.9 ± 4.39	112.1 ± 5.58	123.4 ± 10.23	125.7 ± 7.78	128.6 ± 15.71	182.2 ± 46.49	187.8 ± 53.42	195.4 ± 66.79	
ONO-4641 0.03 mg/kg	126.3 ± 5.27	111.4 ± 3.77	125.9 ± 7.01	126.9 ± 6.87	123.3 ± 5.35	120.6 ± 5.74	130.8 ± 7.27	124.4 ± 6.32	
ONO-4641 0.1 mg/kg	115.6 ± 3.26	105.4 ± 8.24	111.5 ± 8.09	111.6 ± 7.80	106.3 ± 4.53	110.0 ± 7.73	108.3 ± 4.63	109.9 ± 7.95	
FTY720 1 mg/kg	124.3 ± 4.47	119.3 ± 4.38	103.1 ± 2.28	116.4 ± 4.09	117.6 ± 2.75	109.6 ± 3.11	110.7 ± 5.03	101.0 ± 4.07	
Group	17 weeks	18 weeks	19 weeks	20 weeks	21 weeks	22 weeks	23 weeks	24 weeks	
Control	194.3 ± 64.38	177.6 ± 55.60	185.2 ± 58.72	233.8 ± 78.89	227.2 ± 60.01 [†]	225.7 ± 74.76	246.6 ± 90.23	255.3 ± 73.65	
ONO-4641 0.01 mg/kg	194.9 ± 71.68	201.2 ± 75.11	208.5 ± 72.05	201.8 ± 80.21	196.1 ± 67.78	196.9 ± 60.68	206.5 ± 73.73	206.4 ± 75.44	
ONO-4641 0.03 mg/kg	126.0 ± 7.89	127.1 ± 8.74	139.0 ± 9.84	139.9 ± 9.48	137.1 ± 10.03	142.4 ± 11.61	145.9 ± 7.95	135.0 ± 9.21	
ONO-4641 0.1 mg/kg	117.3 ± 3.98	115.2 ± 6.56	113.6 ± 8.49	122.3 ± 5.98	116.9 ± 5.51	116.3 ± 4.53	117.3 ± 3.67	116.9 ± 6.71	
FTY720 1 mg/kg	111.1 ± 3.95	113.9 ± 1.55	114.5 ± 3.39	116.2 ± 4.25	118.4 ± 3.61	114.9 ± 1.59	115.6 ± 4.42	122.4 ± 6.07	

Table 2 Changes in plasma glucose concentration related to the preventive effects of ONO-4641.

Non-obese diabetic mice without diabetes mellitus were treated with 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641, or FTY720 once a day for 24 weeks from a grouping date (19 weeks of age) to 43 weeks of age. Plasma glucose concentrations (mg/dl) in the Control group (n = 10), ONO-4641 0.01 mg/kg group (n = 9), ONO-4641 0.03 mg/kg group (n = 10), ONO-4641 0.1 mg/kg group (n = 10) and the FTY720 1 mg/kg group (n = 9) are expressed as the mean ± standard error ([†] represents data obtained the last week before death). Plasma glucose concentrations in Control and ONO-4641 groups were compared by Dunnett's test at each timepoint. Plasma glucose concentrations were compared between Control and FTY720 groups by the Student's *t*-test at each timepoint. A two-sided test was performed and the significance level was 5% in both tests, but there were no significant differences between groups for all tests.

Group	Grouping	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks
Control		290.2 ± 21.61	296.1 ± 47.26	368.7 ± 73.89	373.0 ± 66.70	413.8 ± 73.74	464.4 ± 78.52
ONO-4641 0.01 mg/kg		302.8 ± 29.22	360.9 ± 62.68	425.4 ± 80.99	496.1 ± 85.72	595.1 ± 75.88	653.3 ± 77.63
ONO-4641 0.03 mg/kg		314.1 ± 32.79	369.7 ± 46.93	325.9 ± 69.73	367.8 ± 100.20	363.1 ± 99.80	372.5 ± 105.50
ONO-4641 0.1 mg/kg		274.6 ± 25.11	247.5 ± 24.70	184.3 ± 34.35	186.8 ± 24.07	222.5 ± 51.47	195.1 ± 38.11*
FTY720 3 mg/kg		295.8 ± 25.32	274.0 ± 41.34	289.4 ± 61.84	263.8 ± 71.64	278.8 ± 71.36	259.6 ± 67.84
		7 weeks	8 weeks	9 weeks	10 weeks	11 weeks	12 weeks
Control		506.4 ± 91.32	596.4 ± 96.98 [†]	546.6 ± 87.38	527.6 ± 80.75 [†]	531.5 ± 76.80	525.9 ± 96.95
ONO-4641 0.01 mg/kg		720.5 ± 89.10	669.7 ± 59.03 [†]	792.5 ± 112.06	677.7 ± 93.28	734.8 ± 87.01 ^{††}	788.3 ± 36.87
ONO-4641 0.03 mg/kg		379.2 ± 111.92	416.2 ± 123.02	409.3 ± 121.73	395.4 ± 115.59	405.1 ± 125.22	376.6 ± 99.34
ONO-4641 0.1 mg/kg		199.0 ± 50.08	198.3 ± 53.56 ^{**}	221.0 ± 69.42	231.8 ± 77.21	246.9 ± 88.80	236.9 ± 85.42
FTY720 3 mg/kg		261.3 ± 68.41 [#]	296.4 ± 97.31 [#]	274.0 ± 86.35 [#]	306.7 ± 103.04	297.2 ± 96.68	280.7 ± 96.62

Table 3 Changes in plasma glucose concentrations related to the therapeutic effects of ONO-4641.

Non-obese diabetic mice with diabetes mellitus were orally administered with 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641 or FTY720 once daily for 12 weeks. Plasma glucose concentrations (mg/dl) in the Control group (n = 9), ONO-4641 0.01 mg/kg group (n = 8), ONO-4641 0.03 mg/kg group (n = 8), ONO-4641 0.1 mg/kg group (n = 8), and FTY720 3 mg/kg group (n = 9) are expressed as the mean ± standard error at weeks after dosing (†: 1 death, ††: 2 deaths). Plasma glucose concentrations were compared between Control and ONO-4641 groups by Dunnett's test at each timepoint (*P < 0.05, **P < 0.01). Plasma glucose concentrations were compared between Control and FTY720 groups by the Student's *t*-test at each timepoint (#P < 0.05).

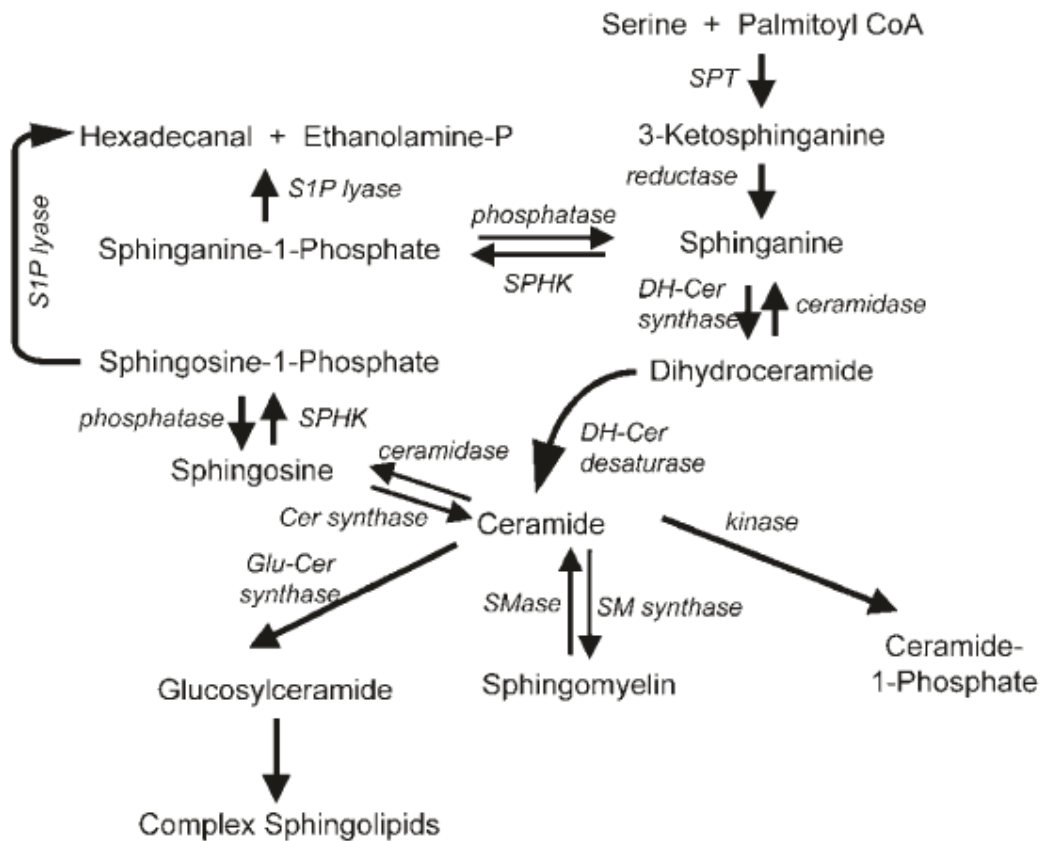


Figure 1 Sphingolipid metabolism

Fig. 1, Spiegel S, Kolesnick R (2002) *Leukemia*. **16**: 1596-1602.

Cer, ceramide; DH-Cer, dihydroceramide; DH-SPH, dihydrosphingosine or sphinganine; Ethanolamine-P, phosphoethanolamine; SMase, sphingomyelinase; SM, sphingomyelin; S1P, sphingosine-1-phosphate; SPHK, sphingosine kinase; SPT, serine palmitoyltransferase.

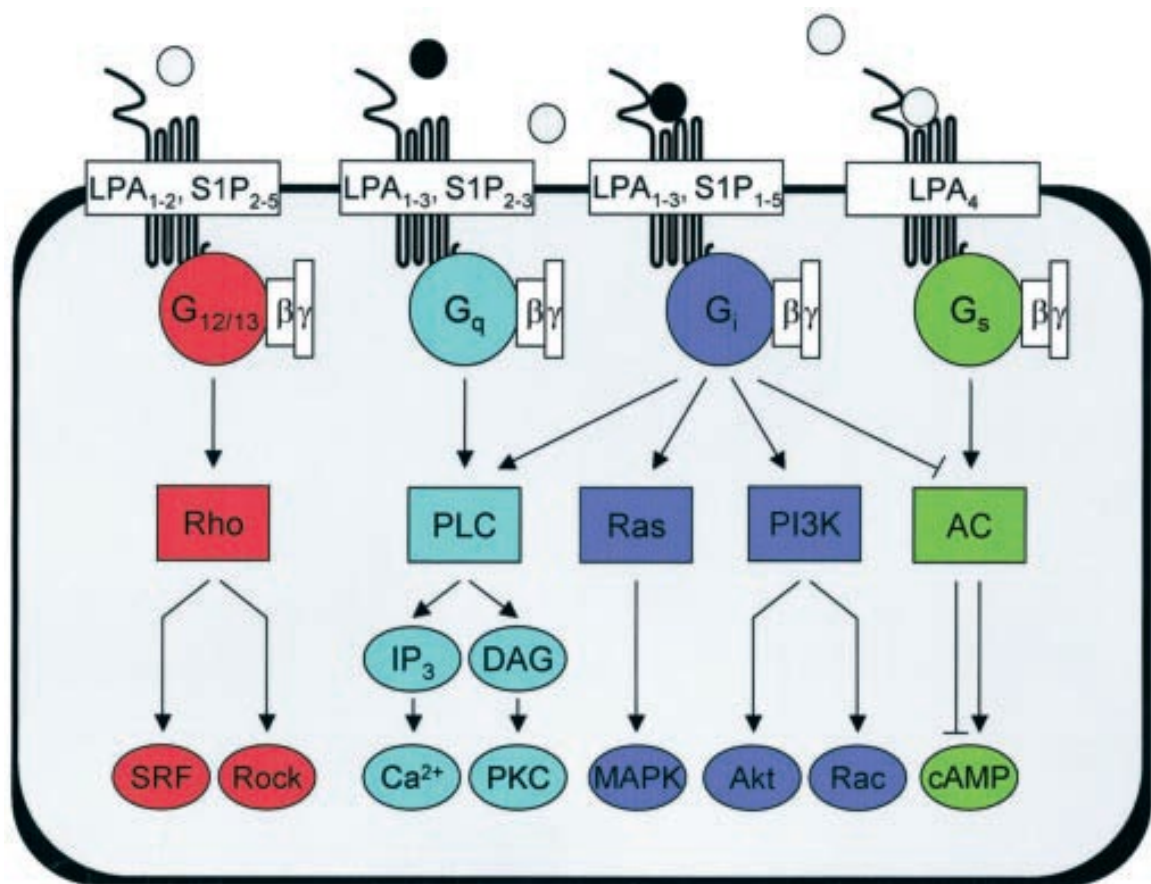


Figure 2 S1P signaling through G protein-coupled receptors

Fig.2, Anliker B, Chun J (2004) *J. Biol. Chem.* **279**: 20555-20558.

