

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発

所属 九州大学生体防御医学研究所 免疫制御学分野
研究者 吉村 昭彦

分担研究者

大鵬薬品工業株式会社 木庭 守

要 旨

サイトカインシグナル制御分子 SOCS ファミリーのうち CIS3 の発現がリウマチ患者患部で亢進しており、マウス関節炎モデルにおいて CIS3 アデノウイルスは関節炎を抑制した。CIS3 は抗炎症性遺伝子として作用しリウマチの治療ターゲットとなることを明かにした。

1. 研究目的

慢性関節リウマチは我が国において総患者数30～50万人、年間発症者は1万5千人ともいわれ、代表的な難治性慢性炎症性疾患のひとつである。典型的な症状としては慢性、進行性に経過する多発性関節炎で、進展すると関節に変形を生じ様々な機構障害を起こす。特に女性に多く我が国では患者の80%を占める。患者のうち5万人が寝たきり状態にあると言われ、また最近では高齢者の発病も増えており、介護問題も含めて社会的に重要な問題となっている。本疾患の病因病態の解明および根治療法の開発には多大の努力が払われており、最近では抗TNF α 抗体や抗インターロイキン(IL)6受容体抗体を用いた治療も注目を集めている。しかしながら病態の分子論に基づく根本的な治療法は未だ確立されていない。本研究は炎症の拡大に重要な役割を果たすIL6/JAK1/STAT3のシグナル伝達経路に焦点をしばりその阻害因子であるCIS3を活用して新たな治療薬を開発しようというものである。また本研究の進展により同様の効果をもつ低分子化合物のシグナル阻害物質が見いだされれば関節炎にとどまらずクローン病や慢性大腸炎などの多臓器の免疫が関与する炎症性疾患の治療にも応用できると思われる。さらにJAK1/STAT3経路の阻害と炎症の関係を分子レベルで解明することができれば、炎症の拡大に関するサイトカインの関与について新たな理解が得られるであろう。本研究が成功すればこれまで蓄積された“サイトカインの細胞内シグナル伝達機構の解明”という極めて基礎的な研究成果が、直接医療に貢献しうる重要な応用例となると思われる。

2. 研究方法

(1) RAの滑膜サンプルは、人工関節置換術か滑膜切除術の術中よりインフォームドコンセントを得た上で得たものであり、RAの患者はアメリカリウマチ学会の診断基準をみたすものである。またOAの滑膜サンプルも、人工関節置換術の術中より得たものである。採取した滑膜は細かく切り刻み(数mm程度)、コラゲナーゼ(4mg/ml)処理後(37℃で2時間)、滑膜小片を培養シャーレに固定し(直径35mmのシャーレに3-10個)、培地(RPMI1640+10%FCS)を加え培養を開始した。80%コンフルエントになると細胞を継代した(3-7継代後の細胞を実験に使用)。

RA滑膜分離培養細胞にアデノウイルスベクターをMOI=50で感染後、24wellのプレートに 5×10^4 個(1mlのmedium)ずつまき、24時間後のmedium中のサイトカイン(TNF α , IL-1 β , IL-6)の産生量をELISA

にて測定した。また細胞増殖の測定は、同様に MOI=50 で感染後 6well のプレートに 5×10^4 個ずつまき、2 日後、5 日後、10 日後の細胞数をカウントした。

(3) 抗原依存性関節炎(antigen-induced arthritis:AIA)モデル; 8 週齢の C57BL/6 を使用した。2 本の注射器にそれぞれ $100 \mu\text{g}$ の methylated BSA(mBSA)と等量の complete Freund adjuvant(FCA)をとり、連絡針で 2 本の注射器をつなぎよく練ってオイルエマルジョンを作成した。これを 0, 7 日目に、尾根部と四肢の足底部に皮内注射した。21 日目に $100 \mu\text{g}$ の mBSA を後肢の足関節内に注射し関節炎を発症させた。6 日目に $50 \mu\text{l}(2 \times 10^9 \text{PFU/ml})$ のアデノウイルスを足関節内およびその周囲に注射する。左足関節にコントロールの LacZ を組み込んだアデノウイルスを、右足関節に SOCS3/CIS3 や dominant negative form の STAT3 を組み込んだアデノウイルスを投与しそれらを組織学的に比較した。35 日目に後肢を切除し、10%のホルマリンで約 3 日間固定、PH6.5 の EDTA にて約 3 週間脱灰、その後水洗、脱水、包埋、薄切りし、各染色(H-E 染色、Safranin-O 染色)を行った。組織学的評価は、次ぎのように採点化した。0:正常の関節 1:滑膜の増殖はないが、少量の浸潤細胞を認めるもの 2:軽度の滑膜細胞の増殖、浸潤細胞を認めるもの 3:中等度の滑膜細胞の増殖と浸潤細胞はみとめるが、軟骨の破壊は認めないもの 4:パニヌスを形成し、軟骨が破壊されているもの

(4) コラーゲン誘導性関節炎(collagen-induced arthritis:CIA)モデル; 8 週齢の DBA/1J マウスを使用した。2 本の注射器にそれぞれ $100 \mu\text{g}$ の II 型コラーゲンと等量の complete Freund adjuvant(FCA)をとり、連絡針で 2 本の注射器をつなぎよく練ってオイルエマルジョンを作成した。これを 0 日目に尾根部に皮内注射する。21 日目に $100 \mu\text{g}$ の II 型コラーゲンと等量の incomplete Freund adjuvant(FIA)を用いて同様の操作を行い、28 日目に $40 \mu\text{g}$ の LPS を腹腔内に注射し関節炎を発症させた。28 日目または 32 日目に $50 \mu\text{l}(2 \times 10^9 \text{PFU/ml})$ のアデノウイルスを四肢の足関節内およびその周囲に注射する。28 日目より、1 日おきに Clinical score をつけて比較検討した。Clinical score は腫脹の程度にあわせて一肢につき 0 点~4 点、四肢合計で最高 16 点になるが、次のように採点化した。0:正常の足関節 1:一肢の指関節のみ腫脹、発赤 2:一肢全体の軽度の腫脹、発赤 3:一肢全体の最大限の腫脹、発赤 4:関節の変形や強直を認めるもの

(5) マウスの滑膜サンプルは後肢を切除したあと、皮膚、筋肉、脂肪組織、骨、腱を除去したものを使用した。

(6) mRNA 検出のためのノーザンブロッティング、タンパク質検出のためのウエスタンブロッティングは既報にしたがって行った。

3. 研究成果

(1) RA 患者滑膜において STAT3 の活性化と CIS3 の高発現を認めた。しかし OA 患者組織では STAT3 の活性化も CIS3 の発現も認めなかった。また AIA, CIA モデルにおいても CIS3 の発現亢進が認められた(図 1 参照)。RA 患者由来の滑膜細胞を用いてアデノウイルスを用いて CIS3、ドミナントネガティブ(dn)STAT3 の強制発現を行った。滑膜細胞はすでに知られているように IL-6 の自己分泌を行っており、STAT3 が恒常的に活性化されている。CIS3 および dnSTAT3 アデノウイルスの投与によって細胞増殖および IL-6 の産生が強力に抑制された(図 2 参照)。また STAT3 の活性化も抑制された。

(2) 代表的なマウス関節炎モデルであるアジュバント関節炎(AIA)およびコラーゲン関節炎(CIA)において STAT3 の活性化とそれに遅れて CIS3 の発現が誘導された(図 1)。CIS3 遺伝子を組み込んだアデノウイルスがほぼ完全に関節炎モデルの発症を抑制すること、そればかりかすでに悪化した炎症を軽減させ治癒率を高めることを発見した(図 3、4、5)。ウイルス投与によって組織破壊も抑えられ IL-6 レベルも減少していた(図 3 c)。CIA モデルにおいては dnSTAT3 よりも CIS3 のほうが効果的であった。このことから CIS3 が炎症性疾患において抑制的な作用を持つことが示唆された(図 4、5)。

