

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591442

研究課題名(和文)細胞遊走及びサイトカイン産生を標的とした関節リウマチの新規治療薬開発の基礎的検討

研究課題名(英文)Development of new therapeutic modalities for Rheumatoid Arthritis

研究代表者

岩田 哲史 (IWATA, SATOSHI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00396871

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)：我々は本研究において、接着分子からのシグナルを細胞内に伝達する作用を持つドッキング蛋白質Cas-Lのノックアウトマウスを使用してそのリウマチ発症における病態生理学的意義の解析を行った。Cas-Lノックアウトマウス(KO)にコラーゲンを投与して関節炎を誘導した場合、KOでは野生型マウスに比較して関節炎発症の遅延と重症度の低下が観察され、その原因として液性免疫及び細胞性免疫両方の低下が示唆された。我々はまた、抗菌作用のない新規マクロライド化合物を導出し、その炎症性サイトカイン抑制とコラーゲン誘導関節炎抑制効果を見出し、リウマチ発症に関与するTh17細胞への分化を抑制する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cas-L is a cytoplasmic docking protein essential for cellular migration and beta 1 integrin-mediated costimulation of T cells. Our current study expanded these findings on the role of Cas-L in the development of rheumatoid arthritis (RA) by analyzing the pathophysiological changes in a Cas-L -/- mouse collagen-induced arthritis (CIA) model, strongly suggesting that Cas-L plays a pivotal role in the pathophysiology of CIA, and that Cas-L may be a potential molecular target for the treatment of RA.

Macrolide antibiotics have immunomodulatory properties that are distinct from their anti-bacterial functions. We synthesized 5-I, which is a new derivative of roxithromycin with less antimicrobial activity, and evaluated its immunomodulatory effects. Administration of 5-I to mice with CIA reduced the severity of arthritis, and this effect was also observed when treatment was delayed till after the onset of disease, suggesting that 5-I may be useful as a potential therapeutic agent for RA.

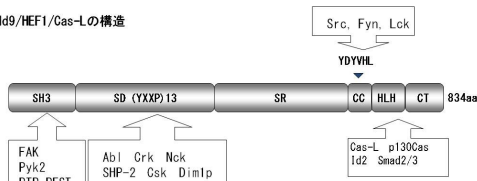
研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ コラーゲン誘導関節炎 接着分子 インテグリン ドッキング蛋白質 Cas-L Nedd9
マクロライド

1. 研究開始当初の背景

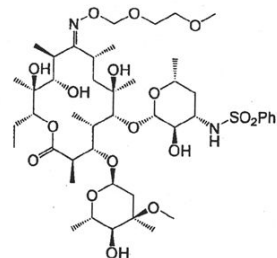
1 インテグリンは細胞の接着遊走、細胞増殖、サイトカイン産生、生存シグナル等の様々な生物学的機能を担う接着分子である。関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)において 1 インテグリンを介する T 細胞遊走能の亢進が重要であるという証拠が多数蓄積している。我々は、ヒト T 細胞においてインテグリン刺激によりチロシンリン酸化される主要な蛋白として Nedd9/HEF1/Cas-L を同定した(以下 Cas-L/Nedd9 と記す)(図 1)(Minegishi M, Iwata S, Morimoto C et al. J Exp Med 184:1365 1996)。

