

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2009～2011

課題番号：21390299

研究課題名（和文）抗 IL-6 阻害治療をツールとした炎症性自己免疫疾患の発症機構の解明

研究課題名（英文）Study of pathogenic mechanism of autoimmune diseases using the evidence from anti-IL-6 therapy

研究代表者 西本 憲弘（NISHIMOTO NORIHIRO）
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：80273663

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)など自己免疫疾患患者の遺伝子発現プロファイルと IL-6 阻害治療効果との関連解析から、病態形成に関わる分子群を同定した。その中で、S100 ファミリー分子は RA 患者における炎症反応のみならず、骨代謝の調節に関与することがわかった。また、SLE においてはミトコンドリアでの ATP 産生異常と DNA 修復分子(ERCC2, ERCC5)の発現低下を見出した。これらの異常は SLE の病態形成に関わる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We analyzed comprehensively gene expression profiles in patients with autoimmune diseases including rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) by DNA microarray and their correlation with the efficacy of anti-IL-6 therapy. S100 family was identified to be involved not only in inflammatory response but in bone metabolism in RA. In SLE patients, abnormal ATP synthesis and DNA repair were identified which may be involved in the pathogenesis of SLE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学

1. 研究開始当初の背景

炎症性自己免疫疾患の根本的原因は未だ明らかではない。しかし、病態形成に IL-6 の過剰産生が関わっており、IL-6 の作用を阻害する分子標的治療が開発された。本研究代表者は、ヒト化抗 IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）の臨床開発において中心的な役割を果たし、IL-6 阻害が関節リウマチ(RA)や全身型ならびに多関節型若年性特発性関節炎

(JIA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、血管炎症候群や成人スティル病に有効であることを示した。また、IL-6 阻害治療が滑膜増殖に不可欠の血管内皮細胞増殖因子 VEGF やマトリックス分解酵素 MMP-3 の産生を抑制すること、抗炎症作用をもつ副腎アンドロゲン分泌を促進することも報告した。

その過程で RA や JIA 患者の中に、トシリズマブ治療により臨床的寛解のみならず血

中 IL-6 が正常化し、トシリズマブを中止しても再燃しない症例を見出し、IL-6 阻害が単なる抗炎症作用のみならず、病気の根本に作用していると考えた。すなわち IL-6 が正常化するメカニズムの解明により発症機構に迫る可能性がある。

そこで、患者末梢血細胞ならびに関節組織における遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて IL-6 阻害治療前後で網羅的に解析し、バイオインフォマティクスを用いて、疾患活動性にかかわる分子群、治療反応性と関連する分子群を同定し、帰納法的に発症機構の解析を試みた。その中から、カルシウム結合タンパク S100 ファミリーならびに抗菌ペプチドである defensin ファミリーが各疾患に共通の IL-6 阻害関連分子として見出された。さらに、全身型 JIA ではミトコンドリア関連分子が、SLE では S100 と defensin ファミリー分子、Type I インターフェロン (IFN) が候補として見出された。しかし、これらの分子の自己免疫疾患における真の役割は未だ不明であり、これらの分子の病態形成における役割と、これらの分子の発現を制御するネットワークを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

IL-6 受容体抗体治療を行った炎症性自己免疫疾患 (特に RA、JIA、SLE) 患者の遺伝子発現プロファイルを含めたデータベースを作成し以下の項目を検討した。

- 1) IL-6 阻害と密接に関連していることがわかった 2 つのファミリー分子 (カルシウム結合タンパクである S100 ファミリーならびに抗菌ペプチドである defensin ファミリー) の病態形成における役割。
- 2) RA、JIA、SLE におけるサイトカインネットワークの異常の解析。
- 3) SLE で発現増加がみられた IFN により誘導される分子機能の解析。
- 4) JIA で見られたミトコンドリア機能異常およびマクロファージ活性化機構の解析。

3. 研究の方法

1) サイトカインネットワークの異常の解析
RA に対する IL-6 阻害治療による遺伝子発現プロファイルの変化を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、臨床効果と比較検討する。第Ⅲ相 SATORI 試験で IL-6 正常化に関連する分子、臨床効果に関連する分子合計 300 分子を同定したが、それらの分子の機能はいまだ不明である。異常発現分子が、特定の機能に統計学的有意差をもって集中が見られる場合、その細胞機能に異常があることが示唆される。そこで、Expression Analysis Systemic Explorer (EASE) を用いて、特定した分子の gene ontology 解析を行う。さらにそれらの分子に対して、Ingenuity

