

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591085

研究課題名（和文） 関節リウマチにおける Notch 分子の役割

研究課題名（英文） The role of Notch on rheumatoid arthritis

研究代表者

関根 知世子（SEKINE CHIYOKO）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40392005

研究成果の概要（和文）：Delta-like 1 (D111) は Notch2 を刺激することにより破骨細胞分化を促進、Jagged1 は Notch1 を刺激することにより破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。実際、RA モデルマウスおよび骨粗鬆症モデルマウスにおいて D111 阻害により関節組織の破骨細胞が減少し骨破壊が抑制されたが、正常マウスの破骨細胞分化には影響しなかった。以上より、D111 阻害は新たな RA 治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We revealed that Notch2/Delta-like 1 (D111) axis promoted osteoclastogenesis but Notch1/Jagged1 axis suppressed it. Actually, blockade of D111 suppressed osteoclastogenesis and bone loss in the affected joints of a mouse arthritis model as well as a mouse osteoporosis model while no effect was observed on normal mouse. Therefore, blockade of D111 could be a novel target for the treatment of RA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 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：免疫学

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：Notch、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）の治療は近年開発された生物学的製剤の有効性により画期的に進展したが、すべての人に有効ではなく副作用や価格の問題もある。したがって、RA の病態を解明し、より安全で有効な治療法の開発が必要である。近年、発生学の分野において重要である Notch 分子の免疫系への関与が盛んに研究されているが、自己免疫疾患への関与についての報告はあまりなく、RA への関与に

ついては、滑膜細胞増殖への関与と RA モデルマウスにおける Notch リガンド Jagged1 の関節炎抑制作用のみである。当研究室ではヒトおよびマウスの Notch 分子に対する各モノクローナル抗体を樹立し、これらの分子の発現動態およびその役割について解析してきた。

これら Notch 分子の中でも Notch リガンドの Delta-like 4 (D114) は胎児期の血管形成に必須であることが知られていたが、D114 が

血管新生にも関わっていて、D114の阻害は血流を伴わない血管新生を誘導することにより腫瘍の増殖を阻害することが報告されている。また、NotchリガンドのD111が生後の動脈新生に重要であることが報告されている。血管新生はRAにおいても血流の亢進、栄養分や酸素、炎症成分を病巣に運搬するなど病態の形成に重要なことが知られている。実際、RAモデルマウスの関節組織においてD111およびD114が血管部位に発現していた。これらの背景より、RA病態にD111およびD114が関与しているのではないかと考え、RAモデルマウスに抗D111阻害抗体、抗D114阻害抗体を投与し関節炎への影響を解析した。すると、D111阻害で関節炎が抑制されたが、D114阻害では関節炎は抑制されなかった。D111とD114を阻害した場合はD111単独阻害と同程度の関節炎抑制効果であった。

RAは免疫異常を伴う関節での炎症と滑膜細胞の異常増殖を特徴とし、最終的には骨破壊に至る疾患である。RA病態にはTNF- α やIL-1 β といった炎症性サイトカインが重要であることが知られている。一方、Notch分子もサイトカイン産生に関与している報告がある。さらに、Notch分子は免疫系やRA滑膜細胞の増殖に関与していることが報告されている。実際、RAモデルマウス炎症関節より樹立した滑膜細胞上にNotch1、Notch2、Notch3、D111、Jagged2が発現していた。

また、RAの病態において、罹患関節の骨破壊による関節機能不全は、生活の基本動作に支障をきたす重大な問題である。骨破壊は、骨芽細胞と破骨細胞のバランスの崩れによって引き起こされるが、Notch分子が骨芽細胞および破骨細胞の分化に関与していることがマウスで明らかとなってきた。

2. 研究の目的

RAモデルマウスにおいて関節炎抑制効果が認められたD111分子の阻害について、その関節炎抑制が血管新生の制御によるものか、メカニズムを解明する。D114の阻害では関節炎は抑制されなかったが血管新生に変化はないのか明らかにする。

さらに、D111阻害による関節炎抑制メカニズムとして、血管新生以外にも関与が考えられる、滑膜細胞増殖、破骨細胞分化などについて、D111を中心に全てのNotch分子の関与について解析を行うことにより、Notch分子の関節炎への役割の全体を明らかにする。以上の解析により、Notch分子が安全で有効な新たなRA治療の標的分子となるか探索する。

3. 研究の方法

D111分子の関節炎における血管新生、滑膜細胞増殖、破骨細胞分化への関与について解析を行うため、RAモデルマウスとしては、関

節炎発症後の病態および治療効果に焦点をしばって解析するための関節炎誘導期がないK/BxNマウス血清移入による関節炎と、免疫反応による関節炎誘導期があるコラーゲン誘発性関節炎マウスを用いる。また、より安全で有効な治療薬の開発に繋げるため、他のNotch分子の役割についての検討、およびマウスで得られた結果について、ヒト細胞での同定性の確認を行う。

まず、RAモデルマウスに抗D111阻害抗体、抗D114阻害抗体、抗D111阻害抗体と抗D114阻害抗体またはアイソタイプコントロールを腹腔内投与した足関節の関節組織切片を各血管識別マーカーに対する抗体で免疫組織染色し、動脈、静脈、毛細血管、リンパ管を同定し、増殖滑膜領域あたりの各血管数を求めコントロール群と各抗体投与群間で比較、統計解析する。上記抗体投与マウス関節組織よりRNAを抽出し各血管マーカー分子のRT-PCRを行い組織染色の結果を確認する。

RAモデルマウス関節より樹立した滑膜細胞を増殖刺激であるTNF- α 、IL-1 β 、またはTNF- α +IL-1 β で刺激すると同時に各Notchリガンドまたは各Notch受容体に対する抗体を加え培養後WST-8法で細胞増殖を測定。どのNotch受容体とリガンドが滑膜細胞増殖に関与しているか特定する。RA患者由来滑膜線維芽細胞においても同様の解析を行い、マウスとヒトの同定性を明らかにする。さらに、培養上清中のRA関連サイトカインをELISAで測定し、Notch分子の関与を検討する。これらの解析に使用する抗体は、当研究室で樹立した抗体で、ヒトまたはマウスの各Notch受容体に対する抗体は各分子を刺激し、各Notchリガンドに対する抗体は各分子を阻害する。

また、マウス骨髄由来マクロファージおよびヒト末梢血単球をRANKLとM-CSFにより破骨細胞に分化させる培養系に各Notchリガンドまたは各Notch受容体に対する抗体、またはアイソタイプコントロールを加えTRAP染色により破骨細胞数を測定し破骨細胞分化を促進または抑制しているNotch受容体とそのリガンドを特定する。D111が関節炎の骨破壊に関わっているか抗D111阻害抗体投与とコントロールのRAモデルマウスをCT解析することにより検討する。

4. 研究成果

RAモデルマウスにおいて、NotchリガンドのD111単独阻害、D111およびD114阻害により関節炎が抑制されたがD114単独阻害では抑制されなかった。D114およびD111は血管新生に関与することから、D111阻害による関節炎の抑制は血管新生の制御によるものなのか検討した。足関節組織切片を血管識別マーカー(CD31、CD105、VE-cadherin)に対する抗体で免疫

組織染色後増殖滑膜領域あたりの血管数を解析すると、直径10 μm 未満の血管数（毛細血管）がD111またはD114単独阻害により減少していた。しかしながら、D111およびD114阻害では減少していなかった。また、経時的解析では、関節炎初期において関節炎は抑制されているにもかかわらず血管数に変化は認められなかった。静脈（EphB4陽性）、動脈（Ephrin-B2陽性）に区別しても関節炎初期、後期ともに相違は認められなかった。一方、リンパ管（LYVE-1陽性）はD111単独阻害、D111およびD114阻害により関節炎初期、後期ともに減少していた。

さらに、Notch分子は破骨細胞分化にも関与していることから、D111阻害による破骨細胞への影響を解析した。ヒトおよびマウスにおいて、RANKLとM-CSFにより破骨細胞へ分化させる培養系で、D111はNotch2を刺激することにより破骨細胞分化を促進し、NotchリガンドのJagged1はNotch1を刺激することにより破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。また、RAモデルマウスにおいてもD111阻害により関節組織の破骨細胞が減少していた。さらに、D111阻害は骨粗鬆症モデルマウスにおいても破骨細胞分化を抑制するが正常マウスの破骨細胞分化には影響しないことを明らかにした。このことより、D111阻害は有効かつ安全な関節炎治療薬となりうることが示唆された。

