

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18473

研究課題名（和文）グリオスタチンの関節リウマチにおける役割と新たな治療標的分子としての可能性

研究課題名（英文）The role and potential of gliostatin as a new therapeutic molecular target in rheumatoid arthritis

研究代表者

川口 洋平（Kawaguchi, Yohei）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：90766734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：グリオスタチン（GLS）は、関節リウマチにおいて血管新生作用および関節炎誘発活性作用があることが知られている。新規経口ヤヌスキナーゼ（JAK）阻害剤であるバリシチニブは、臨床的に関節リウマチ患者に対して、高い有効性を示してきた。我々の研究では、FLSにおいて、GLS mRNA およびタンパクはIFNによる刺激で誘導され、バリシチニブによって抑制された。JAK/STAT経路の活性化はIFNでSTAT1のリン酸化がみられ、バリシチニブで抑制されていた。これらの結果は、バリシチニブがIFN誘導性のGLS発現をSTAT1のリン酸化を阻害することにより抑制したことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の関節リウマチ治療では疾患活動性が制御できない関節リウマチ患者が存在する。それらの患者に対する新規治療薬の開発は急務である。我々の研究は炎症性サイトカインネットワークの下流に位置するグリオスタチンの関節破壊メカニズムを明らかとし、既存治療のnon-responderや二次無効例にグリオスタチンを治療ターゲットとしたRA治療が探索できる。さらに副作用で既存の薬剤が使用できない患者に対し新たな治療を提供することが本研究の社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：Gliostatin (GLS) is known to have angiogenic and arthritogenic activities in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). This study investigated whether GLS/TP production could be regulated by JAK/signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in FLSs derived from patients with RA. In cultured FLSs, GLS mRNA and protein levels were significantly induced by treatment with IFN and these inductions were suppressed by baricitinib treatment. Baricitinib inhibited IFN-induced STAT1 phosphorylation, while JAK/STAT activation played a pivotal role in IFN-mediated GLS upregulation in RA. These results suggested that baricitinib suppressed IFN-induced GLS/TP expression by inhibiting JAK/STAT signaling, resulting in the attenuation of neovascularization, synovial inflammation, and cartilage destruction.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ 線維芽細胞様滑膜細胞 グリオスタチン

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年 RA の治療は劇的に進歩し、生物学的製剤や JAK 阻害剤が新たに適応となり、多くの症例で寛解をめざす治療が可能となってきた。しかし現在のいずれの寛解基準をみただけでも、骨びらんの進行する症例があり、RA 患者の unmet needs は満たされていない。

グリオスタチンにはチミジンホスホリラーゼ (TP) 酵素活性があり、RA 患者において、変形性関節症 (OA) 患者の関節液、滑膜抽出物と比較し有意に高濃度に存在し、血清中の濃度も健常人、OA 患者と比べ、RA 患者は有意に高値であることを報告した [Takeuchi M, et al. Arthritis Rheum. 1994;37:662-672.]。また血清グリオスタチン濃度が血沈、CRP、リウマトイド因子と正の相関があり、治療有効症例ではその濃度が、経過と共に低下することを報告した [Yamagami T, et al. Rheumatol Int. 2011;31:903-9.]。

これまで申請者らは、RA 滑膜から樹立した滑膜培養細胞を用いた基礎研究によりグリオスタチンについて、炎症性サイトカインである IL-1 や TNF- α によってグリオスタチンは誘導される [Waguri Y, et al. Br J Rheumatol. 1997;36:315-21. Tanikawa T, et al. Rheumatol Int. 2007;27:553-559.] ことやグリオスタチン刺激により、軟骨破壊をもたらす matrix metalloproteinases (MMPs)や血管新生をもたらす vascular endothelial growth factor (VEGF) が誘導される [Tanikawa T, et al. Rheumatol Int. 2007;27:553-559., Tatematsu N, et al. Mod Rheumatol. 2018;28:495-505.] ことや、グリオスタチンには autocrine 作用がある [Muro H, et al. Rheumatology. 1999;38:1195-202.] ことなどを報告してきた。

グリオスタチンは関節破壊作用、血管新生作用、起炎症作用を有するタンパク質であると考えられる。関節軟骨への炎症性滑膜の浸潤 (パンヌス形成)、骨びらん形成に関わるグリオスタチンの作用機序の解明とその作用の抑制法を解明することは、新たな治療法へとつながる可能性がある。

2. 研究の目的

炎症性サイトカインネットワークの下流に位置するグリオスタチンの関節破壊メカニズムが明らかになれば、既存治療の non-responder や二次無効例にグリオスタチンを治療ターゲットとした RA 治療が探索できる。さらに副作用で既存の薬剤が使用できない患者に対し新たな治療を提供することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞様滑膜細胞 (FLSs) において IFN γ によって誘導されるグリオスタチンに対する JAK 阻害剤の抑制効果の検討。

RA 診断基準を満たした患者より採取した滑膜を初代培養し、実験には 3 代から 6 代継代した FLSs を使用する。継代後、1 週間培養してコンフルエントとなった時点で、JAK 阻害剤で前処置を行い、次いで INF γ 刺激を行ったのちに細胞を回収する。TNF α で誘導されたグリオスタチンの発現が JAK 阻害剤を投与することで抑制されるかどうかを、リアルタイム RT-PCR 法、酵素免疫測定法 (ELISA 法)、免疫細胞染色法を用いて検討する。グリオスタチン EIA 法は、研究協力者浅井清文らによって確立され、一次抗体としてポリクローナルな抗 GLS 抗体の Fab' 断片を固相化し、二次抗体としてガラクトシダーゼでラベルしたモノクローナル抗 GLS 抗体を用いる [Hirano T, et al. Biochim Biophys Acta. 1993;1176:299-304.]。

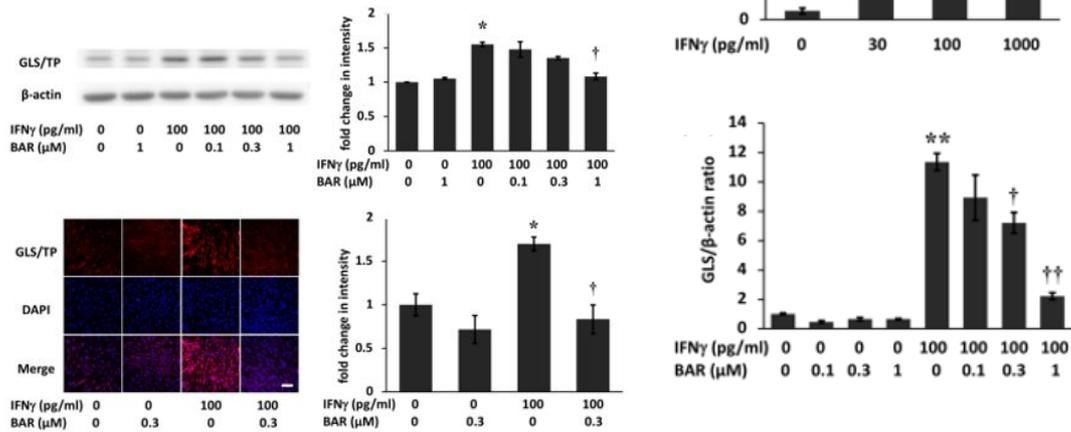
(2) RAFLSs における GLS 誘導の細胞内シグナルの検討

RAFLSs を IFN γ で刺激し、JAK/STAT シグナルの転写因子である、STAT1、STAT3 のリン酸化をウェスタンブロット法で検討する。グリオスタチンのプロモーター領域には STAT1 の結合領域である Interferon-stimulated response element (ISRE) と gamma-activated sequence (GAS) 並びに Sp1 結合部位が存在する。STAT1 の活性化と binding がグリオスタチンを誘導していると仮定し、STAT1 のリン酸化が JAK 阻害剤 (バリシチニブ) によって抑制されることウェスタンブロット法で検討する。

