

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 4月13日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21591265

研究課題名（和文） ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の免疫制御機構の解明と新規細胞治療法の開発

研究課題名（英文） Therapeutic effects and its mechanism of HDACi on Arthritis

研究代表者

森信暁雄 (Akio MORINOBU)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10294216

研究成果の概要（和文）：

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は現在抗癌剤として一部が臨床に使用されているが、我々を含めた最近の研究で、免疫や炎症を抑制する作用があることが明らかになった。この薬剤が関節リウマチの治療に使えるのではないかと発想し、研究を継続している。今回の検討では、関節炎モデルマウスの関節炎を軽減させ、樹状細胞を制御性のものに機能変化させることがあきらかとなり、臨床応用が期待されます。

研究成果の概要（英文）：

Histone deacetylases (HDACs) remove an acetyl group from lysine residue of histones and non-histone proteins, and regulate cellular responses. Histone deacetylase inhibitors (HDAi) induce apoptosis and growth arrest of tumor cells, and are clinically used as anti-tumor drugs. Moreover, HDAi recently have been shown to have immune-regulatory and anti-inflammatory functions in vitro and in animal models.

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammation of joints, leading to the joint destruction. We have examined anti-rheumatic effects of HDAi on various types of cells and in an animal model. The in vitro effects of HDAi were as follows: 1) HDAi induced apoptosis in RA-SF, and synergized with anti-Fas Ab to induce cell death probably by down regulating FLIP expression. 2) Among 11 HDACs, HDAC1 expression was higher in RASF than in OASF by qPCR. 3) HDAi altered the phenotype of human peripheral blood monocyte-driven DC to express lower CD1 and produce reduced IL-12, resulting in less Th1 cells induction. 5) HDAi dramatically suppressed OC differentiation by suppressing NF-AT expression. The in vivo experiments proved that HDAi ameliorates arthritis in SKG mice by altering DC phenotype into regulatory one.

Our data indicate that HDAi have multiple anti-inflammatory effects, suggesting that they can be used as a potential anti-inflammatory and immunosuppressive drug.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

科研費の分科・細目：臨床免疫学

キーワード：ヒストンアセチル化酵素阻害剤、樹状細胞、細胞治療、関節炎

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤) が治療応用され、皮膚T細胞リンパ腫の治療薬として米国で認可された。腫瘍細胞における作用機序としては、増殖抑制やアポトーシス誘導が中心である。関節炎モデルやループモデルで HDAC 阻害剤投与により改善する報告があるが、その背後にある免疫抑制機序に関しては検討されていない。

今回の研究は、特にヒストンアセチル化の制御が免疫系に与える作用を、分子、細胞、動物レベルで検討するものであり、様々な視点から将来の新治療の開発につなげようとする学術的特色を持っている。

2. 研究の目的

(1)HDAC 阻害剤の免疫細胞に対する作用の分子機序を明らかにする。

- ① siRNA を用いて個々の HDAC を knockdown し、破骨細胞、樹状細胞分化とマクロファージ活性化における HDAC の役割を分子レベルで明らかにする。
- ② HDAC 阻害剤添加による樹状細胞の遺伝子発現変化を DNACHIP を用いて検討し、分子機序を明らかにする。

(2)HDAC 阻害剤やHDAC 誘導樹状細胞による自己免疫疾患の治療の可能性を明らかにする。

- ① HDAC 阻害剤を関節炎モデルに投与し、樹状細胞やT細胞の生体内での機能への影響を明らかにする。
- ② HDAC 阻害剤処理した免疫抑制性樹状細胞を関節炎モデルに投与し生体内での役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)HDAC 阻害剤の作用機序と個々の HDAC の役割に関する研究

HDAC 阻害剤の作用機序の解明はより効果的な治療法の開発に結びつくことが期待される。現在まで腫瘍細胞におけるアポトーシスや細胞増殖制御に関わる分子についてよく研究されているが、免疫細胞ではほとんど研究されていない。本研究では、①DNA microarray による遺伝子発現解析、及び②11種類ある個々の HDAC を siRNA により knockdown することで、HDAC 阻害剤の単球系細胞における作用機序を分子レベルで明らかにする。

(2)HDAC 阻害剤の in vivo 免疫調節作用の研究

SKG マウスは関節炎モデルマウスであり、真菌壁成分などで発症が誘導される。本マウスでは Th 細胞の関与が明らかである。このマウスに HDAC 阻害剤を投与すること

により in vivo での樹状細胞機能や Th 細胞機能への作用を明らかにする。

(3)HDAC 修飾樹状細胞を用いた関節炎モデルマウスの治療

最近、免疫系を調節し抑制する樹状細胞群である tolerogenic DC が注目され、特に移植における免疫抑制に関連してその治療応用が模索されている (Nature Rev 2007 vol17 p620)。生体内に存在する tolerogenic DC や試験管内で誘導した tolerogenic DC を投与することにより免疫寛容を誘導しようというものであり、この考えは自己免疫の制御に通じるものである。試験管内で樹状細胞を誘導する際に、さまざまな試薬を加えることにより tolerogenic DC が誘導できるが、私たちも HDAC 阻害剤である酪酸を使用することにより tolerogenic DC 様の樹状細胞が誘導されることを見つけた。この樹状細胞が関節炎モデルマウスの細胞治療に応用できるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1)関節炎モデルマウスをもちいた研究成果

