

平成15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

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	<p>リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用</p>	<p>西島正弘 …… 1</p>
<p>896A KH21010</p>	<p>低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発</p>	<p>芝崎 太 …… 6</p>
<p>897A KH21011</p>	<p>細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発</p>	<p>松田道行 …… 19</p>
<p>898A KH21012</p>	<p>抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構</p>	<p>新井洋由 …… 25</p>
<p>899A KH21013</p>	<p>ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究</p>	<p>葛西正孝 …… 33</p>
<p>900A KH21014</p>	<p>難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用</p>	<p>井上和秀 …… 39</p>
<p>901A KH21015</p>	<p>動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発</p>	<p>望月直樹 …… 47</p>
<p>902A KH21016</p>	<p>天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究</p>	<p>上原至雅 …… 51</p>
<p>903A KH21017</p>	<p>肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発</p>	<p>江崎 治 …… 55</p>
<p>904A KH21018</p>	<p>ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究</p>	<p>絵野沢 伸 …… 59</p>
<p>905A KH21019</p>	<p>神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬</p>	<p>田平 武 …… 62</p>
<p>906A KH21020</p>	<p>レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用</p>	<p>若宮伸隆 …… 67</p>
<p>907A KH21021</p>	<p>感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発</p>	<p>鈴木和男 …… 74</p>
<p>908A KH21022</p>	<p>自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発</p>	<p>川 茂幸 …… 84</p>
<p>909A KH21024</p>	<p>動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用</p>	<p>北川隆之 …… 89</p>
<p>910A KH21025</p>	<p>新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用</p>	<p>山越 智 …… 95</p>
<p>911A KH21026</p>	<p>マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析</p>	<p>辻本豪三 …… 104</p>
<p>912A KH21027</p>	<p>細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明</p>	<p>桃井 隆 …… 111</p>
<p>913A KH22071</p>	<p>ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発</p>	<p>鈴木康夫 …… 118</p>
<p>914A KH22072</p>	<p>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</p>	<p>吉村昭彦 …… 121</p>
<p>915A KH22073</p>	<p>T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立</p>	<p>宮武昌一郎 …… 125</p>
<p>916A KH22082</p>	<p>変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析</p>	<p>目加田英輔 …… 133</p>

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
研究者 吉村 昭彦

研究要旨 サイトカインシグナル制御分子 SOCSファミリーのうち SOCS3 がリウマチ患者で亢進しており、マウス関節炎モデルにおいて SOCS3 アデノウイルスは関節炎を抑制した。またマクロファージにおいて SOCS3 を欠損させると炎症性サイトカインを抗炎症性サイトカインに変換できた。

分担研究者

大鵬薬品生体防御医学研究所 木庭 守

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)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絞りその阻害因子であるSOCS3/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。本研究は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をもとに新たな創薬の標的を見い出すことを目的としている。

B. 研究方法

- (1) 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)モデルについては既報通りに作成した。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。
- (2) 293細胞をTSA化合物で1時間処理した後にTNF α で刺激したのちに細胞を抽出し抗リン酸化I-kB、NF-kB(p65)、STAT5抗体でウエスタンブロッティングを行った。
- (3) SOCS1ノックアウト(KO)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。
- (4) SOCS3コンディショナルノックアウト(C-KO)マウスは既報のように作成しLysCreノックインマウスを交配することでマクロファージ特異的なC-KOマウスを作成した。腹腔よりマクロファージを調整しIL-6(10ng/ml)またはIL-10(10ng/ml)存在下でLPS刺激し培養上清中のTNF α をELISAにて測定した。

C. 研究結果

- (1) SOCS-1欠損マウスの炎症症状がLPS(リポ多糖)によって誘導されるエンドトキシンショックに似ていることから、SOCS-1が病原体に対する感受性に影響している可能性があると考えられた。IFN γ +/+SOCS-1 $^{-/-}$ マウスやSOCS-1 $^{-/-}$ STAT1 $^{-/-}$ マウスはコントロールマウスよりもLPS感受性が高いことが示され

た(12, 13)。LPS は TNF \cdot を誘導して個体を死に至らしめると考えられている。IFN \cdot γ SOCS-1 γ マウス、SOCS1 γ マウスともにコントロールマウスに比べて LPS 投与後の血中 TNF \cdot は高値を示した。SOCS γ マクロファージでは LPS 刺激による STAT1 のチロシンリン酸化ばかりでなく、I \cdot B \cdot , JNK, p38 のセリンリン酸化も増強していた。この結果は、SOCS-1 が TLR シグナル経路を直接あるいは間接的に抑制することで、LPS によるマクロファージの活性化を抑制していることを示している。しかしながら SOCS-1 の作用機序は今後の課題である。

(2) 我々は SOCS1 γ マウスと T, B 細胞に SOCS1 を発現するトランスジェニックマウスとのかけあわせを行い、リンパ球では SOCS1 が発現しているが他の臓器や細胞では SOCS1 がないマウス (SOCS1 γ -Tg) を作成した。この場合 SOCS1 を T 細胞に戻すことでマウスは長期生存可能となるものの関節炎を含む炎症性疾患と自己免疫疾患を発症することを示した。このようなマウスでは樹状細胞が異常に活性化されており、Blys と呼ばれる B 細胞の増殖分化誘導因子や T 細胞の副刺激分子 (CD80, C40 など) を強く発現していた。SOCS1 ノックアウトでみられる T 細胞依存性の炎症性疾患も実は樹状細胞の異常な活性化が原因と考えられる。

(3) SOCS3 は LPS, IL-6, IL-10 によって急速に誘導され、TLR シグナルの制御にかかわることが示唆されていた。マクロファージ特異的な SOCS3-コンディショナル-KO マウスは LPS ショックに対して抵抗性を示した。この性質は STAT3 のマクロファージ特異的なコンディショナルノックアウトと完全に正反対である。野生型マウスと SOCS3-conditional-KO マウス (SOCS3 γ -) 由来のマクロファージを比較したところ、SOCS3 を欠損するマクロファージでは炎症性サイトカインである IL-6 でも抗炎症性サイトカイン IL-10 と同様に LPS シグナルを抑制した。このとき STAT3 の活性化を比較した。野生型マクロファージでは LPS 存在下では IL-10 は強力に STAT3 を活性化するが IL-6 は STAT3 を活性化できなかった。どちらの場合も SOCS 3 蛋白は強力に誘導されていた。一方 SOCS 3 欠損マクロファージでは IL-6 も IL-10 と同様に STAT3 の活性が強く起こっていた。すなわちこの結果は SOCS3 は IL-10 は抑えないが IL-6 を抑える。そのため野生型マクロファージでは IL-6 は LPS シグナルを抑制できない。逆に言えば SOCS3 がなくなれば IL-6 は炎症性サイトカインから抗炎症性サイトカインに変換されることになる。こ

れは SOCS3 が IL-6 受容体 (gp130) には結合するが IL-10 受容体には結合しないことによって説明されることがわかった。これは SOCS3 の結合できない gp130 (Y759F) 変異マクロファージでは IL-10 のみならず IL-6 でも TNF 産生が抑制されたことから証明された。

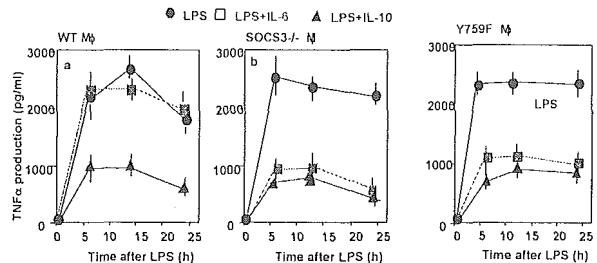


図1 野生型 (WT)、SOCS3 γ 、gp130 (Y759F) マクロファージにおける LPS 応答と IL-6 および IL-10 の効果。LPS 応答は TNF α の産生量を測定した。SOCS3 γ または gp130 (Y759F) 変異マクロファージ (M ϕ) では IL-10 のみならず IL-6 でも TNF 産生が抑制された。

(4) 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 化合物について CIA を抑制する効果を認めた。本化合物の添加によって滑膜細胞からの IL-6 の産生が抑制された。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。さらに本化合物は 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。分解はプロテアソーム阻害剤 LLnL で抑制されることからユビキチン化が関与することが示唆された。図に結果を示す。

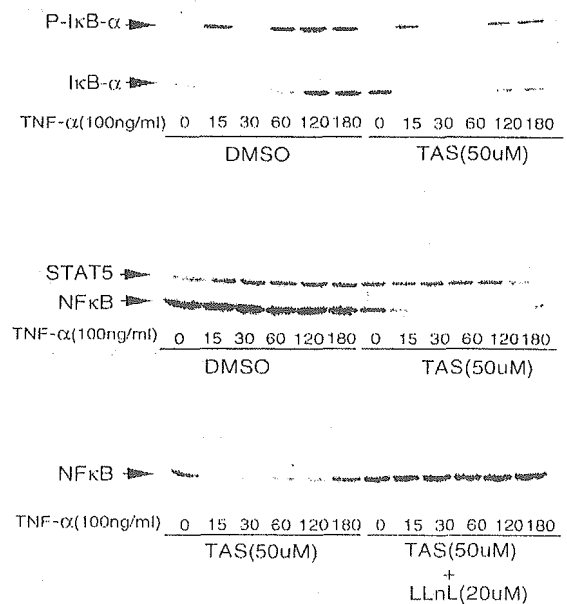


図2 TSA 化合物による NF- κ B 活性化の抑制 293

細胞を TNF α にて刺激し I-kB のリン酸化 (上段) および NF-kB (p65) の分解 (中段、下段) をウェスタンブロットによって調べた。

TSA の作用機構を解明するために TAS 化合物をビーズに固定したアフィニティカラムを用いて TAS 結合タンパクを精製した。マスマスペクトルによって主要な結合分子は NF90 であることがわかった。NF90 は DNA-依存性キナーゼ-Ku 複合体のサブユニットで IL-2 など様々な転写に関与することが知られている。今後 NF-kB やその標的遺伝子、特に IL-6 や TNF との関連を調べていく。

D. 考察

炎症性サイトカインのシグナル伝達機構は STAT や NF-kB を中心に大筋が理解されようとしている。一方これ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/SOCS 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 SOCS3 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 IL-6 のシグナルを抑制することを見出ししている。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 SOCS3 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。また一方でマクロファージでは SOCS3 は IL-6 のシグナルを抑制してむしろ炎症性に働く。このような性質をうまく利用することで炎症性疾患の治療をめざすことが可能と思われる。

E. 結論

SOCS3 が炎症の制御にきわめて重要で SOCS3 の発現ないし機能を制御することは全く新しい炎症性疾患の制御につながる事が予想される。

F. 研究発表

(代表的な論文にとどめる)

Kimura A, Kinjyo I, Matsumura Y, Mori H, Mashima R, Harada M, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A. SOCS3 is a physiological negative regulator for granulopoiesis and G-CSF receptor signaling. *J Biol Chem*. 2004, 297; 6905-6910

Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*. 2003, 4: 1169-1176.

Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. WSX-1 is required for resistance to Trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity*. 2003, 19: 657-667.

Hanada T, Yoshida H, Kato S, Tanaka K, Masutani K, Tsukada J, Nomura Y, Mimata H, Kubo M, Yoshimura A. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity*. 2003; 19: 437-450.

Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M. : SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses *Nature Medicine* 2003, 9, 1047-1054

Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, and Yoshimura A; IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages *Nature Immunol*. 2003; 4, 551-556

Saeki K, Miura Y, Aki D, Kurosaki T, and Yoshimura A; The B cell-specific major raft protein, Raftlin is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction. *EMBO J* 2003, 22:3015-3026

Sasaki, A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, Sasaki M, Kuriyama M, Saito N, Shibuya M, Yoshimura A. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1 *Nature Cell Biol*. 2003, 5:427-432.

Yasukawa H, Yajima T, Duplain H, Iwatate M, Kido M, Hoshijima M, Weitzman MD, Nakamura T, Woodard S, Xiong D, Yoshimura A, Chien KR, Knowlton KU. The suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) is a novel therapeutic target for enterovirus-induced cardiac injury. *J Clin Invest*. 2003, 111: 469-478.

Matsumoto A, Seki YI, Watanabe R, Hayashi K, Johnston JA, Harada Y, Abe R, Yoshimura A, Kubo M. A Role of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated Interleukin 2 Production. *J Exp Med*. 2003, 197: 425-436.

Minoguchi M, Minoguchi S, Aki D, Joo A, Yamamoto T, Yumioka T, Matsuda T, Yoshimura A. STAP-2/BKS, an adaptor/docking protein, modulates STAT3 activation in acute-phase response through its YXXQ motif. *J Biol Chem*. 2003 278: 11182-11189

Sasaki A, Inagaki-Ohara K, Yoshida T, Yamanaka A, Sasaki M, Yasukawa H, Koromilas AE, Yoshimura A. The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem.* 2003 278:2432-2436

Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, Behrmann I, Tsiaris W, Sasaki A, Schneider-Mergener J, Yoshimura A, Neel BG, Heinrich PC, Schaper F. SHP2 and SOCS3 contribute to Y759-dependent attenuation of IL-6-signaling through gp130. *J Biol Chem.* 2003 278: 661-671

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成15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16年9月30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