

令和 4 年 2 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17884

研究課題名(和文) CDK4/6阻害による滑膜線維芽細胞選択的な関節リウマチ治療法の開発

研究課題名(英文) Targeting synovial fibroblasts for the treatment of rheumatoid arthritis by CDK4/6 inhibition

研究代表者

細矢 匡 (Hosoya, Tadashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60737104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞周期制御分子であるCDK4/6の阻害が滑膜線維芽細胞からの炎症メディエーターを抑制する機序を解析し、そのメカニズムがAP-1の精緻なコントロールによってなされていることを明らかにした。関節リウマチの関節では滑膜線維芽細胞からのサイトカイン産生が炎症増幅に関与しているが、CDK4/6阻害は網羅的にAP-1関連遺伝子を抑制するのではなく、RAに関連の深い一部の遺伝子群を選択的に抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ(RA)は代表的な炎症性疾患であり、炎症を標的にした治療は患者の予後を大きく改善するに至ったが、関節炎を完全にコントロールできる患者は一部で感染症などの合併症が問題になる。滑膜線維芽細胞を標的としたいくつかの治療戦略は現在のRA治療を補完と期待され、臨床応用が現在試みられているが、本研究で注目したCDK4/6はリウマチ関節の滑膜線維芽細胞の特徴である過剰な細胞増殖とサイトカイン産生という両面を抑制する、理想的な治療になりうる。

研究成果の概要(英文)：We identified that a small part of inflammatory gene transcription, including was impaired in the absence of CDK4/6 activity by attenuating the AP-1 transcriptional activity. Since the target AP-1 component was protected from ubiquitine-proteasome dependent degradation when CDK4/6 were active, the inhibition of CDK4/6 resulted in the down-regulation of the baseline expression and its induction in RASFs. We hypothesized that the inhibition of CDK4/6 attenuated cytokine responsiveness in the RASFs by enhancing degradation. Furthermore, we confirmed that the inhibition of CDK4/6 resulted in selective gene suppression sharing specific AP-1 motifs in their promoter by the RNA-seq analysis.

研究分野：関節リウマチ、膠原病、免疫学

キーワード：滑膜線維芽細胞 CDK4/6 関節リウマチ AP-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

< 関節リウマチの病態と現行治療の問題点 >

関節リウマチ(RA)は自己免疫応答による免疫細胞の活性化と、炎症性サイトカインの産生、滑膜線維芽細胞の増殖と骨・軟骨の破壊を特徴とする慢性炎症性疾患である。自己免疫応答の抑制やサイトカイン阻害がRAの治療薬として開発され、RAの治療成績は大きく改善した。しかしこれらの治療は感染防御能を低下させるため感染症の合併が不可避である。また関節炎の完全なコントロールを達成できる患者の割合は半数程度で、なぜかどの薬剤を用いても治療成績は同等である。免疫抑制・サイトカイン抑制の機序とは異なる、新たなメカニズムを有する抗リウマチ薬の開発が望まれている。RAにおいては関節局所の高サイトカイン状態が関節炎と密接に関連しており、RASfはその病態形成に重要な役割を果たすことから、治療標的細胞なりえると期待される。

< 関節炎モデルマウス・滑膜線維芽細胞においてCDK4/6阻害が秘める抗炎症作用 >

申請者らの研究室では細胞周期のG1チェックポイントを制御するサイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6に注目し、その阻害を新規RA治療戦略として提案した(Taniguchi, Nat Med. 1999, Hosoya, Ann Rheum Dis. 2016)。滑膜線維芽細胞の過増殖の抑制を作用機序と考えていたが、興味深いことに、CDK4/6の阻害によって炎症細胞浸潤や関節局所でのサイトカイン産生も抑制されていた。さらなる解析によって、CDK4/6の阻害によってRASfからRAの病態に関わるMMP-3やMCP-1の産生が抑制されることを明らかにした(Nonomura, Arthritis Rheum. 2006)。

< CDK4/6が関係する、滑膜線維芽細胞に特有のAP-1制御メカニズムの生理的意義 >

AP-1はJun family(cJun, JunB, JunD)とFos family(cFos, FosB, Fra1, Fra2)がホモ/ヘテロダイマーを形成し、転写活性を発揮するが、各々の構成因子の発現・分解制御は細胞種や誘導刺激ごとに異なる。申請者らは滑膜細胞にはCDK4/6阻害による特有のAP-1制御メカニズムが存在することを見出した。本研究においては同メカニズムの生理学的な意義を検証し、RASfにおけるAP-1ファミリーの選択的制御様式を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究ではCDKIが有する抗炎症作用の分子メカニズムを明らかにすることで、滑膜線維芽細胞を標的とした、新たな作用機序の抗リウマチ薬の開発へとつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、CDK4/6阻害が細胞増殖抑制作用、抗炎症作用をRASf選択的にもたらすメカニズムを解析する。これまでの解析で、CDKIが抑制するサイトカイン群はプロモーター領域に転写因子AP-1を共有していた。RASfにおけるAP-1構成因子の制御メカニズムを後述の計画で解析し、CDKIが影響を与える遺伝子群の特徴を、RNAシーケンス(RNA-Seq)による網羅的な遺伝子解析によって検証する。

A) CDKIがターゲットとするAP-1構成因子の制御メカニズムの解析

転写因子AP-1はJun family(cJun, JunB, JunD)とFos family(cFos, FosB, Fra1, Fra2)がホモ/ヘテロダイマーを形成し、転写活性を発揮する。RASfにおける刺激依存的なAP-1構成因子の変動をWestern blotting(WB)で検討する。一部のAP-1構成因子は転写翻訳と共にプロテアソーム依存的な分解によって制御されていることから、CDKIのターゲッ

トの産生と分解に焦点を当てて検討する。

また、CDK4/6 活性は増殖期の細胞で亢進しているが、非増殖期の細胞では低下している。RASFs を低血清状態に暴露することで CDK4/6 活性を低下させ、サイトカイン産生や AP-1 構成因子の発現のパターン、またこれらに対する CDKI の影響を解析する

B) 新たな CDK4/6 複合体の基質の検討

近年、Rb 以外に FOXM1 が新たに CDK4/6 の基質として報告されたが、すべての細胞種で同様に CDK4/6 複合体の基質として作用しているかは十分に検証されていない。RASFs においても FOXM1 が発現し、CDK4/6 複合体の基質として機能している否かを解析する。具体的には FOXM1 の発現を WB で検討し、CDKI により抑制を受けるかを評価するとともに、FOXM1 の下流の遺伝子群が CDKI による抑制を受けるかを quantitative PCR や WB によって検証する。さらにレンチウイルスを用いた shRNA の手法で、RASFs における FOXM1 の基質のノックダウンが AP-1 構成因子の発現抑制や、CDKI のターゲットである遺伝子群の発現抑制をもたらすか否かを検証する。

C) RNA-Seq による CDK4/6 阻害薬感受性遺伝子群の網羅的解析

複数の患者由来の RASFs を CDKI 存在下にサイトカインで刺激し、RNA-Seq で網羅的に解析することで CDKI 依存的に抑制される遺伝子群を見出し、pathway 解析を行う。また、これらの遺伝子群に特に enrich されている転写因子を探索する。

4. 研究成果

本研究での検討の結果、RASFs にサイトカイン刺激で誘導されるいくつかの AP-1 構成因子が CDKI によって抑制されることがわかった。また、AP-1 構成因子の発現は、サイトカイン刺激によって亢進するが、ベースラインおよび刺激後に誘導される AP-1 構成因子の発現レベルは、培養血清の濃度の影響を受けることを明らかにした。血清非存在下では CDK4/6 活性は消失するが、CDK4/6 の活性が、サイトカイン刺激によって誘導される AP-1 構成因子の発現レベルおよび、サイトカイン産生量に関連することを明らかにした。

siRNA によって AP-1 構成因子をノックダウンすることで、CDKI による効果に主要な役割を果たす AP-1 構成因子を特定した。また、その分子はプロテオソーム依存的な分解を受けることが知られていたため、プロテオソーム阻害薬 MG132 を使用した際の蛋白発現への影響を検討したところ、MG132 の存在下では発現が増強し、さらに MG132 の存在下では CDKI による抑制が観察されないことが明らかになった(図 1)。また、MG132 と CDKI の併用下では、ユビキチン化した蛋白が蓄積していることを免疫沈降で明らかにした(図 2)。

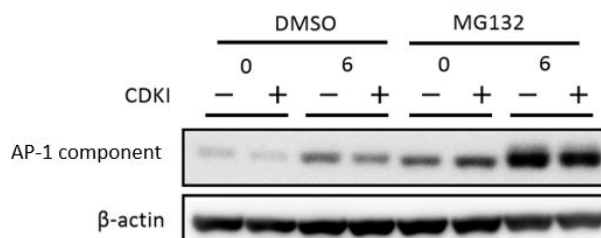


図 1

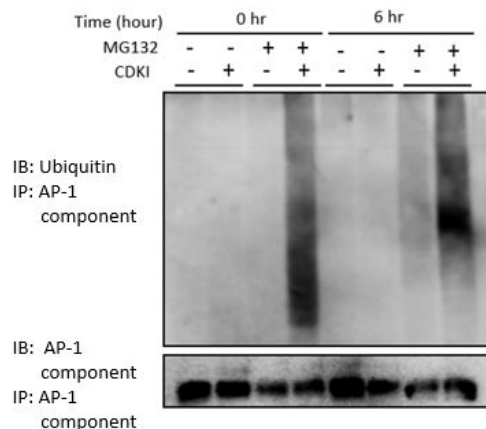


図 2

以上より、CDK4/6 を抑制すると、ユビキチン-プロテアソーム系を介して AP-1 構成因子の分解が亢進することが明らかとなった。

また、既報として報告された CDK4/6 の基質のうち、FOXM1 の発現と制御を検討した。乳癌細胞株は既報通り CDK4/6 阻害で FOXM1 の抑制が見られたが、滑膜線維芽細胞では FOXM1 の発現レベルが低く、従来手法では検出できないことが分かった。FOXM1 の発現は腫瘍細胞では亢進しているが、primary 細胞での発現レベルは低いことが知られている。滑膜線維芽細胞では FOXM1 の CDK4/6 の基質としての寄与は小さいと思われる。

さらに、5 名の RA 患者から樹立した RASFs を用いて、CDKI 依存的に抑制される遺伝子群を網羅的に見出すため、RNA-Seq を行った。サイトカイン刺激で誘導され、かつ CDKI で抑制される遺伝子を CDKI 感受性遺伝子と定義したところ、26 遺伝子が該当した(図 3、図 4)。26 遺伝子で enrich されている転写因子を解析したところ、これらの遺伝子群では転写因子の中で AP-1 モチーフが最も enrich されていることが分かった。すなわち、滑膜線維芽細胞で CDK4/6 依存的に制御されている遺伝子群は AP-1 への依存度が最も高いことを網羅的解析でも証明した。興味深いことに、AP-1 モチーフを有する遺伝子は多数存在するが、CDKI 感受性遺伝子群はそのごく一部であった。さらに、CDKI 感受性遺伝子群をパスウェイ解析すると、関節リウマチ(RA)や IL-17 シグナル経路、JAK-STAT 経路など、RA と関連の深い pathway が上位にランクされた。これらの結果から、CDK4/6 阻害は網羅的に AP-1 関連遺伝子を抑制するのではなく、RA に関連の深い遺伝子群を選択的に抑制する可能性が示唆された。

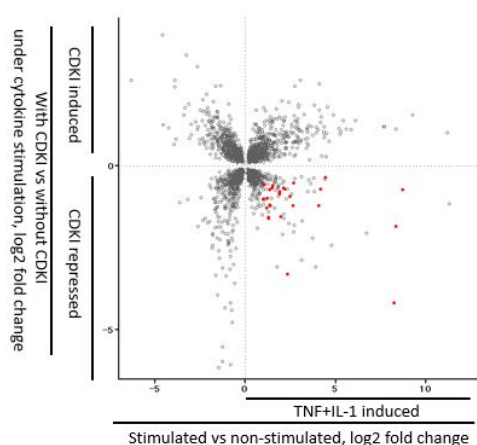


図 3

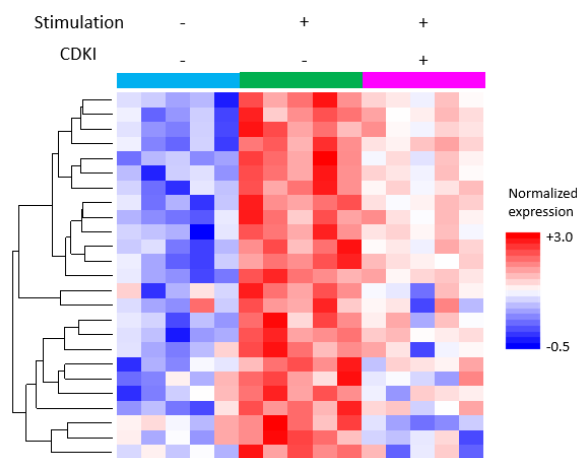


図 4

本研究では滑膜線維芽細胞に対する CDK4/6 阻害による炎症抑制メカニズムを明らかにした。本研究で主に使用した CDK4/6 阻害薬である Palbociclib は乳癌の治療薬として承認され、すでに診療に用いられている。安全性の情報も集積してきているが、重篤な副作用の報告は少なく、特に感染症のリスクについては報告されていない。また、関節リウマチを合併した乳癌患者が、Palbociclib の投与を受けたところ、関節炎も改善したという報告もある。新規薬剤の開発には多くのコストがかかるが、既存の薬剤を他疾患に転用する drug repositioning は効率よい薬剤開発に結び付くとされる。従前から我々の研究グループが提案してきた、CDK4/6 阻害による関節炎治療の臨床応用が近づいていると思われる、本研究はその理論的背景の一つとなりうると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Akio, Saito Tetsuya, Hosoya Tadashi, Kawahata Kimito, Asano Yoshihide, Sato Shinichi, Mizoguchi Fumitaka, Yasuda Shinsuke, Kohsaka Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic effect of cyclin dependent kinase 4/6 inhibitor on dermal fibrosis in murine models of systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42042	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 Tadashi Hosoya, Takahiko Sugihara, Nobuyuki Miyasaka, Shinsuke Yasuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel treatment strategy of polymyalgia rheumatica targeting drug-free remission	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hosoya Tadashi, Shukla Nikunj M., Fujita Yuya, Yao Shiyin, Lao Fitzgerald S., Baba Hiroyuki, Yasuda Shinsuke, Cottam Howard B., Carson Dennis A., Hayashi Tomoko, Corr Maripat	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Compounds With Glucocorticoid Sparing Effects on Suppression of Chemokine and Cytokine Production by Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.607713	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 該当する

1. 著者名 Sugihara Takahiko, Ishizaki Tatsuro, Onoguchi Wataru, Baba Hiroyuki, Matsumoto Takumi, Iga Shoko, Kubo Kanae, Kamiya Mari, Hirano Fumio, Hosoya Tadashi, Miyasaka Nobuyuki, Harigai Masayoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Effectiveness and safety of treat-to-target strategy in elderly-onset rheumatoid arthritis: a 3-year prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa922	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 Hosoya Tadashi, Saito Tetsuya, Baba Hiroyuki, Tanaka Nao, Noda Seiji, Komiya Youji, Tagawa Yasuhiro, Yamamoto Akio, Mizoguchi Fumitaka, Kawahata Kimito, Miyasaka Nobuyuki, Kohsaka Hitoshi, Yasuda Shinsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Chondroprotective effects of CDK4/6 inhibition via enhanced ubiquitin-dependent degradation of JUN in synovial fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keab874	査読の有無 無
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 Hosoya Tadashi, Cordelia Dunai, Michael Benedict D., Miyabe Chie, Nagai Jun, Murooka Thomas T., Miyabe Yoshishige	4. 巻 12
2. 論文標題 Editorial: Targeting the Chemoattractant System in Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.744290	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tadashi Hosoya, Hiroyuki Baba, Shinsuke Yasuda, Maripat Corr
2. 発表標題 Novel compound that impacts FLS migration and chemokine production via NFkB suppressing activity
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会 International Concurrent Workshop
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadashi Hosoya, Nikunj Shukla, Yuya Fujita, Shiyin Yao, Fitzgerald Lao, Hiroyuki Baba, Shinsuke Yasuda, Howard Cottam, Dennis Carson, Tomoko Hayashi and Mary Corr
2. 発表標題 Identification of Small Molecules with Efficacy as Steroid Sparing Suppression of Chemokine and Cytokine Production by Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes
3. 学会等名 ACR Convergence 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細矢 匡、斎藤 鉄也、田川 泰寛、山本 晃央、溝口史高、川畑 仁人、宮坂 信之、上阪 等
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬が有するリウマチ滑膜線維芽細胞に対する抗リウマチ作用の解析
3. 学会等名 骨免疫ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場洋行, 細矢 匡, 保田晋助
2. 発表標題 ステロイドに代わる新たなNF- B抑制性化合物の探索
3. 学会等名 日本臨床免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 3. 細矢 匡、斎藤 鉄也、田川 泰寛、山本 晃央、川畑 仁人、宮坂 信之、上阪 等
2. 発表標題 CDK4/6はAP-1構成因子cJunとFra1の安定性を介してAP-1転写活性を制御する
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 庭野智子、細矢匡、溝口文高、今井耕輔、森尾友宏、小池竜司
2. 発表標題 冠動脈病変による心筋梗塞を契機に診断したA20ハプロ不全症の一成人例.
3. 学会等名 日本リウマチ学会関東支部学術集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi Hosoya, Yasuhiro Tagawa, Hiroyuki Baba, Seiji Noda, Shinsuke Yasuda
2. 発表標題 The active cyclin dependent kinase 4 and 6 contributed in the MMP-1/3 productions by stabilizing JUN in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadashi Hosoya, Yasuhiro Tagawa, Hiroyuki Baba, Seiji Noda, Shinsuke Yasuda
2. 発表標題 Cyclin Dependent Kinase 4 and 6 Determine the Cytokine Responsiveness by Stabilizing JUN in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts.
3. 学会等名 ACR Convergence 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細矢 匡、斎藤 鉄也、馬場 洋行、田中 奈緒、野田 聖二、小宮 陽仁、田川 泰寛、山本 晃央、保田 晋助
2. 発表標題 細胞周期制御分子CDK4/6は転写因子JUNの安定性制御を介してリウマチ滑膜線維芽細胞のサイトカイン産生能を調節する
3. 学会等名 日本臨床免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 細矢 匡、杉原 毅彦、保田 晋助	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 12
3. 書名 リウマチ性多発筋痛症におけるdrug-free remissionを可能にする新たな治療	

1. 著者名 細矢 匡	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 特集 高齢発症関節リウマチ (EORA) の病態と治療 感染症予防対策	

1. 著者名 細矢 匡	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 18
3. 書名 関節リウマチの HBEGF陽性のマクロファージが線維芽細胞の浸潤能を誘導する	

1. 著者名 細矢 匡	4. 発行年 2019年
2. 出版社 臨床薬理研究振興財団	5. 総ページ数 7
3. 書名 カリフォルニア大学サンディエゴ校Moore'sがんセンター 留学記	

〔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
---------	---------