

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25330356

研究課題名(和文) シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づく体内挙動のシミュレーション法の確立

研究課題名(英文) Development of simulation method of behaviors in the body based on signal transduction pathway

研究代表者

山田 訓 (YAMADA, SATOSHI)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：20393506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リウマチ発症のモデルを題材に、細胞内反応と細胞群の挙動を同時に計算して体内での変化を計算する手法を確立した。滑膜細胞内の炎症アンブと呼ばれるIL-6/STAT3の伝達経路とIL-17/NFkBの伝達経路からなる細胞内反応系をモデル化し、ケモカインで誘引されるmacrophageとTh17が血管から関節に侵入して炎症アンブを活性化する過程をモデル化した。F759マウスと呼ばれるIL-6レセプタの突然変異マウスの挙動を再現し、IL-6の産生について培養細胞の実験結果と比較した。sensitivity analysisにより、炎症アンブの内、IL-6/STAT3の方が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The computer model which contains some parts of the body and simultaneously calculates intra-cellular reactions and the population of cell groups was developed by constructing a model of the rheumatoid arthritis. The model contained the inflammation amplifier of IL-6/STAT3 and IL-17/NFkB pathways in synovial cells, infiltration of macrophages and Th17 from blood vessel to joint, and the production of cytokines by infiltrated immune cells. The model mimicked the differences between wild-type mice and F759 mice. The simulation results of the model were compared with the experimental IL-6 productions by fibroblasts extracted from F759 mice. The sensitivity analysis of the model suggested that IL-6/STAT3 pathway is more important than IL-17/NFkB pathway.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：リウマチ シミュレーション F759マウス 炎症アンブ IL-6 NFkB

1. 研究開始当初の背景

シグナル伝達系パスウェイは細胞外の状況変化を感知し、適切な細胞応答をするための細胞内反応系である。シグナル伝達系パスウェイの変化は様々な疾患に関わっているが、疾患との関連を解明するためには、体内各部の免疫系の働きと体全体での調節のメカニズムを理解することが必要である。シグナル伝達系の挙動に基づき、体内での細胞群の挙動をシミュレーションする手法の確立が必要である。

免疫系は体内に侵入してきた異物を排除するためのシステムであり、多種類の細胞の微妙なバランスで反応が行われている。このバランスの崩れが疾病につながる。この免疫反応の時空間的なダイナミクスを予測することは、これらの疾患の治療法や予防法を見出すために必要であり、免疫学の大きな目標の一つである。免疫系では、多種類の白血球（T細胞やB細胞）がサイトカインを介して互いに影響を及ぼしあっているため、各細胞内のシグナル伝達系パスウェイの挙動をシミュレーションすることが、免疫系の挙動を理解するのに必要である。

我々は、既にシグナル伝達系パスウェイのモデル化(JAK/STAT系とRas/MAPK系)及びTh1/Th2分化のモデル化を行っている。さらに、ヘルパーT細胞分化を題材に、シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づく細胞群の挙動をモデル化した。従って、体内各部の環境を設定し、その中で細胞群の挙動をモデル化する準備は整っている。

2. 研究の目的

シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づいて体内の細胞群の挙動をシミュレーションするシステムを構築することを目的とする。題材として、免疫系で重要な働きをするヘルパーT細胞分化を用い、胸腺・血管・超粘膜で構成されるモデルを構築することを研究当初の目的とした。しかし、自己免疫疾患であるリウマチは、発症の分子メカニズムの研究が進展しており、分子生物学的研究も盛んにおこなわれているので、リウマチのモデル化を題材にした方が、生物学実験との比較や疾患との関連性の分析などの点で有利であるので、リウマチ発症のモデル化を題材として、シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づく体内の細胞群の挙動を模擬するシミュレーションシステムの構築を行う。

