

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 4 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591939

研究課題名（和文） IL-1beta, IL-18を活性化するASCを標的とした関節リウマチ治療実験

研究課題名（英文） ASC plays a role in the IL-1beta, IL-18 pathway of the immune response to type II collagen in collagen-induced arthritis

研究代表者

竹岡 みち子 (TAKEOKA MICHIKO)

信州大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30197280

研究成果の概要（和文）：IL-1 β 、IL-18の活性化に主として関わるASCは、II型コラーゲン誘発性関節炎に関与しており、ASC欠失マウスでは炎症が抑制されていることが示されたが、コラーゲン抗体が生成された後のモデルとして行った抗II型コラーゲン抗体誘発関節炎では野生型、ASC欠失型に炎症の差が見られず、ASCの関与が認められなかった。このことから、ASCはII型コラーゲン誘発関節炎においてII型コラーゲンに対する抗体産生以前の免疫反応初期段階で関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the involvement of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruit domain (ASC) in the progression of murine collagen-induced arthritis (CIA) and collagen antibody-induced arthritis (CAIA) using ASC-deficient (ASC^{-/-}) and wild-type (ASC^{+/+}) mice. Analyses were performed by immunohistochemistry for tissues and ELISA for sera. We observed an increase in the expression of ASC, as well as IL-1 β and IL-18, in the joints of CIA DBA mice, which indicated that ASC is involved in disease development. Next, we demonstrated that the infiltration of inflammatory cells and cartilage/bone destruction in CIA knee joints were significantly increased in ASC^{+/+} mice compared with ASC^{-/-} mice. No such differences were noted in ASC^{+/+} and ASC^{-/-} CAIA mice. In terms of cytokine expression in knee joints, IL-1 β and IL-18 were depressed in ASC-deficient CIA mice compared with wild-type mice, but were similarly expressed in CAIA joints in both mice groups. Taken together, we can conclude that ASC is involved in the development of CIA and plays a role in the priming phase of the immune response to type II collagen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：リウマチ病学・ASC

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

近年、関節リウマチの薬物治療は大きく変化し、炎症性サイトカインの働きを抑える各種の抗サイトカイン療法が開発されている。そのひとつであるレミケード等のTNF \cdot の抗体製剤による治療ではリウマチ患者の炎症及び骨破壊に劇的に効力を発揮するが、40%の患者ではその効果は一時的か全く効果がない(Khoury M et al., Arth Rheum, 2008)。現在アメリカで認可されているアナキンラはIL-1 β に対する抗体製剤であるが、強力な関節リウマチ治療薬とは言えない。

そこで、我々はIL-1 β , IL-18の系に着目した。滑膜炎から骨破壊に至る関節リウマチにはIL-1 β , IL-6が直接的に作用するとの考えに加え、様々なサイトカインの関与が報告されて来たが、中でも近年脚光を浴びているサイトカインがIL-18である(Amin MA et al., Arth Rheum, 2007; Khoury M et al., 2008)ため、我々はIL-1 β , IL-18両サイトカインの活性化に重要な役割を持つASCに注目した。

リウマチ性疾患には病原体の感染の関与も一因として挙げられているが、Toll-like receptor (TLR)およびNucleotide-binding domain (NOD)を含むシグナル伝達系については未だ不明であり、リウマチ性関節炎とASCを結びつける報告は殆ど無い。しかし我々は、予備実験により、コラーゲン誘発関節炎を起こすとASCの発現量が増加していることを確認しており、またASC欠失マウスでの滑膜炎の抑制傾向を観察しているため、関節リウマチにおけるASCの役割を検討した。

(2) 応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

ASCは1999年に世界に先駆けて当研究室で発見した(Masumoto J, JBC)が、その後病原体のセンサーとなるNODファミリーが次々と見つかってASCとの相互作用が立証され、ASCが自然免疫の要的分子であることが認知されるに至って、新しい自然免疫研究が始まった。ASCは、LPS等の病原体の刺激を受けたTLRファミリー(Mariathasan S et al., Nature Rev, 2007)、およびNODファミリー蛋白質からのシグナルによりインフラマゾームにおいてカスペース1を活性化し、その活性化されたカスペース1がIL-1 β , IL-18の前駆体を活性化型へと変える。我々は、野田哲生博士(癌研)とともにASC欠失マウスを作

成し、マクロファージでのIL-1 β , IL-18産生がASC欠失マウスで著しく抑制されていることを報告している(Yamamoto M, 2004, Genes to Cells)。

最近、Abdollahi-Roodsaz S等が、II型コラーゲンと不活性結核菌のエマルジョン皮下注入で作るコラーゲン誘発関節炎モデルで、IL-1 β の活性化がLPS同様、TLR4を介していること(Arth Rheum, 2007)、また、滑膜炎の炎症がTLR4に加えてTLR3/7をも介していることを(Ann Rheum Dis, 2008)報告していることから、リウマチ疾患におけるTLRsを介したASCの関与が示唆された。

