

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総合研究報告書

関節リウマチの PADI4 を標的とする治療法の開発

研究分担者 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授 山本 一彦

研究協力者 庄田 宏文 同 助教
瀬理 裕 同 大学院生
藤尾 圭志 同 講師
鈴木 亜香里 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター
自己免疫疾患研究チーム 上級研究員

研究要旨

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis:RA)は多因子疾患であり、その疾患感受性遺伝子として Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)が同定されているが、関節炎病態における意義は明らかとなっていない。今回 PADI4 の関節炎病態・骨破壊における役割を明らかとするため、PADI4 knockout (KO)マウスを作成した。コラーゲン誘導性関節炎(CIA)モデルでは、関節炎の著明な軽減、抗コラーゲン抗体価の低下、血清炎症性サイトカインの低下を認めた。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)免疫による関節炎モデルでは、PADI4 KO マウスにおいて関節炎の重症度の低下がみられた。更に、顆粒球系細胞、単球系細胞の減少、抗 GPI 抗体価の低下、Th17 細胞の減少を認めた。PADI4 は関節炎の病態に関与することが想定されたが、その作用機序としては免疫系細胞に対して多様な影響を有していることが判明した。以上の検討より PADI4 は、自然免疫・獲得免疫系に影響を与え、RA の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなった、新たな創薬標的となりうると考えられた。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)は全身の関節に持続的な炎症をきたす疾患であり、炎症の持続により骨破壊、機能障害に至ることが知られている。RA は多因子疾患として知られているが、現在、RA の病因に関して、次のような仮説が提唱されている。すなわち、喫煙や歯肉炎により、肺や口腔内にシトルリン化蛋白が形成され、これに対する免疫応答が惹起される。そして、このような個人に偶発的な関節炎が起こり、関節内の蛋白がシトルリン化されることで、免疫応答の標的が関節内に向けられる、というものである。また、このシトルリン化された自己蛋白に対する自己抗体は、発症後の関節破壊の進展にも影響する。一方、我々は蛋白のシトルリン化酵素 Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)を RA の

疾患感受性遺伝子として同定し、疾患感受性アレルでは mRNA 分解の低下が起こることにより PADI4 の発現亢進が起きることが分かっている。メタ解析の結果では、アジア人だけでなく欧米人でも関連が認められることが追認され、民族を超えた普遍的な病因との関係が注目されている。一方で、PADI4 の生理学的機能研究では PADI4 はヒストンのシトルリン化などを介した転写調節により、細胞生存に関与しているとの報告もある。PADI4 は免疫系においては好中球、単球やマクロファージに発現することが知られている。しかし、PADI4 の免疫系における機能については未知の部分が多く、PADI4 を標的とした RA 治療法開発の為に PADI4 の免疫系における機能解析が必要である。そこで、この仮説において重要な役割を果たす PADI4 の病因論的

役割を検証し、根本的治療法を開発することを目的として研究を推進した。

B. 研究方法

(1) PADI4 KO マウス作成

PADI4 ノックアウトマウス(PADI4 gene exon 1 の欠損による)を C57BL/6 系で作成した。関節炎を惹起可能なバックグラウンドにするため、DBA/1J 系へのバッククロスを完成させた。

(2) コラーゲン誘発関節炎

DBA/1J, C57BL/6 系の 6-8 週齢メスマウスに、II 型コラーゲンを免疫し、コラーゲン誘発関節炎(collagen-induced arthritis (CIA))の発症率・重症度を検討した。経時的に採血した血清を用いて関節炎マウス血清中の抗 II 型コラーゲン抗体(IgM, IgG)、抗環状シトルリン化ペプチド(cyclic citrullinated peptide: CCP)抗体を ELISA 法にて測定した。また炎症関節組織におけるシトルリン化蛋白の発現を免疫染色法で調べた。一部のマウスは初回免疫後 7 日目でリンパ節、脾臓における濾胞性ヘルパー T 細胞(Tfh)、Germinal center (GC) B 細胞の分化を FACS で検討した。また脾臓 CD4 陽性 T 細胞を MACS にて単離し、II 型コラーゲン刺激に対する増殖反応を ^3H -thymidine 取り込み法により測定した。

(3) OVA 免疫系

B6 PADI4 KO マウスを NP-OVA+alam で免疫し、血清抗 NP 抗体を測定するとともに、FACS で T 細胞分画、B 細胞分画を解析した。

(4) Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘発関節炎

GPI を CFA と免疫することで炎症性関節炎を誘導し、関節炎スコア、病理スコアを経時的に測定した。免疫前、day7, day14 における骨髄、脾臓、関節における免疫系細胞の数、表現型を FACS Vantage を用いて解析した。一部の細胞は cell sorting により回収し、RNeasy Micro kit(Qiagen) を用いて mRNA を合成したうえで、逆転写酵素(super script III (Invitrogen))により cDNA 合成を行い、SYBR Green(Qiagen)を用いて定量的 PCR を行った。免疫後経