Pathway Analysis (IPA, Ingenuity System 社) を用いて異常発現分子群のネットワーク解析を行う。

RA と同様に、JIA、SLE 患者においても同定した分子群に対し、EASE による gene ontology 解析を行い、IPA によるネットワーク解析を行う。

2) S100 ファミリーの機能解析

- ① S100 ファミリー分子の発現プロファイルを破骨細胞分化の各ステージで検討する。
- ② 3 種類の S100 タンパク (S100A4, S100A8, S100A9 etc.) の siRNA を用い、破骨細胞分化に対する作用を in vitro で検討する。
- ③ S100 ファミリー分子の KO マウスを作製し骨密度の変化、関節炎感受性、関節破壊の重症度を与える影響を in vivo において検討する。

3) defensin の解析

ヒト defensin $\alpha 1$, $\alpha 3$ タンパクの発現実験を行う。生理活性を有する成熟 defensin は 30 アミノ酸残基よりなる小型のタンパクであるため、本実験に適した検出系がなく、また in vivo 投与実験では速やかに血中より消失し、有効濃度を保てなかったため、同タンパクに免疫グロブリン Fc 部位を Tag として付加した。これを非増殖型アデノウイルスに組み込み、defensin 発現ベクターを作製する。これを用いて in vivo で defensin を発現させ、同分子の免疫難病病態形成への関与を検討する。

4) 全身型 JIA 患者における末梢血中細胞のミトコンドリア機能の解析とマクロファージ活性化の検討

- ① 正常なミトコンドリア機能を持つ細胞に取り込まれる tetramethyl rhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE) を用い、どの細胞分画に異常が存在するかを明らかにする。
- ② アポトーシス関連分子 p53, p53AIP, DAPK1, SEMA 6 A の IL-6 阻害治療による発現量の変化を検討する。
- ③ ミトコンドリアの修復、複製にかかわると考えられる SLC25A4, nuclear respiratory factor 1 (NRF1), optic atrophy 1 (OPA1) の IL-6 阻害治療による発現量の変化を検討する。
- 5) SLE の病態形成における細胞機能異常とネットワーク解析
① DNA マイクロアレイ解析により異常発現が認められた IFN を中心とする分子群と SLE の各種病態との関連について検索する。
② IFN により誘導される分子群の分子間相互作用を明らかにする。

4. 研究成果

1) サイトカインネットワークの異常の解析
RA (IL-6 阻害治療前後各 180 例)、全身型 JIA (IL-6 阻害治療前後各 51 例) ならびに多関

節型 JIA (IL-6 阻害治療前後各 6 例)、SLE 患者 (IL-6 阻害治療前後 2 例、その他の治療 40 例) の網羅的遺伝子発現プロフィールを含めたデータベースを作成した。IL-6 阻害治療と網羅的遺伝子発現解析ならびにバイオインフォマティクスを用いて、病態との関連解析を行った。また、SLE のサイトカインネットワーク異常と細胞機能異常について検討した。

①RA 患者では、Cell Adhesion、Ion Transport、と Morphogenesis に関わる分子群に発現増加が見られ、Metabolism、特に RNA Metabolism、Protein Biosynthesis と Purine Nucleotide Metabolism に関わる分子群の発現が低下していた。これらの中で特定の分子としては cadherin or protocadherin families の発現が有意に増加した。

IL-6 阻害治療により有意に変化した分子群には免疫関連分子として、Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein、defensin alpha (DEFA)3、DEFA4、complement component 8 gamma polypeptide、platelet factor 4、pro-platelet basic protein、S100A9、S100A12、IL-1 receptor type II、peptidoglycan recognition protein 1、C-type lectin domain family 4 member E が治療前に増加しており、トシリズマブ治療後低下した。一方、MHC class II 分子 (HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DPQA1、HLA-DPQB1、HLA-DRA、and HLA-DMA)、killer cell lectin-like receptor subfamily members と chemokine ligand 5 は治療前に減少していたが、治療により殆どが正常化した。

RA、JIA、SLE に共通する分子としては S100 ならびに defensin ファミリー分子がこれらの疾患に共通する分子として見出された。

②全身型 JIA ではマクロファージ活性化を示す IL-18、IFN γ 、TNF を中心とするネットワークの亢進が見られた。また、遺伝子発現が低下した分子を用いた機能カテゴリー解析では、酸化的リン酸化のカテゴリーに異常がみられ、ミトコンドリア DNA でコードされる分子が多く含まれていた。さらに、ミトコンドリアの障害時や修復時に誘導される分子 SLC25、A4NRF1、OPA1 の発現が増加していたことから、ミトコンドリアの機能異常と修復機転の存在が示唆された。以上より、全身型 JIA ではミトコンドリア機能異常が生じ、アポトーシスの亢進がマクロファージ活性化につながると考えられた。

③SLE で IFN により誘導される分子の発現レベルの増加が確認され (IFN signature)、それらは疾患活動性と相関した。これらの分子群は TNF による発現制御を同時に受けていることがネットワーク解析から明らかになった。IFN α と IFN γ 、TNF の相互作用を *in vitro* で検討したところ、IFN α と TNF は競合したが、

IFN α と IFN γ は相乗効果を示した。

免疫以外の細胞機能としては、SLE においてもミトコンドリア機能異常による ATP 産生の低下と DNA 修復酵素の発現低下が関与する可能性が明らかになった。

2) S100 ファミリーの機能解析

①RA、JIA、SLE に共通する分子として S100 ファミリー分子が見出された。S100A4、A6、A9、A11、A12 は、RA、SLE、JIA で共通に増加したが、S100A5 と S100G は RA に限定され、逆に S100A13、A16 は RA、SLE、全身型 JIA で低下するなど疾患特徴的なパターンが明らかになった。

②RA 患者において、S100 ファミリーのうち S100A4、A6、A9、A12 分子の発現は血清 IL-6 レベルと相関した。バイオインフォマティクス解析により、S100 ファミリー分子と TNF、IL-6、IL-1、TGF β がネットワークを形成して相互に制御し合うことが明らかになった。しかも、これらの発現異常は IL-6 単独阻害により正常化した。

③siRNA による S100A4 の発現抑制は、単球から破骨細胞への分化を *in vitro* で阻害することを明らかにした。S100A4 の破骨細胞分化への関与が *in vitro* で判明したことから、*in vivo* で検証するために、KO マウスを作製した。コンディショナル KO マウスは完成し現在、骨代謝と関節炎における役割を解析中である。

3) defensin の解析

抗菌ペプチドである defensin α 1、 α 3 も IL-6 阻害治療により過剰発現が正常化した。defensin α 1、 α 3 の機能を *in vitro* で明らかにするために、免疫グロブリン Fc 部位を Tag として付加し、発現を安定化させ、非増殖型アデノウイルスに組み込み、defensin 発現ベクターを作製した。炎症反応や免疫細胞の走化作用が期待され、遺伝子導入を試みたが有意な結果は得られなかった。

4) 全身型 JIA 患者における末梢血中細胞のミトコンドリア機能の解析とマクロファージ活性化の検討

①JIA では IL-6 阻害治療によりミトコンドリア DNA でコードされた遺伝子発現低下が回復し、ミトコンドリアの修復、複製にかかわる SLC25A4、NRF1、OPA1 発現も正常化した。また、アポトーシスに関わる p53、p53AIP、DAPK1、SEMA 6 は発現が抑制され、アポトーシスの抑制が示唆された。マクロファージ活性化を示す IL-18、IFN γ 、TNF を中心とするネットワークの異常が見られたが、IL-6 阻害治療により回復した。

②ミトコンドリアに選択的に取り込まれる TMRE による解析によりミトコンドリア機能の低下が確認された。この異常は主に T 細胞に見られた。これらの異常は、IL-6 阻害治療による疾患活動性の低下とともに改善した。

5) SLE の病態形成における細胞機能異常とネットワーク解析

① SLE 患者で、ミトコンドリアの機能異常と ATP 依存性の DNA 修復分子 (ERCC2, ERCC5) の発現低下を見出した。ERCC2, ERCC5 は光線過敏症を共通の臨床症状とする色素性乾皮症やコケイン症候群の原因遺伝子であることから、SLE の病態、特に光線過敏症に関わる可能性がある。また、全身型 JIA でもミトコンドリア機能異常が生じ、アポトーシスの亢進がマクロファージ活性化につながると考えられた。これらの異常は IL-6 に依存することを明らかにした。

6) その他：IL-6 阻害が RA 患者の酸化ストレスを改善することを明らかにした。

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 77 件) すべて査読有

- ① Hiraio M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Rheumatol Int* 2011 Sep 11. [Epub ahead of print]
- ② Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Suzuki R, Ochi K, Ochi T, Nishimoto N. Abnormal networks of immune response-related molecules in bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jun 16;13(3):R89.
- ③ Lee HM, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Underexpression of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011 Apr 15;13(2):R63.
- ④ Hashimoto J, Garnerio P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Mod Rheumatol* 21:10-15, 2011.

- ⑤ Lee HM, Sugino H, Nishimoto N. Cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:676284. Epub 2010 Apr 15
- ⑥ Sugino H, Lee HM, Nishimoto N. DNA microarray analysis of rheumatoid arthritis susceptibility genes identified by genome-wide association studies (GWAS). *Arthritis Res Ther* 12:401, 2010.
- ⑦ Take Y, Nakata K, Hashimoto J, Tsuboi H, Nishimoto N, Ochi T, Yoshikawa H. Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports interaction with B cells and enhances IL-6 production. *Arthritis Rheum* 60:3591-3601, 2009
- ⑧ Lee HM, Mima T, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Yoshio-Hoshino N, Matsubara K, Nishimoto N. Interactions among type I and II interferon, tumor necrosis factor, and beta-estradiol on the regulation of immune response-related gene expressions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2009 Jan 3;11(1):R1.
- ⑨ Mima T, Ishikawa S, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Interleukin-11 and paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha expression correlates with the number of joints with active arthritis in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 68:286-7, 2009
- ⑩ Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis*. 68:264-72, 2009.

[学会発表] (計 93 件)

- ① Lee H, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Shimaoka Y, Ochi T, Nishimoto N. Comparisons of MHC class I molecule expressions in bone marrow (BM) cells and peripheral blood cells (PBCS) of rheumatoid arthritis (RA). EULAR2011. London, United Kingdom. 2011. 5. 25-28
- ② Sugino H, Lee H, Ochi T, Nishimoto N. Suppression of intercellular s100A4 utilizing small interfering RNA inhibits osteoclast genesis. EULAR2011. London, United Kingdom. 2011. 5. 25-28
- ③ Lee H, Sugino H, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Ochi T, Nishimoto N. Correlations between S100 gene expression levels and the local and systemic inflammatory markers (matrix metalloproteinase-3, MMP3; erythrocyte sedimentation rate, ESR) in rheumatoid arthritis patients. ACR2011. Chicago, USA, 2011. 11. 4-11. 9
- ④ Nishimoto N, Kawata Y, Lee H, Aoki C, Sugino H, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Ochi T, Yokota S: The peripheral blood genes that account for predictability of clinical response to tocilizumab (TCZ) treatment, corticosteroid dose reduction, and serum IL-6 normalization at week 48 on systemic onset juvenile arthritis (sJIA). ACR/ARHP2009, USA
- ⑤ Nishimoto N, Sugino H, Aoki C, Lee H, Matsubara K, Mima T: Gene expression profiling of S100 protein families in the peripheral blood from patients with RA, SLE, polyJIA and sJIA-correlation between S100A4 expression and joint destruction, EULAR 2009. 2009. 6, Copenhagen, Denmark.

[図書] (計 8 件)

- ① Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T, Future Science Group E-Books Program. ADDRESSING UNMET MEDICAL NEEDS IN RHEUMATOID ARTHRITIS. 2012. 16

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 憲弘 (Nishimoto Norihiro)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号 : 80273663

(2) 研究分担者

安達 康雄 (Adachi Yasuo)
和歌山県立医科大学 医学部 博士研究員
研究者番号 : 10253882

杉野 英彦 (Sugino Hidehiko)
大阪大学大学院 生命機能研究科 助教
研究者番号 : 70270577

松谷 隆治 (Matsutani Takaji)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号 : 70372290

村上 美帆 (Murakami Miho)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号 : 30595591

(3) 連携研究者

なし