Coupling of LPA and S1P receptors with different classes of G proteins, activation or inhibition of downstream second messenger molecules, and the most prominent resultant cellular effects are illustrated. PI3K, phosphoinositol 3-kinase; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKC, protein kinase C; Rock, Rho-associated kinase; SRF, serum response factor.

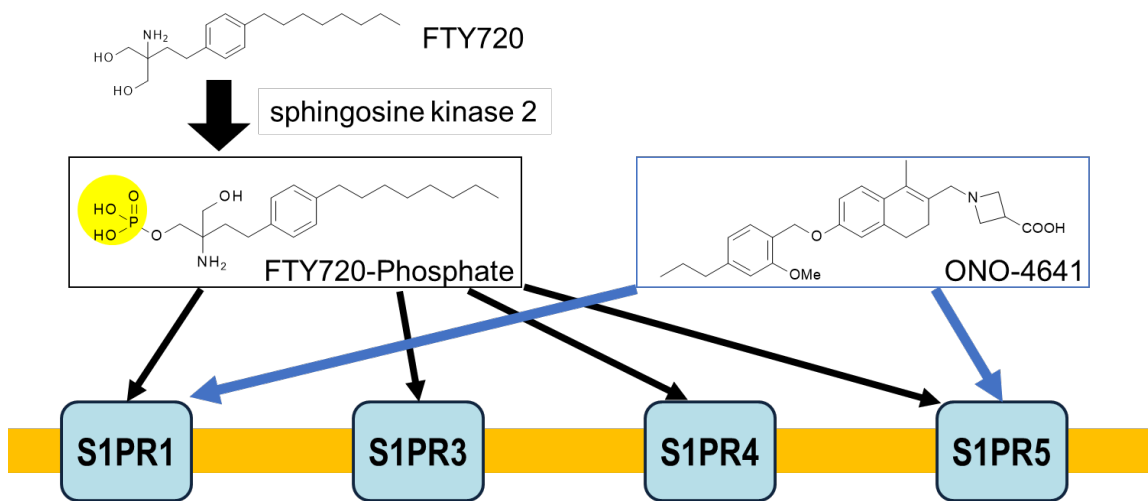


Figure 3 Selectivity of FTY720 and ONO-4641 against S1PRs

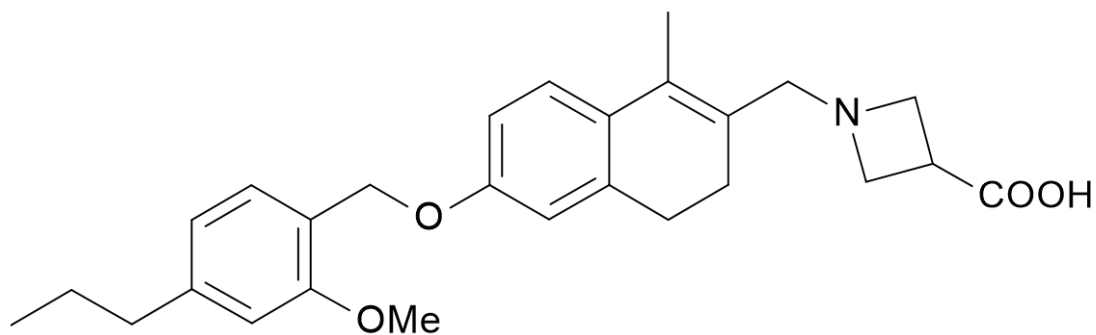


Figure 4 Structure of ONO-4641

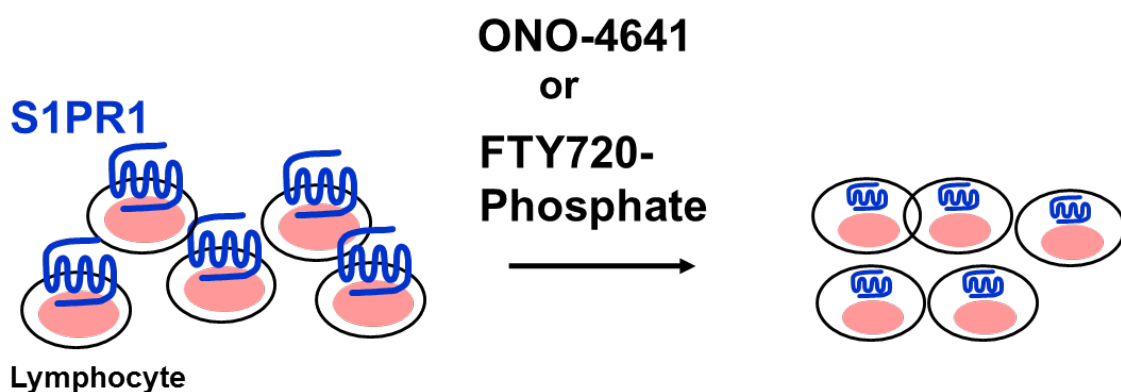


Figure 5 Mechanism of functional Antagonism

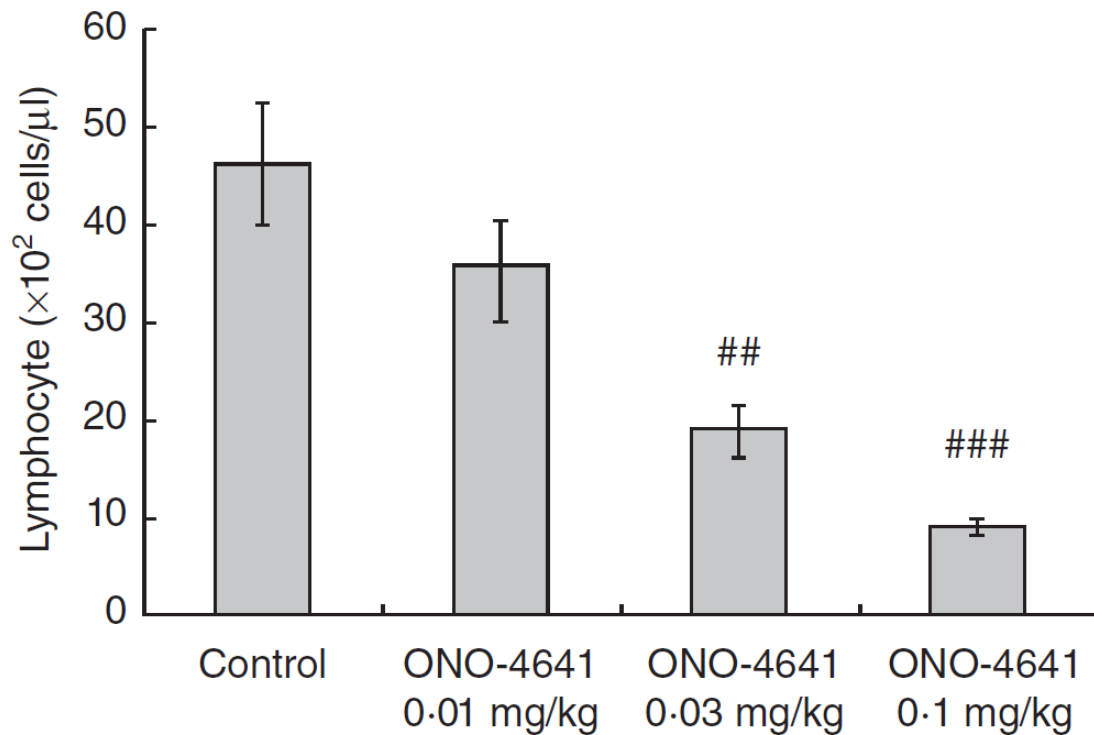


Figure 6 ONO-4641 decreases peripheral blood lymphocytes in NOD mice

Fig. 5a, Komiya T, et al. (2013) *Clin. Exp. Immunol.* **171**: 54-62.

Effect of ONO-4641 (0.01, 0.03 or 0.1 mg/kg) on number of peripheral blood lymphocytes in normal non-obese diabetic (NOD) mice 24 hours after a single oral administration. Data are represented as mean ± standard error (s.e.) (n = 5). The P-values were determined by Dunnett's test; ##P < 0.01, ###P < 0.001.

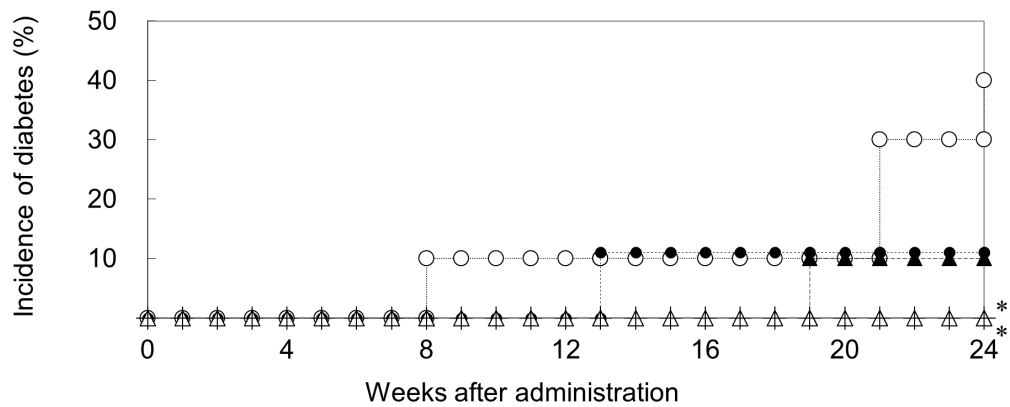


Figure 7 Preventive effects of ONO-4641 on incidence of diabetes

Non-diabetic non-obese diabetic mice were treated with 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641, or FTY720 once a day for 24 weeks from a grouping date (19 weeks of age) to 43 weeks of age. ONO-4641 (0.01, 0.03 and 0.1 mg/kg), FTY720 (1 mg/kg) or 0.5% methyl cellulose was orally administered once daily from the grouping date. The abscissa indicates the number of weeks after the initiation of administration, and incidence of diabetes curves for the rate of mice with onset of diabetes mellitus (onset was defined as the timepoint when the plasma glucose level was ≥ 200 mg/dl at two timepoints) were generated by the Kaplan-Meier method. Control (○) (n=10), ONO-4641 0.01 mg/kg (●) (n=9), 0.03 mg/kg (▲) (n=10), 0.1 mg/kg (△) (n=10), and FTY720 1 mg/kg (+) (n=9). The curves for the Control group and the treatment groups were compared by the log-rank test, with a P-value of less than 5% indicating significance. *P < 0.05.

