

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390272
 研究課題名（和文） 関節リウマチ新治療戦略としてのサイクリン依存性キナーゼ4/6阻害療法
 研究課題名（英文） Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis
 研究代表者
 上阪 等 (KOHSAKA HITOSHI)
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
 研究者番号：00251554

研究成果の概要：

本研究では、関節リウマチ（RA）に対する新たな治療法がサイクリン依存性キナーゼ群を標的とすることの妥当性を検証しつつ、阻害薬の開発を試みた。その中で、本報告書では、現時点で公表することが可能な低酸素状態が関節リウマチ滑膜細胞増殖に及ぼす影響をサイクリン依存性キナーゼ阻害因子活性化の観点から探索した研究結果について報告する。滑膜線維芽細胞（RASf）の無秩序な増殖はRAの病理的特徴である。またRA滑膜は比較的低酸素状態にあるとの報告があるので、低酸素状態がRA滑膜の増殖やサイクリン依存性キナーゼ（CDK）とその阻害因子（CDKI）に及ぼす影響を探索した。まず、低密度で培養したRASfは低酸素（1%O₂）の影響を全く受けなかったが、高密度培養にすると、正常酸素分圧では接触阻害による成長抑制が認められたものの、低酸素ではその影響が認められなかった。この現象は、ヒト皮膚線維芽細胞では認められず、RASfのみで認められた。この現象は、抗腫瘍壊死因子α抗体やインターロイキン1受容体アンタゴニスト添加でも認められた。この際、正常酸素分圧ではサイクリン依存性キナーゼ阻害因子p27Kip1の上昇が認められたものの、低酸素下では認められなかった。また、低酸素はRASf上のN-カドヘリン発現を減少させた。抗N-カドヘリン抗体は低酸素と同様に高密度培養下でのRASfの増殖を抑制し、p27Kip1発現も低下させていた。RA滑膜組織の低酸素は、RASf増殖を促進することによって、RA病態を悪化させているようである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー・感染創内科学

キーワード：膠原病学

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、増殖性滑膜炎とその後の骨・軟骨破壊を特徴とする自己免疫疾患である。炎症関節には、リンパ球とマクロファージなどの炎症性細胞が集簇し、TNF- α 、およびIL-1などの炎症性サイトカインが大量に産生されている。正常の関節では、滑膜は数層以内の細胞からなるが、RA炎症関節の線維芽細胞 (RASf) は過増殖によって多層化し、パンヌスと呼ばれる過形成組織を形成する。この細胞をex vivoで培養するとあたかも形質転換した細胞であるかのように増殖する。RA滑膜では、過形成のため、毛細血管は酸素を十分に供給できなくなる。そのうえ、関節の滑液があるために滑組織圧が増加するため、さらに低酸素となる。報告によれば、患者滑液の酸素レベルは正常の半分未満とされる。したがって、RA滑膜組織は、RASfの活発な増殖にもかかわらず、低酸素であるという逆説的状態にある。

2. 研究の目的

低酸素が細胞周期に及ぼす影響は興味を持たれるが、そもそも本研究課題の主題である細胞周期の進行はサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合物のキナーゼ活性によって進められ、CDK阻害因子 (CDKI) によって抑制されている。この報告書では、本研究課題のうち、低酸素下におけるCDKI発現とRASf増殖についての関係を明らかにするという目的を取り扱う。

3. 研究の方法

細胞培養：滑膜組織は、東京医科歯科大学病院、東京都立墨東病院、国立下志津病院または信州大学病院で治療抵抗性のRA患者の関節置換手術か滑膜切除術を受けた際に得られた。(手順は関係機関の倫理委員会で承認済みである)。RASfは滑膜から単離・培養された。健

康人皮膚線維芽細胞 (HDF) は購入した。これらは5-9継代までの早い段階で、正常酸素条件 (O₂ 21%) ないし低酸素状態 (1%のO₂) で培養された。酸素濃度は酸素電極でモニターした。RASfとHDFは、96穴プレートで一ウエル当たり5,000個相当 (高密度培養)、または、2,000個相当 (低密度培養) で培養された。

細胞増殖分析：RASf培養は低酸素チェンバー内や正常酸素分圧条件のもとで、60-72時間に行われた。一部は組換えヒトIL-1受容体アンタゴニスト (IL-1ra)、抗TNF α 中和モノクローナル抗体 (mAb)、抗N-カドヘリン抗体、対照マウスIgG1 mAbまたは最大200 μ Mの塩化コバルト (CoCl₂) で処理された。0.3 μ Ciのトリチウムが、培養最後の12時間に加えられた、核酸に取り込まれたものが測定された。

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) :

RNAは、RNeasyキットで単離されて、Superscript II逆転写酵素でcDNAに変換された。リアルタイムPCRは既に報告されているN-カドヘリン特異的プライマーやp27Kip1特異的プライマー (センス鎖: GCT CTA GAT TTT TTG AGA GTG CGA GAG AG、アンチセンス鎖: GGG GTA GCC GCT TTT AGA GGC AGA TCA TT) で行われた。データは、28Sリボソームリボ核酸 (センス鎖: TTG AAA ATC CGG GGG AGA G、アンチセンス鎖: ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG) で標準化されて、サイクル閾値法で分析された。

ウエスタン・プロット分析: Nuclear Extract Kitで得た核抽出物をウサギ抗ヒトp16INK4a、p21Cip1、CDK4、マウス抗E-カドヘリン、N-カドヘリン、p27Kip1、カドヘリン-11、Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α 抗体を第一抗体として使用した。西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗ウサギないしマウス免疫グロブリン抗体を二次抗体として使用した。結合

抗体は、ECLで可視化され、信号強度はImageJソフトウェアで定量化した。

ELISA: IL-1 α 、-1 β 、-6、およびTNF- α 測定用ELISAキットを購入した。

統計: 統計比較には、Student paired t-テストが使用された。

4. 研究成果

1. 低酸素による高密度培養下 RASF 増殖の加速

RASF を最初に、対数期増殖させるためにマイクロタイタープレートに低密度で培養したところ、正常酸素分圧(21%O₂)でも低酸素(1%の O₂)でも増殖は同じだった。高密度で培養したところ、正常分圧では増殖が止まって、少ないチミジン取り込みとなった。しかし、低酸素状態では、その増殖抑制が減衰していた。これが線維芽細胞の一般的な特徴であるかどうかを検証するために、HDF は同じ状態で培養したものの低酸素による細胞増殖亢進は認められなかった。

2. 低酸素による増殖促進への IL-1 と TNF- α の効果

前項各条件における RASF 培養上清には検出可能な IL-1 α 、IL-1 β 、および TNF- α は認められなかった。また、IL-1ra や抗 TNF- α 中和抗体を培養液に加えても効果は変わらなかった。従って、低酸素による増殖促進がこれらのサイトカインによるものではない。一方、IL-6 が RASF 増殖を抑制するという報告がある。しかし、正常酸素分圧と低酸素状態とで高密度培養された RASF の培養上清も同じ程度の IL-6 を含んでいた。したがって、IL-6 は低酸素状態による増殖促進の原因ではなかった。

3. 低酸素による CDKI p27kip1 発現の低下
一般に、非形質転換細胞は高密度培養で接触阻害により対数期細胞増殖に抑制がかかる。この接触阻害では、CDKI p16INK4a、p21Cip1、

p27Kip1 などの発現上昇が認められるが、発現上昇する CDKI は細胞によって異なっている。そこで、低酸素が RASF の CDKI 発現にどのような影響を与えているかを調べた。3日間、RASf を高密度で培養すると、p27Kip1 発現はタンパク質レベルで上昇していた。p16INK4a と p21Cip1 タンパク質は上がらなかった。しかし、低酸素状態にすると高密度培養による p27Kip1 発現の上昇が認められなかった。もちろん、RASf を同じ期間、低密度で培養しても p27Kip1 タンパク質レベル上昇は認められなかった。p27Kip1 mRNA 転写を見るために定量的 PCR を行ったところ、タンパク質発現の変化は p27kip1 mRNA 発現の変化に依存しなかった。これは p27Kip1 タンパク質レベルが主として転写後調節で制御されるという過去の事実と合致している。一方、HDF を高密度で培養した場合は、低酸素状態でも p27Kip1 タンパク質発現は上昇していた。