そこで、IL-1 β およびIL-18を活性化するASCに焦点を当て、これら過剰サイトカインの活性化を抑制してリウマチ性滑膜炎、軟骨破壊を防ぐ治療法を検討した。

作成したASC欠失マウスはC57BL/6であり、コラーゲン誘発関節炎モデルができにくいこと既に関節炎モデルであるDBAマウスとのバッククロスを進めていて、実験に入る準備はできていた。

2. 研究の目的

関節リウマチでは、過剰に産生されたIL-1 β , IL-6が骨・軟骨破壊を引き起こすが、滑膜炎、軟骨破壊におけるIL-18の関与も注目されて来ている。当研究室発見のASCはIL-1 β およびIL-18を活性化する自然免疫の中心的分子であり、最近コラーゲン誘発関節炎が、ASCが働くLPS刺激の系と同じ受容体を介することが報告されたことから、関節リウマチにおけるASCの大きな役割が示唆された。

そこで、ASCの抑制がIL-1 β , IL-18の活性化を抑え、関節リウマチにおける滑膜炎、骨・軟骨破壊を防ぐ治療薬の開発につながるかを検討した。

(1) 研究期間内に、まず、コラーゲン誘発関節炎処理したASC欠失DBAマウスにおいて、IL-1 β , IL-18を初めとする種々の炎症物質の放出、および滑膜炎、骨・軟骨破壊が野生型マウスに較べて抑えられているかを評価した。

次に、患者から樹立した滑膜炎細胞を用いた*in vitro*実験で、siRNAによりASCの発現を抑制すればIL-1 β , IL-18を初めとする種々の炎症物質の放出が抑えられるか、またコラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いた*in vivo*実験において、関節へASC・siRNAを注入することで関節の病理所見を、予防または

改善できるかを明らかにし、シグナル伝達系を解明した。

(2) 当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

特色は、関節リウマチの滑膜炎症、骨・軟骨破壊に関わる IL-1 β 、IL-18 を上流で活性化する ASC を治療薬として標的にすることであり、予想される結果と意義については、関節リウマチにおいて、ASC 抑制により過剰の IL-1 β 、IL-18 の活性化を阻害して下流の炎症性サイトカイン、マトロプロテアーゼ、破骨細胞等の発現・増加、ひいては骨・軟骨破壊を抑えるという結果が予想され、ASC 制御による、リウマチ治療薬の開発を探る点で意義があると考えた。

本研究が成功した場合、TNF・抗体製剤と同等の効果、および TNF・抗体製剤の効果の見られない患者に対しての有効な治療薬になると予想された。

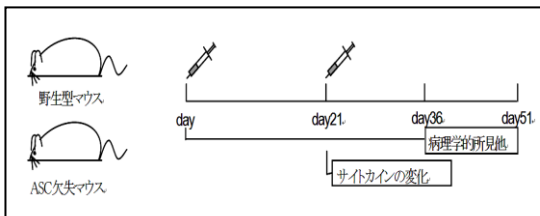
リウマチ専門医である信州大学運動機能教授・加藤博之、同じくリウマチ専門医である山崎秀(大学院生)、また信州大学病理学准教授を加えて準備を始めている上に、ASC は当研究室で発見した蛋白質であって機能を熟知していること、ASC の欠失マウスを作成しており実験の基盤があることが強みであった。

3. 研究の方法

平成 21 年度

(1) コラーゲン誘発関節炎における病理所見が、ASC 欠失 DBA マウスで抑えられているかの検討

ASC 欠失マウスのバックグラウンドは



C57BL/6 なのでコラーゲン誘発関節炎ができてくれない。そこで関節炎のモデルマウスである DBA マウスとのバッククロスを進めていた。

野生型および ASC 欠失 DBA マウスの尾底部皮下に、II 型コラーゲンとアジュバンド CFA (H37Ra-不活性結核菌) の混合エマルジョン

を注入した。

病的所見を観察した上で、21 日後に同じ内容の注入を繰り返した。病的所見は、四肢の関節の状態を 4 段階に分け、週 3 回、2 人が独立で計測することでまとめた。2 回目のコラーゲンとアジュバンドのエマルジョン注入後、およそ 15-30 日の間の、野生型と ASC 欠失マウス間に病的所見に差が出た所で全マウスを屠殺し、下記の病理組織学的解析を行った。

- ・ X 線撮影により、骨密度および変形度、骨びらんの観察を行った。

- ・ 両膝をホルマリン固定した後、脱灰して切片を薄切し、HE 染色および免疫染色に使用した。HE 染色切片では、滑膜細胞や周辺組織への炎症細胞の浸潤、パンヌス形成、軟骨細胞の数および細胞死、軟骨破壊、骨浸潤等を計測して数値化した。

- ・ 組織免疫染色ではまず、軟骨および滑膜組織での IL-1 β 、IL-18 の発現量を観察し、蛍光染色 (Alexa) 量をコンフォーカル・レーザー顕微鏡で数値化して野生型、ASC 欠失マウス間の差を調べた。また ELISA による測定も行う。破骨細胞分化因子である RANKL 量も同様に計測した。

- ・ 骨・軟骨破壊において見られる MMP-3 のレベル上昇の指標として、その基質であるプロテオグリカンをサフラニン 0 で染色し、定量して差を検討した。

- ・ 上記項目で、ウエスタン・ブロットに供せられるものはこの方法で更に確認した。

(2) コラーゲン誘発関節炎におけるサイトカイン等の変動が、ASC 欠失マウスで抑えられるかの検討

上記同様、1 回目、2 回目のコラーゲンとアジュバンドのエマルジョンの注入を行い、2 回目注入後 4 時間で血液を採取して定量的 RT-PCR により種々の炎症性サイトカインの定量を行った。TNF- α 、IL-1 β および IL-18 (RNA の変動も測定する意味で)、IL-6、IL-10、MMP-3 等の項目とした。これにより、病原体刺激による早期のサイトカインの動きに対する ASC の役割を知る事ができた。

平成 22 年度、23 年度

(1) In vitro で、siRNA での ASC 発現低下による、治療予備実験を行った。

ASCの発現をsiRNAにより抑制した時、下流のサイトカインおよび骨・軟骨破壊に至るまでの種々の因子の抑制ができるかを、リウマチ性関節炎患者より不活化した滑膜細胞、MH7A(理研)を用いて実験した。この細胞はIL-1 β の刺激によりIL-6を放出することが確認されている細胞であり、直接的に破骨細胞の分化を促進すると報告される細胞である。ASCのsiRNA処理により起こる増殖抑制を観察し、IL-1 β 、IL-18、IL-6、IL-8、MMP-1、MMP-3等の変化をELISA、定量的RT-PCRで定量する。またRANKLを定量して、破骨細胞の分化度の測定も行った。滑膜細胞で結果が出にくい場合は、患者のマクロファージを培養し、同実験を行った。

(2) In vivoでのsiRNA・ASCによる治療実験を行った。

コラーゲン誘発関節炎を起こしたDBAマウスの膝関節内に、ASCのsiRNAを膜活性化ポリマーで修飾して(Rozema DB, 2007, PNAS)導入効率を上げ、注入する。平成21年度に検討するin vitroでの炎症性サイトカインの変動を基に、in vivo実験において、滑膜炎および骨・軟骨破壊等の病理的所見が、siRNA注入マウスの関節で改善されていることを検証した。

4. 研究成果

IL-1 β 、IL-18活性化に主として関わるASCは、II型コラーゲン誘発性関節炎に関与しているが、抗II型コラーゲン抗体誘発関節炎では関与が認められなかったことから、ASCはII型コラーゲン誘発関節炎においてII型コラーゲンに対する抗体産生以前の免疫反応初期段階で関与していることが示唆された。

以上よりASCの関与するIL-1 β 、IL-18の上流に関わる経路を阻害することによって、RA病態の解明と新しい治療薬の開発につながる可能性が示された。

以上の成果を、2009および2010のアメリカリウマチ学会で発表したところ、高い評価を受け、関係分野の研究者より共同研究の申し出でもあった。

また、これらの成果は、2011年2月、Rheumatology Internationalに論文として受理された。

現在、これらの結果をもとに、リウマチ患者の血球におけるASC発現の特異性を調べるべく、FACSを用いて臨床研究を始めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

Hideshi Yamazaki · Michiko Takeoka ·

Masato Kitazawa · Takashi Ehara ·

Naoki Itano · Hiroyuki Kato ·

Shun'ichiro Taniguchi:

ASC plays a role in the priming phase of the immune response to type II collagen in collagen-induced arthritis.

Rheumatology International Feb 18. [Epub ahead of print], 2011 査読有り

[学会発表] (計 3件)

①Yamazaki Y, Takeoka M, Kitazawa M, Ehara T, Itano N, Kato H, Taniguchi S:

ASC plays a role in the priming phase of the immune response to type II collagen in collagen-induced arthritis. 2010 ACR annual scientific meeting, 2010, Oct 6-10, Atlanta, USA

②山崎 秀、加藤博之: コラーゲン誘発関節炎におけるアポトーシス制御蛋白ASCの役割。第54回日本リウマチ学会総会 2010.4.22, 神戸

③Yamazaki Y, Takeoka M, Kitazawa M, Ehara T, Itano N, Kato H, Taniguchi S:

ASC Deleted Mice Are Resistant to Collagen-Induced Arthritis. 2009 ACR annual scientific meeting, 2009 Oct 17-21, Philadelphia, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹岡 みち子 (TAKEOKA MICHIKO)

信州大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 30197280

(2) 研究分担者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI SHUNICHIRO)

信州大学・医学系研究科 教授

研究者番号: 60117166

江原孝史 (EHARA TAKASHI)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号: 00203646

(3) 連携研究者

加藤 博之 (KATO HIROYUKI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：40204490

相良 淳二 (SAGARA JUNJI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：10225831

(4) 研究協力者

山崎 秀 (YAMAZAKI HIDESHI)
信州大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし