

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08408

研究課題名（和文）時計遺伝子Bmal1を標的とした関節リウマチ時間生物学療法の開拓

研究課題名（英文）Development of chronotherapy for rheumatoid arthritis targeting the clock gene Bmal1.

研究代表者

柱本 照（Hashiramoto, Akira）

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80346246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では時計遺伝子Bmal1が関節リウマチ滑膜細胞において炎症性メディエーター産生、腫瘍様増殖、細胞遊走を介して関節滑膜組織におけるパンヌス形成と不可逆的な骨軟骨破壊を導く過程を検証した。その結果、Bmal1は滑膜細胞におけるTNF α 誘導性CCL2発現とMMP3、CCL2、IL6、IL15の発現誘導を制御し、関節リウマチ病態形成に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リウマチ関節内の血球系細胞の相互作用や滑膜細胞からの炎症性メディエーター産生におけるBmal1遺伝子の役割は明らかではなかったが、本研究により、その一端が明らかになった。リウマチ発症によって経時的な発現が攪乱されたBmal1遺伝子を標的とした治療法が確立されれば、症状の日内変動に合わせた投薬時間の設定と薬理効果の最適化によって、感染症、肝・腎障害、血球減少症などの副次作用の回避と治療効果の最大化を達成できる可能性がある。また本研究はBmal1遺伝子や炎症性メディエーターを介したパラクライン機構の解明に留まらずリウマチ関節内環境の総合的な理解につながる可能性を有するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the process by which the clock gene Bmal1 leads to pannus formation and irreversible osteochondral destruction in synovial tissues of rheumatoid arthritis via inflammatory mediator production, tumor-like proliferation, and cell migration in synovial cells. The results showed that Bmal1 regulates TNF α -induced CCL2 expression and induction of MMP3, CCL2, IL6, and IL15 expression in synovial cells and is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：Bmal1 時計遺伝子 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

時間生物学は生体の昼と夜を司る日内リズムの機構を研究する重要な領域である。日内リズムは細胞の分裂・増殖やホルモン分泌といった生命現象の基本動態にも大きく影響しており、現代のように昼夜の区別が曖昧で光に満ち溢れた社会では、日内リズムの乱れが疾病形成に及ぼす影響には無視できないものがある。本研究は、日内リズムを司る時計遺伝子の一つである *Bmal1* 遺伝子に着目し、その転写を制御する RORE 配列を標的として関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA) 滑膜の増殖抑制と炎症制御を試みる。これにより、日内リズムの破綻が RA 病態の主座をなす慢性炎症に及ぼす影響を解明し、時間生物学の学術体系として、時計遺伝子制御による疾病治療の分野を新たに開拓することを目的とする。

学術的背景: RA は成人女性の約 1% が罹患する国民的難治性疾患で、「関節滑膜の制御困難な持続的炎症と過剰増殖」を病態の基盤とし、病変の場である関節において変形と破壊が進行する。RA の病態を表す代表的な症候に「朝の関節のこわばり」があるが、早朝に増悪する関節症状を端的に説明しうる身体環境の一つが炎症性サイトカイン群血中濃度の深夜から早朝にかけての上昇である。RA 患者の炎症を惹起する TNF (tumor necrotic factor) - α 、IL(interleukin)-6、IFN(interferon) - γ 等のサイトカインは夜間に分泌が亢進し、患者末梢血中で深夜から早朝にピーク濃度を示す分泌リズムを形成して、日内リズムに由来する一つの症状として「朝の関節のこわばり」を誘引する。

哺乳類の日内リズムの中核は視交差上核に存在し、外界の光を受診する網膜と視交差上核は視神経を介して直接的に連動する。視交差上核に入力した明暗の信号はリズムを形成して末梢諸臓器に伝播するが、諸臓器の構成細胞には遍く時計遺伝子が発現しており、伝達された信号は *Clock*、*Bmal1*、*Period (Per)*、*Cryptochrome (Cry)* らの時計遺伝子群によって構成される約 24 時間周期のフィードバックループを稼働して、CLOCK/BMAL1 蛋白二量体と PER/CRY 蛋白二量体を軸とする末梢性調節を受ける。すなわち、「生体の時」は中枢性・末梢性に階層的かつ二元的機構によって管理されており、末梢臓器に発現する時計遺伝子を標的とした治療には、より臓器特異的な効果が期待できる。

