

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18784

研究課題名（和文）関節リウマチにおけるTAK1-NLRP3インフラマソーム活性系の役割の解明

研究課題名（英文）Investigation of the role of TAK1-NLRP3 inflammasome axis 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：NLRP3インフラマソームは、炎症性サイトカインであるIL-1の産生に関わり、その恒常的な活性化が炎症性疾患の進展に関与していることが近年明らかとなってきている。しかし、関節リウマチにおいてはその関与について不明な点が多い。今回の研究によって、関節リウマチモデルマウスにおいてインフラマソームが活性化していることが明らかとなった。さらに、セリンスレオニンキナーゼであるTAK1の活性を抑制する試薬を投与した結果、インフラマソームの活性化が阻害され関節破壊が顕著に抑制された。これらの結果より、TAK1阻害剤はインフラマソーム活性をターゲットとした新たな治療戦略となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、関節リウマチでは治療法の発展に伴い重度の関節破壊を抑制することが可能となってきているものの、既存薬が奏効しないケースもあり、未知の関節破壊誘導機序の存在が示唆されている。また、一度関節破壊が生じると運動障害によるQoLの低下を引き起こすため、病態の解明と新規治療戦略の開発は喫緊の課題と言える。今回の研究によって病態におけるインフラマソームの関与が明らかとなったことは、RAの発症・進展機序を明らかにしていく上で学術的意義が大きい。また、制御が困難であったインフラマソームをTAK1阻害剤が抑制することを見出したことは、今後の創薬にも繋がり得る研究成果であり社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Aberrant activation of NLRP3 inflammasome, the protein complex to produce IL-1, has been reported in various types of inflammatory diseases. But in rheumatoid arthritis, its contribution is still not clear. Thus, we explored the role of NLRP3 inflammasome in RA and treatment strategy against inflammasome activation.

Synovial macrophages in RA animal model expressed NLRP3 inflammasome and IL-1 expression in sera was upregulated. TAK1 inhibitor, LLZ1640-2 inhibited NLRP3 inflammasome in vitro and in vivo. LLZ1640-2 strongly suppressed joint inflammation and bone destruction by not only inhibited IL-1 expression, but also inhibited IL-1-mediated signaling in synovial fibroblast. In addition, LLZ1640-2 directly inhibited RANKL-mediated OC differentiation.

These result suggest that TAK1 inhibition with LLZ1640-2 may become a novel treatment strategy to effectively alleviate inflammasome-mediated inflammation and RANKL-induced osteoclastic bone destruction in rheumatoid arthritis.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：自己免疫性疾患 関節破壊 NLRP3インフラマソーム TAK1 破骨細胞 滑膜線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は全身性の炎症性疾患で、関節破壊とそれに伴う運動障害を主な症状とする。顎関節にも症状が及ぶ場合があり、開口障害や咬合の変化を来す。免疫系細胞、滑膜線維芽細胞、破骨細胞等から産生される多様な炎症性サイトカインが相互作用しながら病態を進行させていくことが知られている。ひとたび関節破壊が生じると破壊された関節を回復させることは困難であるため、いかに関節破壊が生じない内に炎症を抑制するかが重要となる。治療薬の進歩により病態のコントロールが可能となってきているものの、既存薬が奏効しない症例が認められることや免疫抑制による副作用が課題となっている。また、既存の抗体よりもより分子量の小さいキナーゼインヒビターの開発が期待されている。

NLRP3 インフラマソームは主にマクロファージに備わっている免疫機構で、感染や組織破壊に応答し活性化することで、炎症性サイトカインである IL-1 を分泌する。その活性化には複雑なシグナル経路が関わっている (図 1)。IL-1 は以前から RA での治療ターゲットと見なされていた。IL-1 受容体拮抗薬の研究および臨床応用が試みられていたものの、その効果は限定的であった。それらの結果より、IL-1 のシグナル伝達抑制のみでは不十分で、IL-1 の産生、すなわちインフラマソームの活性化を抑制することが重要である可能性が示唆され、インフラマソームをターゲットとした治療法の開発が必要だと考えられた。

セリンスレオニンキナーゼである TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) は様々なシグナル伝達を媒介することが知られている (図 2)。我々は、この TAK1 を阻害することが形質細胞の腫瘍である多発性骨髄腫の治療に有効であることを見出し報告した (Tenshin et al., blood advances, 2017)。TAK1 はインフラマソームが活性化される際のシグナル伝達にも関わっていると考察できたが報告はなかった。そこで、TAK1 の関与を明らかとし、TAK1 を標的とすることでインフラマソームの活性化を抑制できるのではないかと、という着想に至った。

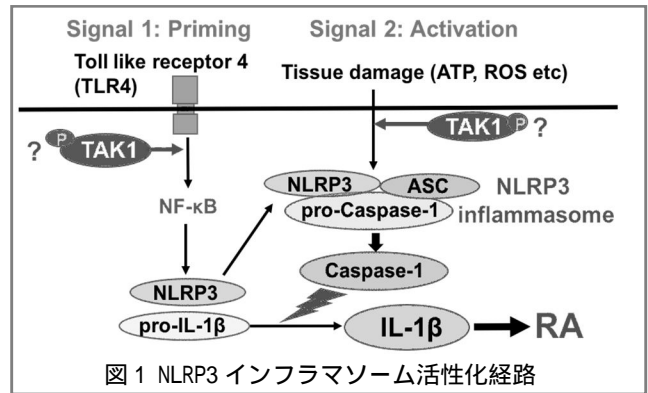


図 1 NLRP3 インフラマソーム活性化経路

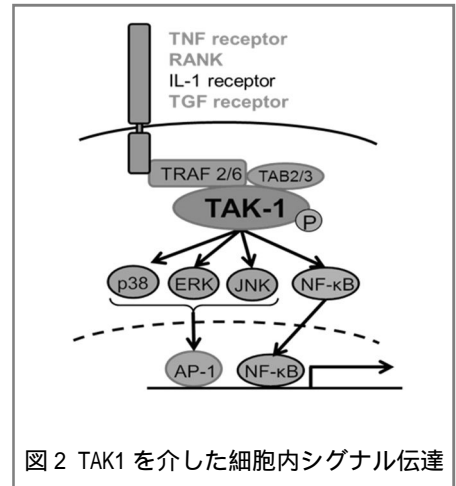


図 2 TAK1 を介した細胞内シグナル伝達

2. 研究の目的

前述の通り、RA における NLRP3 インフラマソームの役割や、インフラマソームの活性化における TAK1 の機能については不明な点が多いため、TAK1 の機能を明らかにすること、そして TAK1-NLRP3 インフラマソーム活性系が RA の炎症および骨破壊の進展にどのような役割を担っているのかを明らかにすることで、TAK1 の活性 (リン酸化) を標的とした新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) インフラマソームの活性化における TAK1 の機能解析

NLRP3 インフラマソームを介した炎症性サイトカインの産生には、炎症刺激による "priming" と呼ばれる転写レベルでの調節と、"activation" と呼ばれる翻訳後レベルでの 2 相が必須である (図 1)。そこで、各相における TAK1 の役割を、RAW264.7 細胞および単離マウス骨髄細胞より分化させたマクロファージに TAK1 阻害剤や TAK1 特異的 siRNA を導入し解析を行った。具体的には、Toll like receptor4 (TLR4) のアゴニストである LPS により発現が誘導される NLRP3 や pro-IL-1 を、ウエスタンブロッティング法や PCR 法を用いて解析した。さらに、activation phase にて ATP や活性酸素種 (H₂O₂ など) の刺激により誘導される NLRP3 インフラマソームの形成をウエスタンブロッティング法にて解析し、ELISA 法にて IL-1 の産生を評価した。

(2) 動物モデルにおける TAK1 阻害剤の有効性の精密解析

TAK1 阻害薬である LLZ1640-2 を RA モデルマウス (CIA マウス) に投与し、炎症、疼痛、関節および骨破壊に対する効果を解析した。小動物用 CT を用いた画像解析および組織学的解析、疼痛の評価等を行なった。

(3) RA 病変局所における TAK1 の発現と NLRP3 インフラマソーム活性の解析

RA 滑膜や破骨細胞における TAK1 の活性化 (リン酸化) や NLRP3 の発現を免疫組織学的手法により解析した。さらに、血中 IL-1 濃度を測定することでインフラマソームの活性化を評価した。

4. 研究成果

TAK1 阻害剤 LLZ1640-2 (LLZ)は、NLRP3 インフラマソーム構成タンパク質の発現誘導を抑制した。また、発現誘導後の "activation" のフェーズにおいて、ATP 刺激による NLRP3 インフラマソームの活性化を抑制した。これには、LLZ による ATP 受容体の発現抑制が関与していた。さらに、si TAK1 を用いた実験においても同様の結果が得られた。これらの結果より、LLZ は NLRP3 インフラマソームの "priming" および "activation" の双方を抑制し、IL-1 の産生を阻害することが明らかとなった。

次に、CIA マウスに LLZ を投与し、その効果を検証した。LLZ 投与によって、関節の炎症および疼痛は顕著に抑制された。組織学的な解析により、破骨細胞数の減少、関節および骨破壊の抑制が認められた(図3)。

CIA マウスにおける NLRP3 インフラマソームの活性化を評価したところ、滑膜マクロファージにおいて TAK1 の活性化 (リン酸化) と NLRP3 の強発現が認められ、血中 IL-1 濃度が上昇していた(図4)。これらの結果より、CIA マウスにおける NLRP3 インフラマソームの活性化が明らかとなった。LLZ 投与により NLRP3 を発現したマクロファージ数の減少と IL-1 濃度上昇の抑制が認められた。これらの結果より、LLZ はインフラマソームの活性化を抑制することで炎症を抑制していることが示唆された。

次に、骨破壊抑制の機序を解析するため、LLZ の破骨細胞に対する効果を検証した。RANKL は破骨細胞分化に必須の因子であり、RA では主に滑膜線維芽細胞や Th17 細胞で発現することが知られている。LLZ は滑膜線維芽細胞における TAK1 のリン酸化および RANKL 発現を抑制することが、滑膜組織の免疫染色によって明らかとなった。その機序を明らかにするため *in vitro* での検証も行ったところ、LLZ は滑膜線維芽細胞における IL-1 のシグナル伝達を阻害し、RANKL の mRNA 発現を抑制した。滑膜線維芽細胞と破骨前駆細胞との共培養系においても、LLZ は破骨細胞分化を抑制した。また、IL-1 が滑膜線維芽細胞に作用すると軟骨破壊因子である MMP-3 や炎症性サイトカインである IL-6 の発現が誘導されることが知られている。この様に種々のサイトカインを分泌するため滑膜線維芽細胞は RA 治療での主要目標となっている訳であるが、LLZ は IL-1 による MMP-3 および IL-6 の発現誘導も抑制した。Th17 細胞に関しては、滑膜組織の免疫染色にて LLZ 投与による IL-17 陽性細胞数の減少が認められた。

さらに、LLZ は RANKL のシグナル伝達自体も抑制し、破骨細胞分化の抑制、骨吸収の抑制を認めた。

本研究により、NLRP3 インフラマソームの病態への関与が明らかとなった。TAK1 阻害はインフラマソームの活性化を抑制することで IL-1 の発現を抑制することができた。さらに、TAK1 阻害は滑膜線維芽細胞における IL-1 のシグナル伝達を抑制することで、RANKL、MMP-3、IL-6 の発現上昇を阻害し、炎症および軟骨・骨破壊を抑制し得ることがわかった。これらの成果を、今後 TAK1 を標的としたキナーゼインヒビターの創薬につなげていきたいと考えている。

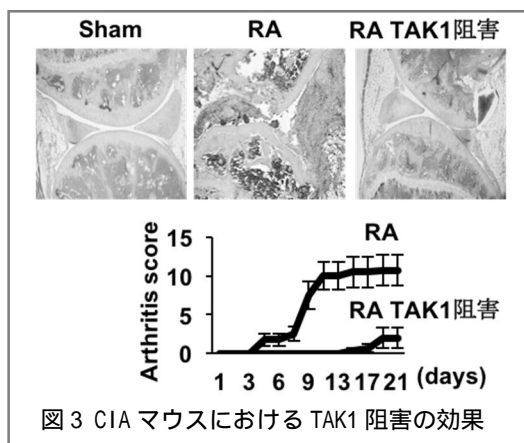


図3 CIA マウスにおける TAK1 阻害の効果

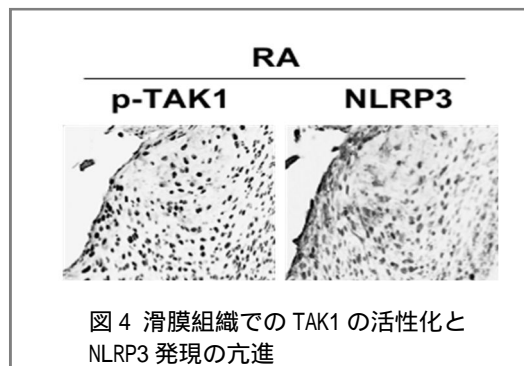


図4 滑膜組織での TAK1 の活性化と NLRP3 発現の亢進

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ashtar M, Tenshin H, Teramachi J, Bat-Erdene A, Hiasa M, Oda A, Tanimoto K, Shimizu S, Higa Y, Harada T, Oura M, Sogabe K, Nakamura S, Fujii S, Sumitani R, Miki H, Udaka K, Takahashi M, Kagawa K, Endo I, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M	4. 巻 12
2. 論文標題 The Roles of ROS Generation in RANKL-Induced Osteoclastogenesis: Suppressive Effects of Febuxostat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 929 ~ 929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12040929	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 Hirofumi Tenshin, Keiichiro Watanabe, Ariunzaya Bat-Erdene, Qu Cui, Jumpei Teramachi, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Takeshi Harada, Hirokazu Miki, Kimiko Sogabe, Masahiro Oura, Ryohei Sumitani, Yukari Mitsui, Itsuro Endo, Eiji Tanaka, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe	4. 巻 106
2. 論文標題 Reveromycin A, a novel acid-seeking agent, ameliorates bone destruction and tumor growth in multiple myeloma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1172 ~ 1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.244418	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 Tenshin H, Teramachi J, Ashtar M, Hiasa M, Inoue Y, Oda A, Tanimoto K, Shimizu S, Higa Y, Harada T, Oura M, Sogabe K, Hara T, Sumitani R, Maruhashi T, Sebe M, Tsutsumi R, Sakaue H, Endo I, Matsumoto T, Tanaka E, Abe M	4. 巻 11
2. 論文標題 TGF activated kinase 1 inhibitor LL Z1640 2 reduces joint inflammation and bone destruction in mouse models of rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome, TACE, TNF and RANKL expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Immunology	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) 10.1002/cti2.1371	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hirofumi Tenshin, Mohannad Ashtar, Jumpei Teramachi, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Takeshi Harada, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Kotaro Tanimoto, So Shimizu, Yoshiki Higa, Eiji Tanaka, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe
2. 発表標題 The novel therapeutic approaches with TAK1 inhibition against the aberrant NLRP3 inflammasome activation in rheumatoid arthritis
3. 学会等名 ヨーロッパ骨代謝学会 (ECTS) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirofumi Tenshin, Takeshi Harada, Yusuke Inoue, Jumpei Teramachi, Masahiro Hiasa, Kotaro Tanimoto, So Shimizu, Yoshiki Higa, Emiko Nakaue Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Tomoyo Hara, Ryohei Sumitani, Tomoko Maruhashi, Itsuro Endo, Toshio Matsumoto, Eiji Tanaka and Masahiro Abe
2. 発表標題 Targeting SLAMF7 to disrupt myeloma-osteoclast interaction: elotuzumab 's ADCC activity with Th1-like T cells towards osteoclasts and myeloma cells.
3. 学会等名 Cancer and bone society, young investigator symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 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
---------	---------