

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

大鵬薬品生体防御医学研究所 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(SOCS3)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。また関節炎モデルを軽減する新規化合物を発見した。

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絞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と思われる。

2. 研究方法

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)

(2) アデノウイルス抗原依存性関節炎(antigen-induced arthritis:AIA)モデル、コラーゲン誘導性関節炎(collagen-induced arthritis:CIA)モデルについてはすでに報告している。化合物 (TAS) はマウスに 100-300 mg/kg/day (1日1回投与) を経口投与した。

(3) SOCS1 トランスジェニックマウスは lck プロモーターを用いて既報の通り作成した。SOCS1 ノックアウトマウスおよびインターフェロン γ (IFN γ) とのダブルノックアウト (DKO) マウスはすでに報告している。

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。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。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。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。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。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。

(3) 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。さらに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) SOCS-1 はサイトカインシグナルを抑制する負のフィードバック制御因子として知られている。しかし SOCS-1 欠損マウスの解析から SOCS-1 は病原体菌体成分リポ多糖 (LPS) のシグナル伝達や LPS トレランスに関与していることが明らかにされた。SOCS-1 は TLR シグナルの制御機構に関与し自然免疫の制御において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(5) 関節炎モデル、特に CIA を抑制する化合物のスクリーニングを行った。その結果 1 化合物 (TSA) について CIA を抑制する効果を認めた。作用機序を明らかにするために JAK/STAT 経路や NF- κ B 経路に対する阻害効果を調べた。レポーターアッセイの結果 10 マイクロモル程度の濃度で STAT よりも NF- κ B の活性化を抑制する効果を認めた。本化合物は I- κ B キナーゼを抑制するほか NF- κ B そのものの分解を促進した。本化合物の標的について現在結合タンパク質の精製と同定を行っている。

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ことが明らかとなった。

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い出している。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らかとなった。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。また我々は CIA を抑制する低分子化合物も見い出しており今後その作用機構の解明をすすめさらに効果的な分子を作成、スクリーニングしていく。

5. 研究発表

(代表的な論文にとどめる)

Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H, Kubo M, and Yoshimura A SOCS1/JAB Is a Negative Regulator of LPS-Induced Macrophage Activation. *Immunity* 2002, 17: 583-591

Hanada T and Yoshimura A Regulation of cytokine signaling and inflammation" *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002; 13 : 413-421.

Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A Activation of STAT3 by the Hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation *J. Exp. Med.* 2002 196: 641-653.

Flodstrom M, Maday A, Balakrishna D, Cleary MM, Yoshimura A and Sarvetnick N; Antiviral defenses expressed by the pancreatic b cell govern the development of type 1 diabetes after Coxsackievirus B4 infection. *Nature Immunology* 3 : 373-382, 2002.

Ohtsuka S, Takaki S, Iseki S, Miyoshi K, Nakagata N, Kataoka Y, Yoshida N, Takatsu K and Yoshimura A; SH2-B is Required for both Male and Female Reproduction. *Mol Cell Biol* 22 : 3066-3077, 2002.

6. 知的所有権の取得状況

なし