

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23805

研究課題名(和文) マクロファージにおける Tofacitinib の新規作用機構の解明

研究課題名(英文) New pharmacological effect of tofacitinib via modulating macrophage function

研究代表者

水野 夏実 (MIZUNO, Natsumi)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：40738621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tofacitinib は抗リウマチ薬であるが、免疫の要であるマクロファージに対する作用については不明な点が多い。本研究では、マクロファージにおける共刺激分子(CD86)、及び抗原提示分子(MHCII)発現に対する tofacitinib の影響を解析した。Tofacitinib は IFN- γ 誘導性 CD86 発現を低下させ、一方、IFN- γ 誘導性 MHCII 発現を増加させた。その結果、tofacitinib により CD86陰性MHCII陽性マクロファージが誘導されることを見出し、tofacitinib の新たな抗リウマチ作用の一つとして寄与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

Tofacitinib 存在下 IFN- γ 刺激による CD86陰性MHCII陽性(CD86-MHCII+)マクロファージの誘導の発見は、tofacitinibの新規抗リウマチ作用の可能性を示した。一方で、CD86-MHCII+マクロファージによる末梢性免疫寛容誘導も示唆される。従って、tofacitinib による易感染性など有害事象発生のメカニズムの一端となる可能性が示唆された。Tofacitinib をはじめとする JAK 阻害薬の免疫疾患に対する期待は大きい。CD86-MHCII+マクロファージ機能についてのさらなる研究によって JAK 阻害薬による過剰免疫の制御方法確立に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Tofacitinib is the first Janus kinase inhibitor approved for the treatment of rheumatoid arthritis. Although macrophages are critically involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, very few studies have reported the influence of tofacitinib on macrophage activation. In the present study, we examined the effect of tofacitinib on the expression of major histocompatibility complex class II (MHC II) and co-stimulatory molecule CD86 in macrophages. IFN- γ induces the cell surface expression of MHC II and CD86. Tofacitinib treatment significantly upregulated IFN- γ -induced expression of MHC II, while decreased the expression of CD86, hence CD86-MHC II+ cells were induced. We anticipate the contribution of induction of CD86-MHC II+ macrophages by tofacitinib in its antirheumatic action, because antigen presentation by MHC II without co-stimulation leads to T cell ignorance, a process known as peripheral immune tolerance.

研究分野：生物系薬学

キーワード：トファシチニブ マクロファージ MHC II CIITA

1. 研究開始当初の背景

(1) トファシチニブ (Tofacitinib, TOF) は, janus kinase (JAK) を阻害することでリンパ球の増殖・分化を抑制し, 抗リウマチ薬として高い効果を発揮する. 一方で, TOF はリンパ球のみならず, 抗原提示細胞である樹状細胞上の共刺激分子 CD80/86 の発現を抑制することが報告され (Kubo et al., *Ann Rheum Dis*, 2014), TOF の作用は多岐に渡ることが推察された.

(2) TOF は抗リウマチ薬として高い効果を発揮する一方, 易感染性などの有害事象の発生が問題となっている. 免疫バランスを制御する抗原提示細胞への TOF の影響解明は有害事象発生抑制にも不可欠であるが, その詳細は明らかにされていない.

(3) マクロファージは抗原提示細胞の一つで, 免疫の司令塔として間接リウマチの病態形成に関与する. また, 有害事象に関わる感染防御においても重要な役割を担う. しかし, TOF のマクロファージに対する作用についてはほとんど明らかにされていない.

2. 研究の目的

間接リウマチにおいて, マクロファージは自己の抗原を認識すると抗原提示分子 (MHCII) を介した抗原提示と同時に共刺激分子 (CD86) を介した T 細胞への刺激によって炎症反応を惹起する. マクロファージの抗原提示機能に対する TOF の影響については不明である.

関節リウマチ病態下において活性化しているマクロファージに対する TOF の影響の解析は, TOF による有害事象発生におけるマクロファージの関与を明らかにする上で重要である. 関節リウマチでは, 炎症性 T 細胞から産生される IFN- γ によってマクロファージが活性化する.

本研究では, IFN- γ により誘導される活性化マクロファージにおける CD86, 及び MHCII 発現に対する TOF の影響を解析することを目的とした.

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) は ATCC より購入し, 5%FBS 含有 RPMI-1640 培地で培養し実験に用いた. 刺激時には培養容器として, MPC ポリマーコート培養容器 (EZ-BindShut®SP) を使用した.

(2) 細胞表面抗原の測定

細胞表面における CD86 および MHCII の発現量測定は, 各分子に対する蛍光標識抗体で細胞を処理した後, 細胞の蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity) をフローサイトメトリーにより解析した.

