

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19574

研究課題名(和文) 脂質分子の炎症収束効果を基盤とした関節リウマチ新規薬剤の開発

研究課題名(英文) Innovation for the therapeutic strategies for Rheumatoid Arthritis based on Specialized pro-resolving lipid mediators

研究代表者

村上 孝作 (Murakami, Kosaku)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70599927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オメガ3由来の炎症収束作用を持つメディエーター(Specialized proresolving mediators, SPM)が膠原病の病態に関わる機序について検討した。健康人および膠原病患者(皮膚筋炎・多発性筋炎および関節リウマチ)末梢血中の単核球を抽出し、SPMの受容体であるBLT1、CMKLR1およびFPR2について、その発現量をフローサイトメトリーにて解析した。BLT1とCMKLR1は健康人と膠原病患者と比較し細胞表面の発現量は同等であったが、FPR2は特にT細胞において膠原病患者のほうが健康人と比較し多く発現していた。FPR2が膠原病の病態に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Omega3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are reported to be effective in rheumatoid arthritis (RA). Specialized Proresolving Mediators (SPMs) are generated from omega3 PUFAs. SPMs are related to the resolution of acute inflammation and tissue repair. To clarify the role of SPMs in connective tissue diseases, Peripheral blood was collected from patients with Polyomyositis / Dermatomyositis and RA. The surface expression of SPM receptors (FPR2, BLT1 and CMKLR1) on White blood cells was determined by flow cytometric analysis. As a result, the expression profile of BLT1 and CMKLR1 in CTD patients were comparable with healthy donors. While the expression of FPR2 on T lymphocytes was higher in CTD patients than in healthy controls, which suggests that FPR2 has some functions related to the pathogenesis of CTDs.

研究分野：膠原病・リウマチ内科学

キーワード：Lipid mediators 膠原病 FPR2 CMKLR1 関節リウマチ Resolvin D1

1. 研究開始当初の背景

3系脂肪酸は主に魚油に多く含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)に代表される多価不飽和脂肪酸(Poly Unsaturated Fatty Acid; PUFA)であり、古くから心血管保護作用や抗炎症作用があることが報告されてきた。3系脂肪酸はこれまで、6系脂肪酸であるアラキドン酸に由来する代謝産物であるプロスタグランジンE2(Prostaglandin E1; PGE2)等といった炎症惹起分子の作用に拮抗することのみが抗炎症作用の機序である考えられていた。しかし近年、Serhanらは炎症収束期に存在する脂肪酸代謝物の解析から、EPA由来のレゾルビンE1(Resolvin E1; RvE1)やDHA由来のレゾルビンD1(Resolvin D1; RvD1)を同定し、これらが好中球の局所遊走抑制やマクロファージの非催炎性貪食(Non-phagocytic phagocytosis)を強力に促進することを突き止めた。さらに、DHA由来のマレシン1(Maresin1; Mar1)やプロテクチンD1(Protectin D1; PD1)も同様の作用をもつことが明らかとなったため、6系脂肪酸由来だが同様の炎症収束作用を有するリポキシンA4(Lipoxin A4; LXA4)等を含め、これらの脂質分子群をSpecialized Pro-resolving

lipid mediators(SPM; 炎症収束因子)として新たに提唱するに至った。その後、LXA4が敗血症モデルマウスの死亡率を低下させたことやPD1がインフルエンザウイルスの宿主内増殖を抑制する効果など、SPMによる炎症収束機構の重要性が次々に報告されている。

SPMが及ぼす炎症収束作用で特筆すべき点は、多くの研究においてその活性がpMから多くとも100nMレベルで作用することにある。極めて低濃度で細胞内の機能活性を来たすことから、SPMの炎症収束作用は(脂質としての代謝作用ではなく)受容体との結合を介したシグナル伝達によるものであると考えられる。実際、細胞表面に発現するGPCR familyに属する蛋白が受容体として同定されている。Leukotriene B4 Receptor(LTB4R, BLT1)はLeukotriene B4の受容体として同定されたが、RvE1がそのアンタゴニストとして作用する。Formyl peptide receptor 2(FPR2)はLipoxin A4(LXA4)やRvD1の受容体であるが、血清アミロイド蛋白A(Serum amyloid A, SAA)もリガンドの一つであり、機能的に拮抗する²¹⁾。G-coupled receptor 32(GPR32)はRvD1やLXA4の受容体として同定されたOrphan receptorであり、機能不明であるところが多いが、マクロファージに発現しRvD1と結合して遊走能抑制とNonphlogistic phagocytosisを促進させることが報告された。Chemokine-like receptor 1(CMCLR1)はRvE1の受容体であるが、アディポサイトカインの一つであるChemerinとの相互作用

も有する。炎症抑制機能を持つ核内受容体の一つである Peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ)はDHAやEPAが基質であることは既に知られているが、十分な活性化を促進させるためには比較的高濃度(EC50で10-100 μ M)が必要となる。一方でSPMとその受容体はEC50がpMからnMレベルであるため、基質であるEPAやDHAと比較し1000分の1の濃度で炎症収束作用を持つことになる。その意義については未だ確立していないものの、SPMは炎症が生じ、lipid mediator class switchingが起こっている局所に限定して(autoocrineあるいはparacrine作用として)十分な炎症抑制効果を発揮していることが想定される。

変形性関節症(Osteoarthritis, OA)は関節を構成している軟骨の退行性破壊と異所性骨形成(骨棘)を特徴とする変性疾患であり、本邦では高齢化社会になるにしたがい、最も頻度の高い骨関節疾患である。現時点で病態進行を確実に抑制する薬剤は存在せず、NSAIDsでも制御出来ない疼痛が生じた場合など症状悪化時には人工関節置換術などの外科的治療を行なう以外の治療法は存在しない。罹患部位は機械的刺激を受けやすい膝関節や股関節に多いが、手指の関節にも罹患し得る。OA発症のリスク因子は一般に高齢、女性、過去の関節障害、職業的要因が挙げられるが、hand OAにおいて高脂血症と肥満も独立した危険因子になり得ることが疫学的に示された。OAの関節局所では、関節リウマチほどではないが滑膜炎や滑液中に炎症細胞が認められることから、脂肪細胞が関与する(慢性)炎症が病態の発症進展に関わる可能性が示唆される。Ioan-Facsinayらは、人工膝関節置換術によって摘出された膝蓋下脂肪組織由来の脂肪細胞(Hoffa's fat pad)を培養し、その上清(Adipocyte conditioned medium; ACM)でT細胞を刺激したところ、皮下脂肪由来脂肪細胞の培養上清と比較して、T細胞からのIFN γ 分泌が優位の上昇することを報告した。一方、マクロファージを同様にHoffa由来のACMで刺激した場合、IL-12p40の分泌が低下した²⁶⁾。重要なことは、どちらの刺激実験においても皮下脂肪由来上清との違いは脂質分画のみ認められたことである。OA関節液のLC-MS/MS解析でdetectされたSPMによって滑膜線維芽細胞のLPS依存性IL-6分泌が抑制されていたことから、脂質異常症とOA発症との関連にSPMが影響している可能性が示唆される。最近、202例の膝OA患者を対象にn-3系多価不飽和脂肪酸の低容量投与(0.45g/日)と高容量投与(4.5g/日)の効果を比較する臨床試験結果が報告された。主要評価項目である軟骨量の減少抑制には有意な効果が認められなかったが、興味深いことに疼痛抑制効果は低容量投与群でより強く認められる結果となった。一見 paradoxical な

結果に思われるが、SPM は基質から変換されると低濃度でも強力な炎症抑制作用を生じることに関連するのかもしれない。

RA は自己免疫現象を背景として滑膜増殖や破骨細胞活性化による関節破壊を来たす慢性炎症性疾患であるが、この病態に SPM が及ぼす影響についての報告は極めて乏しい。応募者の在籍していた施設(Leiden University Medical Center, LUMC, オランダ)では、RA 患者関節液中に数種類の SPM が検出されることを報告した。また応募者は変形性関節症患者の滑膜細胞において、LXA4 や RvD1 の受容体である Formyl peptide receptor 2 (FPR2)と RvE1 の受容体である Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1)が各々異なる細胞群で発現している一方で、RvE1 が antagonist として作用する Leukotriene B4 receptor 1(BLT1)の発現は全く認められないことを示した。このことは、RA をはじめとした関節炎において、SPM が炎症の惹起・遷延を制御する一翼を担っている可能性があると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) RA 患者白血球における SPM の既知受容体 (BLT1、FPR2、CMKLR1) の発現量を測定し、健常人におけるパターンと比較することで、SPM そのもの、あるいは受容体アゴニストとなり得る低分子化合物が新たな RA 治療薬となり得ることを明らかにする。

(2) RA の患者血漿あるいは関節液における各 SPM の濃度を測定し、疾患活動性による患者間での濃度の違いや抗リウマチ薬による治療前後の濃度変動等を検討し、治療薬の候補となり得る脂質メディエーターを探索する。

(3) RvD1、LxA4 が FPR2 発現依存性に単球からの炎症性サイトカインの分泌を抑制することを、RA 患者末梢血液中の単球あるいは遺伝子導入による FPR2 過剰発現単球由来細胞株を用いることによって明らかにする。

3. 研究の方法

(1)健常人または RA 患者の末梢血液から白血球を分離し、フローサイトメトリーによって SPM に対する各受容体 (BLT1、FPR2、CMKLR1) の発現量を細胞分画ごとに測定する。なお、いずれの抗体も unconjugated antibody しか販売されていないため、PE を conjugation 試薬を用いることにより架橋し検討する。

(2)健常人または RA 患者血漿、また RA 患者関節液から高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計 (Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)を用いて SPM 濃度を網羅的に探索し、RA 疾患活動性への脂質分子の影響を同定する。

(3)健常人または RA 患者の末梢血から分離した単球、もしくは FPR2 遺伝子をプラスミ

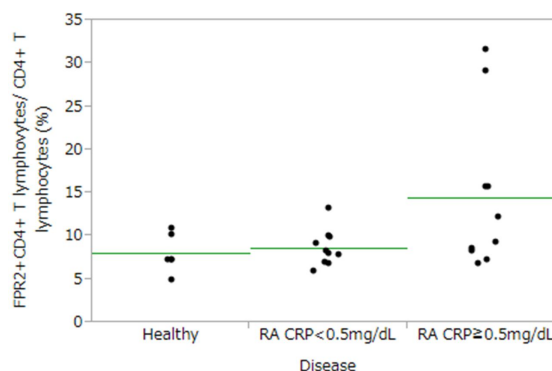
ドベクターによって強制発現させたヒト単球由来細胞株(THP-1)を用いて、RvD1 や LXA4 による炎症性サイトカイン分泌抑制効果を LPS を始めとした炎症惹起物質による刺激の有無で分けて ELISA 法により測定する。

4. 研究成果

【研究の方法(1)における成果】

オメガ 3 由来の炎症収束作用を持つメディエーター (Specialized proresolving mediators, SPM) が膠原病の病態に関わる機序について検討した。健常人および膠原病患者 (皮膚筋炎・多発性筋炎および関節リウマチ) 末梢血中の単核球を抽出し、SPM の受容体である BLT1, CMKLR1 および FPR2 について、その発現量をフローサイトメトリーにて解析した。BLT1 と CMKLR1 は健常人と膠原病患者と比較し細胞表面の発現量は同等であったが、FPR2 は特に T 細胞において膠原病患者のほうが健常人と比較し多く発現していた。FPR2 が膠原病の病態に関わる可能性が示唆された。