図 1 Nedd9/HEF1/Cas-L の構造



また、インテグリン及び TCR 刺激により、FAK と Src family チロシンキナーゼ (Src, Fyn, Lck) が活性化して Cas-L/Nedd9 がチロシンリン酸化されることを明らかにし、Cas-L/Nedd9 が TCR/ 1 インテグリン共刺激 T 細胞による IL-2 産生及び細胞遊走能の亢進に必須の分子であることを報告してきた (Tachibana K, Iwata S, Morimoto C et al J Biol Chem 272:29083 1997. Ohashi Y, Iwata S, Morimoto C et al. J Immunol 163:3727 1999)。この点に着目し、RA のマウスモデルである HTLV-1 tax トランスジェニックマウスの脾細胞・リンパ節リンパ球における Cas-L/Nedd9 の発現上昇とチロシンリン酸化の亢進を見出し (Miyake-Nishijima R, Iwata S, Morimoto C et al. Arthritis Rheum 48:1890 2003)、Cas-L/Nedd9 の RA における意義を探求してきた。さらにヒト RA 患者滑液中のリンパ球において Cas-L/Nedd9 の発現が上昇していることを報告した (Hisakawa N, Morimoto C et al. J Rheumatol 29:1124 2002)。

また、我々の研究室では、免疫薬理学的観点からマクロライド化合物ロキシシロマイシンの免疫調節作用・抗リウマチ作用を研究してきた (Urasaki Y, Iwata S, Morimoto C et al. J Rheumatol 32:1765 2005)。



2. 研究の目的

Cas-L/Nedd9 は、細胞内ドッキングタンパク質であり、インテグリン依存性の細胞遊走能に必須の分子である。本研究は、リンパ球の炎症部位への遊走及びサイトカインバランスと Cas-L/Nedd9 の関係に焦点を絞り、

Cas-L/Nedd9 ノックアウトマウスを用いて、自己免疫性炎症性疾患である関節リウマチの発生機序と病態の解析を行い、Cas-L/Nedd9 を標的分子とするインテグリン経路の制御による治療応用の基盤確立を目的とする。また、新たに導出したマクロライド化合物であるロキシシロマイシン誘導体 5-1 の抗リウマチ作用機序・炎症性サイトカイン産生抑制機序の解析を目的とした。

3. 研究の方法

Cas-L/Nedd9 ノックアウトマウス (Cas-L/Nedd9^{-/-}) は瀬尾らによって作製され当研究室が供与された。コラーゲン誘発関節炎 (Collagen-induced arthritis) マウスの作成とその評価：型 collagen と Freund's Complete Adjuvant でエマルジョンを作成して皮下に免疫し (初回免疫及び追加免疫の 2 回)、コラーゲン誘発関節炎 (Collagen-induced arthritis) を誘導した。関節炎の評価を肉眼的スコアリング、軟部 X 線、病理組織学的解析により行った。コラーゲン誘発関節炎マウスのリンパ節から単核球を単離し、型 collagen に対する増殖反応を解析した。

骨髄細胞移植実験：コラーゲン誘発関節炎の責任細胞を同定するために骨髄細胞移植実験を行った。即ち、放射線照射して骨髄を破壊した野生型マウスに、Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスから単離した骨髄幹細胞を移植したものと、放射線照射した Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスに野生型マウスの骨髄幹細胞を移植したマウスを作製し、コラーゲン誘発関節炎を誘導し、その関節炎の評価を行った。

型 collagen 抗体価及び血清中のサイトカインを ELISA 法で測定した。

共刺激実験：T 細胞の十分な活性化のためには、TCR からのシグナルの他に共刺激分子からの補助シグナルが必要である。Cas-L/Nedd9 及び Rox/5-1 の共刺激系への影響を検討するためリンパ球を用いた共刺激実験を行った。

Rox/5-1 の免疫系への作用点を調べるため、リンパ球及びマクロファージの細胞遊走能に対する影響を検討した。

Rox/5-1 の免疫調節作用の機序を解析するため、CD3 抗体 + CD28 抗体で共刺激したヒト末梢血リンパ球に Rox/5-1 を加えて培養後、mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。Rox/5-1 の関節リウマチに対する治療応用可能性を検討するため、コラーゲン誘発関節炎を誘導し、Rox 或は 5-1 を経口投与してその関節炎の重症度に対する効果を解析した。