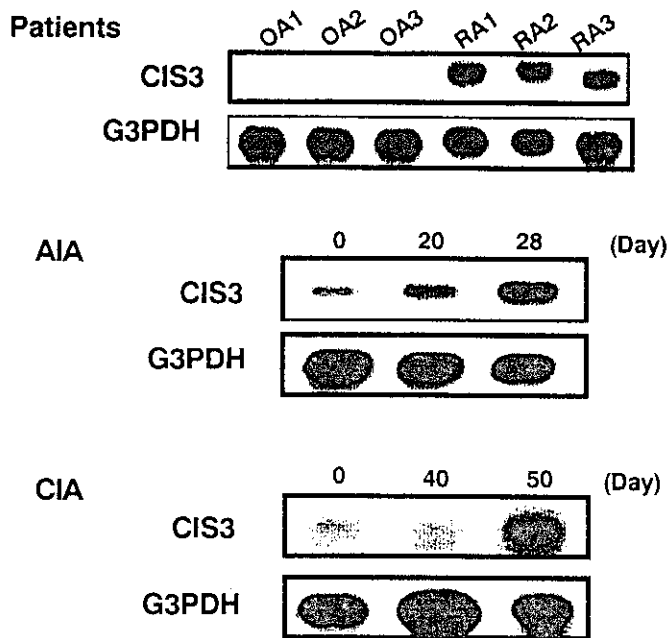


図1 OA患者、RA 患者関節、および AIA,CIA モデルでの CIS3 の発現。ノーザンプロテイングによって CIS3mRNA とコントロールの G3PDH の発現を検討した。AIA,CIA では感作開始後表記の日数を経過した患部を採取した。Total RNA 抽出後それぞれのプローブを用いてノーザンプロテイングを行った。

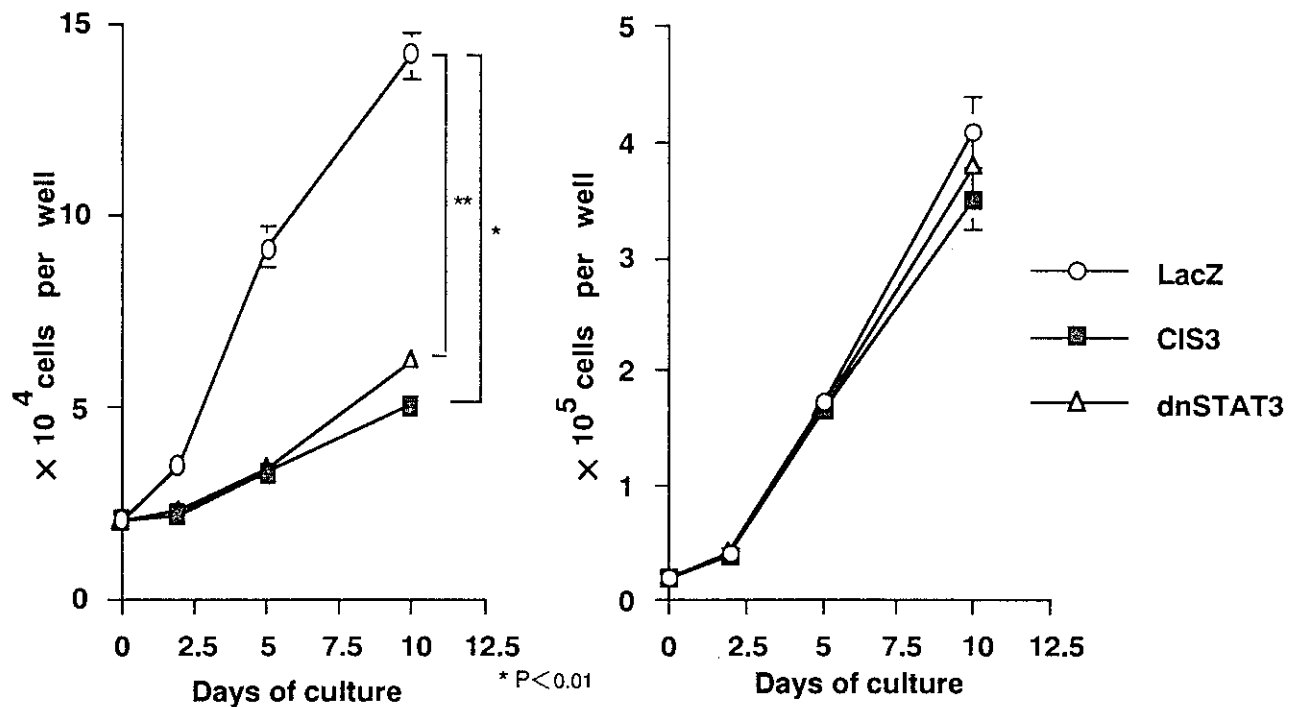


図2 RA 患者由来の滑膜細胞 (左) および NIH-3T3 線維芽細胞の増殖における CIS3 および dnSTAT3 アデノウイルスの影響。ウイルス感染後の細胞増殖を調べた。CIS3 および dnSTAT3 アデノウイルスは滑膜細胞の増殖を抑制した。しかし NIH-3T3 細胞の増殖には影響しないことから細胞特異性が示唆される。

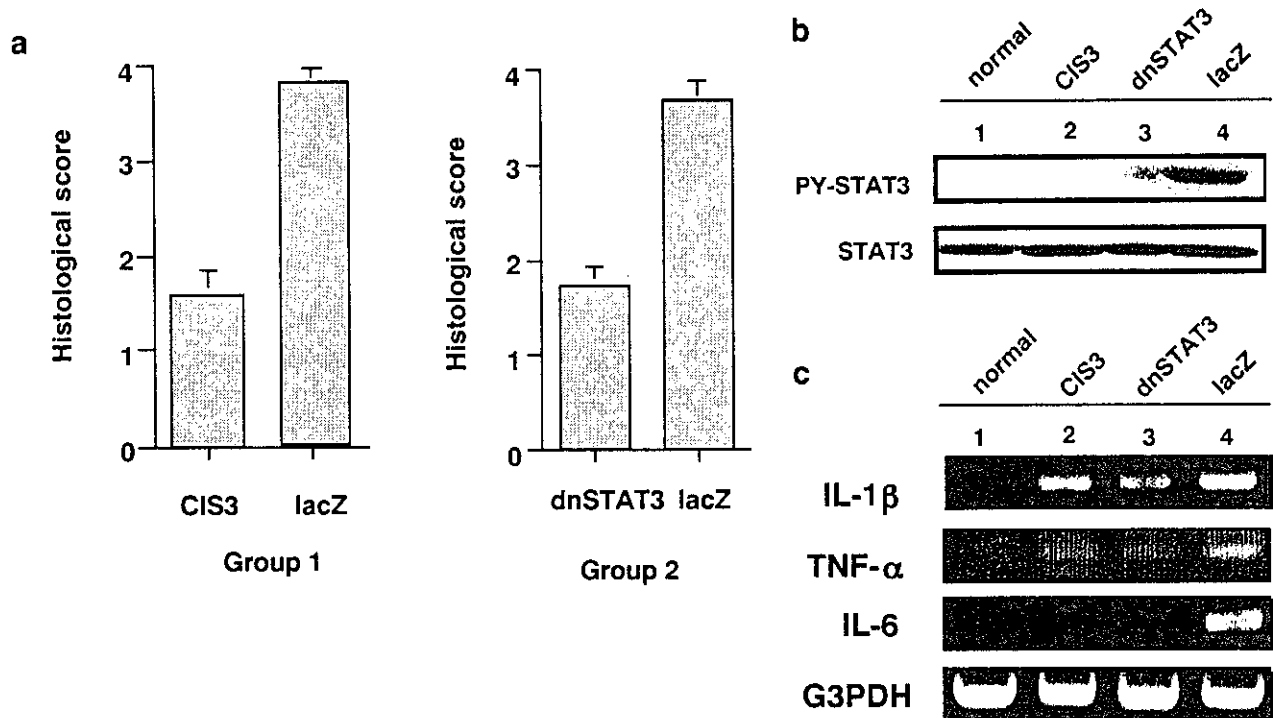


図3. AIA モデルにおけるアデノウイルスの効果。(a)ではそれぞれのアデノウイルスを投与した場合の関節の炎症の組織学的な評価を、(b)では STAT3 のリン酸化、(c)ではそれぞれのサイトカインの産生を RT-PCR にて測定した。

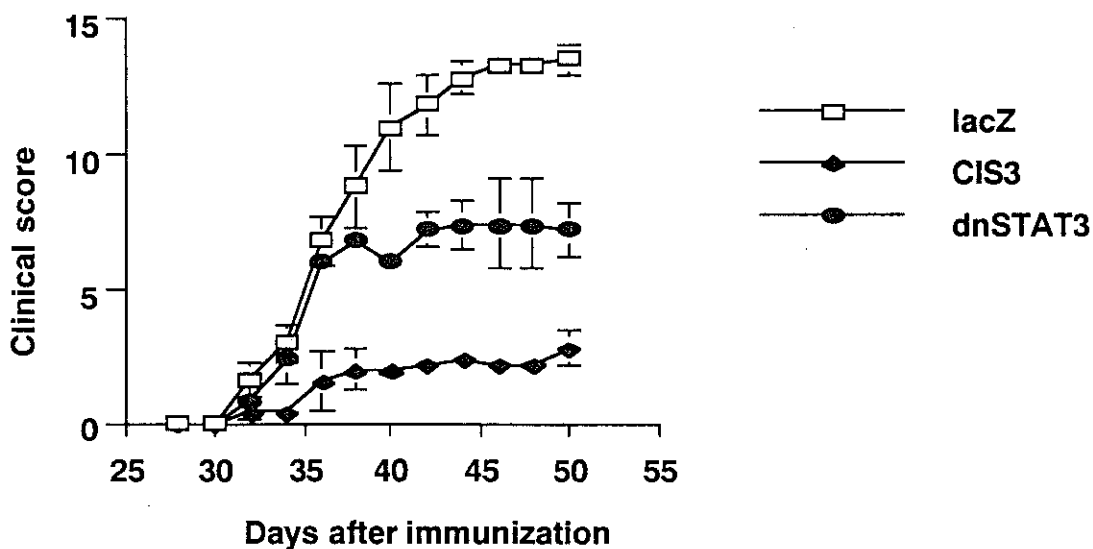


図4 CIA モデルにおけるアデノウイルスの関節腫脹に対する効果。CIA における CIS3 およびドミナントネガティブ STAT3 アデノウイルス投与後の CIA モデルの Clinical Score を示す。

(3) 図6に示すように JAK2 阻害剤として知られている AG490 は部分的に CIA を抑制することが観察された。しかし AG490 は毒性が強く、投与量が少なかったためか、著効は示さなかった。また長期の観察もできなかった。しかし毒性の低い JAK 阻害剤、特に IL-6 に特異的な JAK1 の阻害剤が開発されれば関節炎の治療に効果が期待できることがわかった。

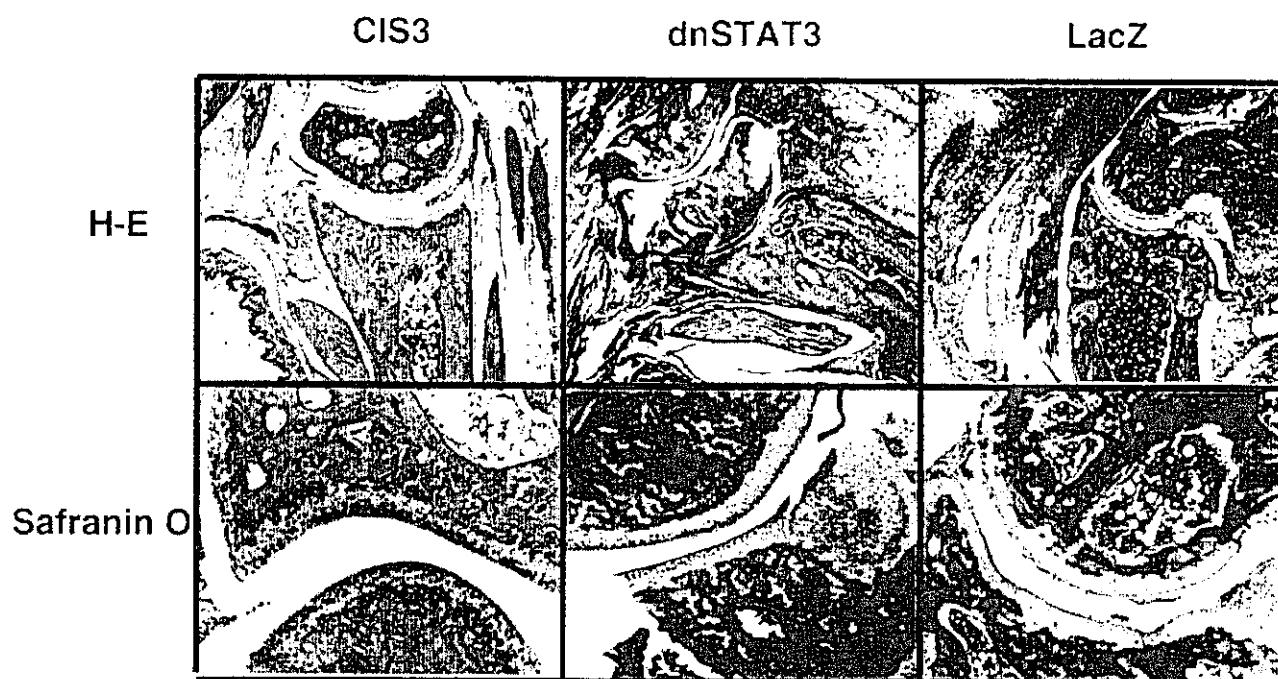


図-5. CIA における CIS3 およびドミナントネガティブ STAT3 アデノウイルスの効果。それぞれのウイルス投与後の組織像を示す。コントロールの lacZ では患部の腫脹と炎症性細胞の浸潤、軟骨の破壊が進行しているが、dnSTAT3 では中程度に、CIS3 ではほぼ完全に抑制された。

(4) 既存のチロシンキナーゼ阻害活性をもつ化合物 (AG シリーズ) 30 種類を調べたが STAT3 に特異的な阻害剤はなかった。大鵬薬品工業の所有する化合物約 2 万種類をスクリーニングしたが JAK1/STAT3 に特異的な代表的な化合物は得られず、抑制効果は非特異的なものであった。

4. 考察・まとめ

すでに IL6 が炎症性疾患の増悪化に関与することが明らかにされつつある。例えば IL6 ノックアウトマウスではコラーゲン関節炎やアジュバント関節炎の症状が軽いことが報告されており、また抗 IL6 受容体抗体が IL6/STAT3 のシグナルを抑制し、関節炎を軽減することが知られている。また最近炎症性腸疾患においても IL6 が炎症の拡大に関与することが多数報告されている。すなわち IL6 は炎症の原因というよりは炎症の増悪化や拡大に寄与することが明らかにされつつある。そのメカニズムとして IL6 が T 細胞の増殖、生存をサポートするという説があり、実際抗 IL6 受容体抗体は T 細胞のアポトーシスを促進した。しかし我々の実験では IL6 は滑膜細胞のオートクリン増殖因子として働き、そのシグナルを停止することで細胞増殖のみならず、さらなる IL6 の分泌を抑制できることが示された。本研究によりこのような IL6 ないしその下流の STAT3 の炎症への関与が分子レベルで解明され、JAK1-STAT3 が関節炎治療のための創薬のターゲットとなりうるということが明かとなった。