時的に回収した血清を用いて、ELISA 法により抗 GPI 抗体価、IL-6 濃度を測定した。また、脾臓 CD4 陽性 T 細胞を MACS により単離したうえで、GPI で再刺激し、Th1, Th17 細胞への分化を FACS で測定した。

(5) in vitro Th17 分化実験

免疫前のマウス脾臓より CD4 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、各種サイトカインによる Th1, Th17 condition で培養を行い、Th1, Th17 細胞への分化を FACS で測定した。

(6) 骨髄好中球生存実験

マウス骨髄細胞より Percoll を用いて単離した好中球を、TNF- α , LPS, GM-CSF, G-CSF をそれぞれ添加して培養し、24 時間後の細胞死(Annexin V+PI)を FACS で解析した。

(7) サイトカイン産生測定

マクロファージ、樹状細胞の LPS に対する反応を検討するため、骨髄由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophage: BMM)、骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell: BMDC)を作成し、試験管内で LPS(100ng/mL)で 24 時間刺激後の遺伝子発現を定量的 PCR で測定した。

(8) 倫理的配慮

マウス実験を行うに当たり、所属機関の承認を受けた動物実験計画書に従い、実験動物に対する倫理的配慮を最大限に行ったうえで、実験を施行した。

C. 研究結果

免疫前の PADI4 KO マウスでは末梢における CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球の割合は野生型と有意な差は見られなかった。

PADI4 KO により C57BL/6, DBA/1J 系ともに CIA の発症・関節炎スコアが有意に抑制された。さらに、PADI4 KO マウスでは、血清抗 II 型コラーゲン抗体価は、IgG, IgM ともに KO マウス群で免疫後 2 週間から WT 群と比較して有意な減少がみられた。一方、ACPA については抗 CCP 抗

体、抗シトルリン化フィブリノーゲンペプチド抗体とともに KO 群で低下していたが、シトルリン化されていないフィブリノーゲンペプチドに対する抗体も同程度に陽性となったため、その意義は不明であった。また病理スコアでは関節の骨破壊の抑制がみられた。関節炎局所では WT において滑膜、血管周囲にシトルリン化フィブリノーゲンの存在がみられたが、KO マウスでは存在は消失していた。初回免疫後 7 日目の検討では、FACS 解析では PADI4 KO マウス脾臓・局所リンパ節において、CD4+CXCR5+PD-1+濾胞性 T 細胞の減少、B220+GL-7+CD95+GC B 細胞の減少がみられた。PADI4 KO マウス由来の脾臓 CD4 陽性細胞の II 型コラーゲンに対する増殖反応には低下がみられた。

NP-OVA+alum 免疫後の PADI4 KO マウスでは抗 NP-IgG, IgM 抗体価の低下がみられた。一方で、NP(8), NP(25)に対する IgG1 抗体価はどちらも PADI4 KO で減少しており、抗体の affinity maturation との関連はみいだせなかった。免疫後 7 日目の脾臓において、CD4+CXCR5+PD-1+濾胞性 T 細胞の減少、B220+GL-7+CD95+GC B 細胞、CD138 陽性形質細胞の減少がみられた。

PADI4 KO マウスにおいて GPI 関節炎は有意に軽減された(平均スコア 10 vs 4: $p < 0.05$)。関節炎の発症については PADI4 KO マウスでやや遅れる傾向があったが最終的に有意差はみられなかった。病理学的検討では炎症細胞浸潤、骨破壊は PADI4 KO マウスで有意に軽度であった。PADI4 KO マウスにおいては、day14 における血清抗 GPI 抗体価(IgG, IgM)の減少、GC B 細胞の減少、day7 以降の血清 IL-6 濃度の低下が観察された。また、GPI 関節炎では IL-6-IL-17 pathway の重要性が報告されているが(Iwanami K, et al. Arthritis Rheum, 2008)、PADI4 KO マウスでは day7 における脾臓 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化が抑制されていた。一方で、免疫前の細胞を in vitro で Th17 へ分化させた場合、WT, PADI4 KO CD4 陽性 T 細胞で Th17 分化の程度は不変であったため、PADI4 KO GPI 関節炎における Th17 細胞減少に関しては、T 細胞へ

