

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249060

研究課題名（和文） 新しいメカニズムによる次世代抗リウマチ療法の開発

研究課題名（英文） Development of new anti-rheumatic drugs

研究代表者

上阪 等 (KOHSAKA HITOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00251554

研究成果の概要（和文）：

我々はサイクリン依存性キナーゼ Cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 の阻害因子である p16^{INK4a} 遺伝子を関節炎モデルの関節滑膜に強制発現させると、滑膜細胞の増殖抑制する細胞周期制御療法により、関節炎を改善することを示した。しかし、p16^{INK4a} は滑膜細胞からの炎症性メディエーターの産生も抑制するが、主要な炎症性サイトカイン産生細胞であるマクロファージにおける作用は不明であった。本研究で、マクロファージにおいて、p16^{INK4a} は CDK4/6 非依存的に IRAK1 のプロテアソーム依存的な分解作用を促進することで AP-1 カスケードを阻害し、IL-6 産生を抑制していることが判明し、p16^{INK4a} 誘導療法の特性の一端を明らかにすることができた。

一方、CDK4/6 阻害による関節リウマチの細胞周期制御療法を臨床応用するために、細胞増殖抑制及び組織破壊酵素産生を効率的に抑制する独自の低分子 CDK4/6 阻害剤をライブラリースクリーニングにより選別した。このクラスの薬剤は免疫抑制が弱いことが期待でき、しかも医療経済的に優れた治療に繋がると考えられる。

別のアプローチとしては、Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM)-1 阻害療法を研究した。TREM-1 阻害薬は既存の抗リウマチ性生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用を増加させない治療法となることが期待される。我々は、マウス関節炎モデルに TREM-1/免疫グロブリン Fc 部分融合タンパク (TREM-1-Ig) を投与し関節炎の改善を認めた。また、マウス TREM-1 リガンドの同定に成功し、同リガンドに対する抗体投与でも関節炎が改善することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Up-regulated expression of cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) p16^{INK4a}, which inhibits CDK4/6, in the synovial tissues as well as systemic administration of small molecule (sm) CDK4/6 inhibitors suppress animal models of rheumatoid arthritis. Although both inhibit cell cycle progression, they exert differential effects especially in modulating inflammatory mediator production. This part of the present studies was conducted to investigate how p16^{INK4a} expression modulates inflammatory cytokine production from macrophages in relation to simple CDK4/6 kinase inhibition. Forced expression of p16^{INK4a} in bone marrow-derived macrophages (BMM) suppressed LPS-induced expression of IL-6 but not TNF α . This was not observed in RSF. A sm CDK4/6 inhibitor and shRNA to knock down CDK4 failed to suppress IL-6 production, demonstrating that the inhibition did not depend on decrease in CDK4/6 kinase activity. The p16^{INK4a} expression accelerated LPS-induced IRAK1 degradation, and suppressed the p38 MAPK/AP-1 pathway but not the NF κ B pathway. Direct down-regulation of IRAK1 with small hairpin RNA also induced specific inhibition of the AP-1 pathway. The accelerated IRAK-1 degradation should be mediated by proteasomal degradation because a proteasome inhibitor restored p38 MAPK activation in p16^{INK4a}-expressing BMM. Also, IRAK1 gene overexpression restored IL-6 production in p16^{INK4a}-expressing THP-1 macrophage cell line. Finally,

p16INK4a knock down with si RNA enhanced IL-6 production from senescent BMM that expressed endogenous p16INK4a. These results showed that p16INK4a suppressed IL-6 production from macrophages in a CDK4/6-independent manner. This was due to proteasome-mediated IRAK1 degradation and following suppression of the AP-1 pathway. Thus, unlike sm CDK inhibitors, p16INK4a could exert anti-inflammatory effects on synovial macrophages.

Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 is the other therapeutic target we are pursuing. It is expressed by macrophages and neutrophils. Its activation augments inflammatory cytokine production triggered by Toll-like receptor engagement. In a mouse sepsis model, blockade of TREM-1 by administration of a TREM-1 extracellular domain/Ig Fc domain fusion protein (TREM-1-Ig) prolonged survival of affected mice. This indicated TREM-1 blockade suppressed pathological inflammation with maintaining minimal inflammatory cytokine production for anti-microbial defense. We reported previously that TREM-1 is expressed on synovial macrophages in the rheumatoid joints and that TREM-1 blockade ameliorated mouse collagen (CII)-induced arthritis (CIA), which is an animal model of rheumatoid arthritis. However, since a ligand for TREM-1 was unknown, physiological roles of TREM-1-ligand and interactions between TREM-1 and TREM-1-ligand remained to be clarified. This part of the studies was conducted to identify the TREM-1-ligand molecule for discerning its involvement in arthritis. To search for cells expressing the TREM-1-ligand, various types of cells were incubated with TREM-1-Ig. It bound to mouse B cells and A20 B-cell lymphoma cells. Expression cloning using A20 cell cDNA library led us to identify a gene encoding the TREM-1-ligand. Furthermore, we raised anti-TREM-1-ligand blocking monoclonal antibody (mAb). Administration of this antibody to CIA mice ameliorated the disease. Anti-TREM-1-ligand mAb treatment exerted no apparent effects on T and B cell responses to CII. Thus, in analogous to the effect of TREM-1-Ig, this effect appeared attributable to attenuation of the inflammatory responses rather than prevention of the adaptive immune responses. Identification of the human TREM-1-ligand in the future study will warrant establishment of a new anti-rheumatic therapy that is not associated with a risk of serious infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2011年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
年度			
総計	35,400,000	10,620,000	46,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学、内科、臨床、薬学、免疫学、病理学