着想に至った経緯: RA は成人女性の約 1% が罹患する国民的難治性疾患で、「関節滑膜の制御困難な持続的炎症と過剰増殖」を病態の基盤とし、病変の場である関節において変形と破壊が進行する。RA の病態を表す代表的な症候に「朝の関節のこわばり」があるが、早朝に増悪する関節症状を端的に説明しうる身体環境の一つが炎症性サイトカイン群血中濃度の深夜から早朝にかけての上昇である。RA 患者の炎症を惹起する TNF (tumor necrotic factor) - α 、IL(interleukin)-6、IFN(interferon) - γ 等のサイトカインは夜間に分泌が亢進し、患者末梢血中で深夜から早朝にピーク濃度を示す分泌リズムを形成して、日内リズムに由来する一つの症状として「朝の関節のこわばり」を誘引する。

哺乳類の日内リズムの中核は視交差上核に存在し、外界の光を受診する網膜と視交差上核は視神経を介して直接的に連動する。視交差上核に入力した明暗の信号はリズムを形成して末梢諸臓器に伝播するが、諸臓器の構成細胞には遍く時計遺伝子が発現しており、伝達された信号は *Clock*、*Bmal1*、*Period (Per)*、*Cryptochrome (Cry)* らの時計遺伝子群によって構成される約 24 時間周期のフィードバックループを稼働して、CLOCK/BMAL1 蛋白二量体と PER/CRY 蛋白二量体を軸とする末梢性調節を受ける。すなわち、「生体の時」は中枢性・末梢性に階層的かつ二元的機構によって管理されており、末梢臓器に発現する時計遺

伝子を標的とした治療には、より臓器特異的な効果が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 関節リウマチ(RA)の病態に關与するケモカイン CCL2 は細胞遊走を制御し、時計遺伝子 Bmal1 と同様に転写因子 ROR α /REV-ERB α に制御される。そこで、TNF α 誘導性 CCL2 発現における ROR α /REV-ERB α とヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 の役割について明らかにする。

(2) 我々はこれまでに、日内リズムを形成する時計遺伝子の発現が RA の疾患活動性と相関することを報告してきた。RA 滑膜細胞は種々の炎症性メディエーターを産生するが、その機構における時計遺伝子 Bmal1 の関与は未だ明らかでない。そこで、時計遺伝子 Bmal1 が RA 滑膜細胞の炎症性メディエーター産生に与える影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) 初代培養 RA 滑膜細胞に対して、ROR α 阻害剤 SR1001、REV-ERB α 促進剤 GSK4112(各 20 μ M)、CBP/p300 阻害剤 C646(25 μ M)を用いて前処理後、TNF α (10ng/ml) 刺激を行った。また、RNA 干渉を用いて Cbp/p300 両遺伝子発現を抑制した細胞に対して TNF α 刺激を行った。各群の Ccl2 mRNA 発現量(qPCR)と培養上清 CCL2(ELISA)を定量した。さらに、C646 前処理群後に TNF α 刺激した培養上清を用いてスクラッチアッセイおよび F-actin 染色を行った。

(2) RA 滑膜細胞を TNF- α (0,20ng/ml)、IL1- β (0,20ng/ml)、IFN- γ (0,20ng/ml)で刺激し、経時的に RNA を抽出した。その後、定量 PCR 法にて Bmal1、MMP3、CCL2、IL6、IL7、IL15 の発現量を測定した。また、RA 滑膜細胞における時計遺伝子 Bmal1 の発現を RNA 干渉により抑制し、TNF- α (0,20ng/ml)、IL1- β (0,20ng/ml)、IFN γ (0,20ng/ml)で刺激した。その後、定量 PCR 法にて MMP3、CCL2、IL6、IL7、IL15 の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) TNF α 誘導性 CCL2 発現は、SR1001/GSK4112 両剤の同時処理や C646 処理すること、あるいは CBP/p300 発現を低下させることで抑制された。さらに、C646 前処理群後に TNF α 刺激した培養上清は、DMSO 前処理群後に TNF α 刺激した培養上清と比べて滑膜細胞の遊走が抑制され、アクチン重合も抑制された。

(2) TNF- α 、IL1- β 、IFN- γ で 16~32h 刺激することにより、RA 滑膜細胞における Bmal1、MMP3、CCL2、IL6、IL15 の発現量が増加した。また、Bmal1 発現抑制下では同条件において MMP3、CCL2、IL6、IL7、IL15 の発現量が有意に減少した。

(3) リウマチ関節内の血球系細胞の相互作用や滑膜細胞からの炎症性メディエーター産生における Bmal1 遺伝子の役割は明らかではなかったが、本研究により、その一端が明らかになった。リウマチ発症によって経時的な発現が攪乱された Bmal1 遺伝子を標的とした治療法が確立されれば、症状の日内変動に合わせた投薬時間の設定と薬理効果の最適化によって、感染症、肝・腎障害、血球減少症などの副次作用の回避と治療効果の最大化を達成できる可能性がある。また本研究は Bmal1 遺伝子や炎症性メディエーターを介したパラクライン機構の解明に留まらずリウマチ関節内環境の総合的な理解につながる可能性を有するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yaekura Arisa, Yoshida Kohsuke, Morii Kanta, Oketani Yuto, Okumura Ikumi, Kaneshiro Kenta, Shibamura Nao, Sakai Yoshitada, Hashiramoto Akira	4. 巻 84
2. 論文標題 Chronotherapy targeting cytokine secretion attenuates collagen-induced arthritis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106549 ~ 106549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106549	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 -

1. 著者名 Kaneshiro Kenta, Yoshida Kohsuke, Morii Kanta, Oketani Yuto, Uchida Koto, Yaekura Arisa, Okumura Ikumi, Hashimoto Teppei, Kawasaki Yoshiko, Shibamura Nao, Sakai Yoshitada, Hashiramoto Akira	4. 巻 30
2. 論文標題 Expressions of circadian clock genes represent disease activities of RA patients treated with biological DMARDs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 293 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1602242	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 -

1. 著者名 Kaneshiro K, Yoshida K, Morii K, Oketani Y, Uchida K, Yaekura A, Okumura I, Hashimoto T, Kawasaki Y, Shibamura N, Sakai Y, Hashiramoto A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Expressions of circadian clock genes represent disease activities of RA patients treated with biological DMARDs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 293-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1602242.	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 -

1. 著者名 Kaneshiro K, Sakai Y, Suzuki K, Uchida K, Tateishi K, Terashima Y, Kawasaki Y, Shibamura N, Yoshida K, Hashiramoto A.	4. 巻 48
2. 論文標題 Interleukin-6 and tumour necrosis factor- cooperatively promote cell cycle regulators and proliferate rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scand J Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 353-361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03009742.2019.1602164.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama C, Tsumiyama K, Uchimura C, Honda E, Miyazaki Y, Sakurai K, Miura Y, Hashiramoto A, Felsher DW, Shiozawa S.	4. 巻 203
2. 論文標題 Conditional Upregulation of IFN- Alone Is Sufficient to Induce Systemic Lupus Erythematosus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 835-843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1801617.	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 該当する

1. 著者名 Suzuki K, Yoshida K, Ueha T, Kaneshiro K, Nakai A, Hashimoto N, Uchida K, Hashimoto T, Kawasaki Y, Shibamura N, Nakagawa N, Sakai Y, Hashiramoto A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Methotrexate upregulates circadian transcriptional factors PAR bZIP to induce apoptosis on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 55-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-018-1552-9.	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 -