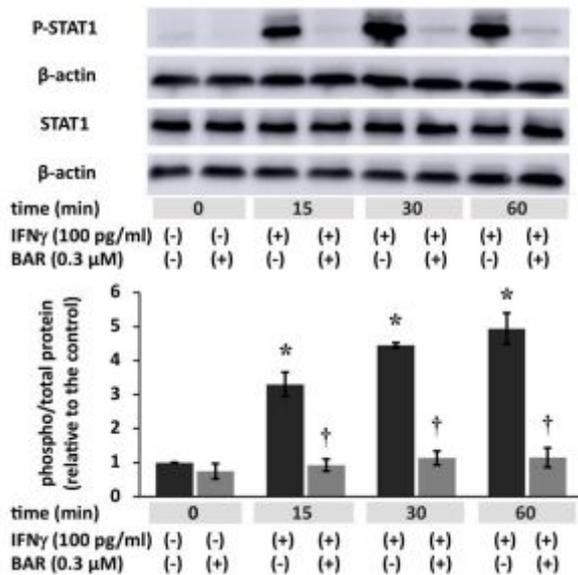
4. 研究成果

FLSにおいてIFN γ の刺激でGLSのmRNAの発現量は濃度依存的に誘導され、バリシチニブを投与することでその発現は抑制された(右図)。

また、タンパク発現量も同様に western blot、ELISA、免疫染色すべてにおいて同様の結果となった(下図)。



IFN γ を投与することで、STAT1のみリン酸化が生じ、そのリン酸化はバリシチニブを投与することで抑制された(下図)。



以上よりIFN γ に誘導されるグリオスタチンの誘導はJAK/STAT系を介しており、バリシチニブはSTAT1のリン酸化を抑制することで、STAT1の核内への移行を阻害し、GLSの発現抑制を行っている可能性が示唆された。以上の結果をImmunologic Researchに投稿した。

Joyo Y, Kawaguchi Y, Yonezu H, Senda H, Yasuma S, Shiraga H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Murakami H, Waguri-Nagaya Y. The Janus kinase inhibitor (baricitinib) suppresses the rheumatoid arthritis active marker gliostatin/thymidine phosphorylase in human fibroblast-like synoviocytes. *Immunol Res.* 2022;70:208-215.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Joyo Yuji, Kawaguchi Yohei, Yonezu Hiroki, Senda Hiroya, Yasuma Sanshiro, Shiraga Hiroo, Nozaki Masahiro, Aoyama Mineyoshi, Asai Kiyofumi, Murakami Hideki, Waguri-Nagaya Yuko	4. 巻 Apr;70(2)
2. 論文標題 The Janus kinase inhibitor (baricitinib) suppresses the rheumatoid arthritis active marker gliostatin/thymidine phosphorylase in human fibroblast-like synoviocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunologic Research	6. 最初と最後の頁 208 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12026-022-09261-4	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 Joyo Yuji, Kawaguchi Yohei, Yonezu Hiroki, Senda Hiroya, Yasuma Sanshiro, Shiraga Hiroo, Nozaki Masahiro, Aoyama Mineyoshi, Asai Kiyofumi, Murakami Hideki, Waguri-Nagaya Yuko	4. 巻 70
2. 論文標題 The Janus kinase inhibitor (baricitinib) suppresses the rheumatoid arthritis active marker gliostatin/thymidine phosphorylase in human fibroblast-like synoviocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunologic Research	6. 最初と最後の頁 208 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12026-022-09261-4	査読の有無 無
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 Yusuke Oguri, Yohei Kawaguchi, Naoe Tatsumatsu, Yuji Joyo, Ken Mizuguchi, Hiroki Yonezu	4. 巻 5
2. 論文標題 N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: A new potential serum biomarker of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	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) 10.24508/mms.2021.06.004	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米津 大貴, 川口 洋平, 上用 祐士, 野崎 正浩, 小林 真, 浅井 清文, 村上 英樹, 永谷 祐子
2. 発表標題 関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞においてIL-6によるグリオスタチン発現はトシリズマブにより抑制される
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米津 大貴, 川口 洋平, 上用 祐士, 浅井 清文, 永谷 祐子
2. 発表標題 IL-6はRA由来線維芽細胞様滑膜細胞においてグリオスタチンを誘導する
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上用 祐士, 川口 洋平, 黒柳 元, 浅井 清文, 永谷 祐子
2. 発表標題 グリオスタチン産生からみた滑膜細胞に対するパリシチニブの新規作用
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 上用 祐士, 川口 洋平, 黒柳 元, 小林 真, 野崎 正浩, 浅井 清文, 永谷 祐子, 村上 英樹
2. 発表標題 リウマチ滑膜細胞においてパリシチニブはSTAT1のリン酸化阻害でGLS産生を抑制する
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年～2021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

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