

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 6月 12日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591276

研究課題名（和文） 免疫難病モデルマウスを用いた生物学的製剤の分子作用機序の解明

研究課題名（英文） Analysis on the mechanism of action of biologic agents using mouse models of autoimmune disorders.

研究代表者

藤本 穰 (FUJIMOTO MINORU)

独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤推進研究部・主任研究員

研究者番号：00379190

研究成果の概要（和文）：本研究では生物学的製剤の作用機序を難病モデルマウス解析により明らかにした。炎症性腸疾患モデルでは、TNF 阻害抗体と IL-6R 阻害抗体が病原性ヘルパーT細胞の増殖阻害により効果を発揮し、後者は更に Th17/Treg 分化の制御作用を有していた。一方 TNFR-Fc 製剤ではどの効果も認められなかった。以上より各製剤の特性が明らかとなった。現在、新規製剤（アバタセプト）と新たな難病モデル（顕微鏡的多発血管炎）の解析が進行中である。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to investigate the mechanism of action of biologic agents by using mouse models of autoimmune diseases. The analysis of the inflammatory bowel disease model revealed that both anti-TNF antibody and anti-IL-6 receptor antibody can restrain expansion of colitogenic helper T cells, thereby exhibiting potent inhibitory effect on colitis. Anti-IL-6R antibody also could regulate the balance between Th17 cells and Treg cells. In contrast, another agent TNFR-Fc exhibited no suppressive effect on colitis. This study thus characterized the difference in the mechanism between biologic agents. Further studies on the new agent (abatacept) and on the new mouse model of microscopic polyangiitis are currently in progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学、自己免疫疾患、サイトカイン、生物学的製剤、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

免疫難病治療薬として新規の生物学的製剤が続々と開発されている。しかし、各製剤をどの疾患のどのような病態に使うべきか、その指標は全く確立されていない。こうした指標の確立にはまず、各製剤の作用機序の相

違を詳細に解明することが不可欠である。

2. 研究の目的

難病治療の新薬として注目される種々の生物学的製剤の作用機序を、モデルマウス解析により詳細に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

免疫難病モデルマウスを作製し、ヒト生物学的製剤と同様の効果を持つ製剤の投与を行い、治療効果とともに免疫系の変化を詳細に解析した。

4. 研究成果

炎症性腸疾患モデルマウスを作製し、TNF α 阻害療法と IL-6 阻害療法の比較を行った。TNF 阻害抗体と IL-6R 阻害抗体の両者が病原性ヘルパーT 細胞の増殖を阻害するという類似の作用機序をもち、腸炎を抑制することが明らかになった。さらに抗 IL-6 受容体抗体のみが、IL-17 産生細胞 (Th17) の出現を抑制すると同時に免疫制御性T細胞 (Foxp3⁺ Treg) の出現を促進することを見出した (図1)。

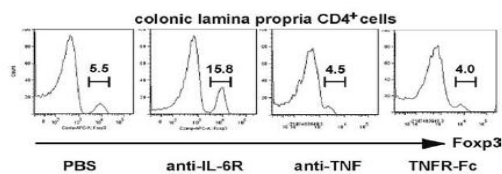


図1：製剤治療後の制御性T細胞 (Foxp3⁺ Treg) の出現

一方、TNF α 阻害作用をもつ「おとり型 TNF 受容体」(TNFR-Fc) は、TNF 阻害抗体でみられた作用がみられず、腸炎に対しても全く無効であった (図2)。

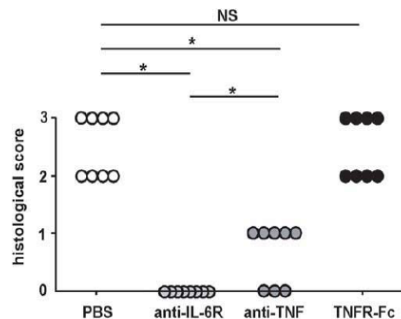


図2：製剤治療後の腸炎スコアの違い

上記によって明らかとなった製剤間の治療効果および作用機序の違いについて、炎症性腸疾患専門誌に報告した (Terabe F, Fujimoto M et al. *Inflamm Bowel Dis* 2011)。こうした作用の違いは、ヘルパーT 細胞が主体となる難治性病態への介入を検討する上で重要な情報である。現在、TNF α シグナルの主たる受け手となる免疫系細胞を同定すべく、TNFR KO マウスを入手して実験系を構築中である。また、新たに日本で認可された生物学的製剤 (CTLA4-Ig:abatacept) の炎症性腸疾患モデルマウスに対する有効性と作用機序について新たに検討を開始している。

顕微鏡的多発血管炎 (MPA) モデルマウス作製については、当初計画した新規疾患誘導法では期待した結果が得られなかったため、オプションとして想定していた別手法による疾患誘導プロトコールに基づき、MPO 欠損マウスに対してあらかじめMPO 蛋白による免疫を行うことにした。まず、免疫後のMPO 欠損マウスより調整したリンパ球を採取し、リンパ球欠損マウス (rag2 欠損マウス) へとトランスファーすることで疾患誘導を試みた。この結果、血管炎によると考えられる体重変化や尿所見の変化が得られており、さらなる疾患誘導および治療プロトコールの最適化を図っている。

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15件)

- ① Serada S, Fujimoto M, Terabe F, Iijima H, Shinzaki S, Matsuzaki S, Ohkawara T, Nezu R, Nakajima S, Kobayashi T, Plevy SE, Takehara T, Naka T. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 査読有, 2012, in press. Doi:10.1002/ibd.22936
- ② Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, Katayama I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res*, 査読有, 25(2), 2012, 219-230. Doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00945.x
- ③ Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, Naka T, Kishimoto T, Katayama I. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol*, 査読有, 180(1), 2012, 165-176. Doi:10.1016/j.ajpath.2011.09.013
- ④ Yamashita T, Iwakura T, Matsui K, Kawaguchi H, Obana M, Hayama A, Maeda M, Izumi Y, Komuro I, Ohsugi Y, Fujimoto M, Naka T, Kishimoto T, Nakayama H, Fujio Y. IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res*, 査読有,

- 91(4), 2011, 640-648.
Doi:10.1093/cvr/cvr148
- ⑤ Terabe F, Fujimoto M, Serada S, Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M, Hayashi N, Nomura S, Kawahata H, Jang MH, Miyasaka M, Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T, Naka T. Comparative analysis of the effects of anti-IL-6 receptor mAb and anti-TNF mAb treatment on CD4+ T-cell responses in murine colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 査読有, 17(2), 2011, 491-502. Doi:10.1002/ibd.21384
- ⑥ Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Lee CM, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, Naka T. Overexpression of SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*, 査読有, 129(4), 2011, 993-1005. Doi:10.1002/ijc.25716
- ⑦ Souma Y, Nishida T, Serada S, Iwahori K, Takahashi T, Fujimoto M, Ripley B, Nakajima K, Miyazaki Y, Mori M, Doki Y, Sawa Y, Naka T. Antiproliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells. *Int J Cancer*, 査読有, 2011, in press. Doi:10.1002/ijc.27350
- ⑧ Haruta H, Ohguro N, Fujimoto M, Hohki S, Terabe F, Serada S, Nomura S, Nishida K, Kishimoto T, Naka T. Blockade of interleukin-6 signaling suppresses not only th17 but also interphotoreceptor retinoid binding protein-specific Th1 by promoting regulatory T cells in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有, 52(6), 2011, 3264-3271. Doi:10.1167/iovs.10-6272
- ⑨ Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, Ripley B, Serada S, Nishikawa T, Kimura A, Nomura S, Kishimoto T, Naka T. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 査読有, 186(1), 2011, 32-40. Doi:10.4049/jimmunol.0903314
- ⑩ Serada S, Fujimoto M, Ogata A, Terabe F, Hirano T, Iijima H, Shinzaki S, Nishikawa T, Ohkawara T, Iwahori K, Ohguro N, Kishimoto T, Naka T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*, 査読有, 69(4), 2010, 770-774. Doi:10.1136/ard.2009.118919
- ⑪ Ripley BJ, Fujimoto M, Serada S, Ohkawara T, Nishikawa T, Terabe F, Matsukawa Y, Stephanou A, Knight RA, Isenberg DA, Latchman DS, Kishimoto T, Naka T. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits cell signaling by inducing SOCS1 gene expression. *Int Immunol*, 査読有, 22(5), 2010, 359-366. Doi:10.1093/intimm/dxq015
- ⑫ Hohki S, Ohguro N, Haruta H, Nakai K, Terabe F, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Kawahata H, Kishimoto T, Naka T. Blockade of interleukin-6 signaling suppresses experimental autoimmune uveoretinitis by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Exp Eye Res*, 査読有, 91(2), 2010, 162-170. Doi:10.1016/j.exer.2010.04.009
- ⑬ Fujimoto M, Naka T. SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterol Res Pract*, On line, 査読有, 2010, pii:470468. Doi:10.1155/2010/470468
- ⑭ 藤本 穰、Th17 細胞とレギュラトリー T 細胞のバランスを決定する要因、臨床免疫・アレルギー科、査読無、53 巻、2010、413-418、DOI・http:なし
- ⑮ 大河原知治、藤本 穰、仲哲治、IL-6 阻害による自己免疫性関節炎治療効果は Th17 抑制を介している、リウマチ科、査読無、43 巻、2010、62~67、DOI・http:なし
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Fumitaka Terabe, Tetsuji Naka, Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is a novel biomarker for monitoring disease activity in patients with Ulcerative Colitis, 第 40 回日本免疫学会総会, 2011/11/28, 幕張メッセ (千葉市)
- ② Yan L, Fujimoto M, Serada S, Murota H, Kotobuki Y, Kitaba S, Katayama I, Naka T, TGFbeta1 promotes bleomycin induced murine dermal sclerosis via its downstream molecule of periostin, 9th Joint Meeting of International Cytokine Society and International

- Society for Interferon and Cytokine Research, 2011/10/11, イタリア (フィレンツェ)
- ③ Ripley B, Fujimoto M, Han A, Millrine D, Lee S, Kawai T, Akira S, Naka T, Kishimoto T, Nuclear receptor PPAR-gamma interacts with IRF7 to negatively regulate TLR7/9-mediated type I interferon production and the development of murine lupus, 9th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, 2011/10/10, イタリア (フィレンツェ)
- ④ 藤本 穰, 仲 哲治, Tregの分化、機能における IL-6 の作用、第31回日本臨床免疫学会総会(招待講演)、2011/9/17、京王プラザ (東京)
- ⑤ Satoshi Serada, Takuhei Yokoyama, Takayuki Enomoto, Shinya Matsuzaki, Akiko Morimoto, Ayako Kim, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka, 定量的プロテオーム解析による子宮内膜癌抗原蛋白質の探索、第9回日本プロテオーム学会、2011/7/29、新潟市朱鷺メッセ
- ⑥ T. Ohkawara, B. Ripley, M. Fujimoto, T. Naka, MYD88 GENE KNOCKOUT INHIBITS THE DEVELOPMENT OF LUPUS-LIKE DISEASE IN NZB/W F1 MICE, EULAR, 2011/5/28, イギリス (ロンドン)
- ⑦ B. Ripley, M. Fujimoto, S. Serada, L.-L. Yang, F. Terabe, Y.-M. Han, T. Ohkawara, T. Nishikawa, T. Naka, NUCLEAR RECEPTOR PPAR-GAMMA NEGATIVELY REGULATES TYPE I INTERFERON PRODUCTION VIA INTERACTION WITH IRF7, EULAR, 2011/5/27, イギリス (ロンドン)
- ⑧ L. Yang, M. Fujimoto, S. Serada, H. Murota, B. Ripley, S. Kitaba, Y. Kotobuki, T. Naka, I. Katayama, PERIOSTIN GENE KNOCKOUT IS PROTECTIVE AGAINST THE DEVELOPMENT OF BLEOMYCIN-INDUCED MURINE SKIN SCLERODERMA, EULAR, 2011/5/27, イギリス (ロンドン)
- ⑨ Takuhei Yokoyama, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Shinya Matsuzaki, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Kiyoshi Yoshino, Ayako Kim, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka, Quantitative proteomic analysis of cell-surface membrane proteins: Biomarker discovery in endometrial cancer, AACR, 2011/4/6, アメリカ (オーランド)
- ⑩ Maiko Urase, Satoshi Serada, Yoshihito Souma, Kouta Iwahori, Kazuki Shimada, Toshiro Nishida, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka, SOCS-1,-3 gene delivery in gastric cancer cells induces a potent anti-proliferative effect via the suppression of JAK/STAT and P38 MAPK signaling pathways, AACR, 2011/4/4, アメリカ (オーランド)
- ⑪ Fujimoto M, Kotobuki Y, Kitaba S, Ukita T, Terabe F, Haruta H, Kishimoto T, Naka T, The effect of IL-6 overproduction in vivo on wound healing, Cytokines in Infectious Diseases, Autoimmune Disorders and Cancer (Cytokines 2010), 2010年10月4日, アメリカ(シカゴ)
- ⑫ Fujimoto M, Terabe F, Ukita T, Mei Y, Serada S, Nishikawa T, Ripley B, Kishimoto T, Naka T, The effect of IL-6 overproduction on T helper cell differentiation in vivo, 14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日 ポートピアホテル(神戸)
- ⑬ Ohkawara T, Fujimoto M and Naka T, Myd88 gene knockout inhibits the development of lupus-like disease in NZB/W F1 mice, Tri-Society Annual Conference 2009年10月20日ポルトガル(リスボン)

[その他]

参照ホームページ:

<http://www.nibio.go.jp/cgi-bin/new/view.cgi?no=939>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 穰 (FUJIMOTO MINORU)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤推進研究部・主任研究員

研究者番号: 00379190