1. 著者名 Yoshida K, Nakai A, Kaneshiro K, Hashimoto N, Suzuki K, Uchida K, Hashimoto T, Kawasaki Y, Tateishi K, Nakagawa N, Shibamura N, Sakai Y, Hashiramoto A.	4. 巻 495
2. 論文標題 TNF- induces expression of the circadian clock gene Bmal1 via dual calcium-dependent pathways in rheumatoid synovial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1670-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashiramoto A, Konishi Y, Murayama K, Kawasaki H, Yoshida K, Tsumiyama K, Tanaka K, Mizuhara M, Shiotsuki T, Kitamura H, Komai K, Kimura T, Yagita H, Shiozawa K, Shiozawa S.	4. 巻 293
2. 論文標題 A variant of death-receptor 3 associated with rheumatoid arthritis interferes with apoptosis-induction of T cell.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 1933-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.798884.	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17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 桶谷優斗、内田京、鈴木行人、金城健太、森井寛太、八重倉愛里沙、
2. 発表標題 IL-6はミトコンドリア内因性経路を介して関節リウマチ滑膜細胞に細胞死抵抗性をもたらす
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森井寛太、桶谷優斗、金城健太、奥村郁美、八重倉愛里沙、吉田幸祐、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 IL-6、TNF 刺激によるRA滑膜細胞の増殖は時計制御遺伝子Tefによって制御される
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八重倉愛里沙、森井寛太、桶谷優斗、奥村郁美、金城健太、吉田幸祐、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 JAK阻害剤Baricitinibを用いた薬物時間療法はマウス関節炎を効果的に抑制する
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥村郁美、吉田幸祐、金城健太、八重倉愛里沙、桶谷優斗、森井寛太、立石耕司、寺島康浩、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 TNF 誘導性CCL2は転写因子ROR /REV-ERB、ヒストンアセチル化酵素CBP/p300を介してRA滑膜細胞の遊走に關与する
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikumi Okumura, Kohsuke Yoshida, Kenta Kaneshiro, Koto Uchida, Arisa Yaekura, Yuto Oketani, Kanta Morii, Koji Tateishi, Yasuhiro Terashima, Yoshiko Kawasaki, Nao Shibamura, Yoshitada Sakai, Akira Hashiramoto.
2. 発表標題 “ Roles Of Histone Acetyltransferases CBP/p300 And Transcriptional Factor ROR /REV-ERB Against TNF -induced CCL2 Expression in RA-FLSs. ”
3. 学会等名 米国リウマチ学会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arisa Yaekura, Kanta Morii, Yuto Oketani, Ikumi Okumura, Kenta Kaneshiro, Kohsuke Yoshida, Yoshiko Kawasaki, Nao Shibamura, Yoshitada Sakai, Akira Hashiramoto.
2. 発表標題 “ Chronotherapy using Baricitinib attenuates Collagen-induced Arthritis in mice. ”
3. 学会等名 米国リウマチ学会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柱本照
2. 発表標題 TNF阻害剤の基礎と臨床
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柱本照
2. 発表標題 JAK阻害剤が拓く最新リウマチ診療
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八重倉愛里沙、奥村郁美、金城健太、内田京、森井寛太、桶谷優斗、吉田幸祐、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照。
2. 発表標題 関節リウマチモデルマウスにおけるJAK阻害剤を用いた時間治療の検討
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶谷優斗、内田京、鈴木行人、金城健太、森井寛太、八重倉愛里沙、奥村郁美、吉田幸祐、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、柴沼均、酒井良忠、柱本照。
2. 発表標題 IL-6は時計遺伝子を介して関節リウマチ滑膜細胞に細胞死抵抗性をもたらす
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森井寛太、桶谷優斗、金城健太、内田京、奥村郁美、八重倉愛里沙、吉田幸祐、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照。
2. 発表標題 生物学的製剤治療が関節リウマチ患者白血球における時計遺伝子発現を変動させる
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村郁美、吉田幸祐、金城健太、内田京、八重倉愛里沙、桶谷優斗、森井寛太、立石耕司、寺島康浩、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照。
2. 発表標題 滑膜細胞におけるTNF 誘導性CCL2発現増加に対するヒストンアセチル化酵素と転写因子ROR /REV-ERB の役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田京、吉田幸祐、金城健太、中井綾子、鈴木行人、橋本哲平、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、中川夏子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1は細胞周期調節因子を介して関節リウマチ滑膜細胞の増殖能を制御する
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会（東京）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 金城健太、吉田幸祐、中井綾子、鈴木行人、内田京、橋本哲平、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、中川夏子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 TNF- α はc-Mycを介してリウマチ滑膜細胞のp27Kip発現を変化させる
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会（東京）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 金城健太、吉田幸祐、中井綾子、鈴木行人、内田京、橋本哲平、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、中川夏子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 IL-6とTNF α は細胞周期調節因子を介して協調的に滑膜細胞増殖に関与する
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会（東京）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 鈴木行人、吉田幸祐、金城健太、中井綾子、内田京、橋本哲平、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、中川夏子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 IL-6は時計遺伝子を介して滑膜細胞に細胞死抵抗性をもたらす
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会（東京）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 K. Kaneshiro, K. Yoshida, A. K. Uchida, T. Hashimoto, Y. Kawasaki, N. Tateishi, N. Terashima Y, Shibanuma, Y. Sakai, A. Hashiramoto.
2. 発表標題 IL-6 and TNF-a cooperate to modulate Cell Cycle of RA-FLS via Cyclin Dependent Kinase 6.
3. 学会等名 2018ACR/ARHP Annual Meeting (Chicago) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------