

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。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、PADI4 が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。特に、PADI4 は顆粒球系細胞、単球系細胞での発現が強い遺伝子であり、PADI4 KO マウスではこれらの細胞群のアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。このことより、PADI4 は免疫系細胞のアポトーシスを制御するとともに、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

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、疾患感受性遺伝子として 2004 年に Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)が同定され、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。PADI4 は蛋白をシトルリン化する翻訳後修飾に関わる酵素であるが、シトルリン化抗原は RA の有力な自己抗原であり、また PADI4 発現は炎症関節局所で亢進していることから PADI4 が RA の病態に深く関与している可能性があると考えられている。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 を標的とした治療法開発の為には PADI4 の関節炎における機能解析が必要である。

B.研究方法

PADI4 KO マウスを作成し、DBA/1J にバッククロスした。Glucose-6-phosphate isomerase (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。また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。

マウス骨髄細胞より Percoll を用いて単離した好中球を、TNF-a, 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。

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

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、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。

D. 考察

従来、PADI4 は自己抗原のシトルリン化による抗原性の変化と、それに引き続いて起こるシトルリン化抗原自己免疫応答の誘導に関与することで RA の病態に重要であると考えられてきた。一方で、PADI4 には neutrophil extracellular traps (NET)の形成に関与する(Li P, et al. J Exp Med, 2010)、骨髄幹細胞の分化に影響する(Nakashima K, et al. Nat Communication. 2013)といった免疫系へ影響を与えることが推定される生理的な作用があることが相次いで報告されている。

PADI4 KO マウスにおける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 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、今回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 マウスでの知見より、PADI4 阻害薬は RA 治療薬となりうると考えられる。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 RA 治療への応用も期待される。

E. 結論

PADI4 KO マウスを作成し、GPI 関節炎モデルを用いて、PADI4 の炎症性関節炎における機能解析を行った。PADI4 欠損により自然免疫系・獲得免疫系に幅広い影響が観察され、関節炎が軽症化された。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

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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, Zernakova 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

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)

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