- ① 関節炎モデルとして SKG マウスを準備した。このモデルに HDAC 阻害剤 (trichostatin A, TSA) を皮下投与した。発症前に投与し、関節点数や組織にて評価評価したところ、TS 投与は関節炎の発症をほぼ完全に抑制した。発症後に投与したところ、関節炎の進展を完全に抑えた。
- ② 脾の樹状細胞の機能を検討したところ、TSA 投与群では、脾臓の CD8 陽性樹状細胞において CD40, CD86 の発現が優位に低下していた。さらにリンパ節の T 細胞分画 (Th17, Treg) を検討したところ、Th17 細胞が低下し、Treg 細胞がふえるということが明らかとなった
- ③ ザイモサン刺激は樹状細胞からのサイトカイン分泌を刺激するが、TSA を共存させると、IL-6 や IL-12 の産生が低下することが明らかとなった。さらに、IDO の発現を増やし、T細胞の刺激脳を低下させることが明らかとなった。

(2)培養滑膜細胞を用いた研究成果

- ①培養滑膜細胞の増殖に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) の影響を検討した。代表的 HDACi である trichostatin A (TSA) は細胞増殖抑制作用を有することがわかった。さらに、TSA はアポトーシスをも誘導することが判明した。これらの作用は容量依存性であった。
- ②細胞周期関連蛋白の発現に対する TSA

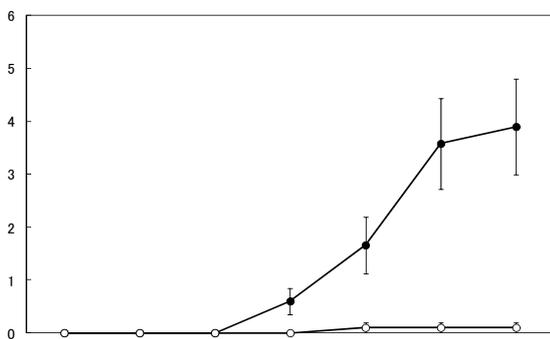
の影響を検討したところ、TSA は p21waf1 を誘導するが、p27kip1、p53、は誘導しないことが判明した。P53 のアセチル化にも影響しないことがわかった。TSA は p 2 1 発現抑制を通じて増殖抑制をしていると思われた。

③さらに、TSA は抗 FAS 抗体によるアポトーシスの誘導に対する感受性を増強することが判明した。アポトーシス増強作用は caspase 依存性であった。TSA は Fas や Bcl-2 の発現には影響しないが、FLIP の発現を低下させることが判明した。

④TSA は TNF- α 刺激による IL-6 および MMP-3 誘導を低下させることが判明した。

(3) 新規作用機序の解明

TSA により誘導される遺伝子の同定。作用機序解明のため、TSA 刺激有り無しでの遺伝子発現の違いを見るため、cDNA サブトラクション法を用いて、発現誘導、発現抑制される遺伝子の同定を試みた。数種類の遺伝子が同定された。これらの遺伝子について realtimePCR 法を用いて実際に発現が変化するかを検討した。Iex-1 遺伝子を同定した。この遺伝子は培養滑膜細胞において、細胞死やサイトカイン産生を調節していることが明らかになった。



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 4 件)

- 1) Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Kasagi S, Fujita M, Miyamoto Y, Matsuki F, Kumagai S. Histone deacetylase inhibition alters dendritic cells to assume a tolerogenic phenotype and ameliorates arthritis in SKG mice. **Arthritis Res Ther.** 2011 May 18;13(3):R77.
- 2) 9. Yamamoto M, Iguchi G, Takeno R, Okimura Y, Sano T, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningshi AE, Fukuoka H, Tobita M, Saitoh T, Tojo K, Mokubo A, Morinobu A, Iida K, Kaji H, Seino S, Chihara K, Takahashi Y. Adult combined GH, prolactin, and TSH deficiency associated with circulating PIT-1 antibody in humans. **J Clin Invest.** 2011 Jan 4;121(1):113-9.
- 3) 1) Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. **J Immunol.** 2010 Mar 1;184(5):2337-47.
- 4) Marika Horiuchi, Akio Morinobu, Yoshitada Sakai, Masahiro Kurosaka, and Shunichi Kumagai, Expression and function of histone deacetylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **J Rheumatol** 2009

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Trichostatin A Induces CD8 α Positive Tolerogenic Dendritic Cells, Regulatory T Cells in SKG Mice, and Ameliorates the Severe Arthritis. Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Miyamoto Y Kasagi S, Fujita M, Matsuki F, Kumagai S. American College of Rheumatology 2011
- 2) Mechanisms of the effects of HDACi on Rheumatoid Arthritis. Morinobu A, Fujita M, Saegusa J, Misaki K, Horiuchi M, Wang B, Kumagai S. International Conference Immunology 2010
- 3) Histone deacetylase inhibitor (HDACi) ameliorates chronic arthritis in SKG mice by altering conventional dendritic cells (cDCs) phenotype into

- tolerogenic DCs. Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Miyamoto Y Kasagi S, Kumagai S International Conference Immunology
- 4) Histone deacetylase inhibitor (HDai) ameliorates chronic arthritis in SKG mice by altering conventional dendritic cells (cDCs) phenotype into tolerogenic DCs. Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Miyamoto Y Kasagi S, Kumagai S. The European League Against Rheumatism 2010

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森信暁雄 (Akio Morinobu)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10294216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし