

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03492

研究課題名（和文）関節リウマチの病態形成における新規アラミンの関与

研究課題名（英文）Effect of novel alarmin on pathogenesis of Rheumatoid Arthritis

研究代表者

鈴木 春巳（Suzuki, Harumi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：70235985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）の治療薬であるブシラミンに結合する蛋白を探索した結果、細胞内蛋白であるPrXを同定した。PrXはTLR4依存的に自然免疫系を活性化して炎症を惹起する強力なアラミンであり、さらにPrXはシトルリン化酵素PAD4の放出を介して自己抗体の産生に関わっていることを示した。RA患者の血清中にはPrXが高濃度に存在しており、RA動物モデルにおいてPrXを阻害すると、関節炎症状および自己抗体量が減弱した。以上のことから、PrXは炎症増悪・遷延化と自己抗体産生誘導という2つの側面からRAの病態進行に関わる重要なキー因子であり、PrXがRAの新たな治療標的となりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは患者数の多い、社会的にも重要な自己免疫疾患という難病です。私達は、PrXという今までに知られていなかった蛋白質が関節リウマチの病状進行に重要な働きをしていることを発見しました。炎症によって壊れた細胞から放出されたPrXは、周囲の細胞に働きかけてさらなる炎症を誘導して病状を悪化させ、さらに、自分の成分を化学修飾する酵素の放出を促すことにより、自己抗体の産生にも関わるといふ、リウマチの病態進行の新たなメカニズムを発見しました。したがって、PrXの働きを阻害する薬剤を開発すれば、リウマチの悪化を効果的に防ぐことが出来る薬となりうることを、この研究によって明らかになりました。

研究成果の概要（英文）：We identified PrX as binding protein of bucillamine, an anti-rheumatic drug. PrX not only functions as a strong alarmin to exacerbate inflammation, but also induces the release of citrullinating enzyme PAD4 to create neo-self protein. We found high concentration of PrX was existed in the serum of rheumatoid arthritis (RA) patients, and inhibition of PrX in mouse RA model resulted in amelioration of inflammatory symptoms and autoantibody titer. Collectively, we identified novel factor PrX, which is involved in both inflammation and autoantibody production during disease progression of RA, and demonstrated that PrX could be a novel potential target for the remedy against RA.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ アラミン シトルリン化 炎症

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチに代表される自己免疫疾患は、自己成分を外敵と間違えて攻撃してしまう「T 細胞の誤作動」が起因ではあるが、炎症が鎮静せず慢性化することが病態進行上極めて重要なファクターとなる。自己免疫疾患における炎症の遷延化は抗原の恒常的な存在だけでは説明できず、フィードバック調節機構の破綻が寄与している可能性が高い。近年、炎症応答や損傷によって細胞内から放出される警告蛋白「アラミン」が周囲に更なる炎症を惹起し、その炎症応答による細胞破壊で更にアラミンが放出される、という正のフィードバックループの形成が、自己免疫疾患における炎症の慢性化に重要であるという新しい概念が提出されている。革新的なモデルではあるが、現在までのところ HMGB1 等のアラミンを阻害しても炎症の慢性化は阻害できておらず、残念ながらこのモデルは実験的には支持されていない。

2. 研究の目的

今回我々が発見した PrX は、既存のアラミンを遙かに凌ぐ強力な炎症誘導活性を有しており、PrX が本命のアラミンとしてフィードバックループを形成して自己免疫疾患の炎症の慢性化に関与しているのではないかと、というのが本研究における学術的な問いであり、これを証明することができれば炎症の遷延化に全く新しい概念を導入する革新的な研究となる。

PrX が新規アラミンとして関節リウマチの病態形成に関与しているかどうかを解明するために以下の点を期間内に明らかにする。a) PrX がマクロファージを活性化してサイトカイン産生を誘導する際の分子機序を明らかにする。TLR 欠損マウス等の自然免疫レセプター欠損マウスを用いて PrX の受容体を同定し、変異体を用いて結合に必要なドメインを特定して PrX のアラミンとしての分子基盤を明らかにする。b) ヒト関節リウマチ患者の血清中における 20 種類の PrX 濃度を網羅的に測定し、どの PrX が高く放出されているか、特定の PrX が疾患症状や病態ステージとの相関を示すかを検討する。c) コラーゲン誘導性マウス関節リウマチモデルにおいて、抗体や阻害剤の投与によって PrX を阻害することで関節炎症状の軽減が見られるか、すなわち PrX の放出が関節炎発症の原因となっているかどうかを検証する。予想される結果として、少なくとも PrX が関節リウマチや炎症性自己免疫疾患の新たな血清診断法として利用できる可能性はきわめて現実的である。