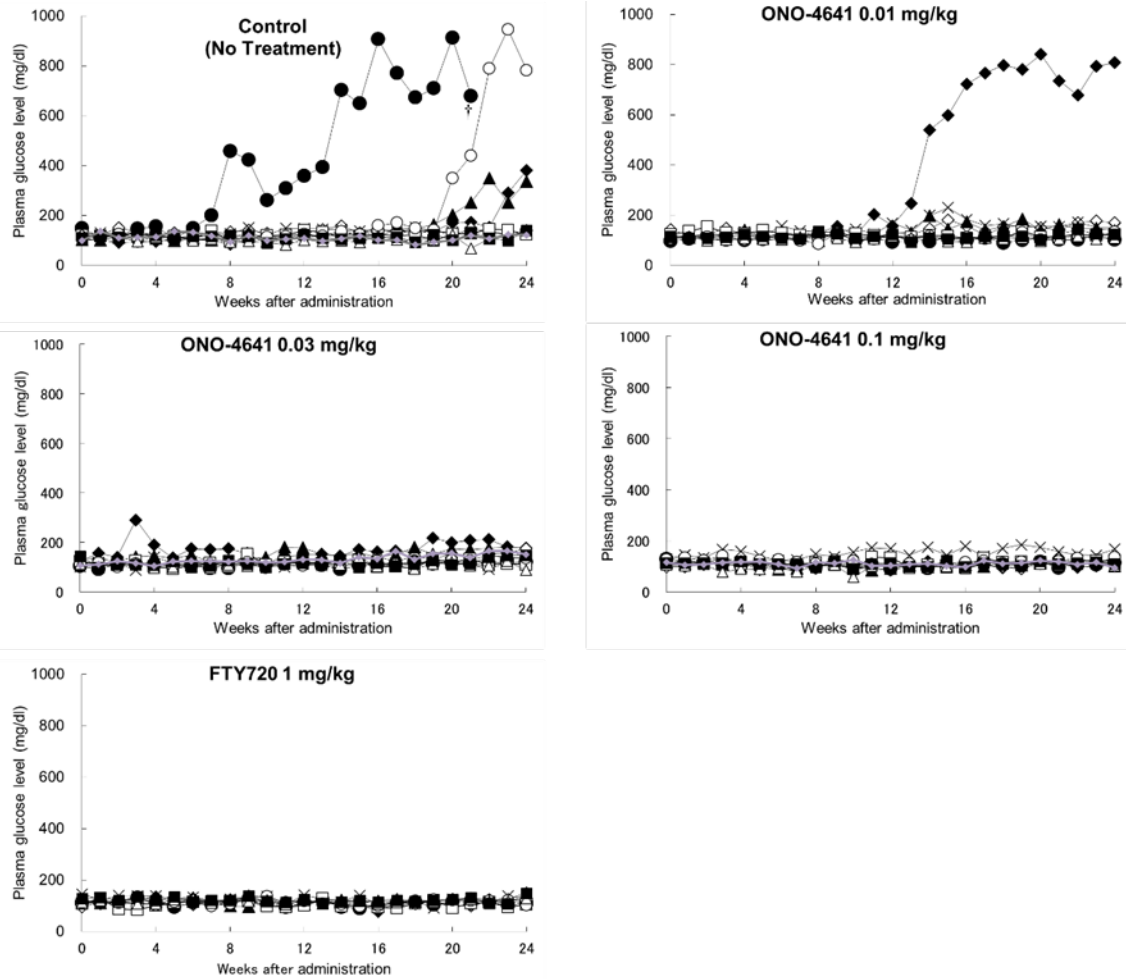


Figure 8 Time course of individual plasma glucose levels in ONO-4641 treated mice Non-obese diabetic mice without onset of diabetes mellitus were treated with 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641, or FTY720 once a day for 24 weeks from a grouping date (19 weeks of age) to 43 weeks of age. The abscissa indicates the number of weeks after the initiation of administration and the ordinate shows the plasma glucose concentration (mg/dl) for each animal (†: dead).

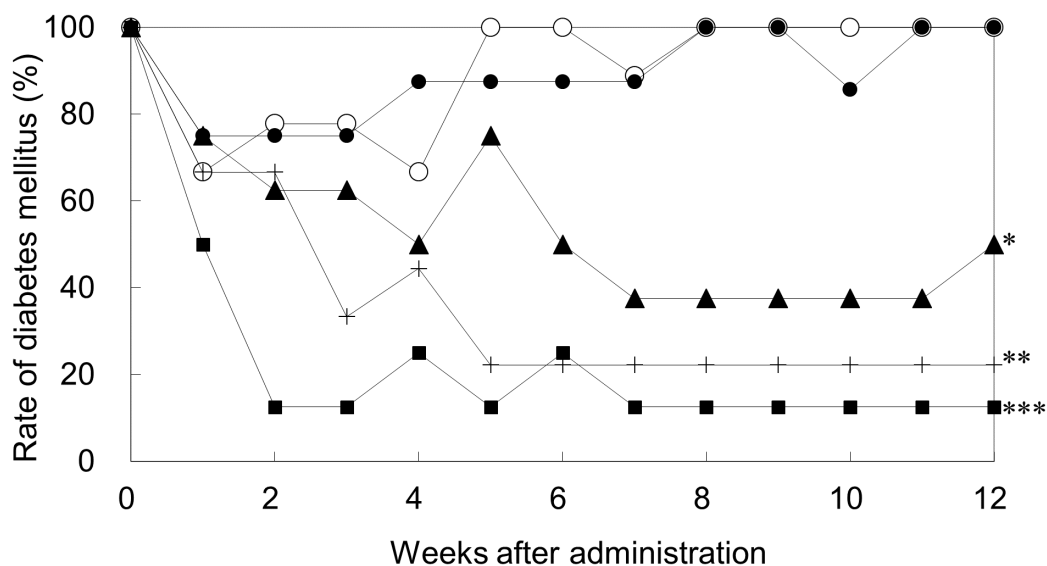


Figure 9 Therapeutic effects of ONO-4641 on the rate of diabetes mellitus

Non-obese diabetic mice with diabetes mellitus were orally administered 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641 or FTY720 once daily for 12 weeks. The abscissa shows the number of weeks after the initiation of the administration and the ordinate shows the rate of diabetes mellitus (percentage of individuals with a plasma glucose level ≥ 200 mg/dl). Control (○) (n=9), ONO-4641 0.01 mg/kg (●) (n=8), 0.03 mg/kg (▲) (n=8), 0.1 mg/kg (■) (n=8), and FTY720 3 mg/kg (+) (n=9). The rate of diabetes mellitus at 12 weeks after administration was compared between the Control group and each treatment group by Fisher's exact test, with a P-value of less than 5% indicating significance. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

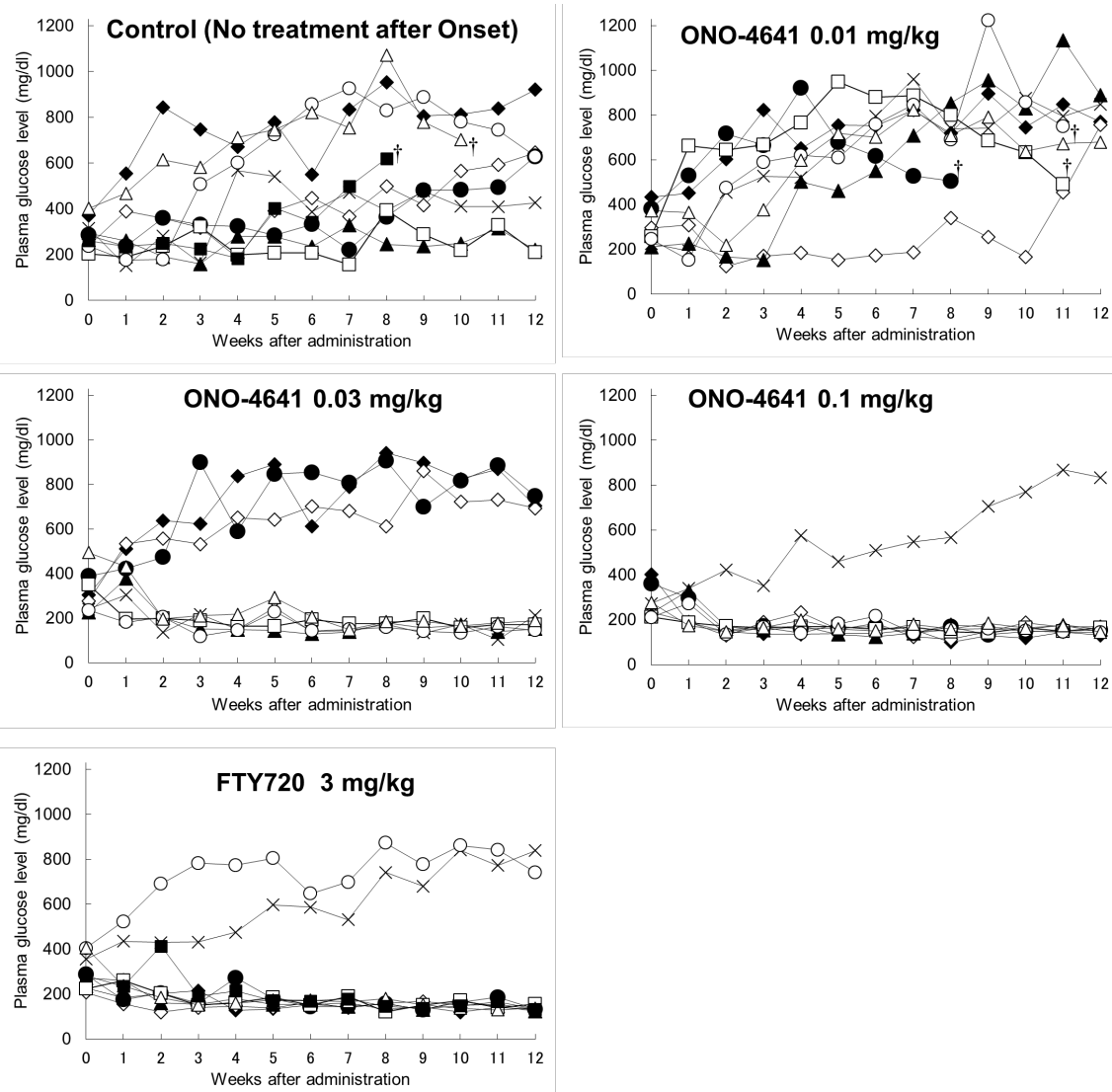


Figure 10 Time course of individual plasma glucose levels in ONO-4641 treated mice. Non-obese diabetic mice with diabetes mellitus were orally administered 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641 or FTY720 once daily for 12 weeks. The abscissa shows the number of weeks after the initiation of administration and the ordinate shows the plasma glucose level (mg/dl) of each animal (†: dead).

