

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 5月23日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009-2011

課題番号：21591275

研究課題名（和文）

関節リウマチ患者単球系細胞に対する JAK3 阻害剤の新規薬効解明と投薬法の開発

研究課題名（英文）

Development of novel medication strategy and drug efficacy on monocyte lineage cells of a JAK3 inhibitor in rheumatoid arthritis patients

研究代表者 山岡 邦宏 (YAMAOKA KUNIHIRO)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20425317

研究成果の概要（和文）：

Jak3 阻害剤である CP690,550 (CP) の関節リウマチ患者における作用を骨破壊に重要な破骨細胞の前駆細胞であり、かつ免疫機構の活性化の起点となる単球系細胞に着目し、その作用を検討した。ヒト単球からの破骨細胞分化と樹状細胞 (DC) 分化は CP 存在下では正常であった。破骨細胞の骨吸収作用は CP により変化はなかったが、DC では共刺激分子の発現が抑制され、リンパ球との共培養ではその増殖と IFN-g 産生を抑制した。

研究成果の概要（英文）：

In order to evaluate the effect of a Jak3-inhibitor CP690,550 (CP) on rheumatoid arthritis patients, we have focused on monocyte lineage cells, a progenitor for osteoclasts essential for bone resorption and dendritic cells (DCs) that functions as a start point of immune reaction. Differentiation of osteoclasts and DCs were not affected by the addition of CP. Bone resorption of osteoclasts was not affected by CP as well. Although, expression of co-stimulatory molecules on DCs were suppressed and co-culture of lymphocytes resulted in suppressed lymphocyte proliferation and IFN-g production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、樹状細胞、サイトカイン、骨代謝、滑膜線維芽細胞、Jak3

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の治療は TNF 阻害薬や IL-6 受容体抗体等の生物学的製剤の開発により飛躍的に進歩したが、同等の薬効を持つ経口内服薬の開発が待ち望まれていた。サイトカインがその生物学的活性を発揮する際に細胞内において Jak を活性化することと、Jak3 の発現が血球系細胞に限られ、その欠損が重

症複合型免疫不全症の原因となることから Jak3 は副作用を最小限に抑えた免疫抑制薬となることが期待され Jak3 特異的阻害薬 CP690,550 が開発された。2006年には生物学的製剤と類似した RA に対する高い治療効果が公表された。2007年から本邦において RA を対象とした治験が開始され、日本人 RA 患者においても高い治療効果を有する事が明

らかとなった。Jak のリンパ球系細胞における重要性は、発見当初より知られ、多くの研究が行われてきたが単球系細胞における機能については不明な部分が多い。単球系細胞において、Jak3 は LPS などの刺激により発現が誘導される事が報告されており、我々は Jak3 欠損マウスでは樹状細胞の分化や TNF、IL-6 等の炎症性サイトカインは野生型マウスと違いを認めないが、抗炎症性サイトカインである IL-10 を過剰に産生する事を報告してきた。

2. 研究の目的

RA に対して生物学的製剤と類似した治療効果を有する Jak3 阻害薬 CP690, 550 の単球系細胞（破骨細胞、樹状細胞）における作用を明らかにすることで骨代謝と免疫機構への影響を明らかにし投薬方法への一助とする。

3. 研究の方法

(1) 単球系細胞における Jak3 の役割と Jak3 阻害剤のヒト血球系細胞に対する効果

Jak3 欠損マウスは少数の活性化された異常リンパ球が存在するため、生後 3 ヶ月目より単球系細胞の異常増殖来たすため、Jak3/Rag2 ダブルノックアウトマウスを用いて単球系細胞 Jak3 の *in vivo* における機能を明らかにする。

(2) Jak3 の骨代謝への影響

Jak3/Rag2 ダブルノックアウトマウスに正常リンパ球系細胞を移入し、経時的に骨密度を測定、*in vitro* では Jak3/Rag2 ダブルノックアウト骨髄細胞より MCSF+RANKL にて破骨細胞分化を検討する。

