

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591435

研究課題名(和文)カンナビノイドによる炎症抑制作用の解明と関節リウマチの新規治療開発

研究課題名(英文)Cannabinoid Receptor 2 as a potential therapeutic target in Rheumatoid Arthritis

研究代表者

南木 敏宏(Nanki, Toshihiro)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：00282749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：カンナビノイド受容体2(CB2)特異的アゴニストによる関節炎抑制効果を解析した。関節リウマチ(RA)滑膜組織のマクロファージ、線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)、T細胞、B細胞にCB2の発現がみられた。CB2特異的アゴニスト(JWH133)は、TNF刺激によるFLSからのIL-6、MMP-3、CCL2の産生亢進を抑制し、また、RANKL+M-CSF刺激による末梢血単球からの破骨細胞分化を抑制した。また、JWH133をマウスコラーゲン関節炎に投与したところ、関節炎の程度、関節の滑膜組織への炎症細胞浸潤、骨破壊が抑制された。CB2アゴニストはRAの新規治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated therapeutic effects of a selective cannabinoid receptor 2 (CB2) agonist on arthritis. Immunohistochemistry showed that CB2 was expressed on macrophages, fibroblast-like synoviocytes (FLS) and lymphocytes in the synovial tissues from rheumatoid arthritis (RA). JWH133, a selective CB2 agonist, inhibited IL-6, MMP-3 and CCL2 production from TNF-stimulated FLS, and osteoclastogenesis of peripheral blood monocytes. Administration of JWH133 to murine collagen type II (CII)-induced arthritis (CIA) reduced the arthritis score, inflammatory cell infiltration, bone destruction, and anti-CII IgG1 production. The results suggested that a selective CB2 agonist could be a new therapy for RA that inhibits production of inflammatory mediators from FLS, osteoclastogenesis, and autoantibody production.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科

キーワード：関節リウマチ カンナビノイド

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は慢性の多発関節炎を特徴とし、病期の進行に伴い関節の骨破壊、手指や足趾などの関節変形がみられるようになり、日常生活の制限、延いては寝たきり状態となることもある。我が国のRA患者数は70-100万人といわれており、従来のRA治療は免疫抑制作用を持つ副腎皮質ステロイド薬、抗リウマチ薬が中心であった。近年、抗TNF抗体などの生物学的製剤により優れた臨床的効果と予後改善がみられるようになったが、それでもなお薬剤抵抗例がみられている。また、生物学的製剤は非常に高価であるため、社会的理由で使用できない患者が存在すること、免疫抑制作用による感染症の発症が問題となっている。そのため、免疫抑制作用を主体とした従来の治療薬ではない、また安価な低分子化合物による新たな治療法の開発が必要とされている。

近年脂質メディエーターの免疫系への関与が注目されている。カンナビノイド(CB)は大麻に含まれる化学物質の総称であるが、内因性のCB(アナンダミド、2-アラキドノイルグリセロール)は脂質メディエーターの一つであり、CB受容体はCB<sub>1</sub>、CB<sub>2</sub>の2種類が同定されている。CB<sub>1</sub>は主に中枢神経系に、CB<sub>2</sub>は免疫細胞に発現が認められる。このことは大麻による中枢神経作用はCB<sub>1</sub>を介していることを示唆している。一方CB<sub>2</sub>は免疫系への関与が示唆され、CB<sub>2</sub>特異的なアゴニストによりT細胞増殖やサイトカイン産生が抑制されること、またケモカインによる単球の遊走作用が抑制されることが報告されている。これらのことより、CB<sub>2</sub>特異的なアゴニストは中枢神経系への影響が無く、免疫細胞に対して炎症抑制的に働くと考えられる。RA滑膜組織ではウェスタンブロットにてCB<sub>2</sub>の発現が報告されており、また当研究グループにおいてCB<sub>2</sub>がRA滑膜組織に発現していることを免疫染色にて確認した。これらのことより、CB<sub>2</sub>特異的なアゴニストがRA炎症滑膜組織において炎症抑制作用を持つことが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究ではCB<sub>2</sub>特異的なアゴニストによるRAに対する新規治療法の開発を目的とし、RA病態形成に関わる各種免疫担当細胞へのCB<sub>2</sub>アゴニストの炎症抑制作用を解析し、また、関節炎モデル動物に対する関節炎抑制効果を解析する。これまでの免疫抑制薬とは全く異なる脂質メディエーター受容体をターゲットとした治療開発であり、感染症などの副作用の少ない治療法が期待される。

### 3. 研究の方法

(1)RA滑膜組織でのCB<sub>2</sub>発現、およびCB<sub>2</sub>特異的なアゴニストによる炎症抑制。

RA患者の関節滑膜組織における、CB<sub>2</sub>の発現を免疫染色にて解析する。変形性関節症(OA)の滑膜組織でのCB<sub>2</sub>発現と比較する。次

に、単球/マクロファージ、T細胞、B細胞、線維芽細胞に特異的な抗体と、CB<sub>2</sub>を二重染色し、CB<sub>2</sub>の発現細胞を同定する。

RA滑膜組織より線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)を*in vitro*で樹立培養する。FLSのCB<sub>2</sub>発現をウェスタンブロットにて解析。次にTNFでFLSを刺激し、その際にCB<sub>2</sub>特異的なアゴニストであるJWH133を投与し、培養上清中のIL-6、CCL2、MMP-3をELISAで測定する。

末梢血単球を単離し、破骨細胞に分化誘導するためM-CSFおよびRANKLで刺激する。その際にCB<sub>2</sub>特異的なアゴニスト、JWH133を投与する。TRAP染色により、TRAP陽性、多核の破骨細胞数を計測し破骨細胞分化への影響を観察する。またコートしたカルシウムの吸収窩の面積を測定する。

(2)関節炎モデル動物における、CB<sub>2</sub>特異的なアゴニストによる関節炎抑制効果の解析。

型コラーゲン免疫により関節炎を発症するマウス(コラーゲン関節炎)に、JWH133を投与し関節炎抑制効果を解析する。関節炎の評価は、関節炎の程度は関節炎スコア、および足の厚さで評価し、また組織学的な炎症細胞浸潤、X線写真による骨破壊の評価も行う。CB<sub>2</sub>アゴニストの投与は関節炎発症前から、および発症後からも行い、関節炎抑制効果および治療効果を解析する。

CB<sub>2</sub>アゴニスト投与による免疫反応への*in vivo*での影響をコラーゲン関節炎マウスにて検討する。マウス脾細胞を型コラーゲンで刺激し、IFN- $\gamma$ 、IL-17産生をELISAで測定する。また血清中の抗コラーゲン抗体価を測定する。

### 4. 研究成果

(1)RA滑膜組織におけるCB<sub>2</sub>発現。

RA滑膜組織を用いて、CB<sub>2</sub>の発現を免疫染色にて解析した。図1に示すように、RA滑膜ではCB<sub>2</sub>の発現が強くみられた。一方、OA滑膜ではCB<sub>2</sub>の発現はわずかであった。

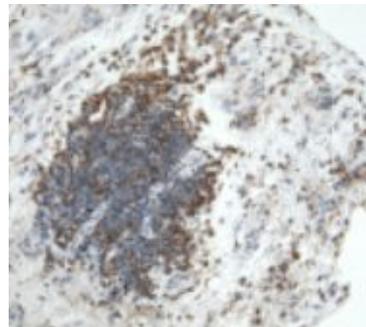


図1 RA滑膜組織でのCB<sub>2</sub>発現。

RA滑膜組織の二重染色により、CD68陽性マクロファージ、CD4、CD8陽性T細胞、CD21陽性B細胞、vimentin陽性のFLSに、CB<sub>2</sub>の発現がみられた。

以上より、RA滑膜組織では、CB<sub>2</sub>の発現は増強しており、マクロファージ、T細胞、B細胞、FLSに発現している。

(2)CB<sub>2</sub>アゴニストによる FLS 活性化、破骨細胞分化抑制作用。

RA 滑膜より FLS を *in vitro* で培養し、CB<sub>2</sub> が発現していることをウェスタンブロットで確認した。FLS を TNF で刺激し、その際、CB<sub>2</sub> 特異的アゴニスト、JWH133 を投与し、培養上清中の IL-6、MMP-3、CCL2 の濃度を測定した。図 2 に示すように、TNF 刺激により IL-6、MMP-3、CCL2 の発現上昇がみられたが、JWH133 の投与により、その発現上昇が有意に抑制された。

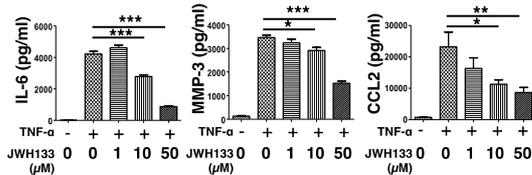


図 2 CB<sub>2</sub> 特異的アゴニストによる、FLS からの TNF 刺激による炎症メディエーター産生の抑制。

末梢血単球を RANKL+M-CSF で刺激し、破骨細胞に分化誘導する際に、CB<sub>2</sub> 特異的アゴニストを投与し、破骨細胞分化の変化を解析した。図 3 に示すように、JWH133 の投与により、TRAP 陽性多核の破骨細胞数は明らかに減少していた。また、カルシウム吸収能も抑制された。

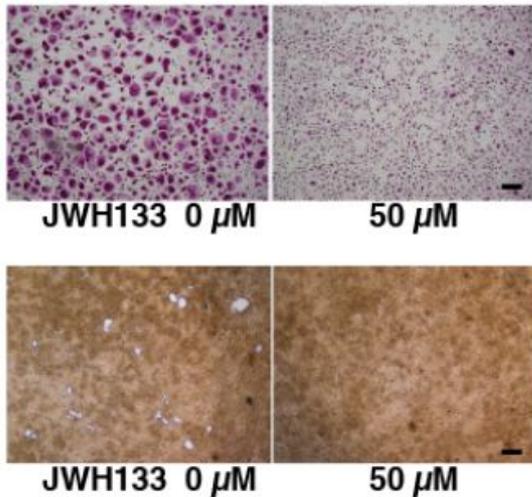


図 3 末梢血単球を RANKL+M-CSF で培養し、JWH133 を投与。TRAP 染色(上段)。カルシウムをコートしたプレートで培養し、カルシウム吸収窩を解析(下段)。

これらの結果より、CB<sub>2</sub> 特異的アゴニストは FLS の活性化抑制、また破骨細胞の分化抑制作用があることが見出された。

(3)マウスコラーゲン関節炎に対する CB<sub>2</sub> 特異的アゴニストの抑制効果。

マウスコラーゲン関節炎に、関節炎発症前より JWH133 を投与し、関節炎の程度を関節炎スコアにて評価した。図 4 に示すように、JWH133 の投与により、関節炎スコアが有意に低値であった。また、足の厚さの増大も JWH133 の投与により軽減された。

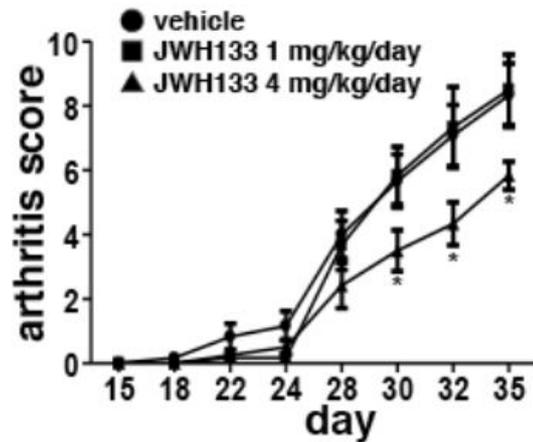


図 4 マウスコラーゲン関節炎に、関節炎発症前より JWH133 を投与し、関節炎の程度を関節炎スコアで評価。

足関節を HE 染色し、組織学的評価を施行。JWH133 の投与により、滑膜組織への炎症細胞浸潤が抑制された(図 5)。また、足関節の骨破壊の程度を X 線にて評価したが、JWH133 の投与により骨破壊も有意に抑制された(図 5)。



図 5 マウスコラーゲン関節炎の足関節を HE 染色(上段)。足関節の X 線写真(下段)。

これらのマウスより脾細胞を採取し、コラーゲン刺激し、IFN- $\gamma$ 、IL-17 の産生を解析した。コラーゲン免疫により、IFN- $\gamma$ 、IL-17 の産生は増加していたが、JWH133 投与マウスに IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生の変化はみられなかった。

血清中のコラーゲン抗体価を測定した。コラーゲン免疫により、抗コラーゲン抗体の産生が認められた。JWH133 投与マウスでは、IgG1 抗コラーゲン抗体が減少していた。IgG2a、IgG2b 抗コラーゲン抗体には変化がみられなかった。

マウス関節炎は CB<sub>2</sub> 特異的アゴニストにより抑制された。その機序として、FLS 活性化抑制、破骨細胞分化抑制、炎症細胞遊走抑制、抗体産生抑制が考えられる。Th 分化への影響は認めなかった。

次に、関節炎発症後から、JWH133 を投与し、同様に関節炎の程度を評価した。図 6 に示すように、関節炎発症後からの投与でも、関節炎抑制効果がみられた。

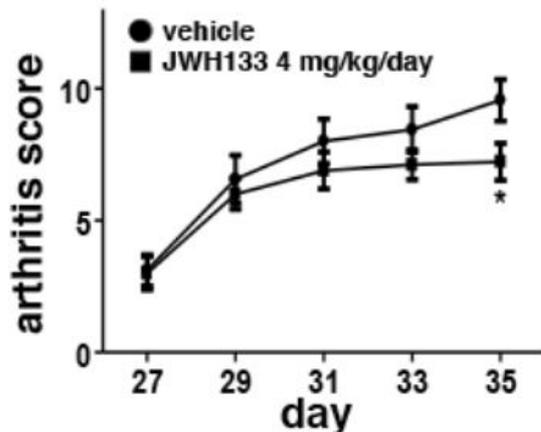


図 6 マウスコラーゲン関節炎に対して、関節炎発症後から JWH133 を投与し、関節炎の程度を関節炎スコアにて評価。

これらの結果より、CB<sub>2</sub> 特異的アゴニストは、滑膜細胞活性化抑制、破骨細胞分化抑制、炎症細胞遊走抑制、抗体産生抑制能を有し、RA に対する新規治療薬として期待できると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

- Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Ohkawa R, Albers HM, Ovaa H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N, Nanki T. Necessity of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 for Development of Arthritis. *Arthritis Rheum.* 査読有 65: 2013: 2037-2047. doi: 10.1002/art.37991.
- Takayasu A, Miyabe Y, Yokoyama W, Kaneko K, Miyabe C, Fukuda S, Kubota T, Miyasaka N, Nanki T. CCL18 activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 査読有 40: 2013: 1026-1028. doi: 10.3899/jrheum.121412.
- Nanki T, Onoue I, Nagasaka K, Takayasu A, Ebisawa M, Hosoya T, Shirai T, Sugihara T, Hirata S, Kubota T, Harigai M, Miyasaka N. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann. Rheum. Dis.* 査読有 72: 2013: 1100-1102. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202768.
- Uto-Konomi A, McKibben B, Wirtz J, Sato Y, Takano A, Nanki T, Suzuki S. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 431: 2013: 772-776. doi:

10.1016/j.bbrc.2013.01.032.

- Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheum.* 査読有 65: 2013: 503-512. doi: 10.1002/art.37784.
- Suzuki F, Kubota T, Miyazaki Y, Ishikawa K, Ebisawa M, Hirohata S, Ogura T, Mizusawa H, Imai T, Miyasaka N, Nanki T. Serum level of soluble CX3CL1/fractalkine is elevated in patients with polymyositis and dermatomyositis, which is correlated with disease activity. *Arthritis Res. Ther.* 査読有 14: 2012: R48. doi: 10.1186/ar3761.
- Komano Y, Yagi N, Onoue I, Kaneko K, Miyasaka N, Nanki T. Arthritic joint-targeting small interfering RNA-encapsulated liposome: Implication for treatment strategy for rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 査読有 340: 2012: 109-113. doi: 10.1124/jpet.111.185884.
- Kaneko K, Miyabe Y, Takayasu A, Fukuda S, Miyabe C, Ebisawa M, Yokoyama W, Watanabe K, Imai T, Muramoto K, Terashima Y, Sugihara T, Matsushima K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 査読有 13: 2011: R158. doi: 10.1186/ar3475.

[学会発表](計 46 件)

- Honda H, Serada S, Fujimoto M, Hattori K, Ogata A, Nanki T, Takeuchi T, Naka T. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a potential disease activity marker under IL-6 suppression in autoimmune arthritis. ヨーロッパリウマチ学会、2013/6、マドリード
- Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Ohkawa R, Albers HM, Ovaa H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N, Nanki T. Lysophosphatidic acid receptor LPA<sub>1</sub> is essential for development of arthritis. ヨーロッパリウマチ学会、2013/6、マドリード
- 宮部齊重、宮部千恵、福田真、横山和佳、宮坂信之、南木敏宏。リゾフォスファチジン酸受容体 1(LPA<sub>1</sub>) 欠損による関節炎抑制。第 57 回日本リウマチ学会総会、2013/4、

京都

Miyabe C, Miyabe Y, Miura N, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. 第 76 回アメリカリウマチ学会、2012/11、ワシントン DC

Nanki T, Onoue I, Nagasaka K, Hirata S, Hosoya T, Ebisawa M, Sugihara T, Harigai M, Miyasaka N. Anti-IL-6 autoantibody inhibited elevation of serum C-reactive protein level in two patients with severe bacterial infection. ヨーロッパリウマチ学会、2012/6、ベルリン

宮部千恵、宮部齊重、大野尚仁、高橋啓、宮坂信之、南木敏宏。Am80 による *Candida albicans* water-soluble fraction 誘導血管炎の抑制効果。第 56 回日本リウマチ学会総会、2012/4、東京

福田真、高安愛子、横山和佳、宮部千恵、宮部齊重、宮坂信之、南木敏宏。カンナビノイドによる関節炎抑制作用。第 56 回日本リウマチ学会総会、2012/4、東京

宮部齊重、宮部千恵、高安愛子、福田真、横山和佳、宮坂信之、南木敏宏。オートタキシン/リゾフォスファチジン酸受容体を標的とした関節リウマチの新規治療法開発。第 56 回日本リウマチ学会総会、2012/4、東京

横山和佳、金子佳代子、高安愛子、福田真、宮部齊重、宮部千恵、宮坂信之、南木敏宏。関節リウマチの病態形成における CCL25/CCR9 相互作用の関与。第 56 回日本リウマチ学会総会、2012/4、東京

高安愛子、宮部齊重、金子佳代子、宮部千恵、横山和佳、福田真、窪田哲朗、宮坂信之、南木敏宏。CCL18 による関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞の活性化。第 56 回日本リウマチ学会総会、2012/4、東京

Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Morio T, Ohno N, Shudo K, Yamagata N, Suzuki K, Suzuki J, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T. Am80 ameliorates murine model of vasculitis via suppression of neutrophil and endothelial cell activation. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop、2012/3、東京

Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Ebisawa M, Miyasaka M, Miyasaka N, Nanki T. Autotaxin and Lysophosphatidic Acid Receptors: Potential Target Molecules in New Therapies for Rheumatoid Arthritis. Keystone Symposia, Chemokines and Leukocyte Trafficking in

Homeostasis and Inflammation、2012/1、Breckenridge, USA

宮部千恵、宮部齊重、三浦典子、高橋啓、寺島裕也、大野尚仁、森尾友宏、松島綱治、宮坂信之、南木敏宏。合成レチノイド Am80 は *Candida albicans* water-soluble fraction 誘導血管炎を抑制する。第 40 回日本免疫学会総会、2011/11、千葉  
宮部齊重、宮部千恵、岩井佳子、海老澤昌史、宮坂昌之、宮坂信之、南木敏宏。オートタキシン、リゾフォスファチジン酸受容体を標的とした関節リウマチの新規治療法開発。第 40 回日本免疫学会総会、2011/11、千葉

Kaneko K, Miyabe Y, Takayasu A, Fukuda S, Miyabe C, Ebisawa M, Yokoyama W, Watanabe K, Imai T, Muramoto K, Terashima Y, Sugihara T, Matsushima K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin Activates Fibroblast-like Synoviocytes in Patients with Rheumatoid Arthritis. 第 75 回アメリカリウマチ学会、2011/11、シカゴ

宮部齊重、福田真、金子佳代子、宮坂信之、南木敏宏。リゾフォスファチジン酸を標的とした関節リウマチの新規治療法開発。第 55 回日本リウマチ学会総会、2011/7、神戸

〔図書〕(計 3 件)

Yoshishige Miyabe, Chie Miyabe, Toshihiro Nanki. Retinoic Acid and Immunity. Vitamin-Binding Proteins - Functional Consequences. Ed. Krishnamurti Dakshinamurti and Shyamala Dakshinamurti. p49-56. 2013. CRC Press/Taylor & Francis Group.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南木 敏宏 (NANKI, Toshihiro)

帝京大学・医学部臨床研究医学講座・特任准教授

研究者番号：00282749

(2) 研究分担者

宮坂 信之 (MIYASAKA, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・名誉教授

研究者番号：30157622