(3) mRNA 発現量の解析

各細胞における mRNA 発現レベルはリアルタイム qRT-PCR 法により解析した.

4. 研究成果

(1) マクロファージにおける TOF による IFN- γ 誘導性 CD86 及び MHCII 発現への影響

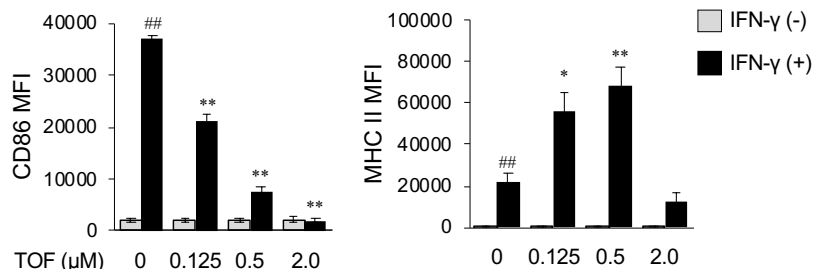


図 1. RAW264.7 細胞における IFN- γ 誘導性 CD86 及び MHCII 発現への影響

RAW264.7 細胞を tofacitinib (TOF) で前処理後, IFN- γ で刺激した. 24 時間後, CD86 及び MHCII の発現量をフローサイトメトリーで解析した.

MFI: Mean Fluorescence Intensity. Mean \pm S.E.M, ## P < 0.01 versus tofacitinib 0 / IFN- γ (-), * P < 0.05 and ** P < 0.01 versus tofacitinib 0 / IFN- γ (+).

マクロファージの代表的な活性化物質として知られる IFN- γ で RAW264.7 細胞を刺激し、CD86, 及び MHCII の細胞表面発現量を解析した. その結果, IFN- γ は CD86 及び MHCII 両分子の発現を増加させた. さらに, IFN- γ 誘導性 CD86 発現に対して TOF は濃度依存的に抑制した. 一方, IFN- γ 誘導性 MHCII 発現は, 低濃度の TOF (0.125, 0.5 μ M) により増強されることを見出した. また, TOF 単独では CD86, 及び MHCII 発現に影響は与えなかった (図 1).

(2) TOF 存在下 IFN- γ 刺激による CD86⁻MHCII⁺ マクロファージの誘導

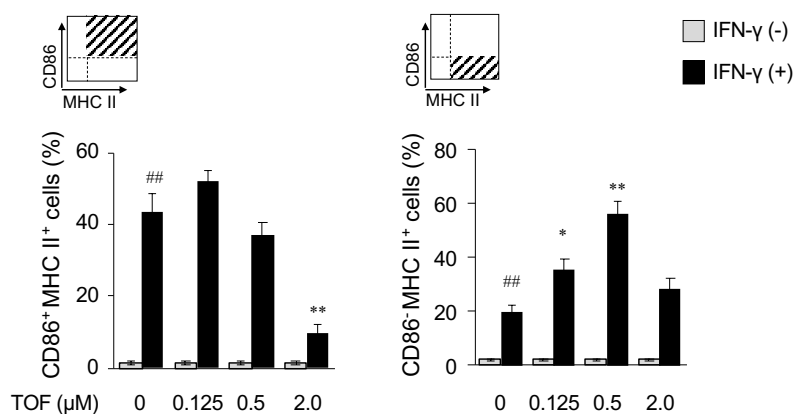


図 2. TOF 存在 IFN- γ 刺激によるマクロファージフェノタイプへの影響

RAW264.7 細胞を TOF で前処理後, IFN- γ で 24 時間刺激した. CD86 及び MHCII の発現量をフローサイトメトリーで解析し, 各領域内の細胞割合を算出した. Mean \pm S.E.M, ^{##} $P < 0.01$ versus TOF 0/IFN- γ (-), ^{*} $P < 0.05$ and ^{**} $P < 0.01$ versus TOF 0/IFN- γ (+).

IFN- γ 刺激により CD86⁺ MHCII⁺ 両陽性 (CD86⁺ MHCII⁺) マクロファージの割合が増加した. 一方, 低濃度 TOF (0.125, 0.5 μ M) 存在下 IFN- γ 刺激は CD86 陰性 MHCII 陽性 (CD86⁻ MHCII⁺) マクロファージの割合を増加させた (図 2). 共刺激分子を欠いた MHCII を介した抗原提示は, T 細胞に免疫不応答を惹起することが知られており, TOF による CD86⁻ MHCII⁺ マクロファージの誘導が感染防御の破綻へ寄与, あるいは抗リウマチ作用へ寄与する可能性を示唆した.

(3) TOF による IFN- γ 誘導性 CD86, 及び MHCII mRNA 発現への影響

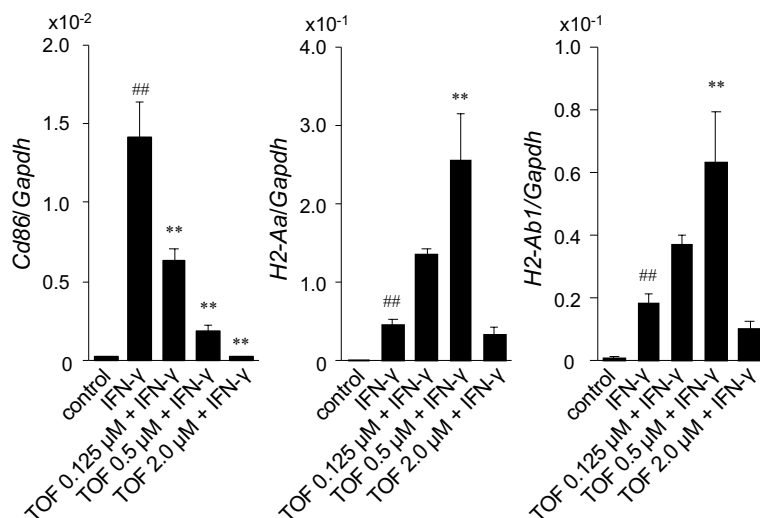


図 3. TOF による IFN- γ 刺激誘導性 CD86, 及び MHCII mRNA 発現への影響

RAW264.7 細胞を TOF で前処理後, IFN- γ で 24 時間刺激し, CD86, MHCII α 鎖, 及び MHCII β 鎖 mRNA の発現量をリアルタイム qRT-PCR で解析した. Mean \pm S.E.M, ^{##} $P < 0.01$ versus control, ^{**} $P < 0.01$ versus IFN- γ 単独 (IFN- γ)

TOF による CD86⁻MHCII⁺ マクロファージ誘導メカニズムを解明するため, TOF による CD86 細胞表面発現低下, 及び MHCII 細胞表面発現増加について両分子の mRNA 発現レベルを解析した. CD86 mRNA (*Cd86*) は IFN- γ によって発現が増加し, TOF の濃度依存的に抑制された. MHCII は α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体を形成している. MHCII α 鎖 mRNA (*H2-Aa*), 及び MHCII β 鎖 (*H2-Ab1*) は共に, IFN- γ により発現が増加し, これを 0.5 μ M の TOF は増強した. 一方で, 2.0 μ M の TOF は IFN- γ 誘導性の *H2-Aa*, 及び *H2-Ab1* 発現には影響を与えなかった. これらの *H2-Aa*, 及び *H2-Ab1* 発現変動は MHCII 細胞表面発現変動と一致するため, TOF による IFN- γ 誘導性 MHCII 発現の増強は転写制御を介していると考えられた (図 3).

(4) TOF 存在下 IFN- γ 刺激による MHCII 発現増加メカニズムの解析

MHCII の発現制御については、転写因子である CIITA がマスター転写因子として知られているため、同様に TOF による CIITA mRNA (*Ciita*) 発現への影響を解析した。 *Ciita* 発現は IFN- γ により誘導され、この発現は 0.5 μ M TOF により増強された。従って、TOF による MHCII 発現増加は、転写因子 CIITA を介していることが示唆された (図 4)。

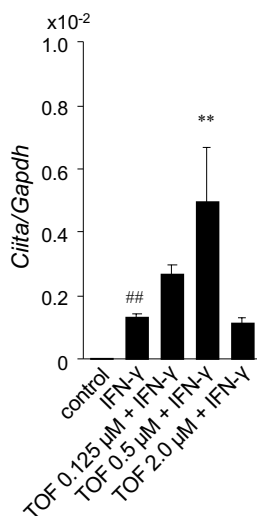


図 4. TOF 存在下 IFN- γ 刺激による CIITA mRNA 発現への影響

RAW264.7 細胞を TOF で前処理後、IFN- γ で 24 時間刺激し、CIITA mRNA の発現量をリアルタイム qRT-PCR で解析した。 Mean \pm S. E. M, ## P < 0.01 versus control, ** P < 0.01 versus IFN- γ 単独 (IFN- γ)