の extrinsic な影響が示唆された。

脾臓、所属リンパ節の総細胞数は GPI 免疫後に増加するが、PADI4 KO マウスでは有意に増加が低下していた。細胞別の解析では、CD3+T 細胞数、B 細胞数に差を認めなかったが、CD11b+Ly6G+の顆粒球系細胞、Ly6C+の単球系細胞の PADI4 KO マウスにおける有意な減少が認められた。骨髄における検討では、GPI 免疫前、免疫後でも WT, PADI4 KO で顆粒球系細胞、単球系細胞の細胞数に差を認めなかった。Day14 の炎症関節では、顆粒球系細胞の有意な減少を認めた。これらの細胞群のアポトーシス関連遺伝子の発現を定量的 PCR で検討したところ、PADI4 KO マウスにおいて Bcl-2, Bim, Bax, Bid などのアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進していた。また骨髄好中球の in vitro におけるアポトーシスの検討では、いずれの条件においても PADI4 KO 好中球のアポトーシスが WT と比較して有意に亢進していた。

PADI4 KO マウス由来 BMM, BMDC においては、LPS 刺激後の TNF-alpha, IFN-gamma, IL-12p35 の遺伝子発現が低下していた。

D. 考察

PADI4 KO マウスモデルを用いた複数の関節炎モデルにおける検討により、PADI4 には関節炎を悪化させる作用があることが判明した。また、PADI4 は好中球、単球、マクロファージなどの自然免疫系細胞で主に発現しているが、PADI4 KO マウスにおいては自然免疫系のみならず、抗体産生の変化など獲得免疫系への影響も観察され、PADI4 が免疫系を広く制御している可能性が示唆された。

PADI4 のヒトにおける RA への病態との関わりについては、自己抗原のシトルリン化と、ACPA の産生に参与している可能性が考えられてきた。マウスにおける ACPA の意義は明らかではないが、CIA マウスにおいて ACPA が出現することは報告されている。一方で、我々の CIA モデルを用いた検討では、PADI4 KO マウスにおいては、確かに関節局所におけるシトルリン化抗原の発現はほぼ認められず、PADI4 欠損によるシトルリン化蛋白の減少作用は確認

された。また ACPA の抗体価は PADI4 KO マウスで減少していたものの、抗体の標的については、確実にシトルリン化されたエピートプを認識しているかどうかは明らかとはならなかった。マウス関節炎モデルにおける ACPA については、ヒト RA と異なり、必ずしもシトルリン化抗原を認識する抗体であることが示せないとの報告もあり(Vossenaar ER, et al. Arthritis Rheum, 2003)、別のシトルリン化抗原に対する抗体を検討するなど更なる検討が必要である。CIA の発症については、抗II型コラーゲン抗体が重要であることが知られている。我々の検討では、CIA マウスの系において、抗 II 型コラーゲン抗体価は IgG, IgM 共に低下していた。また NP-OVA-alum を免疫する別の系でも、抗 NP 抗体価の減少を確認している。これらの結果から、PADI4 KO マウスにおける CIA 改善効果は、獲得免疫系の低下による抗体産生低下による可能性があると考えられる。

また、PADI4 KO マウスにおける GPI 誘発関節炎モデル研究により、PADI4 が顆粒球系細胞・単球系細胞の生存、Th17 細胞の分化、抗体産生といった自然免疫・獲得免疫の幅広いシステムを制御していることが判明した。今回使用した GPI 関節炎モデルは IL-6-IL-17 pathway の重要性が証明されているモデルであり、PADI4 KO マウスの GPI 誘発関節炎軽症化の機序としては in vivo における Th17 細胞分化の減少が関与している可能性がある。また GPI 誘発関節炎における IL-6 の産生細胞としては CD11b 陽性細胞と報告されており、我々が細胞数の減少を証明した顆粒球系細胞・単球系細胞が IL-6 産生を担っている可能性を考慮している。

以上のような PADI4 KO マウスでの複数の関節炎モデルによる知見より、PADI4 阻害薬は RA 治療薬となりうると思われる。実際、腫瘍研究において PADI4 阻害作用のある小分子化合物の報告がなされつつあり、ヒトにおける副作用を見極めたうえでの RA 治療への応用も期待される。

E. 結論

マウスモデルによる検討により、PADI4 は関節炎の病態に

関与することが示された。また、PADI4 には、従来知られていなかった獲得免疫系に対する作用があることが推測された。PADI4 阻害療法は RA 治療の新たな戦略となることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 70:512-5, 2011.

2.Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupuseyrthematosus in Japanese PLoS Genet. 2012;8(1):e100245

3.Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop

M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Nat Genet. 2012;44(5):511-6.

4.Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. Kidney Int. 2012;82(9):969-79.

5.Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 2013. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1.瀬理 祐、山本 一彦ら。関節リウマチの疾患感受性遺伝子である PADI4 の関節炎モデルマウスを用いた機能解析。第 41 回日本臨床免疫学会総会(平成 25 年 11 月 27 日、下関)

2.Seri Y, Yamamoto K, et al. Peptidyl arginine deiminase type 4 deficiency suppresses the development of rhGPI induced arthritis. 第 42 回日本免疫学会総会(平成 25 年 12 月 12 日、千葉幕張)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし