

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08389

研究課題名(和文) 関節組織再生における関節リウマチ治療薬の薬理効果プロファイリング

研究課題名(英文) Profiling efficiency of disease-modifying antirheumatic drugs in cartilage regeneration

研究代表者

劉 爽(Liu, Shuang)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60403812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、すでに障害を受けた関節組織の修復・再生に着目し、関節リウマチ(RA)の治療に使用されている合成抗リウマチ薬、生物学的抗リウマチ薬、及び現在開発中の新たな分子標的薬の投与による、ヒト滑膜に局在する間葉系幹細胞(MSC)の多分化能に与える影響を検討した。高濃度のメトトレキサートとプレドニゾロンは、MSCにおける骨芽細胞や軟骨細胞への誘導分化を阻害することが明らかとなった。TNF- α 阻害剤については比較的安全であり、軟骨細胞の誘導分化と立体構造の形成に明らかな影響を示していない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCの誘導分化には免疫微小環境の適正化が必要になる。多くのRA患者は、長期間に渡って様々な作用機序を持つRA治療薬を投与されており、MSCの再生・修復能における安全性評価が必要である。さらに、関節再生医療を受ける患者において、現在受けている抗リウマチ療法が移植されるMSCの再生能に及ぼす影響を把握することが必須である。本研究は、患者自身の滑膜MSCの修復能とMSCを用いる関節軟骨再生医療の二つの面で、網羅的、かつ直接的なエビデンスを入手することができ、MSCを用いるRAの再生治療法の確立に不可欠な先行研究として位置付けられる。

研究成果の概要(英文)：While the concept of MSC-based joint regeneration has promising results and opens new therapeutic possibilities for rheumatoid arthritis (RA) treatment, it is unknown whether antirheumatic drugs administered to RA patients (often continuously) affect the therapeutic efficiency of transplanted MSCs aiming at cartilage repair. To answer this question, we evaluated the effect of major antirheumatic drugs on the multipotency of MSCs. With a special focus on chondrogenic differentiative capacity, a scaffolded chondrospheroid-engrafted murine model was employed for in vivo drug screening. By acknowledging pharmacological, metabolic, and cellular mechanisms, we attempt to provide insight into the contribution of these drugs with regard to healing capacities and MSC-based tissue engineering.

研究分野：薬理学

キーワード：間葉系幹細胞 関節リウマチ 軟骨移植 免疫抑制薬

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節炎と関節組織 (骨、軟骨、滑膜など) 障害を特徴とする罹患頻度の高い自己免疫性疾患である。発症早期に病態が決定づけられることを考えれば、副作用のリスクを管理しながら、早期から確実な臨床効果が期待できる RA 治療薬を用いる、という戦略がコンセンサスとなっている。現在、合成抗リウマチ薬と生物学的抗リウマチ薬を用いられ、疼痛管理のみならず、関節破壊の進行阻止も日常診療の到達可能な目標となった。これらの製剤は高い生体免疫ステータスの調節力と関節破壊の進展阻止に高い効果を発揮するが、すでに障害が生じた関節の修復は期待できない。重度の関節損傷には、人工関節置換術の適応となり、除痛効果に関して優れているが、耐久年数が限定され 65 歳以下には積極的に行われず、術後の活動性が限定される。特に RA では高頻度罹患する手指関節に関して、手術療法が困難なケースが多く、破壊された関節を修復しうる新たな治療法が待たれる。

RA のみならず、すべての関節損傷性疾患において、骨・軟骨再生を目標として、細胞成分を補うため、患者の自己間葉系幹細胞 (MSC) を用いた再生アプローチがある。MSC は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化能を持つ幹細胞であり、関節構成細胞成分への分化能、関節表面曲率の高い再現能、さらに人体投与への安全性を有する点から、RA における細胞治療ツールとして期待され、臨床応用は着実に近づきつつあると考えられる。自己 MSC 細胞移植により、関節軟骨の修復が促進されることが、前臨床試験ですでに明らかになっている。臨床的には、関節切開により関節を展開して自己骨髄 MSC を移植し、関節軟骨欠損修復が促進される可能性が確認されており、関節鏡下自己骨髄 MSC の移植による関節軟骨修復への有効性・安全性を評価する多施設共同臨床研究が進められている。

滑膜 MSC 自身に免疫抑制能が有する一方で、その関節構成細胞へ分化能は局所免疫微小環境に左右されている。従来、RA という特化した免疫異常環境において、自家 MSC 移植の関節修復アプローチには、関節局所の炎症コントロールが必要と提唱されている。しかし、申請者らは開発中の生物学的免疫抑制剤 (カルシウムチャネル (CRAC) 阻害薬) の投与により、滑膜 MSC の骨芽細胞への誘導分化に促進作用を持ちながら、軟骨の形成には抑制作用を示している。免疫抑制剤の投与による関節軟骨の再生阻害は CRAC 阻害剤だけに限るのか、それとも他の免疫抑制作用を持つ RA 治療薬も同じ薬理作用を持つのか。RA 治療薬が滑膜 MSC に与える影響は細胞受容体に直接作用によるものなのか、それとも免疫微小環境の調整を介するものなのか。現時点では、RA 治療薬が滑膜 MSC の再生能に与える影響の評価プロファイルは存在しない。先行研究と食い違いが生じているため、RA の関節修復における滑膜 MSC の多分化・再生能に視点を置き、RA 治療薬の薬理効果を網羅的に徹底検証しようと考えた。

2. 研究の目的

臨床エビデンスを取得するため、現在 RA の臨床治療に用いる RA 治療薬、及び開発中の生物学的免疫抑制剤の投与により、RA 患者由来滑膜 MSC の多分化・再生能に及ぼす影響を網羅的にプロファイリングするのが本研究の目的である。以下二つの評価項目を用いる。

RA 患者由来 MSC の多分化能において、ステロイド、合成抗リウマチ薬、生物学的抗リウマチ薬、及び申請者ら開発中の生物学的免疫抑制剤の *ex vivo* での薬理効果を明らかにする。

MSC シート移植したヒト化 RA モデルにおいて、これらの RA 治療薬の生体投与により、移植された MSC の関節修復能に与える影響を *in vivo* で検証する。本研究の最終目的は RA 治療薬による MSC 自身に対する薬理作用と免疫微小環境を介して MSC の再生能に対する薬理効果を総合的に評価することである。

3. 研究の方法

本研究は、RA 治療薬が滑膜 MSC の多分化能に与える影響 (*ex vivo*) と生体投与により移植 MSC の関節修復能に及ぼす影響 (*in vivo*) を総合的に評価した。

検体採取

診断目的の為に採取された関節組織 (滑膜・骨・軟骨を含む) 全血の一部を使用した。

計画時の収集目標症例数： RA 患者 20 例

研究対象： RA 診断とされてから 6 ヶ月以上を満たす患者を研究対象とする。

除外基準：内分泌系/代謝 (インスリン療法が必要な糖尿病を含む) 患者、及び血液的/腫瘍学的患者は除外する。

in vivo 評価

同一患者由来 MSC シートをヒト化 RA モデルに移植し、RA 治療薬の生体投与による移植 MSC の

関節修復能に与える影響を検証した。

ex vivo 評価

RA 滑膜由来 MSC の多分化能において、ステロイド、合成抗リウマチ薬、生物学的抗リウマチ薬、及び申請者らが開発中の生物的免疫抑制剤の薬理的特性を明らかにする。正常 MSC コントロールとしてヒト臍帯血由来 MSC を用いた。

表1 本研究に用いる関節リウマチ治療薬

ステロイド	プレドニゾン
合成抗リウマチ薬	メトトレキサート
生物学的抗リウマチ薬	アバタセプト アダリムマブ トシリズマブ インフリキシマブ
開発中の免疫抑制薬	hCRACM1-IgG

4. 研究成果

本研究は、すでに障害を受けた関節組織の修復・再生に着目し、RA の治療に使用されている合成抗リウマチ薬、生物学的抗リウマチ薬、及び現在開発中の新たな分子標的薬の投与による、ヒト滑膜に局在する MSC の多分化能に与える影響を検討した。ヒト滑膜由来 MSC を用いて、メトトレキサート、プレドニゾン、インフリキシマブの投与により、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への多分化能について ex vivo にて検討した。高濃度のメトトレキサートは、MSC における骨芽細胞や軟骨細胞への誘導分化を阻害することが明らかとなった。プレドニゾンは軟骨細胞の誘導分化に影響はないが、骨芽細胞の誘導分化に抑制作用を示した。TNF- α 阻害剤 n について比較的安全であり、骨芽細胞と軟骨細胞の誘導分化に明らかな影響を示していない。

In vivo において、ヒト型 RA モデルを構築するために、専門医療機関と地域ネットワークを築き、検体採取を円滑に行うための研究体制が確立した。免疫不全マウスに異種移植を行い、移植片の生着と滑膜の軟骨・骨への浸潤を確認し、ヒト型 RA モデルの構築に成功した。MSC 誘導分化により形成したスフェロイド(コラーゲン支持材)を免疫不全マウスに移植し、軟骨立体構造が形成することができ、軟骨組織移植モデルを構築した。このモデルマウスを用い、メトトレキサート、プレドニゾン、インフリキシマブの薬効評価を行った。軟骨の形成において、メトトレキサート、プレドニゾンが抑制的な働きが確認され、TNF- α 阻害作用を持つ生物製剤は比較的安全であり、軟骨組織の形成に対する影響が見られなかった。この研究結果により、有効的な関節修復のため、免疫抑制剤の投与が最適化する必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suzuki Y, Liu S, Ogasawara T, Sawasaki T, Takasaki Y, Yorozyu T, Mogi M	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel MRGPRX2-targeting antagonistic DNA aptamer inhibits histamine release and prevents mast cell-mediated anaphylaxis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiyoi T, Liu S, Takemasa E, Nakaoka H, Hato N, Mogi M	4. 巻 17
2. 論文標題 Constitutive hydrogen inhalation prevents vascular remodeling via reduction of oxidative stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0227582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sahid MNA, Liu S, Mogi M, Maeyama K	4. 巻 69
2. 論文標題 Tachykinin-1 receptor antagonism suppresses substance-P- and compound 48/80-induced mast cell activation from rat mast cells expressing functional mas-related GPCR B3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflamm Res	6. 最初と最後の頁 69289-69298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00011-020-01319-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Toyama K, Spin JM, Abe Y, Suzuki Y, Deng AC, Wagenhauser MU, Yoshino T, Mulorz J, Liu S, Tsao PS, Mogi M	4. 巻 140
2. 論文標題 Controlled isoflurane anesthesia exposure is required for reliable behavioral testing in murine surgical models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 106-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.03.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyoshi M, Liu S, Morizane A, Takemasa E, Suzuki Y, Kiyoi T, Maeyama K	4. 巻 824
2. 論文標題 Efficacy of Constant Long-term Delivery of YM-58483 for the Treatment of Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 89-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu S, Sahid MNA, Takemasa E, Maeyama K, Mogi M	4. 巻 151
2. 論文標題 Zoledronate modulates intracellular vesicle trafficking in mast cells via disturbing the interaction of myosinVa/Rab3a and sytaxin4/VAMP7 Liu S, Sahid MNA, Takemasa E, Maeyama K, Mogi M Biochem Pharmacol	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2018.02.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyoi Takeshi, Liu Shuang, Sahid Muhammad Novrizal Abdi, Shudou Masachika, Maeyama Kazutaka, Mogi Masaki	4. 巻 13
2. 論文標題 High-throughput screening system for dynamic monitoring of exocytotic vesicle trafficking in mast cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0198785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Yasuyuki, Ogasawara Tomio, Tanaka Yuki, Takeda Hiroyuki, Sawasaki Tatsuya, Mogi Masaki, Liu Shuang, Maeyama Kazutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycerosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2018.00038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 劉爽, 茂木正樹	4. 巻 39
2. 論文標題 サルコペニアと自己免疫疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 愛媛医学	6. 最初と最後の頁 157-161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu S, Kiyoi T, Takemasa E, Mogi M	4. 巻 5
2. 論文標題 Denervation induced loss of skeletal muscle mass influences immune homeostasis and accelerates the disease progression of lupus nephritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCSM Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 108-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/crt2.26	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Y, Liu S, Kadoya F, Takasaki Y, Yorozuya T, Mogi M	4. 巻 125
2. 論文標題 Association between mutated Mas-related B protein-coupled receptor-X2 and rocuronium-induced intraoperative anaphylaxis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Anaesth	6. 最初と最後の頁 e445-e448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2020.05.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu S, Kiyoi T, Ishida M, Mogi M	4. 巻 11
2. 論文標題 Assessment and comparison of the efficacy of methotrexate, prednisolone, adalimumab, and tocilizumab on multipotency of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.01004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kawanami T, Liu S, Mogi M
2. 発表標題 The influence of sarcopenia on immune hemostasis
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Ishida M, Liu S, Mogi M
2. 発表標題 Establishment of a drug screening system for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Liu S
2. 発表標題 Regulation of multiple differentiation potential in mesenchymal stem cells via an intercellular Ca ²⁺ signaling pathway
3. 学会等名 American College of Rheumatology Annual Meeting （国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takahashi M, Liu S, Mogi M
2. 発表標題 Modulation of multiple differentiation potential in mesenchymal stem cells via an intercellular calcium signaling pathway
3. 学会等名 The 18th world congress of basic and clinical pharmacology（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Liu S, Mogi M
2. 発表標題 Down-regulation of intracellular vesicle trafficking by the treatment of zoledronate in mast cells
3. 学会等名 The 18th world congress of basic and clinical pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Liu S	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 253
3. 書名 Rheumatoid Arthritis: Methods and Protocols	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------