

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09655

研究課題名（和文）Stat3を標的とした慢性炎症性関節炎および関節破壊制御

研究課題名（英文）Inhibition of chronic arthritis and joint destruction by targeting Stat3

研究代表者

宮本 佳奈（Miyamoto, Kana）

熊本大学・病院・医員

研究者番号：60464997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Stat3を阻害する低分子化合物を同定するため約490万クローンについてin silicoスクリーニングを行い、39のStat3阻害剤の候補化合物を同定した。これら39のStat3阻害剤候補化合物のうち、入手が可能であった15の化合物についてin vitroで2次スクリーニングを実施し、3つの化合物について有意なStat3阻害活性を認めた。そこで、これら3つの化合物についてin vivoのコラーゲン誘導関節炎モデルにおいて、1つの化合物に関節炎の有意な抑制効果を認めた。また、この1つの化合物にはIL-6によって誘導されるStat3のリン酸化抑制活性をin vitroで認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ（RA）は慢性的に経過する関節炎や関節破壊のため、ADLやQOLが著しく障害される慢性炎症性疾患である。今日、炎症性サイトカインやシグナル分子であるJakを標的とした分子標的治療が発展しているが、転写因子を標的とした治療法は開発されていない。今回、転写因子であるStat3の阻害によりRAに対する治療効果の可能性を示した点並びにStat3阻害効果をin vivoおよびin vitroで発揮する低分子化合物を同定した点で学術的意義がある。また、既存の治療法では寛解を得られない患者も少なくなく、価格的に安価な低分子化合物で新たな治療法の選択肢を提案した点で社会的意義もあると考えている。

研究成果の概要（英文）：We screened approximately 4.9 million small compounds as potential inhibitors of Stat3 using in silico screening, and identified 39 candidates as potential Stat3 inhibitors. We then tested available 15 compounds out of 39 their Stat3 inhibiting activity in in vitro secondary screen. We found that 3 out of 15 had potential Stat3 inhibiting activities in vitro, thus we analyzed the effects of these 3 compounds in collagen induced arthritis (CIA) model, a rheumatoid arthritis model, in vivo. One out of 3 compounds significantly inhibited arthritis development without apparent adverse effects in CIA models in vivo. Finally, we confirmed that the one compound significantly blocked Stat3 phosphorylation induced by IL-6 in vitro.

研究分野：整形外科、血液、膠原病

キーワード：関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) や自己炎症症候群といった疾患では関節炎と関節破壊が慢性的に経過することが知られている。このため、罹患者はこの炎症と関節破壊の両方を制御しないと、関節炎と関節破壊が継続あるいは進行し、長期的に ADL や QOL に重大な支障をきたすことになる。しかし、なぜ関節炎と関節破壊の両方が慢性的に持続するのか、ということは明らかではなかった。申請者は関節炎と関節破壊の慢性化には、炎症性サイトカインによる炎症性サイトカインの発現誘導、いわゆる炎症性サイトカインのポジティブフィードバックループが関与していること、この炎症性サイトカインのポジティブ

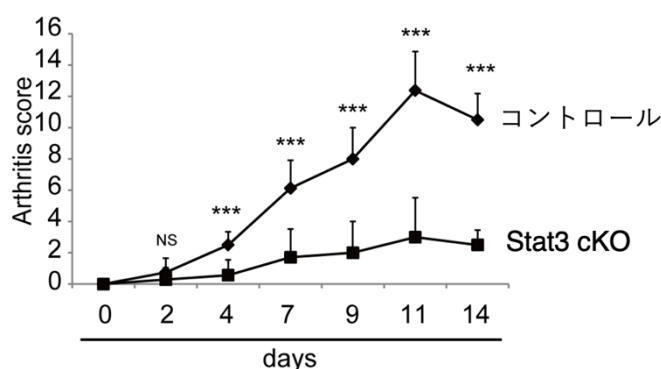


図1：Stat3 cKOでは関節炎の有意な抑制が見られる
Stat3 cKOとコントロールマウスにRAモデルである
Collagen induced arthritis modelを作成すると、
関節炎の有意な抑制が見られた。

