

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06294・19K21382

研究課題名(和文) TAK1に着目した関節リウマチのさらなる病態解明と新規治療法開発への挑戦

研究課題名(英文) The novel therapeutic roles of TAK1 inhibition in rheumatoid arthritis

研究代表者

天真 寛文(TENSHIN, Hirofumi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00829187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)モデルマウスであるCIAマウスの関節では、滑膜線維芽細胞や破骨細胞の両者においてセリンスレオニンキナーゼであるTAK1が活性化していた。TAK1阻害剤であるLLZ1640-2は、CIAマウスにおける関節炎の程度、出現頻度をともに顕著に抑制したのに加え、関節破壊(骨破壊)も抑制した。また、炎症性サイトカインであるIL-1の分泌もLLZ投与により抑制された。さらにLLZは滑膜線維芽細胞においてIL-1によって誘導されるRANKL発現を抑制し、滑膜線維芽細胞と破骨前駆細胞との共培養系における破骨細胞分化を抑制した。加えて、LLZはRANKLによる破骨細胞分化も抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性関節リウマチ(RA)は、近年様々な生物学的製剤が臨床応用され治療成績は向上しているものの、依然として2～3割の症例では寛解せず、過剰な炎症反応と骨・軟骨破壊が著しい疼痛や運動障害を惹起し、ADLやQOLを著しく低下させる。RA病変部においては滑膜細胞や免疫系細胞による炎症と破骨細胞による骨破壊が起こっており、炎症と骨破壊を制御する新規標的分子の探索とその分子を標的とした治療法の開発が急務である。本研究によってTAK1がRAの炎症と骨破壊の双方を効率的に抑制し得ることが示唆され、本研究結果は今後のRAの新規治療法開発に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：TGF- β activated kinase-1 (TAK1) was phosphorylated in synovial cells and osteoclasts in CIA mouse which are generally accepted as a RA animal mode. TAK1 inhibitor, LLZ 1640-2 improved arthritis severity and the incidence of arthritis as well as bone destruction in CIA mouse. In addition, IL-1 secretion in sera were upregulated in CIA mice, however LLZ reduced IL-1 levels in sera of CIA mice. Addition of IL-1 induced RANKL mRNA expression in synovial fibroblasts isolated from CIA mice, and the synovial fibroblasts were able to induce osteoclastogenesis from pre-osteoclasts in the presence of IL-1. However, LLZ suppressed RANKL expression and the enhancement of osteoclastogenesis by synovial fibroblasts. Moreover, LLZ inhibited RANKL induced osteoclast differentiation.

研究分野：骨代謝

キーワード：炎症性疾患 TAK1 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来の RA 治療薬に加え、近年、抗 TNF- 抗体や抗 RANKL 抗体などの RA の疾患特異的な生物学的製剤が開発され、治療成績は飛躍的に改善した。しかしながら、炎症と骨破壊という複雑な病態を示すことから、こうした治療法によっても完治はいまだに困難であり、病態機序の解明による更なる分子標的の探索と薬剤の開発は喫緊の課題である。さらに現在、RA 治療に用いられている薬剤効果は、そのほとんどが抗炎症もしくは骨破壊抑制のいずれかである。このような RA 薬とは対照的に、TAK1 阻害薬は抗炎症作用を有する上に骨破壊抑制作用を併せ持つという新規性と優位性がある。また、RA の病態における TAK1 の役割については報告がなく、本研究は、RA における TAK1 の役割を明らかにするという学術的な意義があることに加え、TAK1 阻害薬の開発につながることを予想される。しかしながら、既存の TAK1 阻害剤としては本研究で用いる (5Z)-7-oxozeaenol 以外の報告がほとんどなく、RA に対する分子標的薬としての TAK1 阻害薬の開発はこれから発展する領域と思われる。

2. 研究の目的

本研究では TAK1 の破骨細胞分化・活性化のみならず炎症の発症と進行におけるその役割を明らかにし、TAK1 経路を標的とした新規の機序による抗炎症および骨破壊制御法を動物モデルで実証し開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では RA における破骨細胞分化・活性化のみならず炎症の発症・進行における TAK1 の重要性を明らかにし、TAK1 経路を標的とした新規の機序による抗炎症・骨破壊制御法を動物モデルで実証し新規治療法の開発を目的とする。具体的には次の事柄を行う。

(1) RA 病変局所における TAK1 の発現と局在

予備実験にて RA 滑膜や破骨細胞に TAK1 の活性化 (リン酸化) が認められたが、具体的に滑膜組織のどのような細胞に TAK1 が活性化しているか、免疫組織学的解析により明らかにする。さらに、炎症や骨破壊に重要な分子 (NLRP3、ASC、caspase-1 などインフラマソーム形成に関連する分子、TRAIL、IL-1、IL-6、TNF- や RANKL) の発現と TAK1 の活性化との関連も解析する。

(2) TAK1 の破骨細胞分化における分子生物学的役割の解明

単離マウス骨髄細胞を用い、可溶性 RANKL や TNF- の添加による破骨細胞分化における TAK1 の発現と、TAK1 阻害薬の破骨細胞分化の主要なシグナル経路に及ぼす影響をウエスタンブロットング法にて明らかにする。破骨細胞への分化は、c-fos、カテプシン K などの遺伝子発現、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色を指標に評価する。

(3) TAK1 の滑膜細胞の機能における分子生物学的役割の解明

RA モデルマウスより採取した滑膜細胞に TAK1 阻害剤処理および TAK1 特異的 siRNA を導入し、これらの因子の発現を RT-PCR やウエスタンブロットング法にて解析し、TAK1 のこれら因子への発現の役割を明らかにする。さらに、上記滑膜細胞とマウス破骨細胞前駆細胞とを共存培養を行い、破骨細胞の形成を TRAP 染色にて確認する。また、近年、過剰なインフラマソーム形成が RA などの難治性自己炎症性疾患の発症と進行に重要な役割を果たし

ていることがわかってきたが、TAK1 との関連は不明である。そこで、RA モデルマウスより採取した滑膜細胞に TAK1 阻害剤処理および TAK1 特異的 siRNA を導入し、インフラマソーム形成を NLRP3、ASC、Caspase-1 や IL-1 の発現を指標に検討する。

(4) TAK1 阻害薬による RA 治療効果の詳細な検討

RA マウスモデルを用いた予備実験にて TAK1 阻害薬が炎症や骨破壊も抑制していることが明らかになった。さらに詳細な解析を行うため、血中 TNF- などの炎症マーカーや骨代謝マーカー（TRAP5b およびオステオカルシン）を測定し、さらに病理組織、骨形態計測を行い、TAK1 阻害剤の抗炎症および骨破壊抑制活性を実証する。

4 . 研究成果

本研究においては、RA の動物モデルとして CIA マウスを用いた。CIA マウスでは炎症を惹起する刺激を与えた後、約 1 週間で関節の炎症が生じ始める。予備実験により滑膜組織および骨破壊部位にて TAK1 の活性化が認められていたことから、TAK1 阻害剤である LLZ1640-2 を炎症惹起と同時に投与すると、図 1 に示す様に炎症の程度（Arthritis score）が顕著に抑制された。組織学的に見ても、滑膜組織の肥厚や軟骨層の破壊、骨破壊が LLZ 投与により抑制されており、TAK1 阻害が炎症および骨破壊を抑制できることが示された。

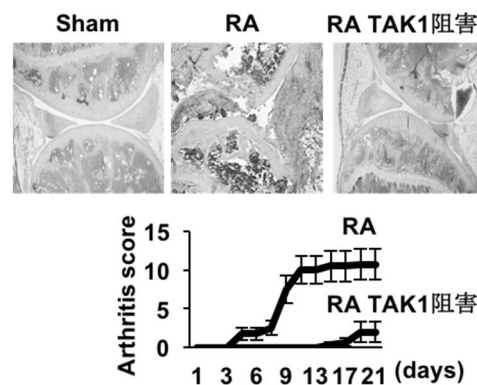


図 1 CIA マウスにおける TAK1 阻害の効果

IL-1 は RA を含む炎症性疾患の主要なメディエーターであるが、IL-1 の産生や IL-1 誘導性のシグナル伝達を抑制することは困難である。CIA マウスの血清中では IL-1 の発現が上昇していたが、LLZ は IL-1 の発現を抑制した。IL-1 が分泌される際には NLRP3 インフラマソームという免疫機構が関与していることが知られているが、連続組織切片の免疫染色にて CIA マウスの滑膜組織において TAK1 の活性化と一致して NLRP3 の発現が上昇していること、LLZ の投与により NLRP3 の発現が抑制されることが明らかとなった。また、免疫染色にて CIA マウスの滑膜組織において破骨細胞分化に必須の因子である RANKL および軟骨破壊因子である MMP3 の発現が上昇していたが、LLZ はそれら因子の発現も抑制していた。

炎症と骨破壊の関連を調べるため、CIA マウスより滑膜線維芽細胞を単離し実験を行った。IL-1 刺激により、滑膜線維芽細胞において RANKL の発現が上昇したが、LLZ 添加により RANKL の発現誘導が抑制された。さらに、滑膜線維芽細胞と破骨前駆細胞との共培養系に IL-1 を添加すると破骨細胞分化が誘導されたが、LLZ によりその破骨細胞分化が抑制された。さらに、LLZ を添加すると RANKL 刺激による破骨細胞分化も抑制されることが判り、LLZ は滑膜線維芽細胞における RANKL 発現の抑制および RANKL のシグナル伝達阻害両方の機序で破骨細胞分化を抑制することが明らかとなった。

これらの結果より、TAK1 阻害は炎症と骨破壊の双方を効果的に抑制できることが示され、RA に対する新規治療法となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Iwasa Masami, Harada Takeshi, Oda Asuka, Bat-Erdene Ariunzaya, Teramachi Jumpei, Tenshin Hirofumi, Ashtar Mohannad, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Udaka Kengo, Fujii Shiro, Nakamura Shingen, Miki Hirokazu, Kagawa Kumiko, Ozaki Shuji, Abe Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 PD-L1 upregulation in myeloma cells by panobinostat in combination with interferon-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1903 ~ 1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26726	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 Dong Bingzi, Endo Itsuro, Ohnishi Yukiyo, Mitsui Yukari, Kurahashi Kiyoe, Kanai Mai, Hiasa Masahiro, Teramachi Jumpei, Tenshin Hirofumi, Fukumoto Seiji, Abe Masahiro, Matsumoto Toshio	4. 巻 3
2. 論文標題 Persistent Activation of Calcium-Sensing Receptor Suppresses Bone Turnover, Increases Microcracks, and Decreases Bone Strength	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 e10182 ~ e10182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10182	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 Bat Erdene Ariunzaya, Nakamura Shingen, Oda Asuka, Iwasa Masami, Teramachi Jumpei, Ashtar Mohannad, Harada Takeshi, Miki Hirokazu, Tenshin Hirofumi, Hiasa Masahiro, Fujii Shiro, Sogabe Kimiko, Oura Masahiro, Udaka Kengo, Kagawa Kumiko, Yoshida Sumiko, Aihara Ken ichi, Kurahashi Kiyoe, Endo Itsuro, Abe Masahiro	4. 巻 185
2. 論文標題 Class 1HDACandHDAC6 inhibition inversely regulatesCD38 induction in myeloma cells via interferon andATRA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 969 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15673	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tenshin H, Hiasa M
2. 発表標題 Effective suppression of inflammasome-mediated joints destruction by TAK1 inhibition.
3. 学会等名 国際歯科研究学会日本支部 平成30年度学術大会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Abe M, Tanaka
2 . 発表標題 Effective suppression of inflammasome-mediated joints destruction by TAK1 inhibition.
3 . 学会等名 97th IADR general session(国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Oda A, Tanimoto K, Shimizu S, Mohannad A, Harada T, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M
2 . 発表標題 NLRP3 inflammasome-mediated inflammation and osteoclastic bone resorption in rheumatoid arthritis: the therapeutic roles of TAK1 inhibition.
3 . 学会等名 16th Meeting of Bone Biology Forum
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Oda A, Mohannad A, Tanimoto K, Iwasa M, Ariunzaya E, Harada T, Endo I, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M.
2 . 発表標題 TAK1 inhibition effectively alleviates joint inflammation as well as bone destruction in rheumatoid arthritis: Suppression of NLRP3 inflammasome-mediated inflammation and osteoclastic bone resorption.
3 . 学会等名 ASBMR 2019 Annual Scientific Meeting(国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Oda A, Mohannad A, Tanimoto K, Shimizu S, Harada T, Oura M, Sogabe K, Endo I, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M
2 . 発表標題 The role of NLRP3 inflammasome activation in joint inflammation and destruction in rheumatoid arthritis: novel therapeutic approaches with TAK1 inhibition.
3 . 学会等名 29th ANZBMS Annual Scientific Meeting(国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 天真寛文、寺町順平、日浅雅博、谷本幸多朗、アシテルモハナッド、アリウンザヤパットエルデネ、岩佐昌美、原田武志、中村信元、三木浩和、遠藤逸朗、田中栄二、松本俊夫、安倍正博
2. 発表標題 TAK1阻害は関節リウマチにおけるNLRP3インフラマソーム誘導性の炎症および骨破壊を抑制する。
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
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