

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09521

研究課題名(和文)細胞内亜鉛制御による関節リウマチの新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel strategy to treat rheumatoid arthritis by regulating intracellular zinc

研究代表者

池田 啓 (Ikeda, Kei)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10456014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス関節炎モデル(CIA)では、足関節の軟骨におけるMTF-1ならびにMMP-3のmRNA発現の亢進を認めた。一方、軟骨特異的ZIP8過剰発現マウス、ならびに軟骨特異的MT-1/2欠損マウスではCIAの明らかな悪化を認めなかった。また、マウスナイーブヘルパーT細胞をTh17条件下で培養した際、亜鉛トランスポーターのmRNA発現と細胞内亜鉛濃度変化との関連は明らかではなかった。また、MT-1/2ノックダウンによるヘルパーT細胞分化に明らかな影響は認められなかった。以上より、マウス関節炎ならびにヘルパーT細胞分化において、亜鉛トランスポーターは有意な役割を果たしていないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：mRNA expressions of MTF-1 and MMP-3 were increased in the cartilage of ankle in mouse arthritis model (CIA). However, CIA did not exacerbate in cartilage-specific ZIP8 transgenic mice or cartilage-specific MT-1/2 knockout mice. On the other hand, no correlations were identified between mRNA expression of zinc transporters and intracellular zinc concentration in Th17 cells differentiated from mouse naive helper T cells. Furthermore, MT-1/2 knockdown did not affect helper T cell differentiation in vitro. These data indicate that zinc transporters are not likely to play significant roles in arthritis or helper T cell differentiation in mice.

研究分野：リウマチ膠原病学・免疫学

キーワード：関節炎 亜鉛 軟骨 ヘルパーT細胞

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

関節リウマチ(RA)は、本邦で約 70 万人の患者が存在する滑膜炎と骨/軟骨の関節破壊を特徴とする自己免疫疾患であり、その身体機能予後は不良である。主に TNF- α 、IL-6 等のサイトカインを標的とする生物学的製剤が臨床応用され治療の選択肢は増えたが、無効例が少なからず存在するため、個々の症例の病態に即した特異性の高い治療戦略が必要であり、新規治療標的の同定と、薬効を予測/反映するバイオマーカーの確立が急務である。

近年、本研究者らは IL-6 受容体抗体であるトシリズマブ (TCZ) 投与前後の RA 患者の末梢血単核球 (PBMC) の遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、健常者と比して RA 患者のメタロチオネイン (MT) 遺伝子発現が亢進していること、その発現亢進が TCZ の有効性を予測すること、また TCZ 有効症例において MT 遺伝子の発現が低下することを見出した (Sanayama et al. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421)。また本研究者らは、TCZ 有効症例の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、転写因子 AT-rich-interactive domain-containing protein 5A (ARID5A) が TCZ 投与により低下し、Th17 細胞分化の負の制御因子として働いていることを見出した (Saito et al. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1185)。

MT は分子量約 6,000-7,000 の低分子亜鉛結合蛋白である。ヒトにおいては I-IV の 4 種のアイソフォームが存在するが、MT-1 および MT-2 が血球系を含む広い細胞種に発現する。MT は分子内の多数のシステイン残基由来のチオール基 (-SH) により金属を取り込む性質を持つが、通常生体に存在する MT は亜鉛に結合した形 (Zn-MT) であり、細胞内亜鉛濃度の維持に重要な役割を果たしている。MT の発現は金属、活性酸素等で誘導され、金属による MT の発現誘導では、プロモーター領域に存在する metal responsive element (MRE) への metal transcriptional factor 1 (MTF1) の結合が重要である。また MT プロモーターは STAT 結合配列を有し、IL-6/STAT3 シグナルにより MT 発現が誘導される。MT-1/2 欠損マウスでは、抗原特異的免疫反応が増強し (Crowthers et al. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;166:161)、脳炎モデル (EAE) (Penkowa et al. *J Neuroimmunol* 2001;119:248) あるいは肺炎多糖 (LPS) 誘導性肺障害モデル (Takano et al. *Thorax* 2004;59:1057) が増悪する。以上より MT は自己免疫および炎症を負に制御することが示唆されるが、その分子機構は不明である。

一方、RA 患者では血清中の亜鉛濃度が低下し、PBMC 中の亜鉛濃度が上昇することが報告されている (Zoli et al. *Clin Rheumatol* 1998;17:378, Wanchu et al. *Ann Rheum Dis* 2002;61:88)。また、マウスコラーゲン誘導

性関節炎 (CIA) モデルでは亜鉛の経口投与により、Th17 分化が抑制され、関節炎が改善することが示されている (Kitabayashi et al. *Int Immunol* 2010;22:375)。さらに近年、マウス変形性関節症モデルにおいて、亜鉛トランスポーター ZIP8 発現を介する軟骨細胞内への Zn²⁺ 流入が、転写因子 MTF1 の活性化、MMP-3/9/12/13 および ADAMTS5 の発現増強、それによる軟骨破壊に重要であり、同時に MTF1 により誘導される MT 発現がその負の制御機構として働いていることが示された (Kim et al. *Cell* 2014;156:730)。

2. 研究の目的

以上より、亜鉛トランスポーターを介する細胞内への Zn²⁺ 流入、および転写因子 MTF1/STAT3 を介する MT 発現による細胞内 Zn²⁺ 濃度の制御機構は、1) Th17 細胞分化、2) 軟骨細胞における基質分解酵素の発現により、関節炎の病態を制御している可能性が示唆される。そこで本研究では、関節炎における細胞内亜鉛制御機構の役割を解明することにより、RA の新規治療法の開発に向けた基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

研究計画 1: マウス関節炎モデルにおける軟骨細胞内亜鉛濃度制御機構の役割の解明

- 1) 野生型マウスにコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を誘導し、足関節軟骨における ZIP8、MTF1、MMP-3、MT-1/2 の発現を、定量的 PCR および免疫組織染色で解析する。また足関節軟骨における Zn²⁺ 濃度を FluoZin-3 を用いて解析する。
- 2) 軟骨特異的 ZIP8 トランスジェニックマウス (Col2A1-Zip8 TG) ならびに野生型マウスに CIA を誘導し、関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを比較する。
- 3) 軟骨 ZIP8 過剰発現による関節炎に対する影響が、MTF1 の転写活性を介するものか否かを明らかにするため、軟骨特異的 Zip8 TG マウスと軟骨特異的 MTF1 欠損マウス (Col2A1 Cre-Mtf1 KO) の交配により軟骨特異的 Zip8 TG/Mtf1 KO マウスを作成し、CIA を誘導した際の関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを、軟骨特異的 Zip8 TG マウスと比較する。
- 4) 定法により、軟骨特異的 MT-1/2 欠損マウス (Col2A1 Cre-Mt KO) を作成し、CIA を誘導した際の関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを、野生型マウスと比較する。さらに軟骨 ZIP8 過剰発現による関節炎に対する影響が、MT 欠損によりさらに増強されるか否かを明らかにするため、交配により軟骨特異的 Zip8 TG/MT KO マウスを作成し解析する。

研究計画 2: Th17 細胞分化に重要な亜鉛トランスポーターの同定

- 1) マウス脾細胞よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞

胞を単離し、Th0/Th17/Treg 条件下で培養した際の亜鉛トランスポーター (ZNT1-10、ZIP1-14) の発現誘導を定量的 PCR で解析する。

- 2) 上記 1) にて発現誘導の強い亜鉛トランスポーターの経時的発現変化、ならびに細胞内 Zn^{2+} 濃度の経時的変化をフローサイトメトリーを用いて単細胞レベルで解析し、Th17 細胞分化において Zn^{2+} 流入に関連する亜鉛トランスポーターを同定する。
- 3) 上記 2) にて同定された亜鉛トランスポーター ZNT/ZIP を、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、 Zn^{2+} 流入および Th17 細胞分化を解析する。またその際に、亜鉛のキレート剤である TPEN を加えた場合の変化を解析する。
- 4) 上記 3) の実験において、MT-1/2 の発現誘導を同時に解析する。さらに siRNA を用いて MT-1/2 発現をノックダウンした際に、亜鉛トランスポーター強制発現による影響がさらに増強されるか否かを解析する。

研究計画 3: マウス関節炎モデルにおける CD4 陽性 T 細胞内亜鉛濃度制御機構の役割の解明

- 1) 野生型マウスに CIA を誘導し、滑膜組織ならびに鼠径リンパ節 CD4 陽性 T 細胞における ZNT、ZIP、MTF1、MT-1/2 の発現を、定量的 PCR および免疫組織染色で解析する。また滑膜組織および鼠径リンパ節における Zn^{2+} 濃度を FluoZin-3 を用いて解析する。
- 2) 研究計画 2 で同定された亜鉛トランスポーター ZNT/ZIP の、T 細胞特異的トランスジェニックマウス (LCK-Znt/Zip TG) を作成し、リンパ組織の形成、及び CD4 陽性 T 細胞の分化を解析する。T 細胞特異的 Znt/Zip TG マウスおよび野生型マウスに CIA を誘導し、CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生、関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを比較する。
- 3) T 細胞 ZNT/ZIP 過剰発現による関節炎に対する影響が、MTF1 の転写活性を介するものか否かを明らかにするため、T 細胞特異的 Znt/Zip TG マウスと T 細胞特異的 MTF1 欠損マウス (CD4 Cre-Mtf1 KO) の交配により T 細胞特異的 Znt/Zip TG/Mtf1 KO マウスを作成し、CIA を誘導した際の CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生、関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを、T 細胞特異的 ZNT/Zip TG マウスと比較する。
- 4) T 細胞 ZNT/ZIP 過剰発現による関節炎に対する影響が、MT 欠損によりさらに増強されるか否かを明らかにするため、MT-1/2 の、T 細胞特異的欠損マウス (CD4 Cre-Mt KO) を作成する。CIA を誘導し、CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生、関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを、野生型マウスと比較する。
- 5) T 細胞特異的 MT-1/2 欠損マウス (CD4

Cre-Mt KO) を作成し、CIA を誘導した際の CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生、関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを、野生型マウスと比較する。さらに T 細胞 ZNT/ZIP 過剰発現による関節炎に対する影響が、MT 欠損によりさらに増強されるか否かを明らかにするため、交配により T 細胞特異的 Znt/Zip TG/Mt KO マウスを作成し、CIA を誘導した際の CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生、関節炎スコア、関節炎発症率、組織スコア、X 線スコアを、T 細胞特異的 Znt/Zip TG マウスと比較する。

研究計画 4: 細胞内亜鉛濃度による Th17 細胞分化制御の分子機構の解明

- 1) 遺伝子改変マウスにおける Th17 分化
 - a. 野生型マウス、T 細胞特異的 Znt/Zip TG マウス、T 細胞特異的 Znt/Zip TG/Mtf1 KO マウス、および T 細胞特異的 Znt/Zip TG/Mt KO マウスの脾細胞よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、Th17/Treg 分化ならびに細胞内 Zn^{2+} 濃度を単細胞レベルで比較する。
 - b. T 細胞特異的 Znt/Zip TG マウスおよび野生型マウスの脾細胞よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、Th17 条件下で分化を促した際の遺伝子発現の違いを、RNA シークエンスを用いて網羅的に解析する。
- 2) ROR γ t/IL-17/MT のレポーター解析
 - a. マウス T 細胞株 EL4 に ROR γ t レポーターベクター (pROR γ t-Luc) を導入し、亜鉛イオノフォアで刺激をした際のレポーター活性を測定する。
 - b. EL4 細胞に IL-17A レポーターベクター (pIL-17A-Luc) を導入し、亜鉛イオノフォアで刺激をした際のレポーター活性を測定する。さらに ROR γ t 結合領域に変異を導入した IL-17A レポーターベクターを用いた場合のレポーター活性と比較する。
 - c. EL4 細胞に MT-1/2 レポーターベクター (pMT1-Luc/pMT2-Luc) をそれぞれ導入し、亜鉛イオノフォアで刺激をした際のレポーター活性を測定する。さらに MTF1 結合領域または STAT 結合領域に変異を導入した pMT1-Luc/pMT2-Luc レポーターベクターを用いた場合のレポーター活性と比較する。

研究計画 5: RA 患者における血清および細胞内亜鉛濃度の臨床的意義の解明

- 1) 薬効予測ならびに薬効反映バイオマーカーの同定
新規にメトトレキサートあるいは生物学的製剤を投与する RA 患者において、治療前および投与 3 ヶ月後の血清の亜鉛、C 反応性蛋白、IL-6、および MMP-3 値、また PBMC 及び CD4 陽性 T 細胞の細胞内亜鉛濃度、ZNT/ZIP、および MT-1/2 発現を測

定する。それらの間の相関、さらに治療3ヵ月後の治療反応性（総合指標および関節エコースコア）との相関を解析し、薬剤毎の薬効予測ならびに薬効反映バイオマーカーを同定する。

2) 新規治療標的の同定

研究計画 1-4 までの結果、ならびに上記1)の結果を、先行研究で蓄積したRA患者のPBMC/CD4陽性T細胞における網羅的遺伝子発現解析結果と照会し、合理的なRAの新規治療標的候補を同定する。さらに現実的な治療介入手段、あるいは創薬手段を決定し、細胞内亜鉛制御による新規RA治療戦略実現のためのロードマップを作成する。

4. 研究成果

研究計画1: マウス関節炎モデル(CIA)が確立し、足関節の軟骨におけるMTF-1ならびにMMP-3のmRNA発現の亢進を認めた。一方、軟骨特異的ZIP8過剰発現マウスではCIAの明らかな悪化を認めなかった。また軟骨特異的MT-1/2欠損マウスにおいても関節炎に関連する明らかな表現型を認めなかった。

研究計画2: マウス脾細胞より単離したナイーブヘルパーT細胞をTh17条件下で培養した際、複数の亜鉛トランスポーターのmRNA発現が増強されることを見出し、その経時的变化を確認した。一方、細胞内Zn²⁺濃度変化との関連は明らかではなかった。また、MT-1/2ノックダウンによるTh17分化あるいはその他のヘルパーT細胞サブセット分化に明らかな影響は認められなかった。

研究計画3: CIAの滑膜組織あるいはリンパ節では、明らかな亜鉛トランスポーター発現の増強は認められなかった。

以上より、マウス関節炎ならびにヘルパーT細胞分化において、亜鉛トランスポーターは有意な役割を果たしていないことが明らかとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

池田 啓 (Ikeda Kei)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10456014

(2)研究分担者

中島 裕史 (Nakajima Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

須藤 明 (Suto Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50447306