フィードバックループには転写因子である signal transducer and activator of transcription factor 3 (Stat3)が必須の役割を担うことを見出していた。Stat3 の通常のノックアウトマウスは胎生致死であるが、Stat3 遺伝子をアダルトにおいて、欠損させるモデルマウスを Stat3 flox マウスと Mx1 Cre マウスとを交配させることで Mx1 Cre/Stat3 flox/flox (Stat3 cKO) 作成すると、polyIpolyC 投与によって全身的に Stat3 をノックアウトし

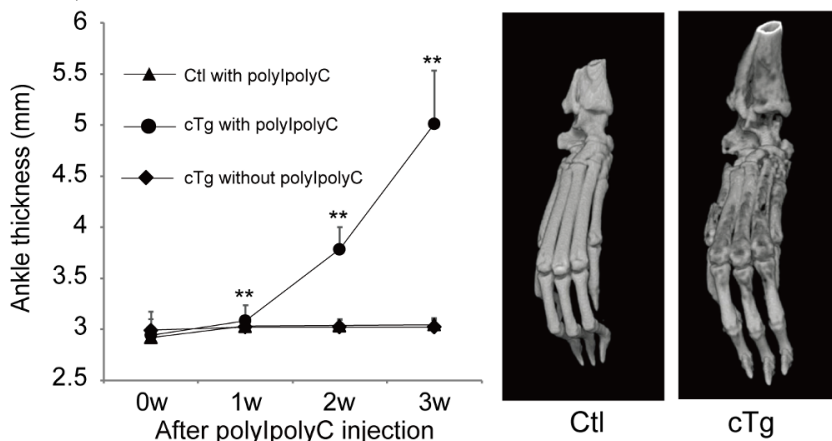


図2：cTgでは大関節の関節炎と関節破壊を認める
IL-1 cTgマウス (cTg) ではpolyIpolyCの投与により発症を誘導すると、
大関節 (ここでは足関節) の関節炎 (左) と関節破壊を認めた。
Ctl=コントロール。

ても致死にはならず、RA の代表的な関節炎モデルである collagen induced arthritis (CIA)モデルでは Stat3 を抑制することで有意な関節炎の抑制効果を認めた (図1)。また、自己炎症症候群は大関節を中心とした炎症や破壊をきたし、また関節外病変を伴うなど、小関節を中心に罹患する RA とは独立した疾患であることが知られていたが、自己炎症症候群の病態を再現し、かつ様々な遺伝子改変動物と交配可能な動物モデルは知られていなかったため、その病態の解明はあまり進んでいなかった。申請者は世界に先駆けて IL-1 シグナルをアダルトにおいて増強することで自己炎症症候群の病態を再現するモデルマウス、IL-1 conditional transgenic (IL-1 cTg)の開発に成功していた (図2)。

2. 研究の目的

本研究では RA については Stat3 を阻害する阻害薬を新規に開発することで、病態解明に基づく新たな RA 治療薬の開発を進めることを、また自己炎症症候群については、まだ世界的に適当な動物モデルが整備されていない状況であったため、今回新たに開発に成功した自己炎症症候群モデルマウスを用いて病態形成のメカニズムと治療標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

Stat3 を阻害する阻害薬の開発については、抗体製剤に代表される生物学的製剤は价格的に高価であることから、より安価な低分子化合物によって Stat3 阻害薬のスクリーニングを行うこととした。Stat3 はその分子の特性上 2 量体を形成し、核内に移行し炎症下で炎症性サイトカインと

RANKL の発現を誘導することから、この 2 量体形成を阻害するため、2 量体形成のために必須の蛋白-蛋白相互作用ドメインに結合する低分子化合物を *in silico* コンピュータスクリーニングにより同定することとした。Stat3 の蛋白相互作用ドメインの結晶構造を確認し、このドメインに結合する低分子について、約 490 万クローンの *in silico* スクリーニングを行うこととした。候補化合物が得られた場合には、その生物学的活性を *in vitro* で評価し、最も Stat3 阻害活性の高い化合物については *in vivo* の RA モデルである collagen induced arthritis (CIA)モデルで効能を評価することとした。

