

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08107

研究課題名(和文) JAK阻害薬を応用した全身性エリテマトーデスにおける新規治療法の確立

研究課題名(英文) The establishment of novel treatment for systemic lupus erythematosus using JAK inhibitor

研究代表者

池田 圭吾 (IKEDA, Keigo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40465068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SLEモデルマウスを用い、JAK阻害薬単剤及びステロイド剤の併用投与を行い、有効性や病態への影響に関して、脾臓由来T細胞の解析を行った。いずれのマウスもSLE患者と同様に腎症を来すため、腎臓の病理解析に加え、T細胞の遺伝子解析も合わせて行った。それらマウスの研究結果に基づき、SLE患者由来CD3陽性T細胞の遺伝子発現解析も行い、解析した。解析結果において、IFIT3及びISG15が、マウスにおいて有意に発現が変化し、患者においては、IFIT3のみ有意に変動していた。治療効果に関しては、ステロイド剤の併用でより高い有効性が認められた。T細胞の活性抑制も同様に併用療法において顕著に改善を認めた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of the JAK inhibitor tofacitinib (TOFA) for controlling IFN signalling via the JAK-STAT pathway and as a therapeutic for SLE in this research project. We treated NZB/NZW F1 mice with TOFA and assessed alterations in their disease, pathological, and immunological conditions. Gene-expression results obtained from CD4+ T cells (SLE mice) and CD3+ T cells (human SLE patients) were measured by DNA microarray and qRT-PCR. TOFA treatment resulted in reduced levels of anti-dsDNA antibodies, decreased proteinuria, and amelioration of nephritis as compared with those observed in control animals. We also detected decreased expression of several IFN-signature genes *Ifit3* and *Isg15* in CD4+ from SLE-prone mice following TOFA and DEXA treatment, and *IFIT3* in CD3+ T cells from human patients following immunosuppressant therapy including steroid, respectively. Our results suggest that TOFA could be utilised for the development of new SLE-specific therapeutic strategies.

研究分野：リウマチ学、免疫学、臨床薬理学

キーワード：全身性エリテマトーデス JAK阻害薬 I型インターフェロン IFIT3 T細胞

1. 研究開始当初の背景

以前から、研究代表者らは様々な膠原病の病態を規定する遺伝子を探索する目的で、様々な膠原病疾患治療前後の患者血液を対象とし、網羅的な解析を行っている。特に関節リウマチ (RA) においては、プロテオーム解析から結合組織成長因子 (CTGF) を抽出し (*Clin Exp Rheumatol.* 26:261, 2008)、さらに RA の活動性への関与を明らかにし (*Arthritis Rheum.* 65: 1477, 2013)、この独自の戦略は非常に有用であることが証明されてきた。また研究代表者らは SLE 患者において、DNA アレイ等を用いた解析により JAK-STAT やインターフェロン調節因子 (IRF) シグナル関連遺伝子の発現量が疾患活動性と相関し、治療とともに発現量が正常化することを明らかにしており (*Lupus.* 20: 1231, 2011)、SLE の増悪因子であるインターフェロンの結合シグナルを、細胞内に伝達する JAK-STAT シグナル経路が、SLE の新たな治療ターゲットとして有望である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、SLE モデルマウスや SLE 患者及び正常人の末梢血単核球等を用い、SLE の増悪因子であるインターフェロンの結合シグナルを、細胞内に伝達する JAK-STAT シグナル経路の抑制を行う JAK 阻害薬 (トファシチニブ) による病態改善への免疫学的機序を明らかにすることにより、SLE に対する新たな治療薬としての可能性を示す。

3. 研究の方法

2 種類の異なる遺伝的背景を有する NZB/NZWf1 (BWF1) と MRL/lpr マウスを用い有効性を証明。薬剤の投与に関しては、実臨床における SLE 患者への投与を念頭に、JAK 阻害薬単剤、JAK 阻害薬 + デキサメタゾン (ステロイド) の併用による治療効果を判定。14 週間の薬剤投与終了後に、脾臓、腎臓などの臓器摘出と全血を収集。各臓器、特に脾臓は、PAS 染色などによる病理学的解析に加え、mRNA の抽出も実施。

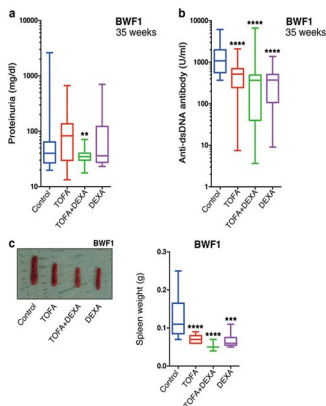
薬剤投与終了後のマウスの脾臓から、セルソーターを用いて分離し、フローサイトメトリーにて、T 細胞に関しては、制御性 T 細胞 (Treg) や濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) 等の解析を実施。B 細胞に関しても、形質細胞などの解析を、T 細胞同様に行う。樹状細胞やマクロファージの解析も併せて行い、各細胞のバランスや、疾患活動性に応じた変化を分析した。

免疫学的機序解明の研究と平行して、十分量の細胞及び RNA を確保する目的で、マウスの脾臓からセルソーターにて、CD4 陽性 T 細胞を分離し、それぞれから精製抽出した RNA を、DNA マイクロアレイ法で解析し、有意に変動している遺伝子を同定。同定された遺伝子は、パスウェイ解析により群別に分類し、どのような遺伝子群が JAK 阻害薬に特異的に変動しているかを分析し、治療特異的に変動している遺伝子の絞り込みを行い、絞り込まれた遺伝子は、RT-qPCR 法での解析を行った。

4. 研究成果

(1) JAK 阻害薬投与群、特にデキサメタゾン併用群において顕著な臨床的、病理学的改善が SLE モデルマウスにおいて認められた

SLE モデルマウスである NZB/NZW1 (BWF1) に対し、JAK 阻害薬 (トファシチニブ、TOFA) 単剤もしくはデキサメタゾン (DEXA) 併用投与を行った。デキサメタゾンは寛解導入に必要な 1mg/kg ではなく半量の 0.5mg/kg での投与とした。無治療コントロール群に対し有意に、抗 DNA 抗体価の低下及び蛋白尿の減少を認め、脾臓の縮小 (正常化) も認めた (下図)。また糸球体腎炎の改善を顕像と免疫蛍光染色像のいずれでも認め、腎炎スコアでは有意な改善を認めた。



異なる遺伝的背景を有する SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスにおいても、腎炎の解析で同様の結果となったことから、遺

伝的背景が異なる場合でも TOFA、特に DEXA 併用群において高い臨床的・病理学的有効性を示すことが明らかとなった。

(2) 免疫学的解析でも高い有効性を示した

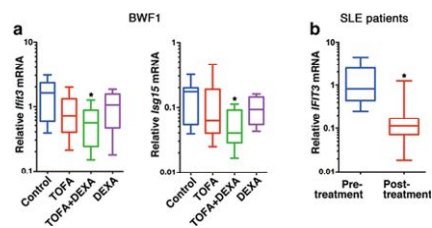
CD4 陽性 T 細胞の詳細な解析において、ナイーブ T 細胞 (CD4⁺ CD44^{lo} CD62L^{hi}) の増加、メモリー T 細胞 (CD4⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo}) の減少、活性化 T 細胞 (CD4⁺ CD69^{hi}) の減少を認めた。また活性化 CD19⁺B 細胞の減少も同様に認めた。腎臓におけるサイトカインの遺伝

子発現は、*Il6* や *Il2*、*Tgf 1* に加え、転写制御因子である *STAT1-4* や *Tbet* が TOFA 単剤もしくは DEXA 併用群で有意に低下していた。これらの結果は、臨床的かつ病理学的な解析での有効性を薬剤の作用機序から裏付ける結果となった。また *Ifn* も有意に治療群で低下していた。

(3) マウス脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞において *Ifit3* 及び *Isg15* の、SLE 患者末梢血 CD3 陽性 T 細胞において *IFIT3* の治療による発現低下を認めた

マウス脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を用い DNA アレイ解析で、インターフェロン関連遺伝子群が有意に変動していることが明らかとなり、RT-qPCR 法による解析を実施したところ、

Ifit3 及び *Isg15* が TOFA もしくは DEXA 併用群で有意に低下していた (下図)。加えて SLE 患者末梢血 CD3 陽性 T 細胞において同様の解析で *IFIT3* のみステロイド単剤もしくは免疫抑制剤併用による治療に伴い発現量が有意に低下していることを認めた (下図)。マウス及び SLE 患者のいずれにおいても、TOFA がインターフェロン関連遺伝子群の発現抑制を介して病態の正常化に寄与していることが示唆された。今後、SLE 患者の新規治療として、TOFA 単剤もしくはステロイドとの併用での応用及びステロイドの減量が期待できる結果となった。



5. 主な発表論文等

[雑誌発表] (計 6 件)

Hayakawa K, Ikeda K, Fujishiro M, Yoshida Y, Hirai T, Tsushima H, Miyashita T, Morimoto S, Suga Y, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I.

Connective tissue growth factor neutralization aggravates the psoriasis skin lesion: the analysis of psoriasis model mice and patients.

Ann Dermatol. 2018 Feb; 30(1): 47-53.

Hirai T, Ikeda K, Tsushima H, Fujishiro M, Hayakawa K, Yoshida Y, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y, Takamori K, Tamura N, Sekigawa I.

Circulating plasma microRNA profiling in patients with polymyositis/dermatomyositis before and after treatment: miRNA may be associated with polymyositis/dermatomyositis.

Inflamm Regen. 2018 Jan 8; 38:1.

Ikeda K, Hayakawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Hirai T, Tsushima H, Miyashita T, Suzuki S, Morimoto S, Tamura N, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I.

JAK inhibitor has the amelioration effect in lupus-prone mice: the involvement of IFN signature gene downregulation.

BMC Immunol. 2017 Aug 23;18(1):42.

Ikeda K, Watanabe K, Hirai T, Tanji K, Miyashita T, Nakajima S, Uomori K, Morimoto S, Takamori K, Ogawa H, Takasaki Y, Sekigawa I.

Mizoribine Synchronized Methotrexate Therapy should be Considered when Treating Rheumatoid Arthritis Patients with an Inadequate Response to Various Combination Therapies. Intern Med. 2017 May; 56(10): 1147-1152.

Ikeda K, Nakajima S, Tanji K, Hirai T, Uomori K, Morimoto S, Tomita S, Fukunaga M, Tamura N, Sekigawa I.

Intestinal perforation due to hemorrhagic Cytomegalovirus enteritis in a patient with severe uncontrolled lupus nephritis: a case and review of the literature.

Rheumatol Int. 2017 Aug; 37(8): 1395-1399.

Hirai T, Ikeda K, Fujishiro M, Tsushima H, Hayakawa K, Suzuki S, Yamaguchi A, Nozawa K, Morimoto S, Takasaki Y, Ogawa H, Takamori K, Tamura N, Sekigawa I.

The effectiveness of new triple combination therapy using synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs with different pharmacological function against rheumatoid arthritis: the verification by an in vitro and clinical study. Clin Rheumatol. 2017 Jan; 36(1): 51-58.

[学会発表] (計2件)

池田圭吾、早川国宏、藤城真樹、川崎美紀子、平井琢也、津島浩、森本真司、高崎芳成、関川巖 SLEモデルマウス及びJAK阻害薬を用いたインターフェロンと転写制御因子の調節に関する検討
第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成28年4月22日、横浜

Ikeda K, Hayakawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Hirai T, Morimoto S, Takasaki Y, Sekigawa I. Pan JAK Inhibitor Tofacitinib Ameliorate Autoimmunity and Nephritis in Lupus Prone Mice Via Inhibition

of Interferon Signaling pathway.

The 79th American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting.、平成27年11月9日、San Francisco, CA, 米国

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 圭吾 (IKEDA, Keigo)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 40465068

(2) 研究分担者

順天堂大学・医学部・教授
関川 巖 (SEKIGAWA, Iwao)
研究者番号: 80179332
佐藤 実 (SATO, Minoru)
産業医科大学・産業保健学部・教授
研究者番号: 90162487

(3) 連携研究者

順天堂大学・医学部・教授
高崎 芳成 (TAKASAKI, Yoshinari)
研究者番号: 80154772

(4) 研究協力者

順天堂大学大学院環境医学研究所
早川 国宏 (HAYAKAWA, Kunihiro)
藤城 真樹 (FUJISHIRO, Maki)
川崎 美紀子 (KAWASAKI, Mikiko)
鈴木 智 (SUZUKI, Satoshi)
宮下 知子 (MIYASHITA, Tomoko)
平井 琢也 (HIRAI, Takuya)

津島 浩 (TSUSHIMA, Hiroshi)