以上より、D111阻害によりリンパ管新生および破骨細胞分化が制御され、関節炎抑制に繋がっていると考えられた。したがって、D111阻害は新たなRA治療法となる可能性が示唆された。Notch分子による特異な破骨細胞分化制御の解明は報告されておらず、治療の標的分子としての適性を探索する上で意義深い。

RAモデルマウスのひとつであるK/BxNマウス血清移入関節炎において、NotchリガンドのD111阻害によりリンパ管新生および破骨細胞分化が抑制され、関節炎が抑制されたため、他のRAモデルマウスのコラーゲン誘発性関節炎（CIA）および自己免疫関節炎を自然発症する突然変異系統マウス（SKG）を用いて同様な結果が得られるか確認した。CIAでは各Notchリガンド阻害（抗D111抗体、抗D114抗体、抗Jagged1抗体、抗Jagged2抗体投与）による関節炎の抑制は認められなかった。また、SKGではJagged1阻害により関節炎が増悪した。したがって、強い免疫反応、炎症反応が起きている状態ではD111阻害によるリンパ管新生抑制および破骨細胞分化抑制のみでは関節炎を抑制するのは難しいと考えられ、慢性期のRA治療薬として有効である可能性が示唆さ

れた。

RAモデルマウスのK/BxNマウス血清移入関節炎において、NotchリガンドのD111を阻害すると関節炎が抑制され、そのメカニズムとしてリンパ管新生制御および破骨細胞分化制御による骨破壊抑制が関与していることを明らかにしてきた。このとき、関節組織の炎症も抑制されていたことから、D111が炎症にも関与している可能性が示唆された。実際、マクロファージを $\text{IFN}\gamma$ で刺激するとNotch受容体のNotch1とNotch3、NotchリガンドのD111、Jagged1、Jagged2の発現が増強した。D111の発現は $\text{IFN}\gamma$ を除いても持続していた。したがって、一過性の $\text{IFN}\gamma$ 産生によりマクロファージ上に発現が誘導されたD111がマクロファージ上に常に発現しているNotch2を刺激、さらにはT細胞などに発現しているNotch受容体を刺激することにより炎症に関与している可能性が考えられた。しかしながら、 $\text{IFN}\gamma$ 刺激でマクロファージ上に発現が誘導されるMHCクラスIIおよびCD80分子の発現誘導にはD111は関与しておらず、Jagged1とJagged2が関与していた。マクロファージのIL-6産生はNotch1、Notch2、Notch3刺激で上昇した。

一方、RAモデルマウス関節より樹立した滑膜線維芽細胞を $\text{TNF}\alpha$ またはIL-1 β で刺激したときの増殖へのNotchの関与は認められなかった。また、D111の発現も認められなかった。しかしながら、IL-6、MMP-3の産生にはD111によるNotch2刺激が関与していた。これらの結果より、RA関節局所において、炎症によりマクロファージ上に発現が誘導されたD111が滑膜線維芽細胞上のNotch2を刺激することにより炎症性サイトカインや関節破壊因子の産生を惹起し関節炎の悪化に関与している可能性が示唆された。

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2件）

- ① Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Hozumi K, Chiba S, Yagita H. Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes. *Arthritis Research and Therapy*. Vol.14: R45-58, 2012. 査読有 DOI:10.1186/ar3758
- ② Koyanagi A, Sekine C, Yagita H. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol.418: 799-805,

〔学会発表〕(計4件)

- ① 関根 知世子、Notch signaling is not essential for the development of marginal zone B cells in autoimmune mice、8th International Congress on Autoimmunity (国際自己免疫学会)、2012年5月12日、グラナダ展示会議場(グラナダ、スペイン)
- ② 関根 知世子、Blockade of Delta-like 1 suppresses osteoclastogenesis and arthritis、第40回日本免疫学会総会・学術集会、2011年11月28日、幕張メッセ(千葉)
- ③ 関根 知世子、Blockade of Delta-like 1 suppresses osteoclastogenesis and arthritis、2011 ACR/ARHP annual scientific meeting (アメリカリウマチ学会)、2011年11月8日、マコーミックプレイスコンベンションセンター(シカゴ、アメリカ)
- ④ 関根 知世子、Blockade of Delta-like 1 suppresses osteoclastogenesis and arthritis、7th International Congress on Autoimmunity (国際自己免疫学会)、2012年5月12日、グラナダ展示会議場(リュブリャナ、スロベニア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 知世子 (SEKINE CHIYOKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：22591085