

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 7 日現在

機関番号：87301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591452

研究課題名(和文) JAKs STATs を標的とした新たな RA 治療法の開発

研究課題名(英文) Inhibition of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signalling pathway in rheumatoid synovial fibroblasts using small molecule compounds.

研究代表者

右田 清志 (Migita, Kiyoshi)

独立行政法人国立病院機構(長崎医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：60264214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Janus kinase (JAK)の阻害剤の抗炎症作用を解析した。RA滑膜細胞をJAKs/STATs系を活性化させるオンコスタチンM(OSM)で刺激し、JAK3選択的阻害剤PF-956980、臨床応用されているJAK阻害剤CP690550、INCB028050の作用について検討した。RA滑膜細胞をOSMで刺激すると、JAK1、2、3/STAT1、3、5の活性化、およびMCP-1、SAA1/2の遺伝子発現が誘導されるがCP690550、INCB028050は、この経路を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated if JAK-3-selective inhibition alone could disrupt cytokine signalling in rheumatoid synovial fibroblasts. In-vitro studies were performed using synovial fibroblasts isolated from patients with RA. The JAK inhibitors CP-690,550 and INCB028050 both suppressed activation of JAK-1/-2/-3 and downstream STAT-1/-3/-5, as well as the expression levels of target proinflammatory genes (MCP-1, SAA1/2) in oncostatin-M (OSM)-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. In contrast, the JAK-3-selective inhibitor, PF-956980, suppressed STAT-1/-5 activation but did not affect STAT-3 activation in OSM-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. These data suggest that JAK-3-selective inhibition alone is insufficient to control STAT-3-dependent signalling in rheumatoid synovial fibroblasts, and inhibition of JAKs, including JAK-1/-2, is needed to control the proinflammatory cascade in RA.

研究分野：臨床免疫、リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 滑膜細胞 シグナル伝達 ヤヌスキナーゼ

## 1. 研究開始の背景

関節リウマチはTリンパ球で代表される炎症細胞の関節滑膜への浸潤と、関節滑膜細胞の炎症性増殖およびそれに伴う関節破壊を特徴とする。これら炎症性細胞、滑膜細胞の活性化と増殖には、炎症性サイトカインが重要な役割を果たしており、サイトカインレセプターは共通する細胞内ドメインを有しており (common 鎖; c 鎖) c 鎖にはチロシンキナーゼである JAK3 が結果している。これら JAK ファミリーは、転写因子である STATs をリン酸化することで、リンパ球の分化、サイトカイン産生を調整している。

我々は、RA 滑膜細胞から IL-6, IL-23, CCL-20 など Th17 細胞誘導に必要なサイトカインのシグナル伝達機構を明らかにし、RA 滑膜細胞をこれらサイトカインで刺激すると、JAKs/STATs が活性化されることを見出している。これらの研究実績をふまえ、RA 病態形成に必要なサイトカインのシグナル伝達機構を同定し、その有効な阻害方法を明らかにすることで、新しい RA の治療法の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

滑膜細胞を活性化に重要なサイトカインレセプターのシグナル分子である Janus Kinases (JAKs)、Signal Transducers and Activator of Transcription (STATs) 分子を特異的に阻害し、機能解析を行なうことで、RA の病態に最も重要な標的分子を見だし、新規治療法の開発を行う。同時に RA の病態と、各種 T 細胞分画 (Th1、Th17、制御性 T 細胞) の機能異常との関連、JAKs/STATs 阻害による T 細胞機能異常の修復の可能性も検討する。

## 3. 研究の方法

JAKs、STATs 分子の選択的阻害、RA 滑膜細胞のサイトカイン産生プロファイルにどのように影響するか明らかにする。

(1) 細胞：滑膜細胞は、RA 患者滑膜由来の培養滑膜細胞 (3~5 継代) を用いた。

(2) 細胞内シグナル伝達：滑膜細胞を無血清下でオンコスタチン M (OSM) で刺激し (0~20min) 細胞を溶解し、その溶解物を抗リン酸化 JAK1、JAK2、JAK3、STAT1、STAT3、STAT5 抗体を用いたイムノプロットで、JAKs/STATs の活性化を検討した。

(3) mRNA の発現、血清アミロイド A (SAA) の遺伝子である SAA1、SAA2 mRNA の発現は、RT-PCR 法で行った。

## 4. 研究成果

### [結果]

(1) JAK 阻害剤である CP690、550 (トファシチニブ) INCB028050 (バリシチニブ) の OSM 刺激で誘導される RA 滑膜細胞の JAKs/STATs の活性化について検討した。RA 滑膜細胞を OSM で刺激すると全ての JAK ファミリー (JAK1、JAK2、JAK3) と STAT1、STAT3、STAT5 の活性化が誘導された。CP690、550 および INCB028050 は、これらすべての JAK ファミリー、(JAK1、JAK3、JAK5) の活性化を阻害した。つまり、CP690、550、INCB028050 は、pan-JAK 阻害剤であることがわかった。

(2) JAK3 選択的阻害剤の影響について

次に、JAK3 選択的阻害剤の影響について検討した。PF-956980 は、OSM で誘導される RA 滑膜細胞の JAK1、JAK2 のリン酸化には影響せず、JAK3 リン酸化のみ阻害することより、JAK3 選択的阻害剤であることを確認した。PF-956980 による JAK3 を選択的阻害にした状況では、OSM 刺激による STAT1、STAT5 の活性化は阻害されるが、STAT3 の活性化は阻害されないことが判った。

JAK3 の阻害のみでは、STAT3 の活性化は阻害できず、STAT3 の阻害には、JAK1、JAK2 の阻害が必要であることを明らかにした。

(3) JAK/STAT シグナルで誘導される炎症蛋白の遺伝子発現に対する JAK 阻害剤の影響。JAK/STAT シグナルで誘導される炎症蛋白である血清アミロイド A (SAA) の遺伝子発現に対する JAK 阻害剤の影響について検討した。OSM の刺激で RA 滑膜細胞に SAA1、SAA2 の mRNA の発現が誘導されるが、CP690、550、INCBO28050 前処理で、その発現はブロックされるが JAK3 選択的阻害剤 PF956980 は SAA1、SAA2 の遺伝子発現には影響しないことを明らかにした。つまり JAK3 の阻害のみでは STAT3 の活性化はブロックできず、STAT3 で誘導される炎症蛋白の発現には影響しないことを明らかにした。

#### [結論]

今回の検討結果より、RA 滑膜細胞は IL-6 系サイトカインである OSM の刺激で JAKs/STATs シグナルが活性化され、トファシチニブ、バリシチニブなど、RA 治療薬として開発された JAK 阻害剤は pan JAK 阻害剤であるため、これら JAKs/STATs のシグナルをブロックすることが判った。また JAK3 のみの阻害では、STAT3 の活性化は阻害されず、STAT3 を介して誘導される SAA などの炎症蛋白の遺伝子発現は阻害できないことが判った。抗炎症効果

には、JAK1、JAK2、STAT3 の炎症シグナルをブロックすることが必要であることが判った。

#### 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 3 件)

Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Izumi M, Sakai T, Nakamura M, Motokawa S, Nakamura T, Kawakami A. Effects of Janus kinase inhibitor tofacitinib on circulating serum amyloid A and interleukin-6 during treatment for rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2014;175:208-14.

Migita K, Izumi Y, Torigoshi T, Satomura K, Izumi M, Nishino Y, Jiuchi Y, Nakamura M, Kozuru H, Nonaka F, Eguchi K, Kawakami A, Motokawa S. Inhibitory effects of the JAK inhibitor CP690,550 on human CD4(+) T lymphocyte cytokine production. BMC Immunol. 2011;12:51.

Migita K, Miyashita T, Izumi Y, Koga T, Komori A, Maeda Y, Jiuchi Y, Aiba Y, Yamasaki S, Kawakami A, Nakamura M, Ishibashi H. Inhibitory effects of the JAK inhibitor CP690,550 on human CD4(+) T lymphocyte cytokine production. BMC Immunol. 2011;12:51.

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

右田 清志 (MIGITA KIYOSHI)

独立行政法人国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター・病因解析研究部長

研究者番号：60264214

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：