自己炎症症候群については、human IL-1 のシグナルを任意のタイミングで上昇させることで、大関節優位の関節炎・関節破壊を認めるモデルマウスの開発に成功しており (hIL-1 cTg)、罹病関節において、滑膜炎と関節破壊を認め、その際、滑膜と軟骨下骨に Stat3 の活性化を認めること、また血清において炎症性サイトカインである IL-6 と IL-17 の有意な上昇を認めていた。また、hIL-1 cTg は炎症を誘導しなければ通常通りの交配が可能であった。そこで、本研究では hIL-1 cTg と Stat3 コンディショナルノックアウトマウス (Stat3 cKO)、IL-6 KO あるいは IL-17 KO と交配し、これらの分子が自己炎症症候群の治療的となり得るかを検証することとした。

4. 研究成果

Stat3 を阻害する可能性のある低分子化合物を同定するため約 490 万クローンについて *in silico* スクリーニングを行い、39 の Stat3 阻害剤の候補化合物を同定した。続いてこれら 39 の Stat3 阻害剤候補化合物のうち、入手が可能であった 15 の化合物について *in vitro* で 2 次スクリーニングを実施した。Stat3 の代表的な転写標的である IL-6 の発現抑制を指標に 15 の化合物の効能を評価したところ、4 つの化合物について有意な IL-6 の発現抑制を認めた。これら 4 つの化合物については、さらに Stat3 の転写標的の 1 つで、関節破壊において中心的な役割を担う破骨細胞の分化誘導因子である

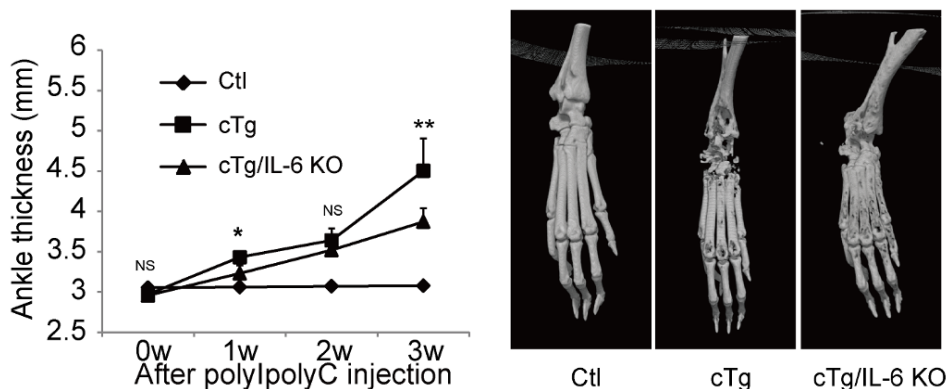


図 3 : cTgの関節炎と関節破壊はIL-6の抑制により改善する

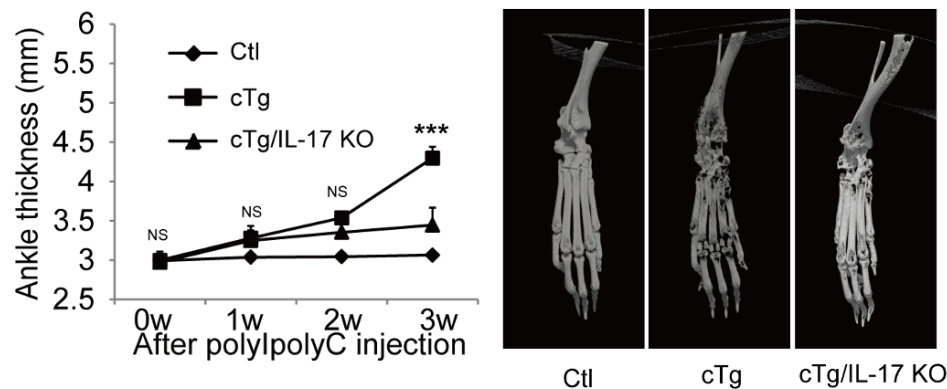


図 4 : cTgの関節炎と関節破壊はIL-17の抑制により改善する

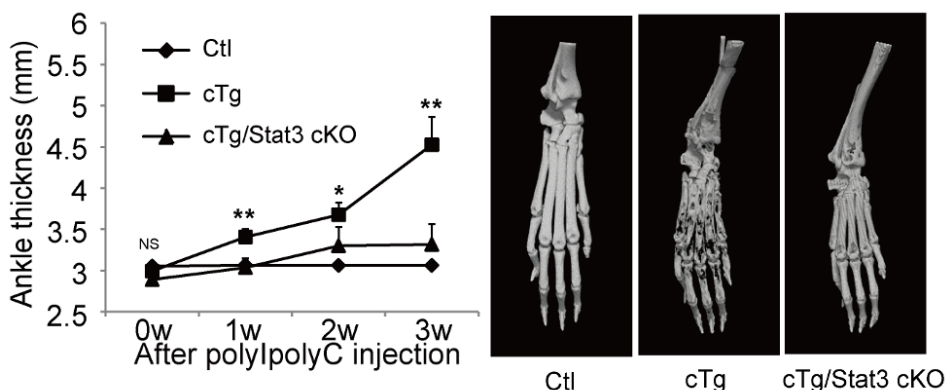


図 5 : cTgの関節炎と関節破壊はStat3の抑制により改善する

RANKL について、その発現抑制活性を *in vitro* において評価したところ、3つの化合物に有意な *RANKL* の発現抑制活性があることを見出した。そこで、これら3つの化合物について *in vivo* の CIA モデルにおいて、関節炎の抑制効果を検証したところ、1つの化合物に関節炎スコアで評価する関節炎の有意な抑制効果を確認した。この1つの化合物については組織学的評価によっても、CIA モデルに見られる関節症の発症が抑制されていることを見出した。最後に、この1つの化合物において *Stat3* そのものの抑制効果を見るために、*in vitro* において IL-6 刺激下における *Stat3* の核内移行やリン酸化に対する抑制効果を免疫染色およびウエスタンブロッティングで検証を行ったところ、この化合物が確かに *Stat3* の抑制効果を有していることが確認された。これらの成果については、現在英文論文としてまとめ、投稿中である。

また、自己炎症症候群については、モデルマウスである hIL-1 cTg と IL-6 KO、IL-17 KO あるいは *Stat3* cKO との交配を完了し、*Stat3*、IL-6 あるいは IL-17 のいずれの抑制によっても、hIL-1 cTg に認められる関節炎と関節破壊を有意に抑制できることを明らかにした (図 3~5)。これらの成果についても、英文論文に投稿した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito E, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Soma T, Matsumoto T, Kimura A, Miyamoto K, Matsumoto H, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T	4. 巻 542
2. 論文標題 Treatment with an active vitamin D analogue blocks hypothalamic dysfunction-induced bone loss in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 48-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.026	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 Ito E, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Soma T, Matsumoto T, Kimura A, Miyamoto K, Matsumoto H, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T	4. 巻 534
2. 論文標題 Food restriction reduces cortical bone mass and serum insulin-like growth factor-1 levels and promotes uterine atrophy in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 165-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.122	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 Soma T, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Ito E, Okada H, Watanabe H, Miyamoto K, Matsumoto M, Nakamura M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	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) 10.1007/s00774-020-01174-2	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 Kobayashi H, Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 ALDH2 mutation promotes skeletal muscle atrophy in mice via accumulation of oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	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.bone.2020.115739	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 Kiyota Y, Muramatsu H, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Iwamoto T, Matsumoto M, Nakamura M, Tateno H, Sato K, Miyamoto T	4. 巻 10
2. 論文標題 Smoking cessation increases levels of osteocalcin and uncarboxylated osteocalcin in human sera	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	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) 10.1038/s41598-020-73789-4	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 Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Kaneko Y, Ito E, Soma T, Okada H, Miyamoto K, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T	4. 巻 10
2. 論文標題 Vitamin D protects against immobilization-induced muscle atrophy via neural crest-derived cells in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	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) 10.1038/s41598-020-69021-y	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 Kaneko Y, Tanigawa N, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Ito E, Soma T, Miyamoto K, Kobayashi S, Harato K, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of N-acetyl cysteine prevents osteoarthritis development and progression in a rat model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55297-2.	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 Miyamoto T, Miyakoshi K, Sato Y, Kasuga Y, Ikenoue S, Miyamoto K, Nishiwaki Y, Tanaka M, Nakamura M, Matsumoto M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Changes in bone metabolic profile associated with pregnancy or lactation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43049-1.	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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