

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10946

研究課題名(和文) 椎間板変性におけるIL-17の役割の解析と新規IL-17活性阻害剤の探索

研究課題名(英文) Effects of IL-17 on intervertebral disc degeneration and the investigation of the new small-molecule IL-17 inhibitor for treating degenerative discs

研究代表者

隅山 香織 (SUYAMA, Kaori)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20433914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン17(IL-17) familyの一つであるIL-17Aは多様な炎症反応に関与するとされる。本研究では椎間板髄核細胞におけるIL-17Aの作用を解析し、さらにin Silico解析を用いて新規IL-17A阻害剤候補化合物を探索し、その効果を評価した。椎間板髄核細胞においてIL-17Aは椎間板細胞の変性進行や疼痛の原因物質の産生を促進し、細胞外基質産生を抑制している可能性を認めた。今回、我々が選出した低分子IL-17A阻害剤候補化合物はこれらの因子の発現を有意に抑制し、細胞外基質産生を改善したため、新たな椎間板変性治療薬と成り得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は椎間板におけるIL-17Aの作用解析から薬物を使用した治療標的としての可能性までを包括した体系的研究である。既存のIL-17阻害剤は生物学的製剤が主体であり、副作用として重篤な感染症や高い薬価、投与方法が注射薬に限定される点、等が問題とされている。これに対し低分子化合物の利点としては、生物学的製剤より安価であり、水溶性に優れるため外用薬、経口薬としての投与が可能となる等が挙げられる。現在、椎間板変性以外にも多くの疾患に対してIL-17Aの関与が報告されており、上述した低分子阻害剤化合物の利点はこれらの椎間板疾患を含めたIL-17関連疾患に対する新しい治療薬としての応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：IL-17A is a member of the IL-17 cytokine family, which mediates the induction of some inflammatory cytokines and chemokines. We evaluated the effects of IL-17A on nucleus pulposus (NP) cells and pharmacotherapeutic potential of the new small-molecule inhibitors that block IL-17A receptor binding.

We analyzed the spatial structure of the protein-protein interactions between IL-17A and IL-17A receptor (IL-17RA), and identified four small-molecule inhibitors that accessed the IL-17A-binding site of IL-17RA, as determined by in silico analysis of numerous drug molecules. Our results showed that IL-17A promoted the expression of the factors which lead degeneration of intervertebral discs (IVD); however, the four small-molecule inhibitors suppressed augmentation of IVD degeneration factors. These results showed that IL-17A regulated the factors which mediate disc degeneration and the small-molecule inhibitor of IL-17A could be useful for pharmacotherapy of intervertebral disc disease.

研究分野：整形外科学

キーワード：インターロイキン17 低分子化合物 インシリコ創薬 椎間板

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰痛は患者の Quality of life (QOL) を下げるのみならず社会生産性を低下させ医療費増加にも深く関与する。厚生労働省による業務上疾病発生状況等調査(休業4日以上)では腰痛の件数が最も高く、本邦における腰痛の生涯有病率は約83%(松平, 日本職業・災害医学会誌. 2015)とされ、腰痛の実用的な治療・予防法の開発は、今後さらに進む高齢化社会においても最重要課題のひとつである。

腰痛の主な原因として脊椎椎体の間に存在する椎間板の障害がある。椎間板は中心部の髄核とこれを取り巻く線維輪から成る無血管器官であり、衝撃を吸収し脊椎可動性を保持する重要な役割を担う。加齢や物理的外力等の様々な外部からのストレスにより傷害された椎間板においてはIL-1 β 、IL-6、TNF α に代表されるサイトカインの上昇や、細胞数・細胞外基質の減少から組織の変性に至り、腰痛・背部痛のみならず、椎間板の神経の圧迫による下肢痛、下肢しびれ等の様々な脊椎疾患の原因となる(Risbud, Nat Rev Rheumatol. 2014)。

これらに加えて、近年、インターロイキン 17(IL-17)も椎間板傷害・変性において増加するサイトカインとして新たに注目されるようになった(Gabr, J Orthop Res. 2011; Shamji, Arthritis Rheum. 2010)。A~Fの6つのIL-17 familyの内、特にIL-17Aは受容体(IL-17RA)に結合後、下流シグナル因子となるNF- κ BやMAPK経路等を活性化して多様な炎症反応に関与する(Gu, Cytokine. 2013)。これらの知見から申請者は椎間板におけるIL-17の作用解析及び椎間板変性疾患に対する治療方法としてのIL-17活性制御の有効性に着目し、検討を行ってきた。

