

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10917

研究課題名(和文)自己炎症症候群モデル動物の樹立と治療標的の同定

研究課題名(英文) Generation of an animal model and identification of therapeutic targets for auto-inflammatory syndrome

研究代表者

宮本 佳奈 (Miyamoto, Kana)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：60464997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、IL-1シグナルが自己炎症症候群患者では出生後に亢進することに着目し、出生後に任意のタイミングでIL-1シグナルを亢進することが可能な動物モデルであるcTgマウスを新規に樹立した。cTgマウスは大関節優位の関節炎を発症し、自己炎症症候群患者の病態を再現した。cTgマウスでは、血清中のIL-6やIL-17のレベルが上昇していたほか、関節滑膜や軟骨下骨でStat3が活性化しており、これらの遺伝子欠損マウスとの交配によりcTgマウスに見られた表現型がほぼ消失した。以上のことから、自己炎症症候群においてはIL-6やIL-17、Stat3が治療標的として有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己炎症症候群は大関節優位の関節炎を発症するなど、小関節優位の関節炎を発症する関節リウマチ(RA)とは区別される。しかし、自己炎症症候群は患者数が少ないことや動物モデルが樹立されていないこともあり、その病態解明や治療法の開発は進んでいなかった。本研究では、自己炎症症候群の表現型を再現する動物モデルを新規に樹立し、その解析からIL-6、IL-17およびStat3が自己炎症症候群の治療標的となり得ることを示し得た点で、学術的また社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Auto-inflammatory syndrome is a disease characterized by systemic inflammation in tissues such as major joints, and is distinct from rheumatoid arthritis (RA), which exhibits minor joint inflammation. However, since auto-inflammatory syndrome is a rare disease, and the appropriate animal models were not generated, underlying pathological mechanisms have not been clarified nor are treatment strategies established. In this study, we successfully established a new mouse model in which IL-1 signaling was conditionally activated in adult mice (cTg), and observed phenotypes similar to those seen in auto-inflammatory syndrome patients. We found that levels of serum IL-6 and IL-17 were elevated and Stat3 was activated in joints of cTg mice. Phenotypes seen in cTg mice were ameliorated by crossing cTg mice with either IL-6 KO, IL-17 KO or Stat3 cKO mice. Thus, we concluded that IL-6, IL-17 and Stat3 all represent potential therapeutic targets for Auto-inflammatory syndrome.

研究分野：整形外科学、血液・膠原病学

キーワード：関節疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は主に手指などの小関節を中心に多関節におよぶ腫脹および疼痛を主徴とする疾患であるが、RA とは異なり、足関節や膝関節などの大関節優位に関節炎を発症し、発熱や白血球増多などを伴う RA とは独立した疾患概念として自己炎症症候群が近年注目されるようになってきた。しかし、RA に比べてその病態は不明の部分が多く、治療法も確立されてはいないのが現状であった。また、RA に関しては、動物モデルとして collagen induced arthritis モデルや抗 collagen type II 抗体注射モデル、TNF α トランスジェニックマウスモデルなど、様々な疾患モデル動物が作製され、病態の解明が進んできたが、自己炎症症候群に関しては疾患を再現する動物モデルも確立されていないことから解析も進んでいなかった。

2. 研究の目的

研究期間内に自己炎症症候群を再現する新たな動物モデルを樹立し、病態の解明から疾患治療標的を同定し、治療法を確立することまでを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 自己炎症症候群の疾患発症が出生後であること、IL-1 シグナルの増強を認めることに着目し、Cre/LoxP システムを用いて、出生後の任意のタイミングで IL-1 シグナルを増強する動物モデル (cTg) を作製することとした。

(2) 作製したマウスについて、関節腫脹はノギスにより定量的に計測した。末梢血について白血球数 (WBC)、ヘモグロビン (Hb)、血小板数 (Plt) を計測した。また、血清中にサイトカイン濃度について、マルチプレックスサイトカインアレイで網羅的に計測した。組織染色で活性化型の signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) を免疫染色で同定した。

(3) 血清中あるいは組織染色で cTg マウスにおいて亢進を認めたものについては遺伝子欠損マウスを用意し、cTg マウスと交配し、関節炎等の表現型の解析を行った。関節軟骨破壊はサフラニン O 染色で評価し、染色領域を定量的に計測した。また、関節破壊についてはマイクロ CT にて評価した。

(4) 治療標的因子を抑制する治療薬をドラッグ・リポジショニングの手法にて同定した。日本で承認されている既存薬ライブラリーを用いて、Stat3 の阻害効果について Stat3 レポーターアッセイ、Stat3 標的因子の発現抑制を realtime PCR でスクリーニングし、絞り込んだ薬剤については Stat3 の活性化阻害を western blot で評価した。

4. 研究成果

(1) 今回新規に作製した cTg マウスでは、IL-1 シグナル増強後に 100% の確率で足関節などの大関節優位に関節炎を発症する一方で、手指などの小関節には関節炎を発症しない自己炎症症候群の表現型を再現する動物モデルの作製に世界で初めて成功した (図 1)。

(2) cTg マウスにおいて、末梢血液像では好中球や単球を中心とした白血球増多を示す一方で、リンパ球は減少したこと

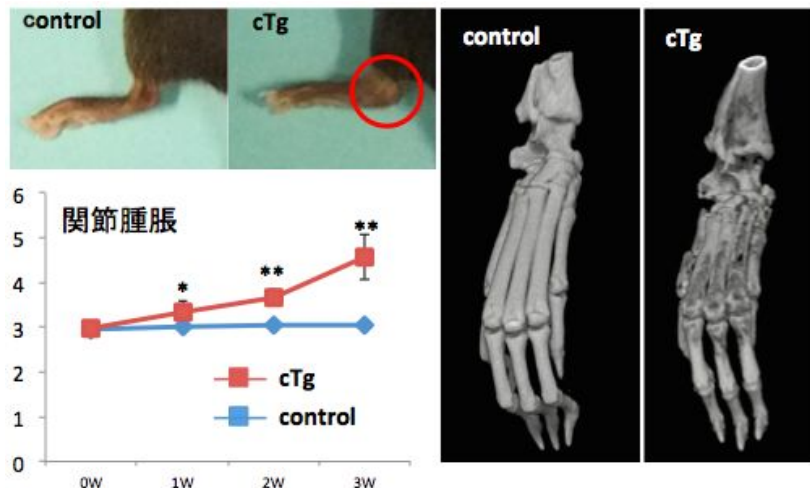


図 1: 出生後誘導型 IL-1 シグナル増強 (cTg) マウスでは大関節優位の関節炎ならびに破壊を呈す

(左上) cTg マウスでは control マウスに比べて足関節に腫脹を呈す。(左下) 出生後の IL-1 シグナル増強後 1 週ですでに cTg では control に比べて優位な関節腫脹を認める。(右) マイクロ CT にて、cTg では足関節周辺に関節破壊をきたしていることを認める。

らも、T 細胞が病態形成の主要細胞である RA とは異なり、好中球・単球が病態形成の中心細胞である自己炎症症候群の病態をよく反映したモデルとなっていることを確認した。網羅的サイトカインアレイ解析を血清にて実施したところ、IL-6 および IL-17 レベルがコントロールマウスに対して cTg マウスにおいて有意に上昇することを見出した。また、cTg マウスにおいて腫脹を認めた組織における免疫染色にて、増生した滑膜や関節下骨において Stat3 が活性化していることを見出した。

(3) サイトカインアレイ解析にて cTg マウスで上昇を認めた IL-6 と IL-17 についてはそれぞれの欠損マウスを、免疫染色で腫脹関節において活性化が確認された Stat3 については conditional knockout mouse を入手し、それぞれ cTg マウスと交配し、cTg/IL-6 KO、cTg/IL-17 KO、cTg/Stat3 cKO マウスを作製した。その結果、IL-6、IL-17、および Stat3 のいずれの抑制でも cTg の表現型をほぼベースラインレベルまで抑制したが、中でも Stat3 の抑制が最も cTg の表現型を顕著に改善した(図2)。以上から、自己炎症症候群では IL-6、IL-17 および Stat3、特に Stat3 が治療標的として有用である可能性が示唆された。これまで、病態や治療標的が不明であった自己炎症症候群について、動物モデルの新規の樹立から、病態解明および治療標的因子の同定までを達成できた。自己炎症症候群は希少疾患であり、治療法も確立されていないものも少なくないが、新たな治療法を提案するという点で社会的にも意義がある。これらの知見をまとめ、論文発表した(発表論文2)。

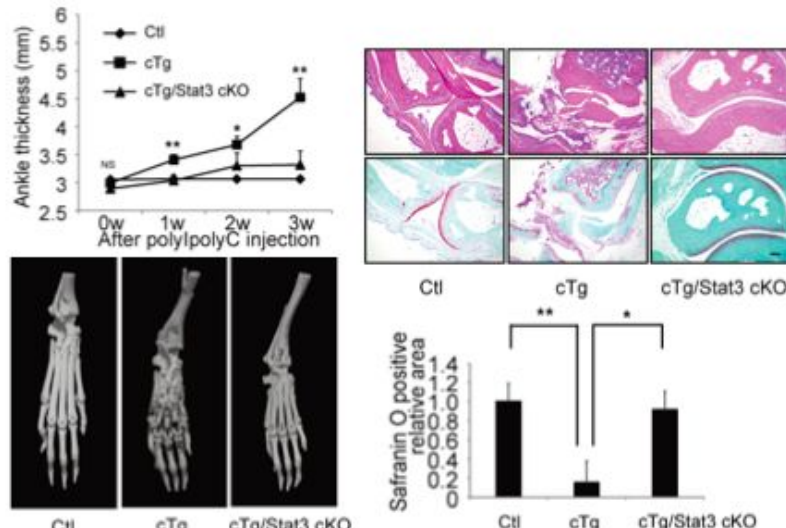


図2: cTg/Stat3 cKOではcTgの表現型がほぼキャンセルされる
 cTg/Stat3 cKOでは関節腫脹(左上段)、マイクロCTで評価した関節破壊(左下段)、およびサフラニンO染色にて評価した関節軟骨破壊(右上段:染色、右下段:サフラニンO陽性エリアの定量評価)が、いずれもほぼコントロール(Ctl)レベルに抑制された。

また、病態や治療標的が不明であった自己炎症症候群について、動物モデルの新規の樹立から、病態解明および治療標的因子の同定までを達成できた。自己炎症症候群は希少疾患であり、治療法も確立されていないものも少なくないが、新たな治療法を提案するという点で社会的にも意義がある。これらの知見をまとめ、論文発表した(発表論文2)。

(4) マウスジェネティクス解析により、Stat3の抑制が最も効果的に cTg の表現型を抑制したことから、ドラッグ・リポジショニングの手法にて Stat3 を阻害する薬剤を同定することとした。日本で承認されている既存薬のライブラリーを用いて、まずは Oncostatin M 刺激で活性化される Stat3 のレポーターアッセイ系を用いて1次スクリーニングを行い、続いて IL-6+soluble IL-6

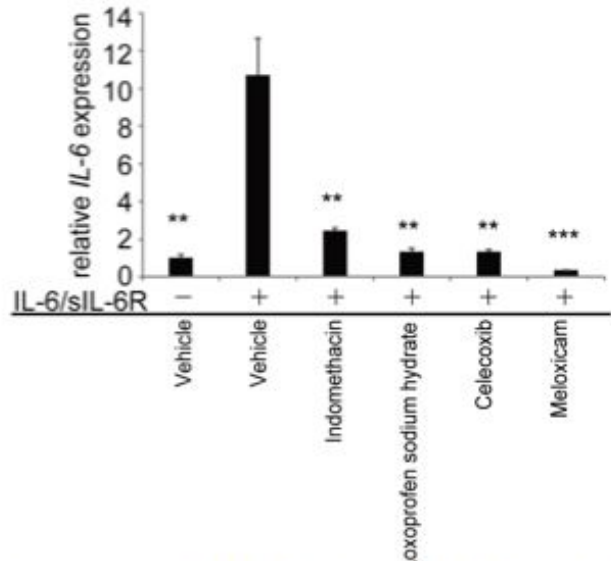


図3: Meloxicamが最も効率良くStat3の活性化を抑制する IL-6+IL-6 soluble receptor (IL-6/sIL-6R)で誘導されるStat3の標的因子のIL-6のmRNAの発現をMeloxicamが最も効率良く抑制した。

receptor 刺激で活性化される IL-6 の mRNA の発現抑制効果を realtime PCR で検証し、絞り込みを行った。これらのスクリーニングで絞り込んだ薬剤については、IL-6+soluble IL-6 receptor 刺激で活性化される Stat3 の活性化阻害効果を western blot で検証し、さらなる絞り込みを行った。その結果、Meloxicam が最も効率良く Stat3 の活性化を抑制することを見出した(図3)。そこで、Collagen 誘導性関節炎モデルを用いて Meloxicam を投与したところ、関節炎の発症をコントロール薬剤(vehicle)に比べて有意に抑制できることが明らかとなった。以上の結果から、関節炎治療のための新たな治療標的として Stat3 を同定し、その治療薬を同定したこと、また近年では高額な生物学的製剤が関節炎の治療薬として多くなっている中で、安価な低分子化合物に関節炎治療薬を同定した点で社会的な意義があると考えている。以上の知見をまとめて論文報告した(発表論文5)。

5. 主な発表論文等
 [雑誌論文](計17件)
 *corresponding author

Miyamoto T, Oguma Y, Sato Y, Kobayashi T, Ito E, Tani M, Miyamoto K, Nishiwaki Y, Ishida H,

Otani T, Matsumoto H, Matsumoto M, Nakamura M. Elevated Creatine Kinase and Lactic Acid Dehydrogenase and Decreased Osteocalcin and Uncarboxylated Osteocalcin are Associated with Bone Stress Injuries in Young Female Athletes. *Sci Rep.* 2018 Dec 21;8(1):18019. doi: 10.1038/s41598-018-36982-0. (査読あり)

Oike T, Kanagawa H, Sato Y, Kobayashi T, Nakatsukasa H, Miyamoto K*, Nakamura S, Kaneko Y, Kobayashi S, Harato K, Yoshimura A, Iwakura Y, Takeuchi T, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T. IL-6, IL-17 and Stat3 are required for auto-inflammatory syndrome development in mouse. *Sci Rep.* 2018 Oct 25;8(1):15783. doi: 10.1038/s41598-018-34173-5. (査読あり)

Oya A, Katsuyama E, Morita M, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nishiwaki T, Funayama A, Fujita Y, Kobayashi T, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T. J Bone Miner Metab. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 is required to inhibit foreign body giant cell formation and activate osteoclasts under inflammatory and infectious conditions. *J Bone Miner Metab.* 2018 Nov;36(6):679-690. doi: 10.1007/s00774-017-0890-z. (査読あり)

Miyamoto T, Hirayama A, Sato Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Kanagawa H, Fujie A, Morita M, Watanabe R, Tando T, Miyamoto K, Tsuji T, Funayama A, Soga T, Tomita M, Nakamura M, Matsumoto M. Metabolomics-based profiles predictive of low bone mass in menopausal women. *Bone Rep.* 2018 Jun 18;9:11-18. doi: 10.1016/j.bonr.2018.06.004. eCollection 2018 Dec. (査読あり)

Oike T, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K*, Nakamura S, Kaneko Y, Kobayashi S, Harato K, Saya H, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T. Stat3 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2017 Sep 8;7(1):10965. doi: 10.1038/s41598-017-11233-w. (査読あり)