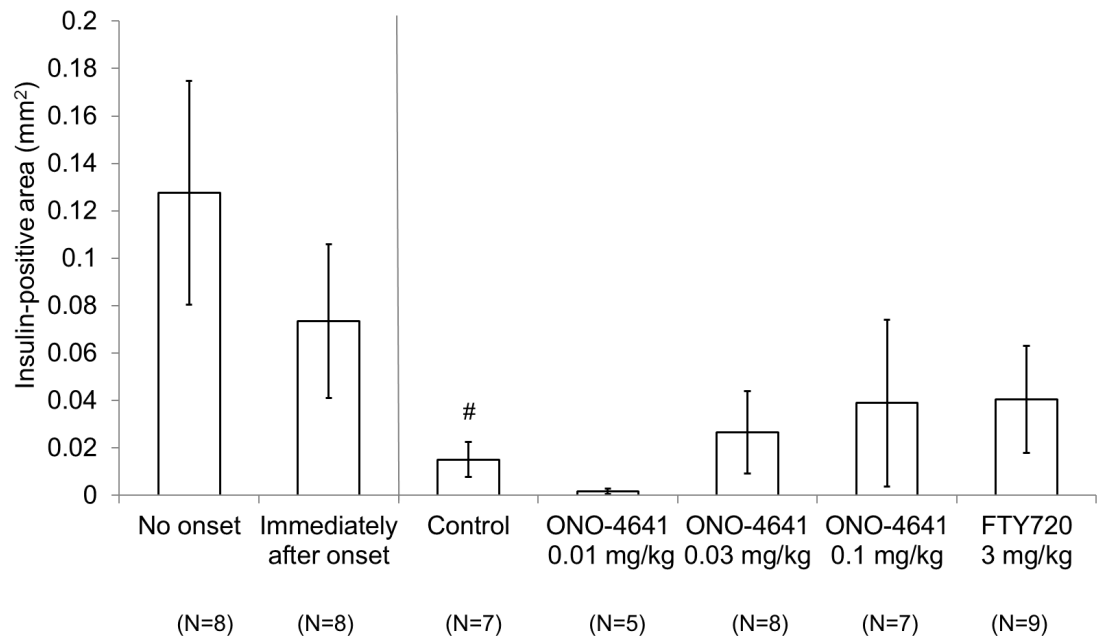


Figure 11 Insulin-positive areas in ONO-4641 treated mice

Non-obese diabetic mice with diabetes mellitus (defined as plasma glucose concentrations ≥ 200 mg/dl at two timepoints) were assigned to the study groups and Immediately after onset group, respectively. We randomly assigned the mice without diabetes mellitus to the Immediately after onset group and the No onset group. In another group, non-obese diabetic mice with diabetes mellitus were orally administered 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641 or FTY720 once daily for 12 weeks. Mice pancreases were removed from the No onset group and Immediately after onset group on the day of grouping, and the day after the last dose for the other groups. The insulin-positive area (mm²) of each specimen was calculated by imaging analysis and expressed as the mean \pm standard error. Dunnett's test was used to compare the insulin-positive area between the Control and ONO-4641 groups. Comparisons of the insulin-positive areas between the Control group and the FTY720 group, the No onset group, the Immediately after onset group, and between the No onset group and the Immediately after onset group were performed by the Student's *t*-test. Significant differences were observed between the No onset group and the Control group, and there were no significant differences between the other groups (# $P < 0.05$ vs No onset group).

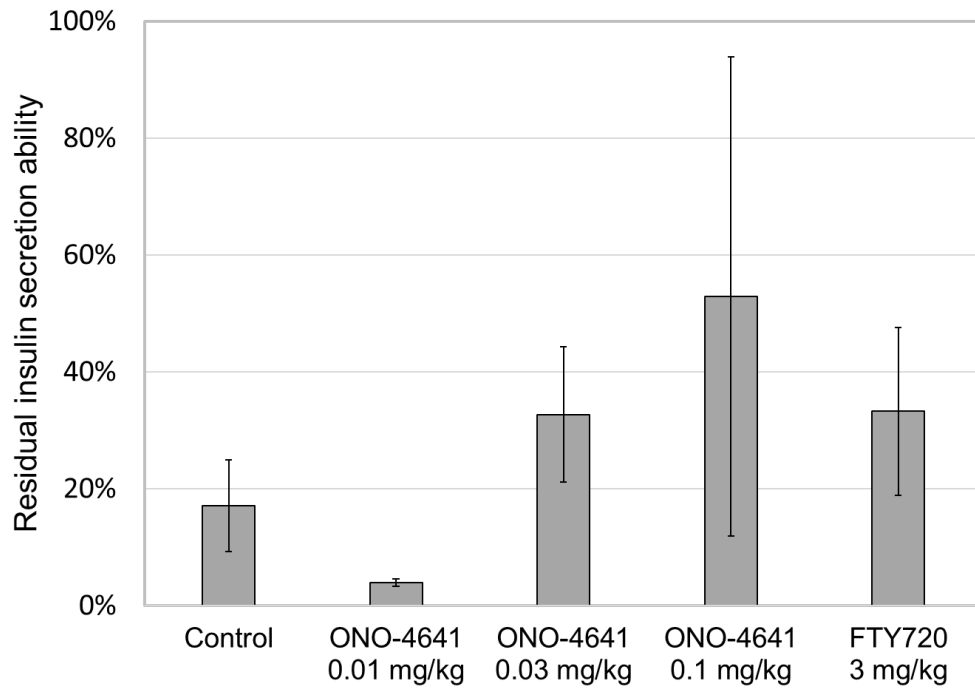


Figure 12 Protective effect of ONO-4641 on insulin secretion

Non-obese diabetic mice with diabetes mellitus orally received 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641 or FTY720 once daily for 12 weeks (Assessment of therapeutic effects). The ordinate shows residual insulin secretion ability, which is a ratio of plasma insulin concentrations at 12 weeks after administration to that on the day of grouping. The residual insulin secretion ability is expressed as the mean \pm standard error. Dunnett's test was performed for the comparison between the Control and ONO-4641 groups. Student's t-test was performed for the comparisons between the Control and FTY720 groups. There were no significant differences.

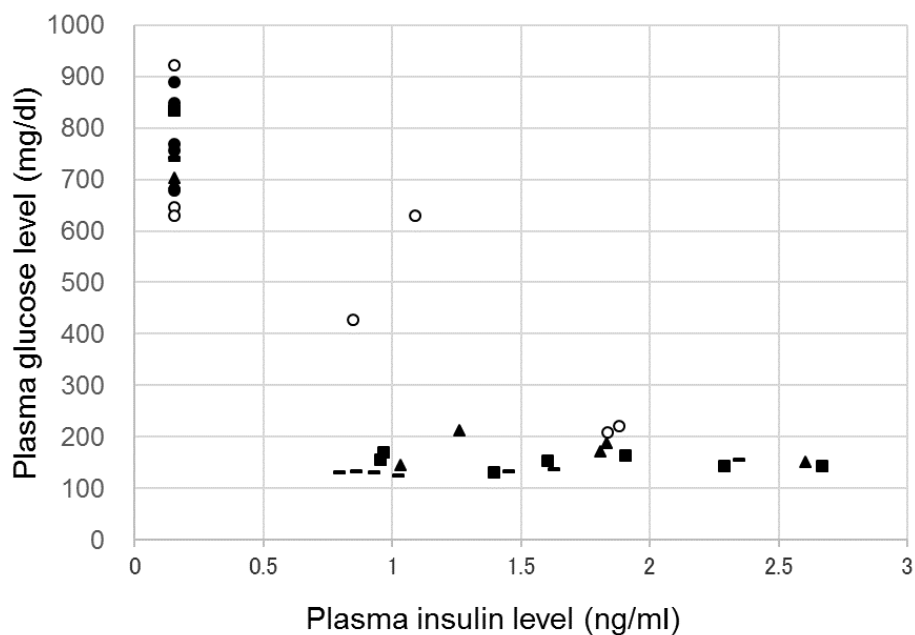


Figure 13 Relationship between plasma glucose level and plasma insulin level

Non-obese diabetic mice with diabetes mellitus orally received 0.5% methyl cellulose (Control), ONO-4641 or FTY720 once daily for 12 weeks (Assessment of therapeutic effects). Control (○), ONO-4641 0.01 mg/kg (●), 0.03 mg/kg (▲), 0.1 mg/kg (■), and FTY720 3 mg/kg (-). The abscissa shows the plasma insulin level (ng/ml), and the ordinate shows the plasma glucose level (mg/dl) of each mouse at 12 weeks after administration. For the measurement of insulin concentrations, lower limit of quantitation was 0.156 ng/ml.

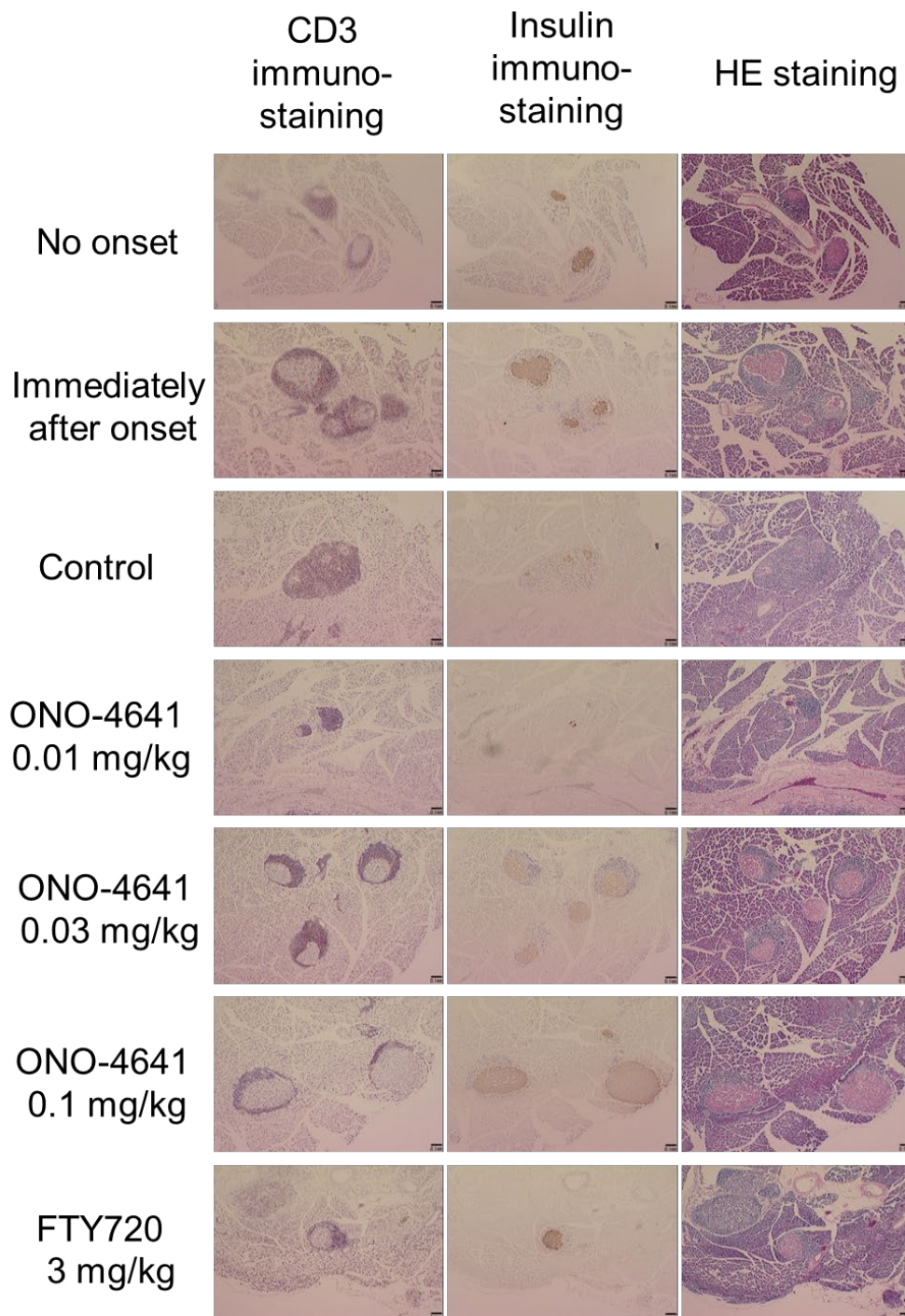


Figure 14 Staining images of islets

Pancreases from the No onset group, Immediately after onset group, Control group, ONO-4641 groups, and FTY720 group were removed and various histopathological specimens with CD3 immunostaining, insulin immunostaining or hematoxylin and eosin [HE] staining were prepared. An image of staining around the pancreatic islet is shown for each group.