1. 研究開始当初の背景

2. 研究の目的

生物学的製剤に代表される免疫抑制的な抗リウマチ薬に加え、作用機序の異なる治療薬を開発し、併用することが、安全かつ究極的な骨破壊抑制に寄与すると考えられる。我々はアデノウイルスによる炎症関節へのサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) p16INK4a 遺伝子導入が、滑膜細胞の増殖を抑制し、関節リウマチ(RA)動物モデルに著効することを見いだした。これまで、p16INK4a は RA 滑膜細胞 (RSF) からの MCP-1 や MMP-3 の産生は抑制することを確認したが、本研究では、マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する p16INK4a 強制発現の効果を検討する。

さらに、臨床応用可能な、抗関節炎効果が強く、優れた薬物動態をもつサイクリン依存性キナーゼ阻害薬 (CDK4/6 阻害薬) を化合物ライブラリーからスクリーニングする。

Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 は、マクロファージや好中球に発現し、その刺激は Toll 様受容体刺激による炎症性サイトカインの分泌を増幅させる。一方、マウス敗血症モデルの TREM-1 細胞外ドメイン Ig 融合蛋白 (TREM-1-Ig) による TREM-1 阻害療法は生存率を改善させた。これは TREM-1 阻害では感染防御に必要な炎症性サイトカインを温存しつつ炎症を抑制することを示唆する。我々はこれまでに、TREM-1 の関節リウマチ患者滑膜細胞での発現、及び TREM-1 阻害のコラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスでの治療効果を報告した。さらに、B 細胞に発現するマウス TREM-1 リガンド (TREM-1-L-B) を同定し、抗 TREM-1-L-B 抗体投与による、CIA での治療効果を検討してきた。本研究では、TREM-1 及び TREM-1-L-B 発現細胞の相互作用を解析する。また、ヒト TREM-1-L 同定も行う。

3. 研究の方法

[2] DBA/1J マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養して、骨髄由来マクロファージ (BMM) を得た。RSF は RA 患者滑膜組織から分離した。p16INK4a ないし IRAK1 遺伝子のレトロウイルス発現ベクター、CDK4 および IRAK1 に対する short hairpin RNA (shCDK4, shIRAK1) のレトロウイルス発現ベクターを構築し、マクロファージに導入した。RSF への p16INK4a の遺伝子導入にはアデノウイル

スベクターを用いた。IL-6 発現は ELISA 法、定量的 PCR 法、シグナル伝達分子発現とリン酸化は Western blot 法で検討した。AP-1、NF- κ B の結合活性は、ゲルシフトアッセイで測定した。

CDK4/6 阻害薬の非細胞系一次スクリーニング法としてリン酸化による基質の電荷の変化を用いた電気泳動法である Mobility Shift Assay (MSA) 法を用いてスクリーニングを行った。化合物ライブラリーは東京医科歯科大学ケミカルスクリーニングセンターのものを使用した。その後、二次スクリーニングとして化合物の作用が細胞毒性に基づくものではなく、Rb 依存性阻害によることを、Rb (+) 細胞 (MCF-7) 及び Rb (-) 細胞 (MDA-MD-468) での増殖抑制で確認した。さらに、ヒト関節リウマチ患者滑膜線維芽細胞における MMP-3 産生抑制を確認し炎症抑制能を評価した。TREM-1 発現細胞であるマクロファージに対する、TREM-1-L-B-Ig 刺激、あるいは TREM-1-L-B 発現細胞である B 細胞との共培養による、TNF- α 産生や増殖能に与える影響を検討する。

ヒト TREM-1 細胞外ドメイン 6 x Histidine 融合蛋白 (TREM-1-His) を用いて、ヒト TREM-1-リガンドが発現する細胞を確認する。同細胞の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングによりヒト TREM-1-リガンドを同定する。同分子の発現様式を明らかにする。

4. 研究成果

[2] p16INK4a 発現により、LPS 刺激下の Bone Marrow Macrophage (BMM) からの TNF α mRNA 発現は変動せず、IL-6 mRNA およびタンパクの発現が著減した。この抑制は、選択的 CDK4/6 阻害薬や、shCDK4 による CDK4 をノックダウンによって細胞増殖を抑制しても影響を受けず、CDK4/6 活性低下に依存しなかった。また、RSF では p16INK4a を強制発現させても IL-6 産生に影響がなかった。LPS 受容体である TLR4 下流分子では、p16INK4a 発現 BMM で IRAK1 分解亢進が認められ、p16INK4a 発現 RSF では認められなかった。刺激した BMM における IRAK1 下流シグナルを検討したところ、p38MAPK および JNK のリン酸化、AP-1 結合活性の低下があり、AP-1 経路が抑制されていた。さらに、プロテアソーム阻害薬を投与したところ、p16INK4a による IRAK1 の分解亢進は解除され、それに伴い AP-1 経路抑制が回復した。一方で、p16INK4a 発現は IKK リン酸化、I κ B 分解、NF- κ B の結合活性のいずれにも影響を与えず、NF- κ B 経路は保持さ

れていた。次に、IRAK1 分解亢進を模倣するために、shIRAK1 で IRAK1 をノックダウンしたところ、やはり AP-1 結合活性低下が認められ、一方、 $I\kappa B$ 分解は保持されていた。また、p16INK4a 発現した THP-1 (ヒトマクロファージ) 細胞では、BMM と同様に LPS 誘導 IL-6 産生が抑制され、この IL-6 産生低下は、IRAK1 追加強制発現によって解除された。以上の結果は、p16INK4a 発現はマクロファージにおいて、IRAK1 分解を亢進させ、AP-1 経路を抑制して IL-6 産生を低下させることを示す。なお、細胞老化を誘導するため、増殖停止まで培養して内因性 p16INK4a 誘導負荷をかけた BMM を LPS 刺激して IL-6 を産生させる際に、p16INK4a に対する siRNA で p16INK4a をノックダウンしたところ、IL-6 産生が増強した。従って、p16INK4a 発現による IL-6 阻害は、生理的意義をもつものと考えられる。MSA 法を用いた 1 次スクリーニングにて約 2 万個の化合物ライブラリーから 70%以上の CDK4/6 阻害効果を持つ化合物を 40 個抽出した。さらに Rb(+)及び Rb(-)細胞を用いた系で Rb 依存性増殖抑制能を持つ候補化合物を 2 個に絞り込むことができた。これらの化合物の中から、ヒト関節リウマチ患者滑膜線維芽細胞における MMP-3 産生抑制をきたす化合物を 1 個選別することができた。

p16INK4a 遺伝子は、CDK4/6 非依存的に IL-6 産生を抑制する。CDK4/6 を除いた p16INK4a の標的分子としては、HeLa 細胞において NF- κB の構成分子である p65 に結合することが示されており、NF- κB の活性化を阻害することが報告されている。また MEF に UV 照射し p16INK4a を発現させた研究では、p16INK4a は JNK に結合し、JNK のリン酸化を阻害することなく、JNK が c-Jun との結合を阻害して AP-1 活性化を抑制することが報告されている。これら線維芽細胞系を用いて示された p16INK4a の作用機序とは異なり、p16INK4a 発現マクロファージでは IRAK1 分解亢進により、p38MAPK および JNK のリン酸化を抑制し、AP-1 活性を阻害した結果 IL-6 産生が抑制されたと考えられる。一方、NF- κB 経路が阻害されなかったのは分解亢進により IRAK1 が減少しても NF- κB 経路を活性化できることが考えられる。IRAK1 の分解機序は、MEF を用いた研究でユビキチン化依存でないことが報告されているが、我々の知見と同様に単球/マクロファージでは、プロテアソーム阻害剤により、IRAK1 の分解が抑制されることが示されている。このことから、p16INK4a は細胞特異的にプロテアソーム依存・非依存的に IRAK1 分解を制御していることが考えられる。

化合物ライブラリーの中から MSA 法による酵素系、Rb 依存性阻害をみる細胞系で関節リウマチの滑膜増殖相に作用する化合物を抽出した。さらに炎症相に作用する化合物を

MMP-3 産生を指標に選別した。今後、*in vivo* での効果をマウスコラーゲン誘導関節で解析を進めていく必要がある。また、投与方法、投与量の改善、化合物の分子構造、半減期変換による薬物動態改良を行うとともに、スクリーニングをさらに増量し、最適な化合物を開発していく。

TREM-1-L-B-Ig を用いた、TREM-1 を介したマクロファージ刺激では TNF- α の産生が確認された。この作用には LPS 刺激による TNF- α 産生の増幅効果も認めた。一方、TREM-1-His 同時投与によりこの TNF- α 産生は抑制され、TREM-1-L-B-Ig による刺激は TREM-1 特異的であることがわかった。

マクロファージと TREM-1-L-B を発現していると考えられる B 細胞との共培養では抗 IgM 抗体存在下で、TNF- α 産生は増加した。この増加は抗 TREM-1-L-B 抗体投与で抑制された。ヒト TREM-1-His による各種ヒト細胞の染色により、既報告とは異なり、マクロファージ上にヒト TREM-1-リガンド発現を発見した。この細胞の cDNA を用いた発現クローニングによりマクロファージ上にヒト TREM-1 リガンド(TREM-1-L-M)を同定した。

マクロファージ及び B 細胞の相互作用に関する分子として、BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) 及び BAFF レセプターが知られている。今回、他に TREM-1 及び TREM-1-L を介する経路が存在することが示唆された。また、新規に同定されたヒト TREM-1-L-M はマウス TREM-1-L-B とは発現様式も全く異なるものであり、この機能解析も行い、関節炎における役割の解明を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：