3. 研究の方法

本研究では、PrX のアラミンとしての機能の解析、関節リウマチにおける PrX の関与、の 2 本柱を中心として研究を展開してゆく。PrX は我々が新規に発見したアラミンでありその性状や機能はまだ殆ど分かっていないため、アラミンとしての解析が本研究の主な部分を占めることになる。

PrX のアラミンとしての機能解析

- a. サイトカイン産生：リコンビナントヒト PrX タンパク質が invitro で M を活性化して LPS に匹敵する程の IL-6 産生を誘導することが分かっている。IL-6 以外に、TNF、IFN、IL-10 などの IL-6 以外のサイトカインやケモカイン等も産生するか網羅的に検討する。また、M だけでなく、好中球、マスト細胞、樹状細胞あるいは T 細胞などの他の免疫担当細胞に対しても作用するか検討する。上記以外の残りのヒト PrX 蛋白、バクテリア PrX 蛋白についても予備的実験で同様のサイトカイン産生能を持つことを確認しており、これら 20 種の PrX について、産生能の強さ、産生サイトカインスペクトルの違いがあるか等も検討する。
- b. 受容体の特定：HMGB1、PrX 等のこれまでのタンパク性アラミンは TLR2、TLR4、RAGE 等を介してシグナルを伝達していることから、PrX においても TLR や RAGE が受容体となっている可能性は高い。そこで、MyD88、TLR2、TLR4、TLR7、RAGE を欠損した M を用いてサイトカイン産生を検討する。一部の PrX は細胞外で IL-8R やラミニンと結合することが分かっているので、これらの分子についても欠損マウスを用いて検討する。
- c. PrX 変異体の作製：まず始めに PrXK の変異体を作製する。PrXK には 4 つのドメインが同定されているので、これらのドメインの変異体を作製し、サイトカイン産生や受容体との結合実験に供する。他の PrX についても随時変異体の作製を開始する。
- d. シグナル伝達経路の解析：PrX が TLR を介して自然免疫を活性化している場合は、TLR の下流のシグナル伝達、すなわち NF- κ B 経路の活性化や TNF プロモーターを用いた Luc アッセイなどについても検討する。
- e. M 以外の細胞、すなわち好中球や樹状細胞における自然免疫応答、および B 細胞の増殖、特異的抗体産生に対する作用や、Th1、Th2、Th17 分化に与える影響についても検討を進める。
- f. HMGB1 などのアラミンが放出されることが実証されている LPS 誘導性敗血症やリステリア感染症などの実験系において、HMGB1 等と同様に PrX が放出されているかどうかを解析することにより、PrX が in vivo で実際にアラミンとして機能しているかどうかを検証する。

関節リウマチの病態形成における PrX の関与

- a. 関節リウマチ患者血清、関節炎モデルマウス血清中の PrX 量の測定：
我々は慢性関節リウマチのモデルマウスであるコラーゲン誘導性関節炎モデルマウス (CIA) において、病態の進行に伴い血清中に PrXK、PrXH、PrXY が放出され、ブシラミン投与により関節炎症状が改善されると、それに呼応して血中 PrX 量も正常値に戻ることを確認している。そこで残りの 17 種の PrX についても血中濃度を測定し、20 種ある PrX 蛋白のどれが高濃度に放出されているかを解析する。また、ヒトの関節リウマチ患者の血清中に PrXC、PrXF、PrXG が高値で検出されることを見出しているため、その他の 17 種の PrX についても網羅的に血中濃度を測定する。
- b. 関節リウマチ発症における PrX の関与：CIA モデルマウスにおいて PrX を除去する手段として、中和抗体を作製する。PrX 分子群はどれも細胞生存に必須の基本因子であるので、遺伝子変異は致死となりノックアウトマウスの活用は難しい。20 種全ての抗体を作製するのは時間がかかるので、初年度は血中への放出が既に確認されている 3 種すなわち、PrXK、PrXH、PrXY に対する抗体の作製を開始する。抗体が取れないばあいはペプチドを検討する。
- c. 関節リウマチ患者血清中の各種 PrX 濃度を測定し、症状や治療履歴、炎症スコアなども考慮して、各々の血中 PrX 値と症状との関連を検討する。さらに、関節は変形するが炎症を伴わない変形性関節症 (OA) 患者の血清も採種し、炎症性の関節リウマチとの対比を検討する。また、血清と同時に炎症局所の関節液も採種して PrX 量の測定を行い、炎症局所と全血との比較も検討する。

4 . 研究成果

19 種類の PrX ファミリーのマクロファージにおける IL-6 産生誘導を検討したところ、いずれの分子においても程度の差こそあれ活性を持つことが明らかとなった。IL-6 以外にも TNFa も産生誘導することもわかった。受容体に関してはノックアウトマウスのマクロファージを用いて検討し、TLR4、MD2、CD14 に依存し、RAGE、IL-8 には依存しないことが明らかとなった。PrX と TLR4、MD2、CD14 とのタンパク質レベルでの相互作用はまだ検証出来ていないが、PrX 認識の分子機構についての理解が進展した。シグナル伝達に関しては、NFkB の関与が示唆され、PrX の受容体が TLR4 であることとの整合性も確認された。マクロファージ以外にも樹状細胞も刺激することもわかった。

ドメイン要求性に関して、PrXY の ATP 結合活性、Zn 結合活性、を欠失する点突然変異体を作製して活性を検討したが、いずれの変異体も活性を失っており、これらのドメイン構造が活性発現に必須であることが示唆された。

阻害抗体は 3 種の PrX に対して抗血清を作製したが、活性をブロックできる中和可能な抗血清を得ることが出来なかった。そこでペプチドライブラリーを作製して阻害活性をスクリーニングしたところ、効果的な阻害活性を持つペプチド P51 を取得した。興味深いことに、P51 は数種の PrX によるマクロファージ活性化を抑えることが出来た。

関節リウマチの患者血清の解析は、PrX ファミリーメンバーにより、漏出濃度が高い群、中程度の群、およびほとんど漏出が見られない群とに分類できることがわかった。そこでまずは、漏出量の高い PrXC、F、P、G の 4 種に特に着目して解析を進め、漏出 PrX 濃度が炎症マーカーとある程度相関することが認められた。さらに、関節液についても解析を進め、関節リウマチ患者の関節液中にも高濃度の PrX の漏出を認めたが、興味深いことに変形性感染患者の関節液中には漏出が全く認めされなかった。関節リウマチ患者血清中の PrX の濃度と各種症状、炎症パラメーターなどとの相関を詳細に検討した結果、抗 CCP 抗体 (ACPA) 陽性者において、PrX の血中濃度が高いことが明らかとなった。PrX が ACPA すなわちシトルリン化に関与する可能性を考え、関節リウマチに関わる重要なシトルリン化酵素である PAD4 について検討したところ、驚いたことに *in vitro* でマクロファージを PrX 刺激すると PAD4 が細胞外に放出されることがわかった。すなわち、PrX 刺激を受けたマクロファージは炎症性サイトカインを放出するだけでなく、PAD4 の放出を促し、自己蛋白のシトルリン化を誘導することにより、いわゆるネオ抗原の創出を導き、自己抗体の産生に関与している可能性が明らかとなった。

関節リウマチの病態進行における PrX の関与を検討するため、マウスモデルであるコラーゲン誘導性関節炎モデル (CIA) を用い、PrX 阻害ペプチド P51 を投与することで病態進行が抑制されるかを検討した。P51 連続投与により、CIA の病態スコアは有意に減少し、血中サイトカイン濃度や PrX 濃度が低下した。さらに興味深いことに、P51 投与により血中 PAD4 濃度も低下しており、PrX が関節リウマチの病態進行に重要な働きをしていることを示すことができた。

以上のように、本研究では関節リウマチの病態形成、進行に全く新しい細胞内アラミンである PrX の細胞外放出が深く関与しており、この PrX が単なる炎症誘導アラミンではなく PAD4 の放出を介してネオセルフ抗原を創出することによる自己抗体産生にも関与していることを明らかにすることができた。本研究により、関節リウマチの病態形成の理解が大きく進んだと共に、今後のリウマチ治療戦略に新しい概念を吹き込むきわめて重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kitajima M, Kubo M, Ziegler SF, Suzuki H*	4. 巻 205
2. 論文標題 Critical role of TSLP receptor on CD4 T cells for exacerbation of skin inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 27-35
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 Tamehiro N, Nishida K, Sugita Y, Hayakawa K, Oda H, Nitta T, Nakano M, Nishioka A, Yanabu-Takanashi R, Goto M, Okamura T, Adachi R, Kondo K, Morita A, Suzuki H	4. 巻 143
2. 論文標題 RhoH deficiency induces psoriasis-like chronic dermatitis by promoting TH17 cell polarization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Allergy Clin. Immun	6. 最初と最後の頁 1878-1891
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kitajima M, Ziegler SF, Suzuki H
2. 発表標題 Critical role of TSLP receptor on CD4 T cells for exacerbation of skin inflammation.
3. 学会等名 EMBO Workshop ThymE（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitajima M, Ziegler SF, Suzuki H
2. 発表標題 Significant role of TSLP receptor on CD4 T cells in chronic allergic dermatitis.
3. 学会等名 The 17th International Congress of Immunology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田響子、木村彰宏、鐔田武志、鈴木春巳
2. 発表標題 The anti-oxidative enzyme NAD(P)H quinone oxidoreductase1 promotes Th17 cells differentiation by protecting oxidative stress
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村彰宏、鈴木春巳
2. 発表標題 The AhR-sMaf complex promotes the differentiation of Breg cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	木村 彰宏 (Kimura Akihiro) (20533318)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長 (82610)	

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
---------	---------