3. 研究の方法

リウマチは自己免疫疾患であり、関節内で自己抗原に対する免疫反応によって、滑膜細胞の炎症が起こり、破骨細胞分化を誘導し、破骨細胞が骨を破壊することにより、関節の変形が起こる。このリウマチ発症では、滑膜細胞内のIL-6/STAT3シグナル伝達系パスウェイとIL-17/NFκBシグナル伝達系パスウェイで構成される炎症アンブという細胞内反

応系の活性化が重要であると考えられている。関節内を主な環境として、滑膜細胞内のシグナル伝達系パスウェイである炎症アンブ反応と滑膜細胞群の挙動、関節への血管からの免疫細胞群の侵入と関節内での免疫細胞群の挙動をシミュレーションするモデルを構築する。

(1) 第一段階のモデル

滑膜細胞内の炎症アンブのモデルとして、IL-6/STAT3のパスウェイとIL-17/NFκBのパスウェイからなる、図1のようなモデルを構築した。その際に、サイトカインから転写因子に至るシグナル伝達系パスウェイの経路を簡略化し、サイトカイン濃度依存的に転写因子活性化が起こるモデルとした。

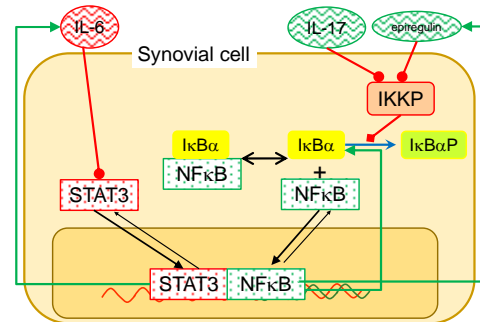


図1 第一段階の滑膜細胞のモデル

ケモカインに誘引されて、Th17とmacrophageが関節内に侵入し、関節内でIL-17やIL-6などのサイトカインを産生し、このサイトカインが滑膜細胞の炎症アンブを活性化して、破骨細胞分化を導く、epiregulinなどのサイトカインの大量産生が起こるといふ、関節内の反応の図2のようなモデルを構築した。

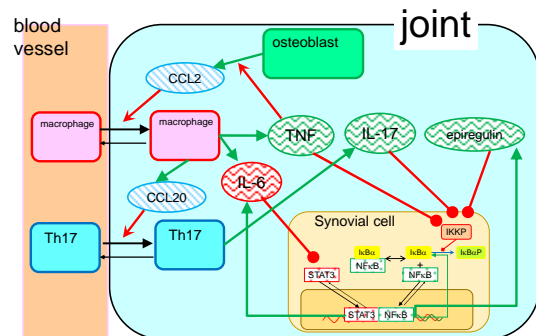


図2 第一段階の関節モデル

モデルに含まれる各種パラメータは、連携研究者である慶應大学吉村と北海道大学村上が行った生物実験結果に適合するように、設定した。

(2) 第二段階のモデル

北海道大学村上らは、リウマチを自然発症する突然変異マウスを研究対象としてリウマチ発症の分子メカニズムの研究を行っている。このマウスでは、IL-6レセプターのチ

ロシン(759 番目)がフェニルアラニンに変異している (F759 マウスと呼んでいる)。759 番目のチロシンは、IL-6/STAT3 シグナル伝達系パスウェイの活性化反応でリン酸化される。リン酸化されたこのチロシンは、IL-6/STAT3 パスウェイの抑制物質である SOCS3 の結合部位である。F759 マウスでは、リン酸化された結合部位がないので、SOCS3 が IL-6 レセプターに結合できない。従って、negative feedback が起こらず、IL-6/STAT3 パスウェイの過剰な活性化が持続する。この IL-6/STAT3 の過剰な活性化が炎症アンプの活性化を引き起こし、リウマチ発症を起こしていると考えられている。第二段階のモデルでは、F759 マウスと wild-type マウスとの違いからリウマチ発症の分子メカニズムを解析するために、図 1 の滑膜細胞内の反応系のモデルの内、IL-6/STAT3 のパスウェイのモデルを改良し、SOCS3 の結合反応及び結合による IL-6/STAT3 パスウェイの抑制を組み込んだ図 2 のようなモデルを構築した。

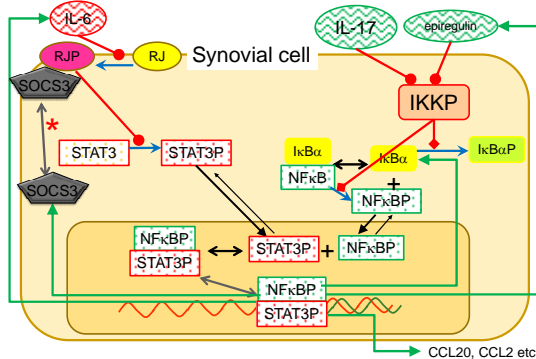


図 3 第二段階の滑膜細胞のモデル

関節内の細胞群のモデルは第一段階のモデルと同様である (図 2)。

第二段階のモデルのパラメータも、連携研究者である慶應大学吉村と北海道大学村上が行った生物実験結果に適合するように、設定した。

4. 研究成果

(1) 第一段階のモデルの結果

関節内に初期状態で存在するケモカイン (CCL2 や CCL20) が血管中の macrophage や Th17 を誘引し、関節中に侵入した macrophage が TNF と IL-6、Th17 が IL-17 を産生する。関節中で増加した IL-6 が滑膜細胞中の STAT3、TNF と IL-17 が NFκB を活性化するシグナル伝達系パスウェイを活性化する。この共活性化により滑膜細胞の炎症アンプが活性化する。炎症アンプは、positive feedback loop を構成するように、IL-6 と epiregulin を産生する。epiregulin は関節中の他の細胞に働きかけ、破骨細胞の分化を促し、リウマチ発症につながると考えられる。

滑膜細胞内のモデルとして図 1 のモデルを用い、滑膜細胞のモデルを含む関節内の細胞群の相互作用を表すモデルとして図 2 の

モデルを用いて、時間経過をシミュレーションしたところ、図 4 のような結果が得られ、関節内に、macrophage と Th17 が侵入し、侵入した免疫細胞により炎症アンプを活性化するサイトカインが産生され、滑膜細胞内の炎症アンプが活性化され、IL-6 と epiregulin が産生される様子が再現された。

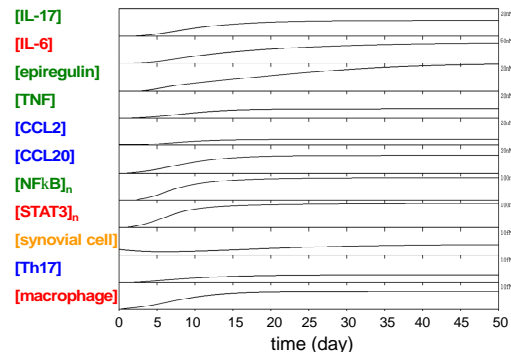


図 4 第一段階のモデルの時間経過

このモデルに対し、抗サイトカイン抗体の効果を調べたところ、図 5 のように、抗 IL-6 抗体を添加すると、IL-6 の減少とともに、活性化型 STAT3 が減少し、epiregulin の産生も減少した。抗 IL-6 抗体はリウマチ発症を抑制する効果があることがシミュレーションで再現された。これは、臨床的な知見と一致する。一方、抗 TNF 抗体や抗 IL-17 抗体は TNF や IL-17 を減少させるが、活性化型 NFκB を減少させる効果は限定的であり、epiregulin の産生もあまり減少しなかった。臨床的な知見では、抗 TNF 抗体はリウマチに効果があると知られているので、この結果は臨床的な知見とは一致しない。TNF の作用として、NFκB を活性化する以外の作用があり、その作用がリウマチ発症に重要であるので、抗 TNF 抗体が臨床的に有効ではないかと考えられる。

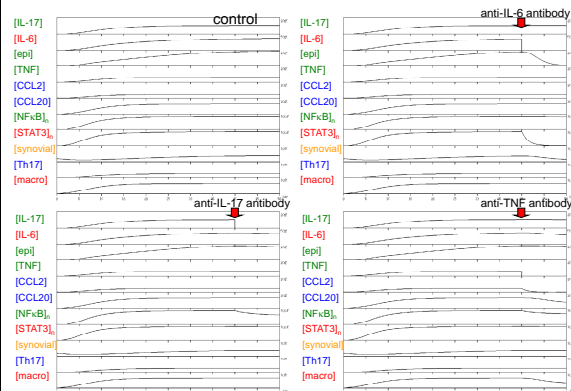


図 5 第一段階のモデルでの抗サイトカイン抗体の効果

(2) 第二段階のモデルの結果

F759 マウスはリウマチを自然発症するので、発症過程の多様な実験が可能で発症の分子メカニズムを解析することが可能であると考えられている。F759 マウスを再現するモデルを構築し、実験結果とシミュレーション

結果を比較することで発症の分子メカニズムを解明することが可能になると考え、F759マウスの構築を行った。第一段階のモデルでは簡略化していた、IL-6のレセプターとの結合やレセプターのリン酸化、リン酸化レセプターとSOCS3との結合などの反応を組み込み、第二段階のモデルを構築した。構築した図3のモデルは wild-type のマウスのモデルで、F759 マウスでは、リン酸化レセプターとSOCS3 との結合が非常に弱くなっているため、リン酸化レセプターとSOCS3の結合反応を除外することにより F759 マウスの滑膜細胞内の反応系のモデルとした。図6は第二段階のモデルで wild-type マウスと F759 マウスの挙動を比較した結果である。F759 マウスだけで、STAT3 や NFκB の活性化が持続し、IL-6 と epiregulin の産生が増加した。F759 マウスでだけ、リウマチ発症が起こることを再現しているといえる。

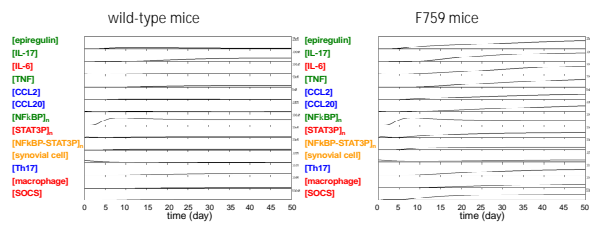


図6 第二段階のモデルの時間経過

血液中の Th17 と macrophage 濃度依存性を計算すると図7のような結果になった。滑膜細胞中の炎症アンプの活性化、ひいてはリウマチ発症には、血液中の Th17 と macrophage の両者が必要であることが分かる。また、北海道大学の村上は、マウスの実験で炎症アンプが活性化した際には、活性化 STAT3 と活性化 NFκB が複合体を形成している可能性が高いことを見出している。第二段階のモデルで、複合体を形成する場合と形成しない場合を比較すると、複合体を形成する場合には炎症アンプの活性化と epiregulin の大量産生が起こるが、複合体を形成しない場合には、epiregulin の大量産生が起こらないので、複合体形成が炎症アンプの活性化に必須であると考えられる。

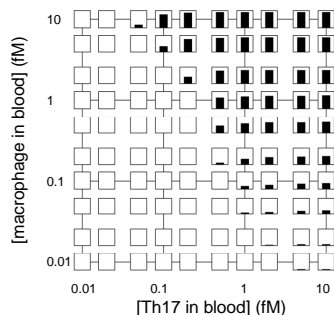


図7 第二段階モデルの血液中の Th17 と macrophage 濃度依存性

第二段階のモデルで抗サイトカイン抗体の効果調べたところ、第一段階のモデルと同様に、抗 IL-6 抗体は効果があったが、抗 TNF 抗体や抗 IL-17 抗体は効果が小さかった。

F759 マウスから分離した fibroblast で炎症アンプを活性化する条件でサイトカインを添加した際の IL-6 産生を計測した。計測結果とシミュレーション結果を比較すると図8のようになった。シミュレーションでは一貫して、F759 マウスの IL-6 産生速度が wild-type の産生速度より大きいのが、実験では、サイトカイン添加後16時間までは、顕著な差はなく、その後 wild-type マウスで産生速度が抑制されて、F759 マウスと wild-type マウスの差が大きくなっている。wild-type マウスでは何らかの抑制メカニズムがあるのではないかと考えられ、その解明は今後の課題である。

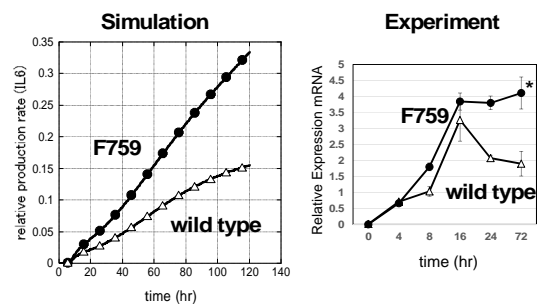


図8 滑膜培養細胞による IL-6 産生速度のシミュレーションと実験結果の比較

構築したリウマチ発症のモデルで、ある一つのパラメータの値だけを変化させ、そのパラメータ変化による全体の挙動の変化（今回は epiregulin の産生量）を調べるという sensitivity analysis を行った。その結果、図9に示すように、現在のモデルでは、NFκB を活性化させる経路より SOCS3 を活性化する経路の反応の方がパラメータ変化による影響が大きかった。従って、IL-6/STAT3 のパスイエイの方がリウマチ発症に重要ではないかと示唆される。

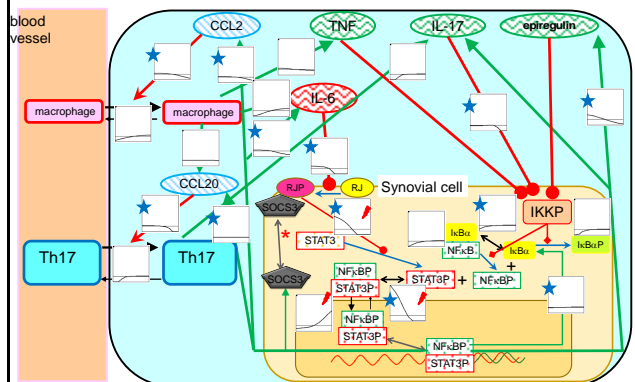


図9 第二段階モデルの sensitivity analysis の結果

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 0件)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 山田訓, 吉村昭彦, 熱海徹, 村上正晃
「リウマチ様関節炎発症における F759 マウスと野生型マウスの違いのコンピュータモデルによる解析」, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
2. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Toru Atsumi, Masaaki Murakami, “Computer model analysis of the difference between F759 and wild type mice in rheumatoid-like arthritis emergence”, 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
3. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Toru Atsumi, Masaaki Murakami, “Computer model analysis of the difference between F759 and wild type mice in rheumatoid-like arthritis emergence”, 4th European Congress of Immunology, 2015年9月8日, ウィーン(オーストリア)
4. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Toru Atsumi, Masaaki Murakami, “Computer model analysis of the difference between F759 and wild type mice in rheumatoid-like arthritis emergence”, 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月11日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)
5. 山田訓, 吉村昭彦, 熱海徹, 村上正晃,
「リウマチ様関節炎発症における F759 マウスと野生型マウスの違い」, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
6. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura,
“Computer model of rheumatoid arthritis”, 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年12月12日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)
7. 山田訓, 吉村昭彦, 「リウマチのコンピュータモデル」, 第36回日本分子生物学会年会」, 2013年12月5日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 訓 (YAMADA SATOSHI)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号: 20393506

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 90182815