CIITA には少なくとも 3 つのプロモーター、pI, pIII, 及び pIV が存在し、各プロモーターからはそれぞれ CIITA type I, III, 及び IV mRNA が転写される。 TOF による CIITA type I, III, 及び IV の mRNA 発現への影響について解析した。 IFN- γ により全てのアイソフォームの発現レベルが上昇した。 低濃度の TOF (0.5 μ M) は IFN- γ 誘導性の CIITA type III, 及び type IV の発現レベルに影響を与えなかった。 これらに対して IFN- γ 誘導性 CIITA type I の発現レベルは低濃度の TOF (0.5 μ M) によりさらに上昇した (図 5)。 従って、TOF による IFN- γ 誘導性 MHCII 発現の増強は、転写因子 CIITA のうち特に CIITA type I の発現増加が関与していることが示唆された。

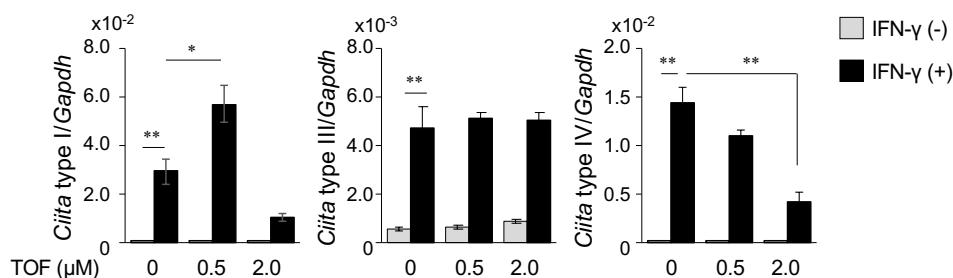


図 5. TOF 存在下 IFN- γ 刺激による CIITA 各アイソフォーム mRNA 発現への影響

RAW264.7 細胞を TOF で前処理後、IFN- γ で 24 時間刺激し、CIITA type I, type II, 及び type IV mRNA の発現量をリアルタイム qRT-PCR で解析した。 Mean \pm S. E. M, * P < 0.01, ** P < 0.01

(5) TOF による IFN- γ 下流シグナルへの影響

IFN- γ は JAK を介して STAT1 をリン酸化する。 データでは示さないが、本研究で使用した TOF の濃度においては濃度依存的に IFN- γ による STAT1 のリン酸化を抑制することを確認した。 すなわち、低濃度の TOF (0.5 μ M) による IFN- γ 誘導性 MHCII 発現増加は JAK-STAT 経路を介さないこと、一方、TOF による IFN- γ 誘導性 CD86 発現の低下は JAK-STAT 経路阻害にすることが示唆される。

(6) まとめ

研究開始当初の背景では、TOF の有害事象発生メカニズムが不明であること、また、TOF のマクロファージに対する影響についてはほとんど知られていないことに着目した。 TOF のマクロファージにおける抗原提示機能について解析を行った結果、IFN- γ によって誘導される CD86, MHCII 発現に対して、TOF は CD86 発現を抑制したが、MHCII 発現を増強させた。 結果的に、IFN- γ 存在下において TOF は CD86⁻ MHCII⁺ マクロファージを誘導することを見出した。

共刺激分子 (CD86) を欠いた MHCII を介した抗原提示により、T 細胞の免疫不応答が惹起される。 TOF を間接リウマチ病態下で用いることにより CD86⁻ MHCII⁺ マクロファージが誘導され、末梢性免疫寛容に寄与することが推察される。 抗原非特異的な末梢性免疫寛容は、TOF の有害事象としても重大な易感染性への原因となる。 しかしその一方で、CD86⁻ MHCII⁺ マクロファージによる自己抗原の認識と抗原提示は、TOF による抗リウマチ作用に寄与することが推察される。 今後、TOF により誘導されるマクロファージの詳細な機能解析とともに、*in vivo* 実験によって有害作用、及び新規抗リウマチ作用の両面からの研究が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 水野夏実, 遠藤朋子, 柳川芳毅
2. 発表標題 RAW264.7マクロファージの活性化に対する janus kinase 阻害薬 tofacitinib の作用
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsumi Mizuno, Tomoko Endo, Yoshiki Yanagawa
2. 発表標題 Tofacitinib, an oral janus kinase inhibitor, induces CD86- MHC II+ macrophages
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野夏実, 遠藤朋子, 柳川芳毅
2. 発表標題 経口 janus kinase 阻害薬 tofacitinib による MHC class II 発現増加機構
3. 学会等名 第71回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野夏実, 志賀咲紀, 柳川芳毅
2. 発表標題 New pharmacological effect of tofacitinib via modulating macrophage function
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------