4. 研究成果

RA における Cas-L/Nedd9 の意義の解明：我々は、RA モデルマウスである tax トランスジェニックマウスにおける Cas-L/Nedd9 の発現増強と細胞遊走能の亢進について報告してきた。炎症性疾患において、リンパ球が血管内

皮細胞へ接着し、血管外へ遊走後、炎症部位へ浸潤して行く過程は、治療介入の可能性を考えるうえで非常に重要である。また、実際のヒト検体においても Cas-L/Nedd9 の発現亢進を見出している。Cas-L/Nedd9 ノックアウトマウスの出生比率は Mendel の法則の期待値にほぼ一致するが、形態学的にリンパ節の marginal zone B 細胞の欠失、二次リンパ臓器リンパ球数の減少が観察されるとともに、T 細胞・B 細胞のケモカイン (CXCL12, CXCL13, CCL21) に対する細胞遊走能や、インテグリンリガンドに対する接着性の低下が指摘され、これまでの我々の *in vitro* での Cas-L/Nedd9 の解析が証明された形となった。

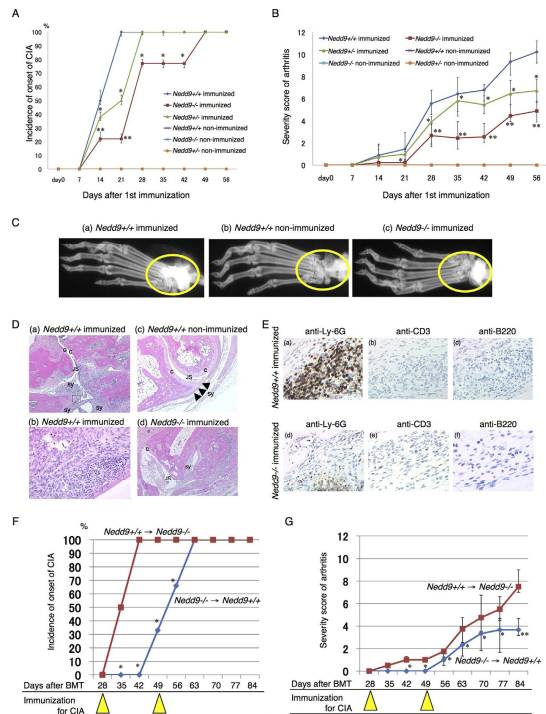
本研究において、Cas-L/Nedd9 ノックアウトマウスを用いたコラーゲン誘発関節炎の解析から、同マウスでは関節炎の重症度が低下することを明らかにしたことである。このことは、肉眼的な関節炎のスコアリング、罹患関節の X 線撮影、及び病理組織学的解析により確認された。また、Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスでは、対照群の野生型マウスと比較して、血清中の II 型 collagen に対する抗体価、炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17A) の低下・抑制性サイトカイン (IL-10) の上昇が認められた。これらのサイトカインバランスの異常は、同マウスでの炎症の遅延と関節炎の軽症化の一因とも考えられる。コラーゲン誘発関節炎マウスから単離したリンパ球の II 型 collagen に対する増殖反応においても、Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスは、野生型マウスと比較して低下を示した。このように Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスでは液性免疫のみならず、細胞性免疫の低下も示唆された。

骨髄移植実験においては、Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスから単離した骨髄幹細胞を移植した野生型マウスにおいても、コラーゲン誘発関節炎の発症遅延と重症度の低下が認められ、逆に野生型マウス骨髄幹細胞を移植した Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスではそのような現象が認められなかったことから、Cas-L/Nedd9^{-/-} マウスにおける関節炎軽症化の責任細胞の少なくとも一部は骨髄由来細胞であることが示された。

以上のことから、本研究において、Cas-L/Nedd9 は関節リウマチ発症において重要な病態生理学的意義をもつ分子であることが明らかになるとともに、Cas-L/Nedd9 がこれまでに明らかとなっている細胞接着・遊走の制御のみならず、サイトカイン産生の制御にも関与していることが示唆された (右頁図; 論文 1 より引用)。