Watanabe R, Fujita N, Sato Y, Kobayashi T, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Kuro-O M, Michigami T, Fukumoto S, Tsuji T, Toyama Y, Nakamura M, Matsumoto M, Miyamoto T. Enpp1 is an anti-aging factor that regulates Klotho under phosphate overload conditions. *Sci Rep.* 2017 Aug 10;7(1):7786. doi: 10.1038/s41598-017-07341-2. (査読あり)

Morita M, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Nakamura S, Kaneko Y, Miyamoto K, Ishihara K, Iwakura Y, Ishii K, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Sci Rep.* 2017 Apr 7;7:46322. doi: 10.1038/srep46322. (査読あり)

Mito K, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nitta E, Iwama A, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T. The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential negative regulator of bone mass. *Sci Rep.* 2017 Mar 28;7:45597. doi: 10.1038/srep45597. (査読あり)

Takeshima K, Nishiwaki Y, Suda Y, Niki Y, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Uchida H, Inokuchi W, Tsuji T, Funayama A, Nakamura M, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. A missense single nucleotide polymorphism in the ALDH2 gene, rs671, is associated with hip fracture. *Sci Rep.* 2017 Mar 27;7(1):428. doi: 10.1038/s41598-017-00503-2. (査読あり)

Miyamoto T, Hirayama A, Sato Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Kanagawa H, Miyamoto H, Mori T, Yoshida S, Fujie A, Morita M, Watanabe R, Tando T, Miyamoto K, Tsuji T, Funayama A, Nakamura M, Matsumoto M, Soga T, Tomita M, Toyama Y. A serum metabolomics-based profile in low bone mineral density postmenopausal women. *Bone.* 2017 Feb;95:1-4. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.027. (査読あり)

Sato Y, Tando T, Morita M, Miyamoto K, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Matsumoto M, Nakamura M, Miyamoto T. Selective estrogen receptor modulators and the vitamin D analogue eldcalcitol block bone loss in male osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 22;482(4):1430-1436. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.053. (査読あり)

Watanabe R, Fujita N, Takeda S, Sato Y, Kobayashi T, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Matsumoto Y, Matsumoto M, Nakamura M, Miyamoto T. Ibandronate concomitantly blocks immobilization-induced bone and muscle atrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Nov 25;480(4):662-668. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.112. (査読あり)

Morita M, Sato Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. Selective Estrogen Receptor Modulators Suppress Hif1 α Protein Accumulation in Mouse Osteoclasts. *PLoS One.* 2016 Nov 1;11(11):e0165922. doi: 10.1371/journal.pone.0165922. eCollection 2016. (査読あり)

Morita M, Yoshida S, Iwasaki R, Yasui T, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Takami M, Ozato K, Deng CX, Aburatani H, Tanaka S, Yoshimura A, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. *Sci Rep.* 2016 Oct 12;6:35221. doi: 10.1038/srep35221. (査読あり)

Kanagawa H, Masuyama R, Morita M, Sato Y, Niki Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Saya H, Miyamoto T. Methotrexate inhibits osteoclastogenesis by decreasing RANKL-induced calcium influx into

osteoclast progenitors. J Bone Miner Metab. 2016 Sep;34(5):526-31. doi: 10.1007/s00774-015-0702-2. (査読あり)

Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, Kanaji A, Hao W, Watanabe R, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Soga T, Nomura M, Yoshimura A, Tomita M, Matsumoto M, Nakamura M, Toyama Y, Miyamoto T. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-induced Skeletal Muscle Atrophy. J Biol Chem. 2016 Jun 3;291(23):12184-94. (査読あり)

Miyamoto T, Katsuyama E, Kanagawa H, Fujie A, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura M, Matsumoto M, Nishiwaki Y, Hirose H, Kanda T, Saito I, Toyama Y. Vitamin D Deficiency with High Intact PTH Levels is More Common in Younger than in Older Women: A Study of Women Aged 39-64 Years. Keio J Med. 2016 Jun 25;65(2):33-8. (査読あり)

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：尾池 崇嗣

ローマ字氏名：OIKE, Takatsugu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。