2. 研究の目的

これまでの知見と結果を受け、本研究は以下の2点を目指して研究を実施した。

(1) 椎間板細胞におけるIL-17の作用機序を解明する。
椎間板細胞におけるIL-17の作用については未だ不明な点が多い。本研究では、まずIL-17Aが椎間板細胞に与える影響、及びストレスや加齢により変性した椎間板細胞におけるIL-17Aの反応と作用を解析・評価して新規IL-17A阻害剤のアッセイ系を完成させる。

(2) 新規IL-17A阻害剤候補化合物の探索と選定
インシリコ(in Silico)解析により選出したIL-17A活性阻害剤の候補化合物の効果を、上記(1)の結果と比較検討して評価し、新規IL-17A活性阻害剤として最適な化合物を選定する。

3. 研究の方法

(1) 椎間板髄核組織・細胞におけるIL-17Aの作用の解析と評価
培養ラット椎間板髄核細胞を用いたIL-17Aの評価
ラット椎間板より採取した髄核細胞(NP細胞)を生体内における椎間板の環境と近似した1%の低酸素条件で培養し、IL-17Aの作用、及び、IL-17A活性を抑制した場合の反応を解析した。NP細胞にIL-17Aを50ng/ml投与して24時間培養し、サイトカインや細胞内シグナル因子の発現を、リアルタイムPCR、ウエスタンブロット法、プロモーターアッセイ法で評価した。IL-17A活性抑制実験では、抗IL-17A中和抗体をIL-17Aと共に投与して評価した。

ヒト変性椎間板組織におけるIL-17A発現の評価

患者同意の下、手術の際摘出した椎間板を用いてIL-17A免疫染色をおこなった。変性度は術前のMRI画像でPfarrmann分類に基づいて判定した。

(2) 新規低分子IL-17A阻害剤候補化合物の作用評価
In Silico解析を用いた新規低分子IL-17A阻害剤の探索
IL-17Aタンパク質の立体構造をX線解析して、その受容体結合部分に結合可能な化合物の立体構造を予測し、さらにその予測された構造の結合シミュレーションをコンピュータ上で行った。これらにより得られた情報を用いてIL-17A結合阻害剤として適した化合物、すなわち候補化合物を医薬品低分子化合物データベースの中から探索し選出した。

培養ラット椎間板髄核細胞に対するIL-17A阻害剤候補化合物の作用の評価

のin Silicoスクリーニングにより選出された4種類のIL-17A結合阻害剤候補化合物50 μ g/mlを、IL-17A50ng/mlと共にラットNP細胞に投与し、リアルタイムPCR、ウエスタンブロット法、プロモーターアッセイ法、アルシアンブルー染色で評価した。

培養ヒト椎間板髄核細胞に対するIL-17A阻害剤候補化合物の作用の評価

で選出されたIL-17A候補化合物群の内、最も結合親和性の高いSTK630921(STK)50 μ g/mlをIL-17Aと共に培養ヒト椎間板髄核細胞に投与し、1%の低酸素濃度条件で培養してリアルタイムPCRとコロニーアッセイ法で評価した。

4. 研究成果

(1) 椎間板髄核組織・細胞におけるIL-17Aの作用の解析と評価

培養ラット椎間板髄核細胞を用いた IL-17A の評価

IL-17A を 50ng/ml 投与した 24 時間後に IL-6、COX-2、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現が無処置群と比較して有意に増加し、IL-6 と COX-2 のタンパク質発現も無処置群より有意に増加した(n=4, p<0.05)。また、IL-17A によって mRNA の著明な増加を呈した IL-6 を NP 細胞に 50ng/ml 投与して同様の条件で培養すると、24 時間後の COX-2、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現は無処置群と比較して有意に増加した(n=4, p<0.05)。

次に、抗 IL-17A 中和抗体 0.5μg/ml と IL-17A 50ng/ml を共に投与すると、24 時間後の IL-6、COX-2、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現が IL-17A 単独投与と比較して有意に抑制される現象を認めた (n=4, p<0.05)。

転写活性評価では、IL-17A 投与群における COX-2 の転写活性は無処置群と比較して有意に増加し、IL-17A 中和抗体投与条件下では、IL-17A 投与群と比較して有意に抑制された(n=3, p<0.05)。

ヒト変性椎間板組織における IL-17A 発現の評価

術前の MRI 画像診断において Pfirrmann 分類 grade3 以上の髄核組織での IL-17A 染色陽性髄核細胞が、grade1,2 の髄核組織と比較して有意に増加していることを確認した (n=11, p<0.05)。

(2) 新規低分子 IL-17A 阻害剤候補化合物の作用評価

In Silico 解析を用いた新規低分子 IL-17A 阻害剤の探索

In Silico 解析と探索により以下の 4 つの低分子化合物;STK630921 (STK), PB203263256 (PB), Z92151850 (Z9251), P2000N-53454 (P2000) を IL-17A 結合阻害剤候補化合物として選出し、評価した。