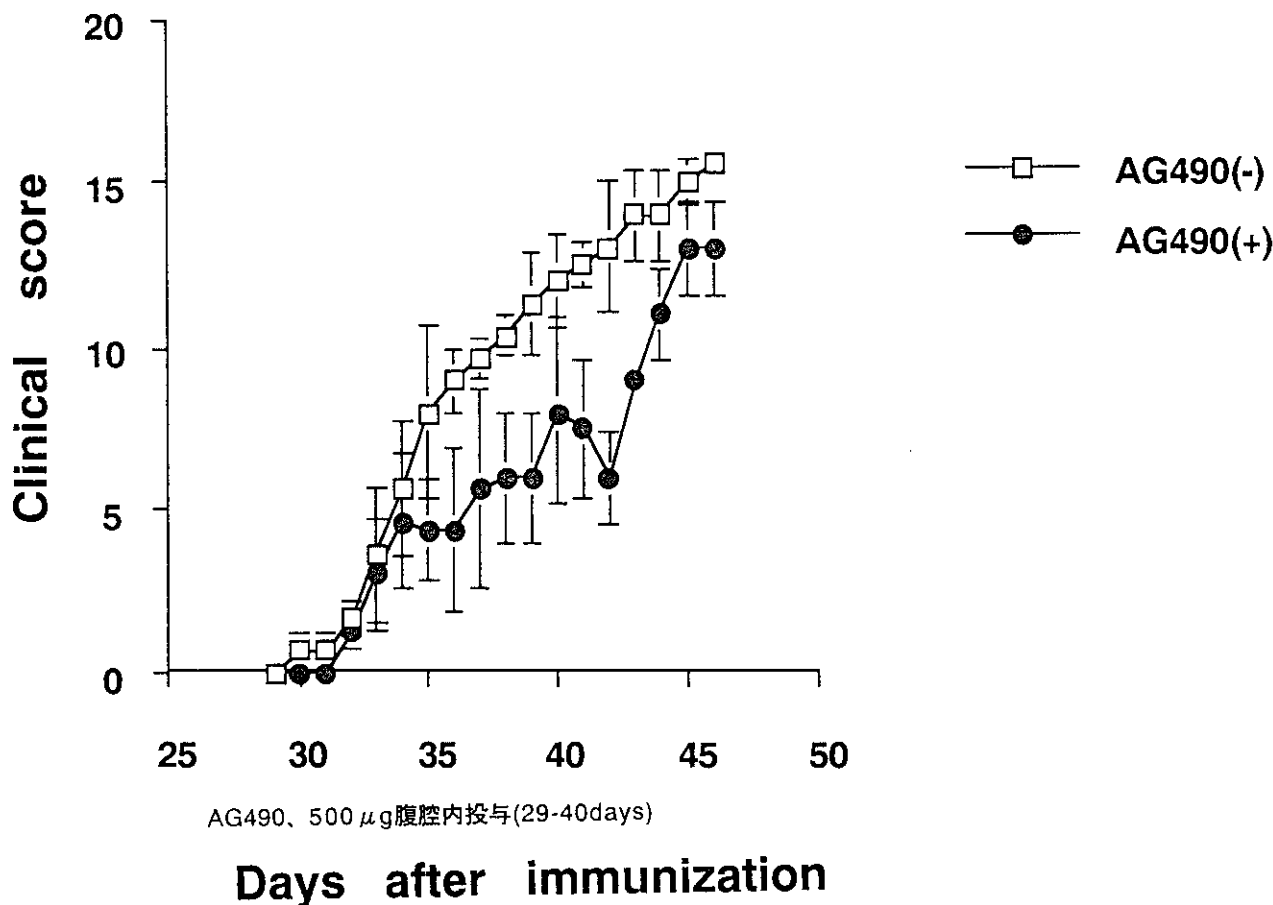


図6 CIAモデルにおけるアデノウイルスの関節腫脹に対する効果。AG490投与後のCIAモデルのClinical Scoreを示す。

存のチロシンキナーゼ阻害活性をもつ化合物（AGシリーズ）30種類を調べたがSTAT3に特異的な阻害剤はなかった。大鵬薬品工業の所有する化合物約2万種類をスクリーニングしたがJAK1/STAT3に特異的な代表的な化合物は得られず、抑制効果は非特異的なものであった。

一方で炎症性サイトカインのシグナルを調節するメカニズムの解明が進んでいる。我々は独自に発見したCIS/JABファミリーがサイトカイン-JAK-STATシグナル系の負のフィードバック調節因子として作用することを明かにしてきた。特に我々はCIS3が関節炎のみならず大腸炎やアトピー性皮膚炎などの炎症部位で高発現することや、それぞれの細胞でIL6のシグナルを抑制することを見出している。JABやCIS3は本来生体のもつフィードバック調節のひとつであり、自然治癒力の実態のひとつと言っても過言ではない。抗IL6受容体抗体に比べるとJAB/CIS3は広範な炎症性サイトカインのシグナルをすべてをブロックできるのでさらに強力な効果が期待できる。本研究はサイトカインシグナルの抑制因子の発見というきわめて基礎的な研究を治療にまで結びつけるものである。

慢性関節リウマチ(RA)は関節滑膜における難治性の炎症性疾患であり自己免疫疾患の一種であると考えられている。その原因は諸説あり未だ確定的なものはないが、我々はIL6をはじめとするサイトカインのシグナル抑制分子群であるCIS/SOCSファミリーが関節炎の進展に対して抑制的に働くこと明らかにした。以上の結果よりIL-6/STAT3経路は自己免疫性炎症性疾患の増悪化に寄与し、それを抑制するCIS3は抗炎症性遺伝子として作用することが明かとなった。また本研究はサイトカインシグナル経路遮断薬の自己免疫性炎症性疾患への治療効果を期待させるものである。

しかし何故滑膜細胞ではSTAT3経路を抑制することで増殖やIL-6の分泌を抑制できるのか？CIS3アデノ

ウイルスは破骨細胞やT細胞にはどのような影響を及ぼすのか?など基礎的な問題も多く残されており、これらを解決することは関節炎の病態を理解し、新しい治療法の開発につながることを期待される。

我々は JAK2 阻害剤として知られる AG490 の CIA モデルへの効果を検証した。試験管内では AG490 はやや弱く IL6 による STAT3 の活性化を抑制した。これは IL6 が主に JAK1 を使用しているためと思われる。さらに CIA モデルでは部分的ではあるが抑制効果が認められた。副作用の少ない JAK1 阻害剤を開発できれば関節炎に有効な治療薬となりうる可能性が示された。

5. 研究発表

Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, and Yoshimura A

Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis J. Clin. Invest. 2001 108: 1781-1788.

6. 知的所有権の取得状況

なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社