新規マクロライド誘導体の抗サイトカイン産生機序の解明と、RA 治療への応用の可能性: 我々はこれまで、ロキシスロマイシンによる炎症性サイトカイン産生抑制作用とマウスコラーゲン関節炎に対する予防と治療効果について報告してきた。

本研究において、新規ロキシスロマイシン



誘導体 5-1 を導出し、その炎症性サイトカイン抑制とマウス関節炎抑制効果を見出した。

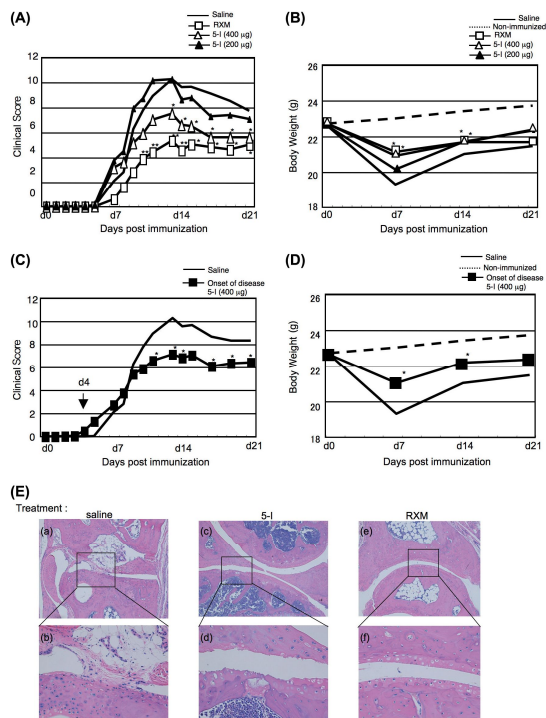
即ち、5-1 及びロキシスロマイシンは、CD3/CD28 共刺激下でのヒト T 細胞の IL-2, IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 の産生、及び LPS 刺激マクロファージによる TNF- α , IL-6 の産生を用量依存的に抑制した。

また、活性化 T 細胞及び、LPS 刺激マクロファージの細胞遊走能が、5-1 及びロキシスロマイシン投与により用量依存的に抑制された。一方、5-1 及びロキシスロマイシンは、CD3/CD28 共刺激下でのヒト T 細胞の増殖反応や Th2 サイトカイン産生には影響しなかった。

さらに、ヒトリンパ球を用いたマイクロアレイ解析の結果、5-1 及びロキシスロマイシンは、Th17 細胞への分化に重要な核内転写因子 ROR- γ t の発現を抑制することが明らかになった。

また、コラーゲン誘発関節炎モデルへの発症前或は発症後投与により、関節炎重症度の肉眼的、病理学的スコアの改善を認めた。

これらのことから、新規ロキシスロマイシン誘導体 5-1 を起点として関節リウマチの新規治療薬の創出につながる可能性が示唆された (次頁図; 論文 2 より引用)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- 1) Katayose T, Iwata S, Oyaizu N, Hosono O, Yamada T, Dang NH, Hatano R, Tanaka H, Ohnuma K, Morimoto C.

The role of Cas-L/NEDD9 as a regulator of collagen-induced arthritis in a murine model.

Biochem Biophys Res Commun. 2015 460(4):1069-75.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.156.

査読有

- 2) Otsuki N, Iwata S, Yamada T, Hosono O, Dang NH, Hatano R, Ohnuma K, Morimoto C. Modulation of immunological responses and amelioration of collagen-induced arthritis by the novel roxithromycin derivative 5-I.

Mod Rheumatol. 2015 Mar 24:1-9.

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14397595.2014.983262>

査読有

- 3) Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes.

J Immunol. 2015 194(8):3697-712.

doi: 10.4049/jimmunol.1402785.

査読有

- 4) Hatano R, Ohnuma K, Otsuka H, Komiya E, Taki I, Iwata S, Dang NH, Okumura K, Morimoto C.

CD26-mediated induction of EGR2 and IL-10 as potential regulatory mechanism for CD26 costimulatory pathway.

J Immunol. 2015 194(3):960-72.

doi: 10.4049/jimmunol.1402143.

査読有

- 5) Komiya E, Ohnuma K, Yamazaki H, Hatano R, Iwata S, Okamoto T, Dang NH, Yamada T, Morimoto C.

CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2014 447(4):609-15.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.037.

査読有

- 6) Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Okamoto T, Komiya E, Yamazaki H, Iwata S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C.

Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant pleural mesothelioma.

Br J Cancer. 2014 110(9):2232-45.

doi: 10.1038/bjc.2014.151.

査読有

- 7) Ohnuma K, Saito T, Hatano R, Hosono O, Iwata S, Dang NH, Ninomiya H, Morimoto C.

Comparison of two commercial ELISAs against an in-house ELISA for measuring soluble CD26 in human serum.

J Clin Lab Anal. 2015 29(2):106-11.

doi: 10.1002/jcla.21736.

査読有

- 8) Hatano R, Yamada T, Matsuoka S, Iwata S, Yamazaki H, Komiya E, Okamoto T, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C.

Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue.

Diagn Pathol. 2014 9:30.

doi: 10.1186/1746-1596-9-30.

査読有

- 9) Okamoto T, Iwata S, Yamazaki H, Hatano R, Komiya E, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C.

CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells.

PLoS One. 2014 9(1):e86671.

doi: 10.1371/journal.pone.0086671.

査読有

10) Havre PA, Dang LH, Ohnuma K, Iwata S, Morimoto C, Dang NH.

CD26 expression on T-anaplastic large cell lymphoma (ALCL) line Karpas 299 is associated with increased expression of versican and MT1-MMP and enhanced adhesion.

BMC Cancer. 2013 13:517.

doi: 10.1186/1471-2407-13-517.

査読有

11) Ohnuma K, Haagmans BL, Hatano R, Raj VS, Mou H, Iwata S, Dang NH, Bosch BJ, Morimoto C.

Inhibition of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection by anti-CD26 monoclonal antibody.

J Virol. 2013 87(24):13892-9.

doi: 10.1128/JVI.02448-13.

査読有

12) Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C.

Impact of the integrin signaling adaptor protein NEDD9 on prognosis and metastatic behavior of human lung cancer.

Clin Cancer Res. 18(22):6326-38. doi:

10.1158/1078-0432.CCR-11-2162.

査読有

〔学会発表〕(計 2件)

1) 波多野良 大沼圭 石井智徳 岩田哲史 奥村康 関川巖 森本幾夫

T細胞共刺激分子 CD26 に基づく全身性エリテマトーデスの病態および疾患活動性の新規バイオマーカーの探索

第59回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2015年4月25日

名古屋国際会議場(名古屋)

2) Iwata S, Katayose T, Kichikawa Y, Ichihara H, Kawasaki H, Hosono O, Tanaka H and Morimoto C.

Gene Targeting of an Integrin-Mediated Signaling Adaptor Molecule, Crk-Associated Substrate Lymphocyte Type Reduced the Severity of Collagen-Induced Arthritis. Its Possible Involvement in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis.

American College of Rheumatology Annual Meeting 2012

2012年11月09日~2012年11月14日

米国 ワシントン DC

〔図書〕(計 1件)

山川彰夫 岩田哲史

改変抗体による創薬

日本臨床増刊号 分子標的薬

70巻増刊8 2012年 408-412

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.researchgate.net/home.Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 哲史 (IWATA SATOSHI)

順天堂大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 00396871

(2) 連携研究者

森本 幾夫 (MORIMOTO CHIKAO)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30119028