さらに、特に RA 患者において BLT1 や CMKLR1 では明らかな発現率の差は認められなかったのに対し、FPR2 は特に血中 CRP 値が 0.5mg/dL の高炎症群において T 細胞表面への発現率の増加が認められた(図 1)。この結果は、SPM 受容体の中でも特に RvD1 の受容体である FPR2 が RA の病態に重要であることを示唆している。現在、症例数を増やして継続的に検討している。

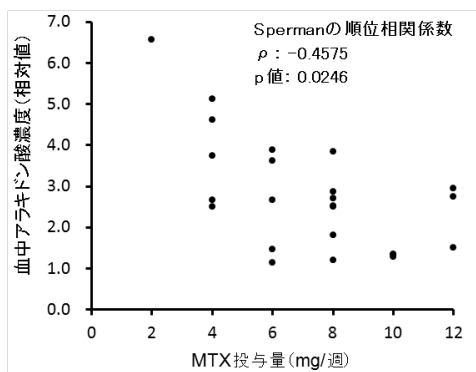


(図 1) 健常人および RA 患者血中 CD4 陽性 T 細胞における FPR2 陽性率 (フローサイトメトリーによる検討)。健常人末梢血の FPR2 陽性 T 細胞と比較し、とくに疾患活動性の高い (CRP が 0.5mg/dL となっている) 患者群の FPR2 陽性 T 細胞の割合が高い傾向にあった。なお、FPR2 以外の SPM 受容体も検討したが、上記のような差は得られなかった。

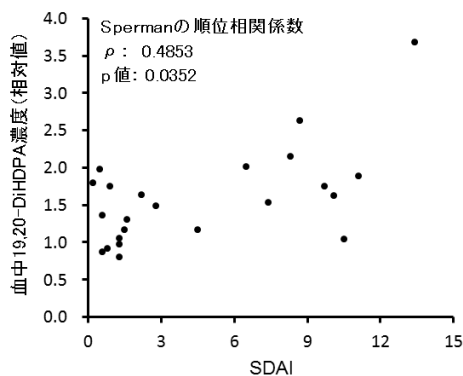
【研究の方法(2)における成果】

RA 患者血漿から 32 種類の脂質メディエーター濃度について高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析法を用いて定量化し、臨床情報との相関関係を調べたところ、血中アラキ

ドン酸濃度は抗リウマチ薬であるメトトレキサート投与量と有意な負の相関を認めた(図2)。また、DHAの代謝産物である血中19,20-DiHDP Aは上記32種の中で最も強く疾患活動性指標(SDAI, Simplified disease activity index)と有意な正の相関を示した(図3)。このことは、脂質メディエーターがRAの病態に関わるだけでなく、治療反応性や疾患活動性を反映する生体マーカーとなり得ることを示唆している。



(図2)RA患者におけるMTX投与量と血中アラキドン酸濃度との相関(n=24)。その他にも、19,20-diHDP AとMTX投与量に統計学的に優位な負の相関が得られた。



(図3)RA患者血中におけるSDAIと血中19,20-DiHDP A濃度との相関(n=24)。その他にも、14,15-diHETEとSDAIに統計学的に優位な負の相関が得られた。また、19,20-diHDP AとSDAI投与量に統計学的に優位な正の相関が得られた。

【研究の方法(3)における成果】

本研究期間中は上記(1)、(2)の研究結果の進捗にとどまり、(3)における成果は得られなかった。2017年度にその検討を開始する予定である。

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1件)

村上 孝作、Specialized pro-resolving mediator (SPM)による関節炎およびリウマチ性疾患制御の可能性(総説)、日本臨床免疫学会会誌、査読なし、39巻、2016、155-163 DOI: 10. 2177/jsci. 39. 155

〔学会発表〕(計1件)

Isao Murakami, Kosaku Murakami, et al. The role of novel lipid mediators in connective tissue diseases. The 13th International Workshop on Autoantibodies on Autoantibodies and Autoimmunity (国際学会)、2016年10月11日-10月13日、京都

〔図書〕(計0件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.rheum.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
村上 孝作(MURAKAMI, Kosaku)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：70599927

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

村上 功 (MURAKAMI, Isao)