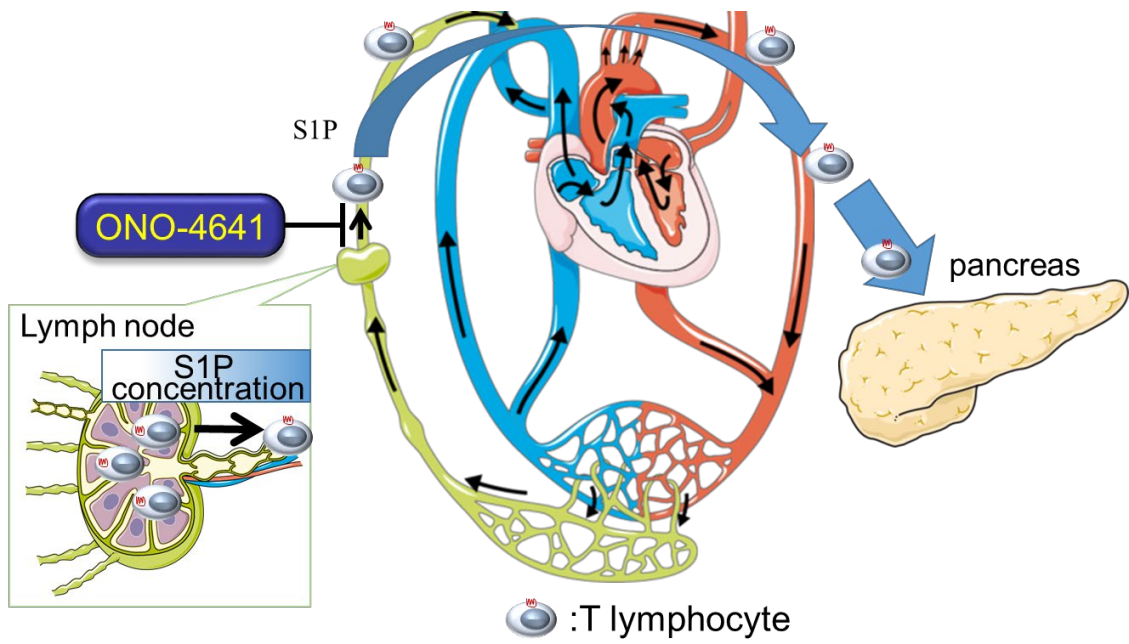


Figure 15 Illustration of the proposed mechanistic pathway of ONO-4641 in T1DM

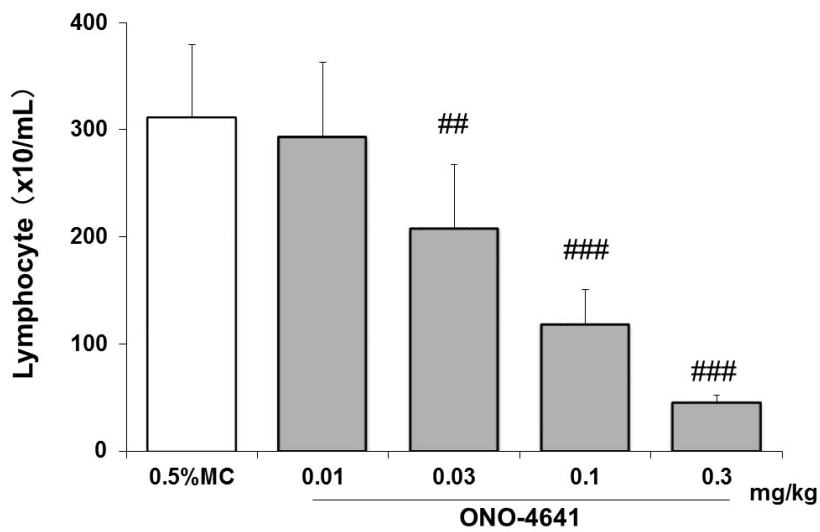


Figure 16 ONO-4641 decreases peripheral blood lymphocytes

Effect of ONO-4641 (0.01, 0.03, 0.1 or 0.3 mg/kg) on the number of peripheral blood lymphocytes in CBF1 mice 24 h after the oral administration of a single dose. Data are represented as mean + standard deviation (S.D.), n=6 per each group. The p-values were determined by Dunnett test; ## p<0.01, ### p< 0.001 vs 0.5%MC.

(A)

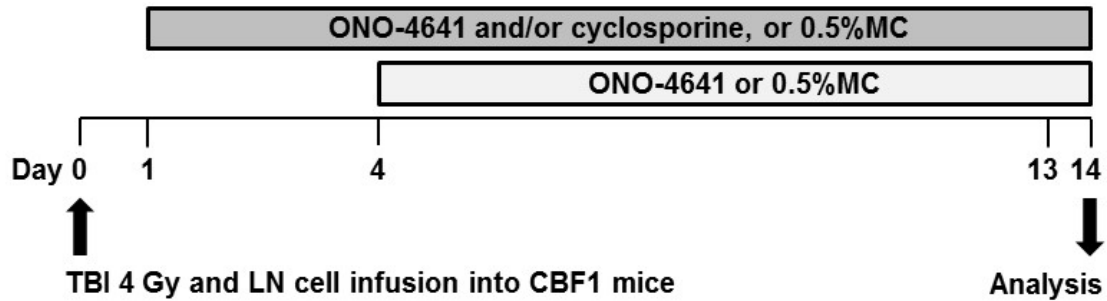


Figure 17 ONO-4641 treatment alleviates the induction of BM failure in mice.

CBF1 mice were subjected to 4 Gy total body irradiation (TBI), and 5×10^6 LN cells from B6 mice were administered via caudal vein injection to induce aplastic anemia model. On day 14 after disease induction, peripheral blood cell count was determined by the hematology analyzer.

(A) Schema of the ONO-4641 and/or cyclosporine treatment experiments.

(B)

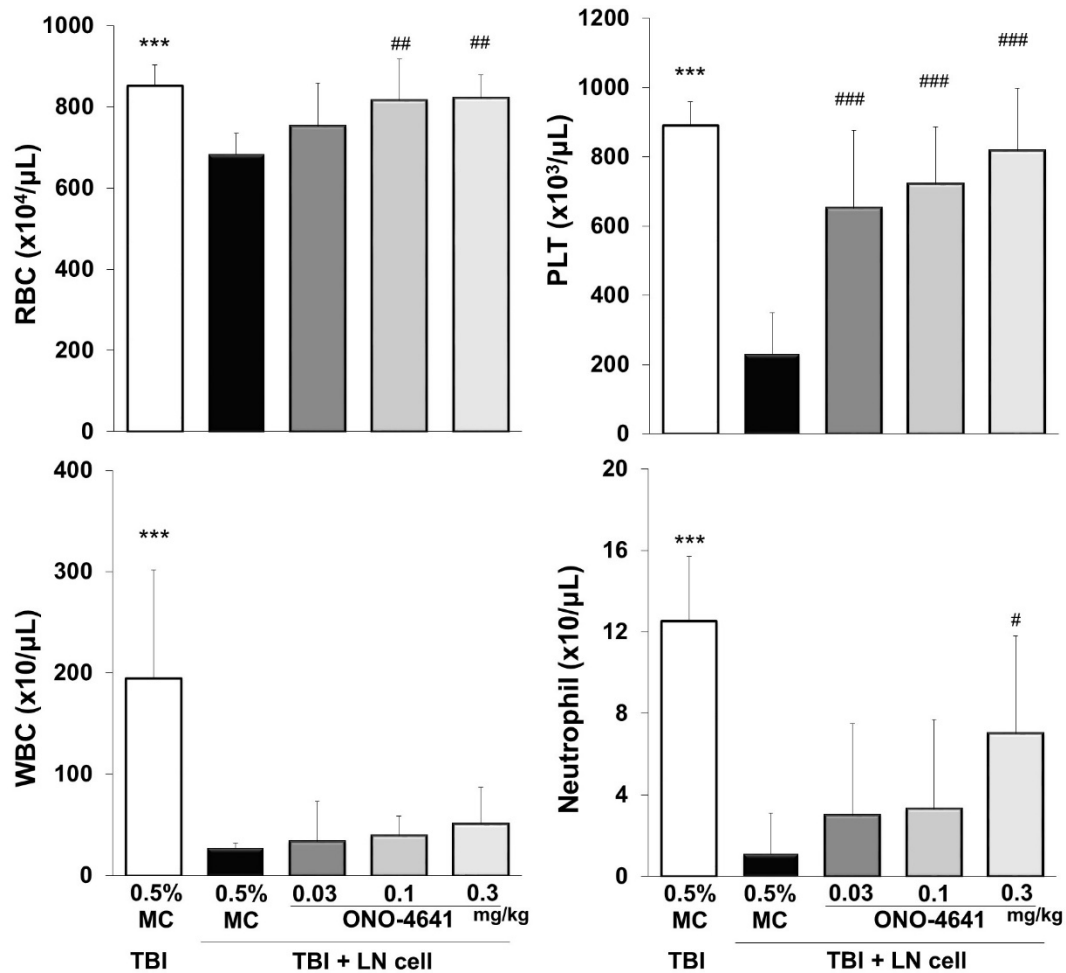


Figure 17 Continued

(B) CBF1 mice were treated daily with ONO-4641 (0.03, 0.1 or 0.3 mg/kg) or 0.5%MC (vehicle) by oral gavage from day 1 after disease induction. On day 14 after disease induction, peripheral blood cells were determined by a hematology analyzer. Indicated values are presented as mean + S.D., $n=8$ per each group except for vehicle, $n=7$. Dunnett test was performed for comparison between the vehicle and the ONO-4641 0.03, 0.1, 0.3 mg/kg groups, with a p -value of less than 5%. #, $p<0.05$. ##, $p<0.01$, ###, $p<0.001$. A t -test was performed for comparison between the vehicle and the TBI only with a p -value of less than 5%. ***, $p<0.001$.

(C)

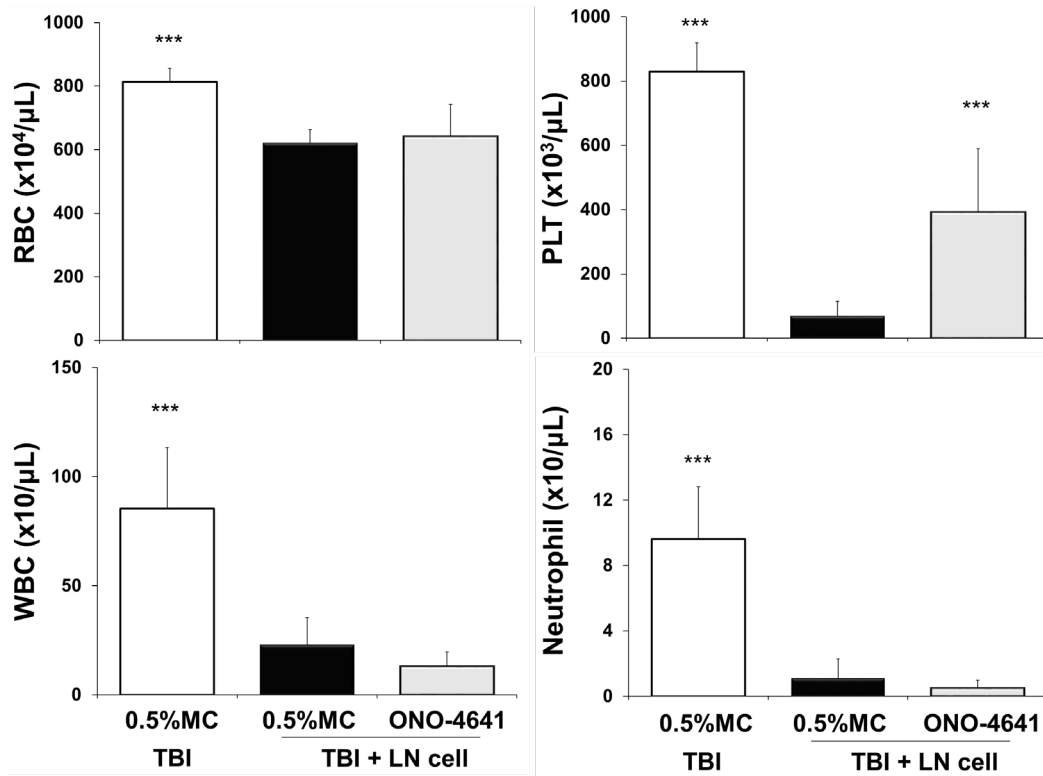


Figure 17 Continued

(C) CBF1 mice were treated daily with ONO-4641 0.3 mg/kg or 0.5%MC (vehicle) by oral gavage from day 4 after disease induction. Indicated values are presented as mean + S.D., n=8 per each group except for vehicle, n=10. A t-test was performed for comparison between the vehicle and the TBI only, the ONO-4641 0.3 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. ***, p<0.001.

(D)

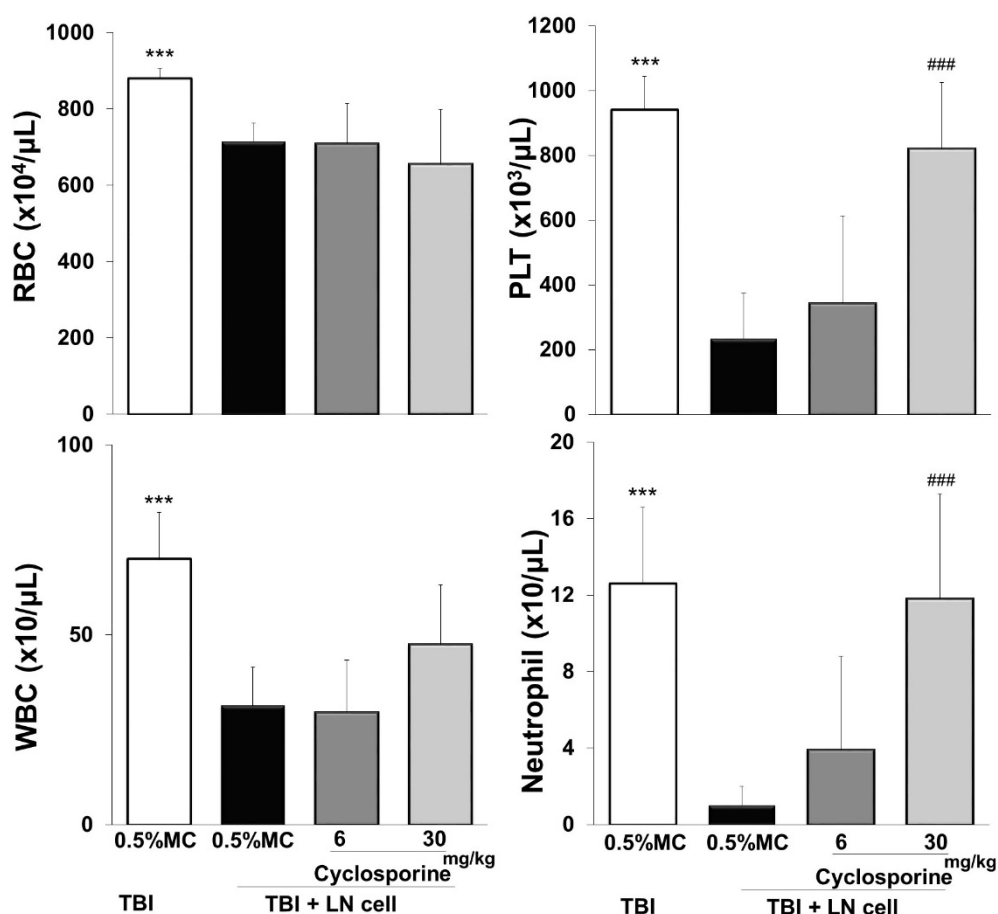


Figure 17 Continued

(D) Cyclosporine treatment alleviates the induction of BM failure in mice. CBF1 mice were subjected to 4 Gy TBI, and 5×10^6 LN cells harvested from B6 mice were injected into pre-irradiated CBF1 mice to induce aplastic anemia model. CBF1 mice were treated twice a day with cyclosporine with a dose of 6, 30 mg/kg or 0.5%MC (vehicle) by oral gavage from day 1 after disease induction. On day 14, peripheral blood cell count was determined. Indicated values are presented as mean + S.D., $n=8$ per each group except for vehicle, $n=7$, Dunnett test was performed for comparison between the TBI plus LN cell with vehicle and the TBI plus LN cell with cyclosporine groups, with a p-value of less than 5%. ###, $p<0.001$. A t-test was performed for comparison between the TBI only with vehicle and the TBI plus LN cell with vehicle groups, with a p-value of less than 5%. ***, $p<0.001$.

(E)

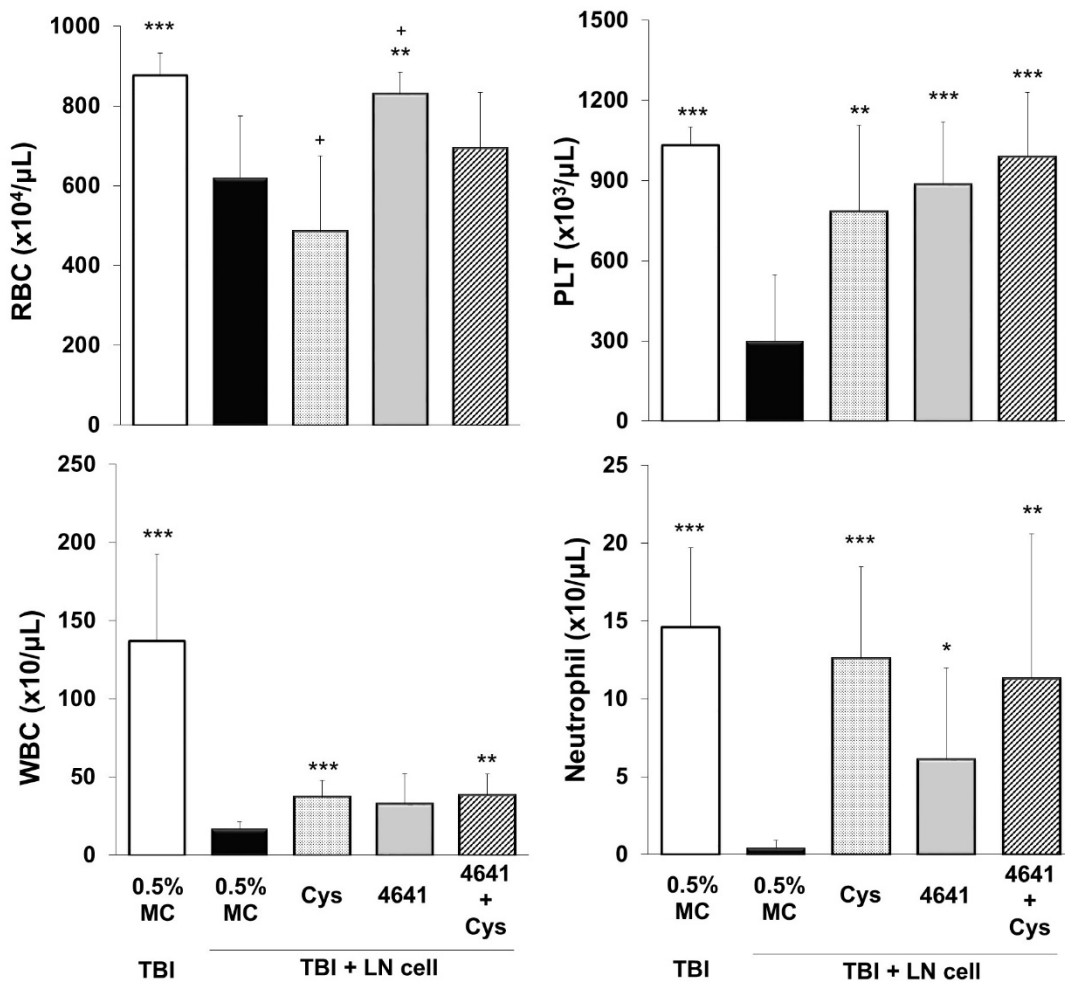


Figure 17 Continued

(E) In the two-drug combination experiment, CBF1 mice were treated with either ONO-4641 0.1 mg/kg, cyclosporine 15 mg/kg (Cys), 0.5%MC (vehicle) alone, or ONO-4641 0.1 mg/kg plus cyclosporine 15 mg/kg from day 1 after disease induction. Indicated values are presented as mean + S.D., n=8 per each group except for vehicle, n=7. A t-test was performed for comparison between the vehicle and the TBI only, the ONO-4641 0.1, 0.3 mg/kg, the cyclosporine 15 mg/kg, or the ONO-4641 0.1 mg/kg plus cyclosporine 15 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. *, p<0.05. **, p<0.01. ***, p<0.001. A t-test was performed for comparison between the ONO-4641 0.1 mg/kg plus cyclosporine 15 mg/kg and the ONO-4641 0.1 mg/kg, or the cyclosporine 15 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. +, p<0.05.

(A)

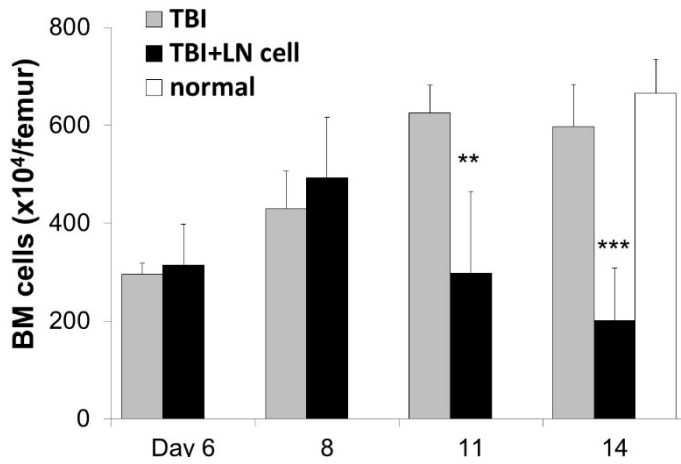
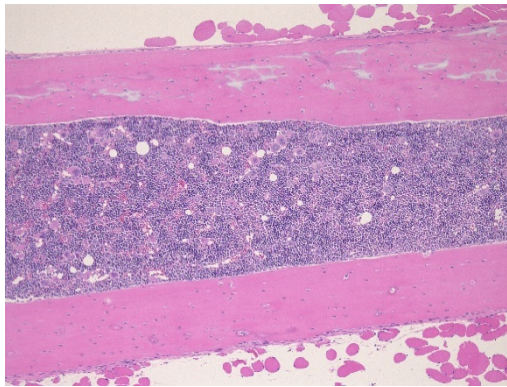


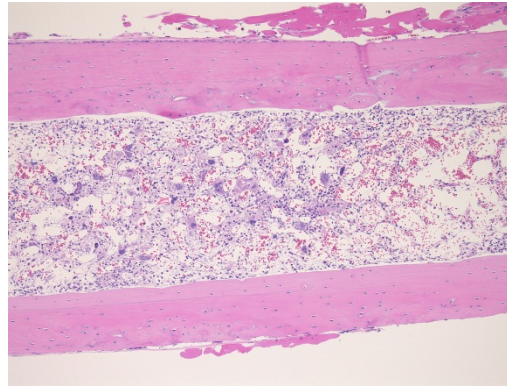
Figure 18 ONO-4641 treatment reduces the destruction of BM cells by inhibiting the infiltration of donor-derived T lymphocytes to BM

(A) The counts of total cells in the BM of mice that received TBI only, TBI plus LN cell infusion, or were untreated (normal mice) at the indicated days after disease induction. Indicated values are presented as mean + S.D., n=5 or 6 per each group. A t-test was performed for comparison between the TBI only and the TBI plus LN cell infusion, with a p-value of less than 5%. *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001

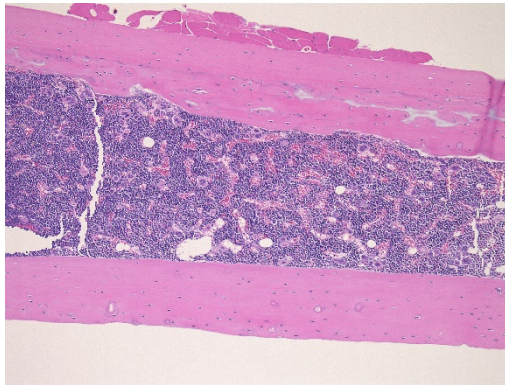
(B)



TBI with 0.5%MC



TBI+LN cell with 0.5%MC



TBI+LN cell with ONO-4641 0.3 mg/kg

Figure 18 Continued

(B) Representative hematoxylin and eosin stained femur section (original magnification x10) in the treatment groups of TBI only with 0.5%MC (vehicle), TBI plus LN cell infusion with vehicle, and TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg.

(C)

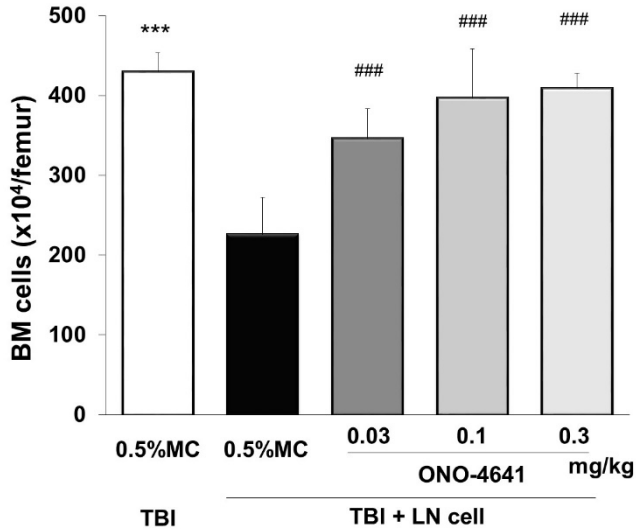


Figure 18 Continued

(C) Total cell counts in the BM of mice on day 14. Mice were treated daily with ONO-4641 at 0.03, 0.1, 0.3 mg/kg, or vehicle by oral gavage starting from day 1 after disease induction. Indicated values are presented as mean + S.D., n=8 per each group except for vehicle, n=7. Dunnett test was performed for comparison between the vehicle and the ONO-4641 groups, with a p-value of less than 5%. ###, p<0.001. A *t*-test was performed for comparison between the TBI only and the TBI plus LN cell infusion with vehicle, with a p-value of less than 5%. ***, p<0.001

(D)

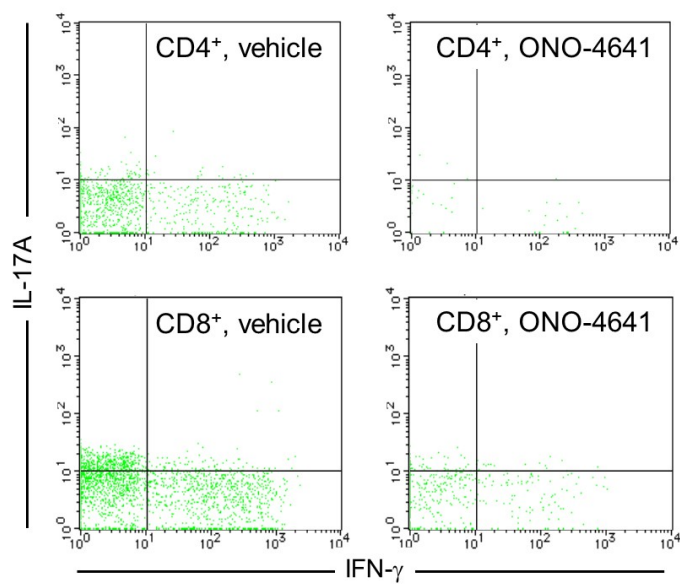


Figure 18 Continued

(D) Representative flow cytometric analysis of IFN- γ or IL-17A expressions in donor-derived CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the vehicle or ONO-4641 0.3 mg/kg-treated groups on day 14.

(E)

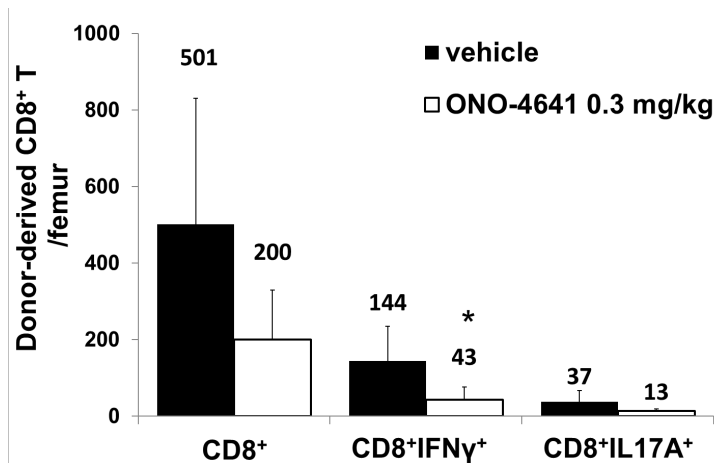
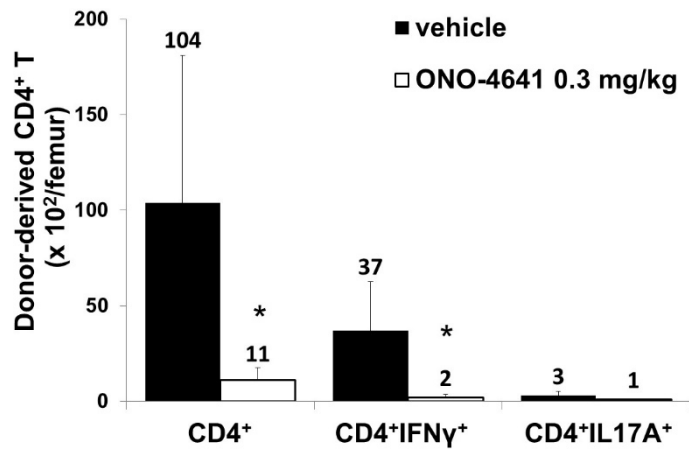


Figure 18 Continued

(E) Absolute numbers of donor-derived CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subsets in the vehicle or ONO-4641 0.3 mg/kg-treated groups on day 14. Indicated values are presented as mean + S.D., n=6 for the vehicle and n=5 for ONO-4641 0.3 mg/kg-treated group. A *t*-test was performed for comparison between the TBI plus LN cell infusion with vehicle and the ONO-4641 0.3 mg/kg groups, with a *p*-value of less than 5%. *, *p*<0.05

(A)

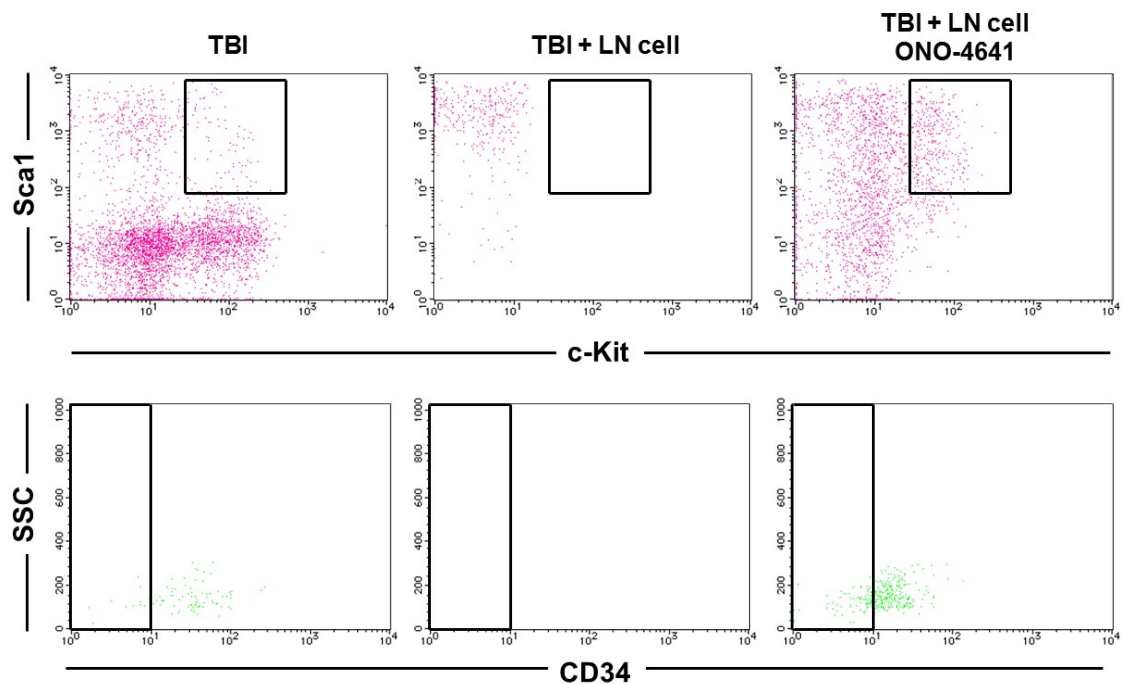


Figure 19 ONO-4641 treatment increases the number of HSPCs in the BM of model mice

Mice received TBI only with vehicle, TBI plus LN cell infusion with 0.5%MC (vehicle), or TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg treatment. Mice were treated daily with ONO-4641 0.3 mg/kg or vehicle for 13 days starting from day 1 after disease induction. On day 14, mouse femurs were collected for HSPC analysis.

(A) Representative FACS dot plots of HSPCs. Data represent the expressions of Sca-1 and c-Kit on Lin⁻ BM cells (top panels) and the expressions of CD34 on Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ BM cells (bottom panels) of TBI only with vehicle, TBI plus LN cell infusion with vehicle, and TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg treatment groups in the femur.

(B)

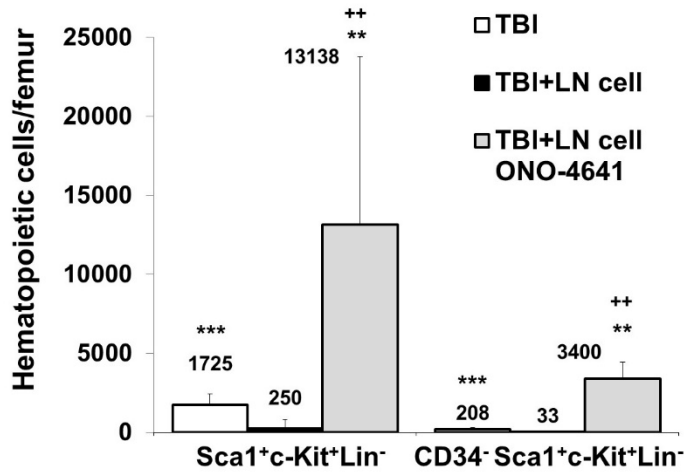


Figure 19 Continued

(B) The numbers of HSPCs of TBI only with vehicle, TBI plus LN cell infusion with vehicle, and TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg treatment groups in the femur. A *t*-test was performed for comparison between the TBI plus LN cell infusion with vehicle and the TBI only with vehicle, or the TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. **, p<0.01. ***, p<0.001. A *t*-test was performed for comparison between the TBI only and the TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. ++, p<0.01.

(C)

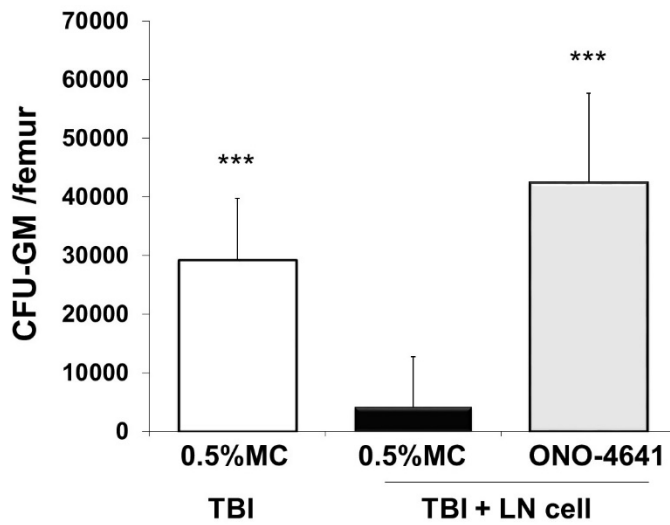


Figure 19 Continued

(C) The number of CFU-GM progenitors was enumerated in an *in vitro* colony-forming assay. Indicated values are presented as mean + S.D., n=8 per each group except for vehicle, n=10. A *t*-test was performed for comparison between the TBI plus LN cell infusion with vehicle and the TBI only with vehicle, or the TBI plus LN cell infusion with ONO-4641 0.3 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. ***, p<0.001.

(A)

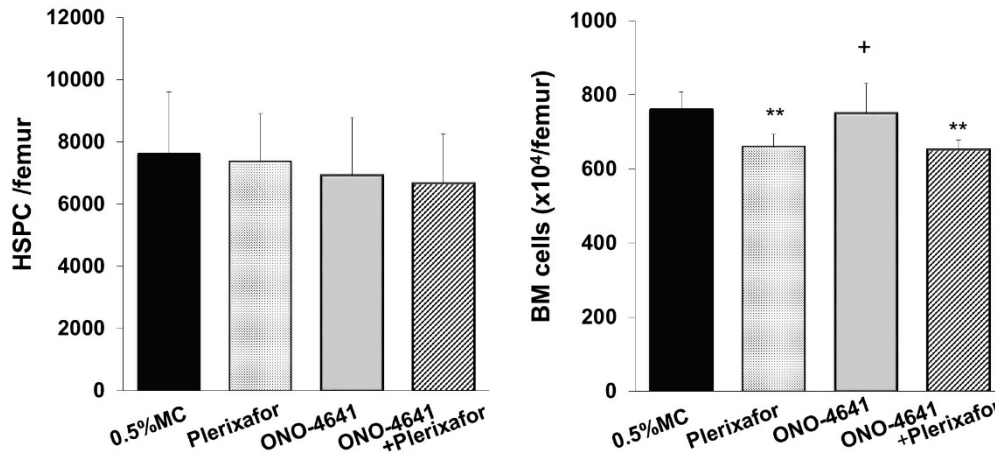


Figure 20 ONO-4641 regulates plerixafor-induced mobilization of HSPC in mice

Mice were administered orally with 0.5%MC (vehicle), ONO-4641 0.3 mg/kg, or injected subcutaneously with PBS, plerixafor 3 mg/kg, or ONO-4641 plus plerixafor (oral administration of ONO-4641 30 min before subcutaneous injection of plerixafor) for 8 days. After 3 h following the last dosing, femurs were collected for BM and HSPC cell analysis. Blood was also collected for HSPC cell analysis.

(A) The numbers of Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ HSPC and BM cells in the femur. Indicated values are presented as mean + S.D., n=5 per each group. A *t*-test was performed for comparison between the vehicle and the ONO-4641 0.3 mg/kg, the plerixafor 3 mg/kg, or the ONO-4641 plus plerixafor groups, with a p-value of less than 5%. **, p<0.01. ***, p<0.001. A *t*-test was performed for comparison between the ONO-4641 plus plerixafor and the ONO-4641 0.3 mg/kg, or the plerixafor 3 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. +, p<0.05.

(B)

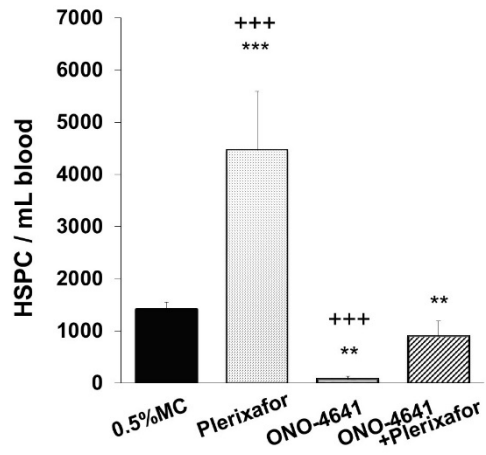
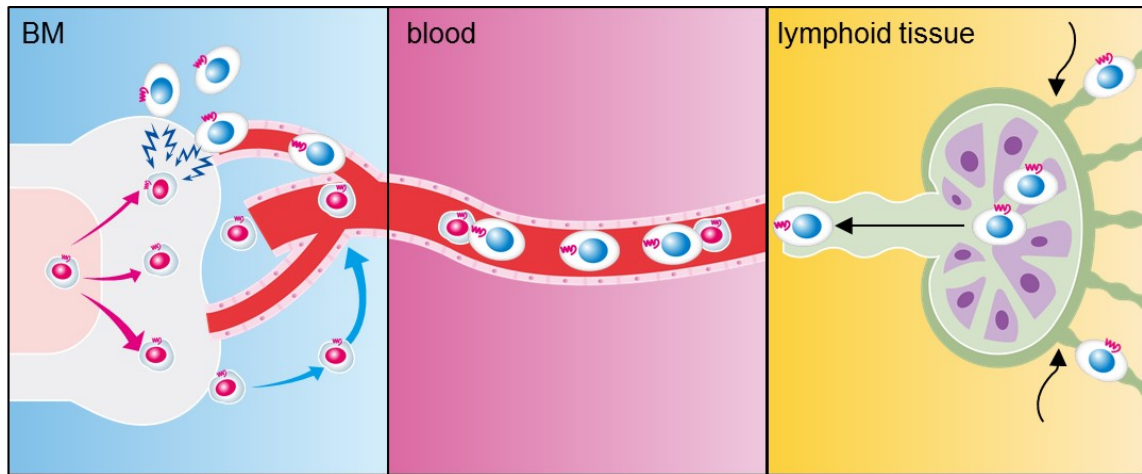


Figure 20 Continued

(B) The number of Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ HSPC cells in the blood. Indicated values are presented as mean + S.D., n=5 per each group. A *t*-test was performed for comparison between the vehicle and the ONO-4641 0.3 mg/kg, the plerixafor 3 mg/kg, or the ONO-4641 plus plerixafor groups, with a p-value of less than 5%. **, p<0.01. ***, p<0.001. A *t*-test was performed for comparison between the ONO-4641 plus plerixafor and the ONO-4641 0.3 mg/kg, or the plerixafor 3 mg/kg groups, with a p-value of less than 5%. ***, p<0.001.

(A) Pathology in aplastic anemia model



(B) Treatment with ONO-4641

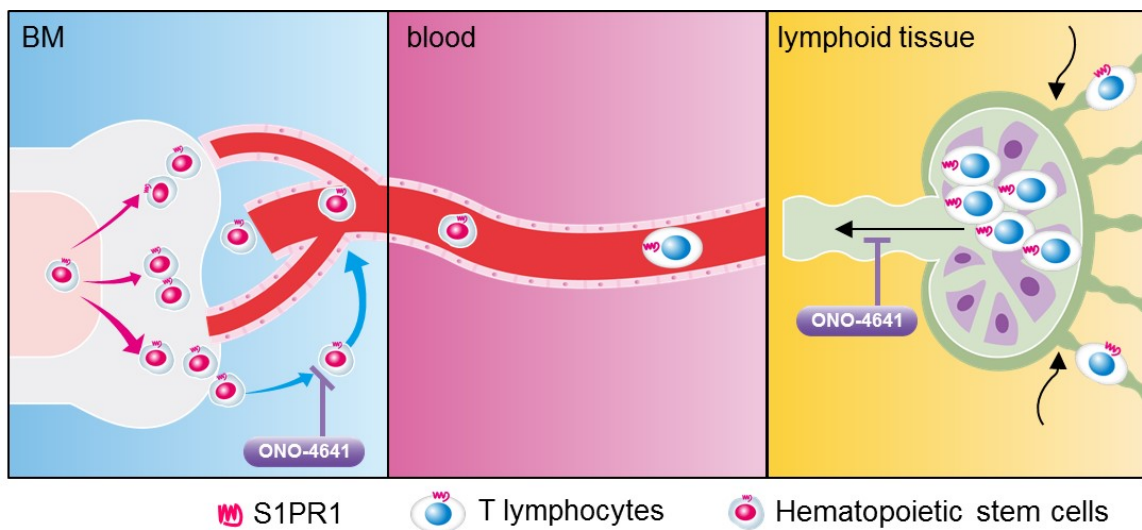


Figure 21 Scheme of the proposed mechanistic pathway of ONO-4641 in aplastic anemia model

(A) In the aplastic anemia model, T lymphocytes infiltrate into the BM, where they target and destroy hematopoietic stem cells. (B) ONO-4641 inhibits the infiltration of T lymphocytes into BM and the destruction of hematopoietic stem cells by preventing the egress of T lymphocytes from secondary lymphoid tissues. ONO-4641 also accumulates hematopoietic stem cells in the BM.