4. 低酸素による RASf 増殖の原因としての N-カドヘリン発現の低下。

カドヘリンは、細胞接着を認識して、細胞内にシグナルを伝達する細胞表面分子群である。細胞表面の N-カドヘリンや E-カドヘリンの相互作用は接触阻害による p27Kip1 タンパク質の蓄積の原因となる場合があることが知られている。また、最近、カドヘリン-11 が RASF に発現していて、RA 滑膜組織形成を促すと報告された。そこで、正常酸素分圧下で培養された RASF を調べたところ、E-カドヘリン発現はなく、N-カドヘリンとカドヘリン-11 が発現していた。低酸素状態で培養すると、カドヘリン-11 発現はそのままに N-カドヘリン発現が抑えられた。定量的 PCR によれば、この減少は mRNA レベルで制御されていた。したがって、低酸素は N-カドヘリン発現を抑制することによって高密度培養下の RASF 増殖を促進していることが判明した。実

際、HDF ではこのような現象は認められなかった。

次に、抗N-カドヘリン中和抗体を用いて、N-カドヘリン同士の相互作用を阻害してみた。RASf を正常酸素分圧で高密度培養し、この抗体を作用させると、あたかも低酸素分圧下で培養したときのように増殖を促した。かつ、この時、p27Kip1 タンパク質発現も低下していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計20件、代表5件を示す)

1. Murakami Y, Kohsaka H, Kitasato H, and Akahoshi T. Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous Prostaglandin E2. *J Immunol* 178(2): 1144-1150, 2007

2. Sugihara T, Sekine C, Nakae T, Kohyama K, Harigai M, Iwakura Y, Matsumoto Y, Miyasaka N, and Kohsaka H. A new murine model to define critical pathologic and therapeutic of polymyositis *Arthritis Rheum* 56(4):1304-1314, 2007

3. Ohata J, Miura T, Hori S, Ziegler SF, Kohsaka H Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts *Arthritis Rheum* 56(9):2947-2956, 2007..

4. Sekine C, Sugihara T, Miyake S, Hirai H, Yoshida M, Miyasaka N, Kohsaka H Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with smallmolecule cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Immunol* 180(3):1954-61, 2008.

5. Nonomura Y, Mizoguchi F, Suzuki A, Nanki

T, Kato H, Miyasaka N, Kohsaka H. Hypoxia-induced Abrogation of Contact-dependent Inhibition of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblast Proliferation *J Rheumatol* 36(4), 698-705, 2009.

[学会発表] (計15件)
シンポジウム

上阪 等、野々村美紀、村上洋介、関根知世子、宮坂信之 CDK4/6 阻害薬による関節炎治療 横浜 2007年4月26-29日 第51回日本リウマチ学会総会

上阪 等、大畑順子 関節炎抑制のために制御性T細胞に必要な抗原特異性と免疫抑制性 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 札幌 2008年4月20-23日

上阪 等、村上洋介、野々村美紀、宮坂信之 関節リウマチ治療の新たな標的分子 第45回神戸 2008年7月24-25日 日本臨床分子医学会学術集会

村上洋介、宮坂信之、上阪 等 関節リウマチの新しい標的分子 Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 東京 2008年10月17-18日 第36回日本臨床免疫学会

一般演題・ワークショップ

村上洋介、上阪 等、赤星 透 PGE2 を介したLPSによるTREM-1発現の制御機構 東京 2007年6月23日 第16回内毒素・LPS研究会

上阪 等、野々村美紀、村上洋介、関根知世子、宮坂信之 CDK4/6 を標的とした関節炎治療(ワークショップ) 東京 2007年8月2-3日 第28回日本炎症・再生医学会

中里 款、野々村美紀、宮坂信之、上阪 等 細胞膜透過型タンパク製剤を用いた新規抗リウマチ療法の研究(ワークショップ) 東京 2007年8月2-3日 第28回日本炎症・再生医学会

中里 款, 野々村 美紀, 宮坂信之, 上阪
等 TAT-PTDを用いたリコンビナントCDKIタ
ンパクの関節リウマチ滑膜線維芽細胞への
導入 大阪 2007年10月19-20日 第35回
臨床免疫学会総会(ワークショップ)

Makoto Nakasato, Yoshinori Nonomura,
Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka.
Preparation of a TAT-PTD CDKI Fusion
Protein that efficiently Inhibits
Proliferation and MMP-3 Production of
Rheumatoid Synovial Fibroblasts. American
College of Rheumatology 71th National
Meetings, Boston, MA, November 6-11, 2007
Yoshiya Tanaka, Kazuhiko Yamamoto,
Tsutomu Takeuchi, Nnorihito Nishimoto,
Nobuyuki Miyasaka, T Sumida, Tetsuji
Sawada, Hitoshi Kohsaka, Isao Matsumoto,
K. Saito, Takao Koike A 2 Year-Extended
Follow-Up Of The Phase I/II Trial Of
Rituximab For Treatment Of Refractory
Systemic Lupus Erythematosus Annual
European Congress of Rheumatology EULAR
Paris, France, 11-14 June 2008

Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H,
Nakashima K, Nakamura T, Kohsaka H,
Miyasaka N, Harfe B, Kato S, Ezura Y, Noda
M. Osteoclast Specific Dicer Deficiency
Suppress Osteoclast Differentiation And
Increase Bone Mass 2nd International
Conference on Osteoimmunology. Rhodes,
Greece June, 8-13, 2008

豊本雅靖、石戸 聡、宮坂信之、上阪 等 E3
ユビキチンリガーゼ c-MIR の抗炎症効果によ
る関節炎治療 東京 2008年7月8-10日
第29回日本炎症・再生医学会

中里 款、宮坂信之、上阪 等 リウマチ滑
膜線維芽細胞における let-7 microRNA の効
果 東京 2008年10月17-18日 第36回日

本臨床免疫学会

中塩屋 大樹、宮坂信之、松下 祥、上阪 等
マウスのコラーゲン誘発性関節炎と破骨細
胞に対するドパミン受容体阻害薬の効果
東京 2008年10月17-18日 第36回日本臨
床免疫学会

豊本雅靖、石戸 聡、宮坂信之、上阪 等 E3
ユビキチンリガーゼ c-MIR の抗炎症効果によ
る関節炎治療 東京 2008年10月17-18日
第36回日本臨床免疫学会

[図書] (計3件)

上阪 等 ステロイドを使う主な病気「膠原
病・リウマチ内科」ステロイドがわかる本
宮坂信之編著 法研 58-112頁、2008年
上阪 等 関節リウマチ 病因 新しい診
断と治療のABC「関節リウマチ」宮坂信之
編集 59-66頁 最新医学社 2008年
上阪 等 ステロイド薬の適応と副作用
「よくわかる関節リウマチのすべて」宮坂
信之編集 179-185頁 永井書店 2009年

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

2007年6月1日日本国特許出願 c-MIRを
利用したCD40の発現調節、及びそのスクリ
ーニング方法(出願番号:2007-146706)

2008年2月20日 日本国特許出願 膠原病
の予防・治療剤 (出願番号:特願
2008-39292)

[その他]

報道発表

関節リウマチに新薬の可能性 NHK おはよう
日本 2008年1月26日

抗がん剤がリウマチに効果 医科歯科大チー
ムが確認 京都新聞、日刊スポーツ、中日新
聞、東京新聞、北日本新聞、北海道新聞、徳
島新聞、神戸新聞、山陽新聞、佐賀新聞、福
井新聞、岩手日報、共同通信 47 ニュース、
goo ニュース、i-revo ニュース、MSN 産経ニ
ュース、excite ニュース、AOL ニュース 2008
年1月26日

信濃毎日 2008 年 1 月 26 日夕刊の第 2 社会面、四国新聞 27 日朝刊の 3 面、東奥日報（青森県）27 日朝刊の第 3 社会面

抗がん剤使って関節リウマチ治療 東京医歯大チームが開発 読売新聞 2008 年 1 月 28 日

落第抗がん剤、再チャレンジ成功 東京医歯大など 朝日新聞 2008 年 1 月 28 日 社会面

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上阪 等

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科
准教授

00251554

(2) 研究分担者

宮坂 信之

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科
教授

30157622

野々村 美紀

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科
助教

杉本八郎

京都大学大学院・薬学研究科
教授

(3) 連携研究者

該当せず