(3) ヒト化マウスを用いた Jak3 阻害剤の滑膜細胞に対する効果

関節置換術施行患者より採取した軟骨と滑膜を一塊として免疫不全マウスの背部に移植すると共に、同患者より採取した末梢血単核球をマウスに移入し、ヒト化マウスを作成する。この手法により患者体内での滑膜炎をマウス体内にて再現し、かつ末梢血単核球を移入することにより自己免疫反応を維持する。CP690,550 は埋め込みポンプを用いて持続的に投与する。

(4) ヒト単球由来樹状細胞への作用

健康人末梢血 CD14 陽性単球を *in vitro* にて GM-CSF と IL-4 を用いて樹状細胞に分化誘導する。その分化過程における CP690,550 の影響と、正常に分化した樹状細胞の抗原提示能やリンパ球刺激能を検討した。

4. 研究成果

(1) Jak3/Rag2 ダブルノックアウトマウスを用いた解析

本検討においては、血球系細胞では単球系のみを有するマウスを用いて、正常のリンパ球

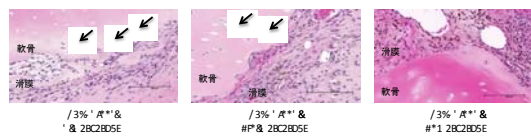
を移入し、マウス体内や関節炎モデルを作成することで単球系細胞の役割を検討したが、移入リンパ球の長期生存が得られなかったことと、マウスの繁殖が困難であった。

(2) 骨代謝に与える影響

前述の如く、マウスを用いた検討では成果が得られなかったため、ヒト単球より M-CSF と RANKL を用いて *in vitro* にて破骨細胞を分化誘導し、分化過程への影響と、骨吸収機能に関する解析を行った。CP690, 550 添加の有無に関わらず破骨細胞数、カテプシン K 発現と象牙の吸収能に変化は見られなかった。これらの結果から、CP690, 550 の破骨細胞分化に与える影響はなく、ひいては Jak3 の破骨細胞分化における役割は限定的であると考えられた。

(3) 滑膜細胞への作用

ヒト化マウスを用いた実験において CP690, 550 の投与により滑膜細胞の IL-6, IL-8, MMP-3 発現が強く抑制され、軟骨への浸潤も濃度依存性に抑制された。この結果は、滑膜内に存在するリンパ球を介した滑膜細胞への作用を示唆するだけでなく、最近になり指摘されている CP690, 550 の血球系以外の間葉系細胞に対する直接的抑制作用を示唆する結果であった。

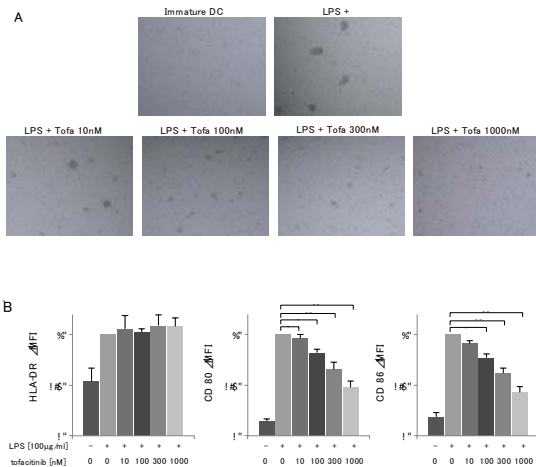


(4) ヒト単球由来樹状細胞の分化・機能

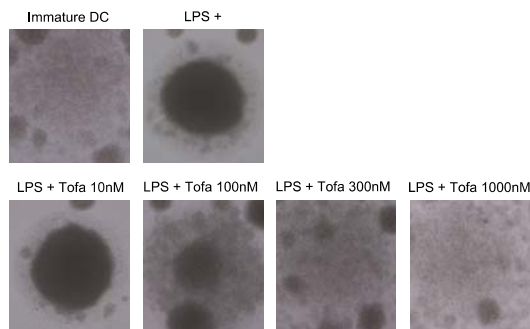
CP690, 550 が今後 RA 患者に投与されることを考慮し、本研究課題において最も重要な検討項目である。単球を樹状細胞に分化誘導するには GM-CSF と IL-4 を同時添加するが、CP690, 550 は IL-4 の作用を完全に阻害することが知られている。そこで、IL-4 添加の有無にて検討を行ったが、いずれの条件下においても樹状細胞分化に大きな違いを認めなかった。しかし、GM-CSF 単独培養または IL-4 と CP690, 550 同時添加の条件ではマクロファージへの分化誘導がより多く見られ、得られる樹状細胞数は減少した。この結果は、Jak3 欠損マウス骨髄細胞を用いた検討において、樹状細胞分化が正常である結果と一致しており、CP690, 550 の樹状細胞分化への影響は最小限と考えられた。また、本検討において用いた濃度では樹状細胞の細胞死が誘導されない事を確認した。

以後の樹状細胞機能の検討には細胞数の確保が必須であることから GM-CSF と IL-4 で分化誘導後、CP690, 550 の存在下で LPS 刺激を行った。樹状細胞は刺激することによりコロニーを形成するが、CP690, 550 添加により濃度依存性にコロニー数は抑制された。また、LPS 刺激により樹状細胞表面上の MHC

classII、CD80 と CD86 の発現が増強するが、CP690, 550 添加により CD80 と CD86 の発現のみが濃度依存的に抑制された。



樹状細胞は体内におけるもっとも優れた抗原提示能を有する細胞であり、CP690, 550 の樹状細胞を介した他の細胞への間接的影響を検討する目的でヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞との共培養を行った。その際、樹状細胞を CP690, 550 存在下で LPS 刺激後、通常の培養液と交換し、樹状細胞の影響のみを評価する条件下で行った。LPS 刺激で活性化され CD80 と CD86 を高発現している樹状細胞との共培養では T 細胞の増殖が誘導され多数のコロニー形成が観察された。一方、CP690, 550 の添加により T 細胞の増殖は強く抑制され、上清中の IFN- γ 濃度も有意に低下した。



Jak は発見以来、免疫機構の中でも T 細胞の分化と増殖に必須であることに着目されて来た。Jak の中でもとりわけ Jak3 は血球系細胞のみに発現が限られている事から、Jak3 に対して高い特異性を有するとされる CP690, 550 は中枢神経細胞など非血球系細胞には作用しない免疫抑制薬となることが期待され創薬された。しかし、本研究開始後に他の Jak、特に Jak1 に対する強い抑制作用を有し、これまでの化合物同様、非特異性を有することが明らかとなった。しかし、その非特異性は過去の化合物と比較すると Jak に対

する特異性は維持されていたことから、現在では、適度な特異性、非特異性を有することが高い臨床効果には重要であると考えられている。我々は CP690, 550 が RA 患者末梢血または滑膜由来の CD4 陽性リンパ球に直接作用することで間接的に滑膜線維芽細胞と単球からのサイトカイン産生を抑制することを報告した。本研究では、従来より指摘されてきたリンパ球への直接作用に加えて、樹状細胞に直接作用して抗原提示細胞能を修飾することで間接的に CD4 陽性 T 細胞の増殖とサイトカインを抑制する事が明らかとなった。これらの結果は、CP690, 550 が自然免疫に作用することをはじめて明らかにしたものであり、CP690, 550 が自然免疫と獲得免疫の双方に作用する事で免疫抑制作用を有する事を明らかにしており、その投与に際しては十分な配慮が必要であることを裏付けている。

本研究結果は健常人由来の細胞を用いたものであるため、CP690, 550 の RA 患者樹状細胞への作用についての評価が必要である。今後は RA 患者単球由来樹状細胞機能だけでなく、CP690, 550 内服患者の樹状細胞機能を評価する事で適切な投与方法を検討する。

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 59 件)

1. Iwata S., Yamaoka K., Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy and Clinical Immunology* 2012 (in press) 査読有 (7, 2 番目)
2. Iwata S., Yamaoka K., Tanaka Y. Involvement of Syk in pathology of systemic autoimmune disease. *Jpn J Clin Immunol.* 35: 56-61, 2012 査読無 (8, 2 番目)
3. Yamaoka K., Maeshima K., Kubo S., Sonomoto K., Tanaka Y. Anti-rheumatic effect of JAK inhibitors. *Jpn J Clin Immunol.* 2012 (in press) 査読無
4. Yamaoka K., Maeshima K., Kubo S., Tanaka Y. Regulation of inflammation through JAK3-Stat6 pathway in dendritic cells. *Jpn J Clin Immunol.* 35:62-68, 2012 査読無
5. Tanaka Y., Maeshima K., Yamaoka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann*

Rheum Dis. 71(Supp II): i71-i74, 2012 査読有

6. Maeshima K., Yamaoka K., Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- γ and IL-17 production by human CD4⁺ T cells. Arthritis Rheum. 2011 Dec 6. doi: 10.1002/art.34329. 査読有 (12, 2 番目)

7. Yamaoka K., Tanaka Y. Janus kinase (JAK) inhibitors in rheumatoid arthritis. Curr Rheum Rev. 7:306-312, 2011 査読無

8. Yamaoka K., Kubo S., Sonomoto K., Maeshima K., Tanaka Y. JAK inhibitor: tofacitinib, a new disease modifying anti-rheumatic drug. Inflammation and Regeneration Journal 31:349-353, 2011 査読無

9. Tanaka Y., Iwata S., Yamaoka K. Jak and Syk: Emerging their relevance to the treatment of inflammatory diseases. Inflammation and Regeneration Journal 31:237-44, 2011 査読無

10. Tanaka Y., Yamaoka K. Cytokine-mediated signals as targets for treatment of rheumatoid arthritis: a JAK inhibitor *in vitro* and *in vivo*. Int J Clin Rheumatol. 6:439-444, 2011 査読無

11. Nakano K, Yamaoka K., Tanaka Y. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naïve T-cells and a D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. J Immunol 186:3745-52, 2011 査読有 (10, 2 番目)

12. Oshita K, Yamaoka K., Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. Arthritis Rheum 63:1658-1667, 2011 査読有 (12, 2 番目)

13. Iwata S, Yamaoka K., Tanaka Y. Efficacy of combination therapy of anti-TNF- α antibody infliximab and methotrexate in refractory entero-Behçet's disease. Mod Rheumatol. 21:184-191, 2011 査読有 (7, 3 番目)

14. Iwata S, Yamaoka K., Tanaka Y. Phenotypic Changes of Lymphocytes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus who are in the long-term remission After B Cell Depletion Therapy

with Rituximab. J Rheumatol. 38:633-641, 2011 査読有 (11, 4 番目)

15. Kubo S., Yamaoka K., Saito K., Tanaka Y. Pericarditis induced by prophylactic administration of isoniazid in a patient with rheumatoid arthritis. Joint Bone spine 78:99-100, 2011 査読有

16. Kurihara R., Yamaoka K., Tanaka Y. C5a promotes migration, proliferation, and vessel-formation in endothelial cells. Inflamm Res. 59:659-666, 2010 査読有 (11, 2 番目)

17. Yukawa S., Yamaoka K., Tanaka Y. Involvement of mast cells in systemic sclerosis. Jpn. J. Clin. Immunol. 33:81-86, 2010 査読無 (6, 2 番目)

18. Yamaoka K., Tanaka Y. Jak inhibitor ; possibility and mechanism as a new disease modifying anti-rheumatic drug. Jpn J Clin Immunol. 32 : 85-91, 2009 査読無

[学会発表](計 25 件)

1. Yamaoka K. IL-10 production induced by LPS is negatively regulated by Stat6 in dendritic cells. 第 40 回日本免疫学会 学術集会 幕張メッセ (千葉) 2011 年 11 月 27 日

2. 山岡邦宏. 低分子化合物を用いた治療の進歩. シンポジウム 19 ; 関節リウマチの診療の革新的進歩 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 グランドプリンスホテル新高輪 (東京) 2011 年 11 月 12 日

3. Yamaoka K. Tofacitinib reduces Interleukin-6 and Matrix Metalloproteinase-3 production and inhibits cartilage destruction in rheumatoid arthritis. American college of Rheumatology McCormick Place West (シカゴ) 2011 年 11 月 6 日

4. 山岡邦宏. 樹状細胞 Stat6 の IL-10 産生制御機構. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル (東京) 2011 年 9 月 15 日

5. 山岡邦宏. JAK 阻害薬による関節リウマチ治療とその作用機序. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル (東京) 2011 年 9 月 15 日

6. 山岡邦宏. リウマチ性疾患の治療の進歩-低分子化合物の可能性と作用機序. 合同シンポジウム 1 第 39 回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル (東京) 2011 年 9 月 16 日

7. 山岡邦宏. JAK-Stat シグナル伝達経路阻害による抗炎症作用. 第 29 回日本骨代謝学会 大阪国際会議場 (大阪) 2011 年 7 月 28 日

8. 山岡邦宏. 次世代低分子化合物を用いた治療—JAK阻害薬. 第55回日本リウマチ学会総会Next decadeシンポジウム 神戸ポートピアホテル(神戸) 2011年7月19日
 9. 山岡邦宏. JAK阻害薬投与による関節リウマチ患者由来CD4+T細胞のIL-17産生抑制作用. 第55回日本リウマチ学会総会学術集会 神戸ポートピアホテル(神戸) 2011年7月19日
 10. 山岡邦宏. JAK-STATシグナル伝達経路阻害による炎症抑制作用. 第32回日本炎症再生医学会 京都国際会館(京都) 2011年6月3日
 11. Yamaoka K. Stat6 in dendritic cells is involved in inflammation by negatively regulating IL-10 production. 第14回国際免疫学会 神戸ポートピアホテル(神戸) 2010年8月24日
 12. 山岡邦宏. JAKインヒビター. 第31回日本炎症再生医学会 シンポジウム 京王プラザホテル(東京) 2010年8月6日
 13. Yamaoka K. Involvement of Stat6 in inflammation by negatively regulating IL-10 production. 第11回欧州リウマチ学会 Fiera di Roma(ローマ) 2010年6月18日
 14. 山岡邦宏. JAK-STATシグナル伝達経路阻害による炎症抑制作用. 第75回日本インターフェロンサイトカイン学会 北九州国際会議場(北九州) 2010年6月25日
 15. 山岡邦宏. Jak阻害薬の抗リウマチ薬としての可能性とその作用機序. 第75回日本インターフェロンサイトカイン学会 北九州国際会議場(北九州) 2010年6月26日
 16. 山岡邦宏. 樹状細胞のJak3-Stat6によるIL-10産生制御を介した炎症性疾患制御. 第54回日本リウマチ学会総会学術集会 神戸ポートピアホテル(神戸) 2010年4月22日
 17. 山岡邦宏. Jak阻害薬(CP-690, 550)による臨床的効果とMMP-3低下作用. 第54回日本リウマチ学会総会学術集会 神戸ポートピアホテル(神戸) 2010年4月23日
 18. 山岡邦宏. Jak阻害薬の抗リウマチ薬としての可能性とその作用機序. 第54回日本リウマチ学会総会学術集会 神戸ポートピアホテル(神戸) 2010年4月24日
 19. Yamaoka K. Role of Jak3-Stat6 in dendritic cells and its involvement in inflammation. 第39回日本免疫学会総会学術集会 大阪国際会議場(大阪) 2009年12月3日
 20. Yamaoka K. Role of Jak3-Stat6 and effect of Jak inhibitor on dendritic cells and its involvement in rheumatoid arthritis. 第37回日本臨床免疫学会 東京ステーションコンファレンス(東京) 2009年11月14日
 21. Yamaoka K. Inhibition of Jak3-Stat6 pathway leading to an anti-inflammatory process in rheumatoid arthritis. American college of Rheumatology Pennsylvania convention center(フィラデルフィア) 2009年10月18日
 22. Yamaoka K. Jak3-Stat6 in dendritic cells; involvement in the pathological condition of RA. 第74回日本インターフェロンサイトカイン学会 京都大学(京都) 2009年6月27日
 23. 山岡邦宏. 関節リウマチに対するJak阻害剤の樹状細胞を介した効果. 第53回日本リウマチ学会総会学術集会 グランドプリンスホテル新高輪(東京) 2009年4月26日
- 〔図書〕(計1件)
1. 山岡邦宏, 田中良哉. メディカルレビュー社ファーマナビゲーター リウマチ〜生物学的製剤編 単独投与, 抗リウマチ薬(MTX)の併用との使い分けのコツありますか? 2010, 108-110,
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
山岡 邦宏 (YAMAOKA KUNIHIRO)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20425317
 - (2) 研究分担者
田中 良哉 (TANAKA YOSHIYA)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30248562