培養ラット椎間板髄核細胞に対する IL-17A 阻害剤候補化合物の作用の評価

4 種類の IL-17A 結合阻害剤候補化合物 50μg/ml を、IL-17A50ng/ml と共にラット NP 細胞に投与し評価した。その結果、(1)の評価において IL-17A 投与 24 時間後に上昇した IL-6、COX-2、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現が、これら 4 個の IL-17A 阻害剤により有意に抑制されることを確認した (図 1, n=3~5, *p<0.05)。

次に IL-17A 候補化合物の内、最も結合親和性の高い

STK630921(STK)50μg/ml を IL-17A50ng/ml と共に NP 細胞に投与し、IL-17A 刺激により発現が著明に増加した IL-6 と COX-2 のタンパク質発現を解析した。STK 投与により、24 時間培養後の IL-6 と COX-2 のタンパク質発現が IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制されることを確認した (n=3, p<0.05)。

同様の条件下において STK は COX-2 の転写活性を有意に抑制することも確認された (n=3, p<0.05)。

さらに、細胞内で IL-17A が関与する Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) シグナル経路に対する阻害剤の効果を評価した。50ng/ml の IL-17A と MAPK 因子 (p38, ERK, JNK)活性阻害剤 10μM を投与して 24 時間培養した NP 細胞において、IL-6 は p38 と ERK の活性阻害剤投与下において、COX-2 はすべての活性阻害剤投与下において、mRNA 発現が IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制されたことから、IL-6 と COX-2 の発現には MAPK 経路が関与していることが確認された。

続いて、STK50μg/ml を IL-17A50ng/ml と共に NP 細胞に投与すると、30 分後には、STK 投与群で IL-17A による p38 のリン酸化が有意に抑制された(図 2, n=3, *p<0.05) 従って、STK は p38 活性化を抑制することにより COX-2、IL-6 の発現を抑制している可能性が考えられた。

アルシアンブルー染色を用いた細胞外基質の主

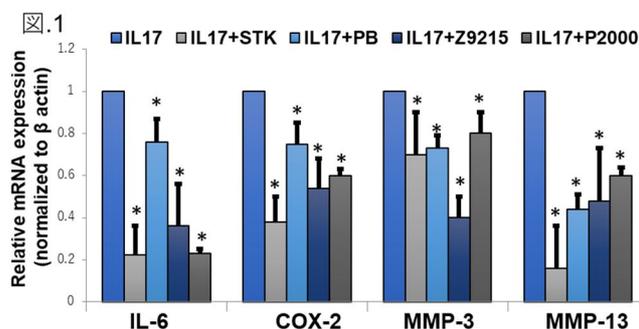
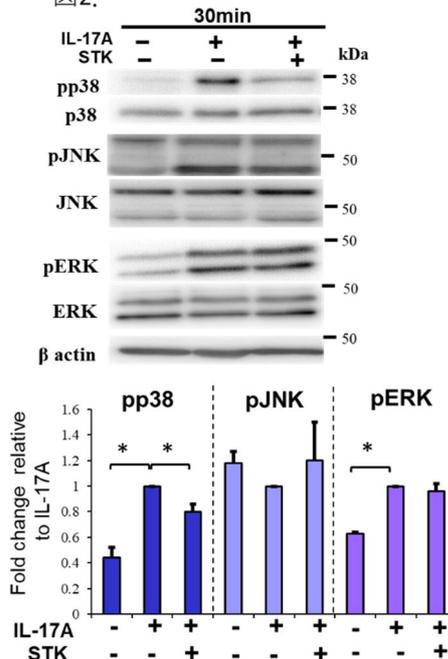
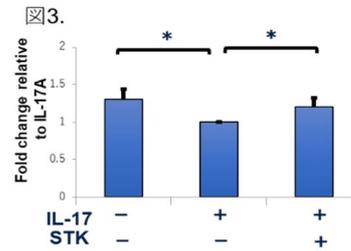


図 2.



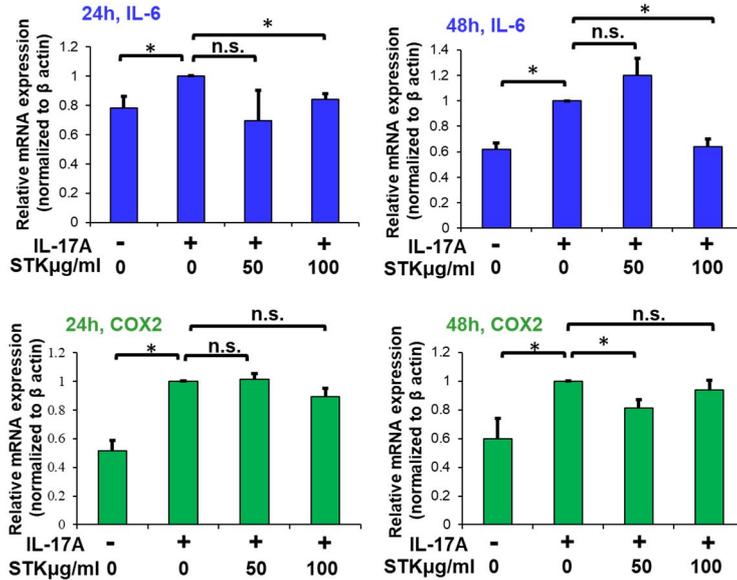
体成分であるグリコサミノグリカン産生量の評価において IL-17A50ng/ml 単独投与下で 8 日間培養した NP 細胞群では、グリコサミノグリカン産生が無処置群と比較して有意に減少したが、STK50 μ g/ml と IL-17A を共に投与した群では有意な改善を示した(図 3. n=3,*p<0.05)



培養ヒト椎間板髄核細胞に対する IL-17A 阻害剤候補化合物の作用の評価

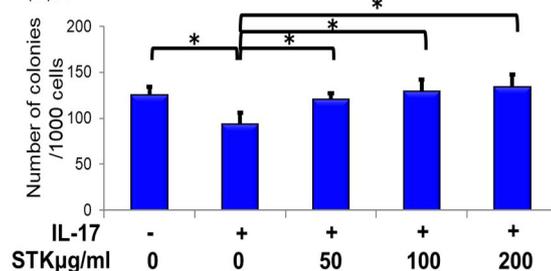
ラット NP 細胞を用いた上記の実験結果を基に、ヒト椎間板髄核 (NP) 細胞に対する STK の効果を検討した。50ng/ml の IL-17A を投与したヒト NP 細胞において、IL-6 の mRNA 発現は STK100 μ g/ml 投与から 24 ~ 48 時間後に、COX2 の mRNA 発現は STK50 μ g/ml 投与 48 時間後に、それぞれ IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制された(図 4. n=4,*p<0.05)

図4.



また、コロニーアッセイ法による細胞外基質産生能の評価では、培養 10 日後に、IL-17A50ng/ml 単独投与群と比較して STK50~200 μ g/ml 投与群におけるコロニー形成能が有意に改善することを認めた(図 5. n=3,*p<0.05)

図5.



以上の結果から、IL-17A は椎間板変性に関わる因子の発現や、疼痛の原因物質の産生を制御している可能性が示され、IL-17A は椎間板変性の有効な治療標的と成り得ると考えられた。

今回、我々が in Silico 解析を用いて選出した新規低分子 IL-17A 阻害剤候補化合物は、IL-17A に誘導される炎症反応因子や椎間板変性促進因子の発現を有意に抑制し、細胞外基質の減弱を有意に改善することが確認され、椎間板変性疾患に対する新たな治療薬と成り得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaori Suyama, Daisuke Sakai, Noriaki Hirayama, Yoshihiko Nakamura, Erika Matsushita, Hayato Terayama, Ning Qu, Osamu Tanaka, Kou Sakabe, Masahiko Watanabe	4. 巻 Nov;22
2. 論文標題 Effects of interleukin-17A in nucleus pulposus cells and its small-molecule inhibitors for intervertebral disc disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 5539-5551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.13828.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 隅山香織
2. 発表標題 椎間板変性に対する新規低分子化合物を用いたIL-17A阻害療法の評価
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Suyama
2. 発表標題 The potential utility of interleukin-17A inhibitors for the intervertebral disc disease treatment
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隅山香織
2. 発表標題 新規低分子IL-17A阻害剤を用いた椎間板変性治療法の評価
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隅山香織
2. 発表標題 椎間板変性に対するIL-17の作用
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kaori Suyama
2. 発表標題 Effects of interleukin-17A on intervertebral disc degeneration: Interleukin-17A can be a potential therapeutic target for treating degenerative discs
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隅山香織
2. 発表標題 新規低分子IL-17A阻害剤による椎間板変性治療法の可能性を評価する
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隅山香織
2. 発表標題 In Silico創薬による新規低分子IL-17A阻害剤を用いた椎間板変性治療の可能性
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 IL-17A活性阻害剤およびその用途	発明者 酒井大輔、平山令明、隅山香織	権利者 学校法人東海大学、日本臓器製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/6786	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	酒井 大輔 (SAKAI Daisuke) (10408007)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	