

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19428

研究課題名(和文) Beyond steroid: 新たな自己免疫疾患治療薬開発を目指して

研究課題名(英文) Beyond Steroids: Toward the Development of Novel Therapies for Autoimmune Diseases.

研究代表者

西 英一郎 (Nishi, Eiichiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30362528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫機序を原因とする疾患には、有効な治療法が乏しい疾患、ステロイドが唯一の治療薬である疾患が多く含まれている。我々は、メタロペプチダーゼ、ナルディライジン(NRDC)の欠損マウス欠損(NRDC-KO)が複数の炎症モデルにおいて疾患抵抗性を示したことから、NRDCを標的とする治療がステロイドの代替となる可能性を追求した。特に本研究では、T細胞、B細胞特異的欠損マウスを用い、リンパ球に発現するNRDCが、複数の自己免疫疾患(自己免疫性肝炎、全身性エリテマトーデス)の病態において重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、原因不明、治療方針が未確定で後遺症を残すおそれが少なくない300以上の疾患を指定難病と認定しています。その中には自己免疫機序を原因とし、ステロイドが唯一の治療薬である疾患が多く含まれています。ステロイドの長期内服が必要な患者は、その重篤な副作用に苦しめられています。我々は、ナルディライジン(NRDC)という分子を欠損したマウスを用い研究を行い、この分子を抑制することが新たな自己免疫性疾患治療薬開発につながる可能性を示しました。今後もNRDCを標的とする治療薬がステロイドの代替となる可能性を追求します。

研究成果の概要(英文)：Diseases caused by autoimmune mechanisms include many diseases for which effective treatments are scarce and steroids are the only therapeutic agents. We investigated the potential of nardilylin (NRDC)-targeted therapies as an alternative to steroids, as mouse deficient in NRDC (NRDC-KO) conferred disease resistance in several inflammatory models. In this study, we used T- and B-cell-specific deficient mice and showed that NRDC expressed in lymphocytes may play an important role in the pathogenesis of several autoimmune diseases (autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus).

研究分野：病態医化学 薬理学 内科学

キーワード：自己免疫疾患 ステロイド ナルディライジン

1. 研究開始当初の背景

我が国では、原因不明、治療方針が未確定で後遺症を残すおそれが少ない341疾患(現時点)を指定難病と認定している。難病対策の契機になったのは、昭和40年代に急増したSMON(薬剤性と判明)だが、当初からベーチェット病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス(SLE)、サルコイドシスなどが調査研究の対象となった。これらの疾患、そして多くの指定難病に共通しているのは、自己免疫機序が原因となっている可能性が高く、ステロイドが治療薬として用いられていることである。ステロイドの薬効は1948年関節リウマチ(RA)患者に対して初めて確認された。その後、抗炎症・免疫抑制薬として、多くの難治性疾患において唯一無二といえる治療薬として用いられたが、長期内服が必要な患者は、その多岐にわたる重篤な副作用に苦しめられてきた。近年RAなど一部の疾患については、分子標的薬、生物学的製剤の導入により病態コントロールは大幅に改善されたが、未だにステロイド以外に有効な治療法がない疾患は多い。世界で猛威をふるったCOVID-19においても、その重症化の鍵を握るサイトカインストームが自己免疫機序で生じることが示唆されており、ステロイドは治療薬として承認されている。これらの背景は、自己免疫疾患発症機構のさらなる解明と、新たな治療薬開発が強く求められていることを示している。

2. 研究の目的

本研究において応募者は、メタロペプチダーゼ、ナルディライジン(NRDC)を標的とする治療が、ステロイドの代替となる可能性を追求する。その可能性を示唆する実験結果は、1)NRDC全身欠損(NRDC-KO)マウスが複数の炎症モデルにおいて強い疾患抵抗性を示したこと、2)炎症細胞特異的なNRDC欠損が、自己免疫性疾患治療につながる表現型を呈したこと、などである。1)については、RAモデルにおける関節腫脹と発赤、炎症性腸疾患モデルにおける陰窩構造の破壊、炎症細胞浸潤、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルにおける線維化や脂肪蓄積が、野生型対照マウスと比較して、NRDC欠損マウスにおいて著明に抑制されていた(RMD Open 2017、PLOS One 2014など)。2)については、各種血球細胞特異的CreマウスとNrdc-floxedマウスの交配により、マクロファージ特異的欠損によるRA関節炎抑制、B細胞特異的欠損による抗体産生量抑制、T細胞欠損による抗体親和性抑制が示された。NRDC欠損が、疾患モデルマウスにおいて顕著な炎症抑制を呈したことから、NRDCがグルココルチコイド(GC)産生あるいはGC受容体シグナルそのものに関与している可能性も考えられたが、我々の予備データは、下垂体のACTH産生細胞数、血中コルチコステロン値などはNRDC欠損の影響を受けないことを示しており、NRDC欠損マウスの代謝系表現型も、ステロイド投与時とは明らかに異なることから、NRDC阻害がステロイドとは異なる経路で免疫系を抑制している可能性が強く示唆された。本研究では、B細胞あるいはT細胞特異的NRDC欠損マウスを用いて、自己免疫疾患モデル(RA、SLE自己免疫性肝炎モデル、サイトカインストームモデルなど)における各リンパ球のNRDCが果たす役割を明らかにする。さらに、ペプチダーゼ活性欠損型変異体NRDCノックインマウスを用いて、NRDCの酵素活性が抗体産生や自己免疫疾患で果たす役割を検討する。またハイスループットスクリーニングで得られたNRDC酵素活性阻害薬の、自己免疫疾患モデルにおける有用性を検証する。

3. 研究の方法

1)B、T細胞NRDCの自己免疫疾患における役割の解明：B細胞特異的NRDC欠損(B-KO)マウス、T細胞特異的NRDC欠損(T-CO)マウスをSKGマウス(遺伝型背景BALB/cの場合はRAモデル、C57BL/6の場合はSLEモデル)と交配し、関節炎スコア、自己抗体価、腎炎レベルなどを検討する。SLEモデルとしては、Imiquimod(IMQ:TLR7アゴニスト)耳介塗布モデルも用い、自己抗体価(抗2本鎖DNA抗体価)、腎組織などを検討する。急性モデルとして、自己免疫性肝炎(Concanavalin A投与モデル)、サイトカインストームモデル(TNF- α +IFN γ 投与)を用い、肝障害、死亡率、Treg数などを検討する。

2)NRDCの酵素活性が自己免疫疾患で果たす役割の検討：NRDCは活性中心(HXXEH)のグルタミン酸をアラニンに変異(E>A)することでペプチダーゼ活性を失う。我々は最近不活性型ペプチダーゼノックインマウス(E>A KIマウス)を作製し、同マウスがNRDC-KOマウスと酷似した表現型(成長遅延、低体温、徐脈など)を呈することを確認した。E>A KIマウスの抗体産生能を検討し、NRDCペプチダーゼ活性の抗体産生における意義を明らかにする。さらに細胞特異的な酵素活性の役割を検討するため、Cre依存性に野生型NRDCがKOされ、NRDC-E>Aが発現するマウス(NRDC^{flox/flox}:Rosa26-Lox-Stop-Lox-NRDC-E>A)を作製している。このマウスを用い、抗体産生におけるB、T細胞のNRDC酵素活性の役割を明らかにする。さらに1)の自己免疫疾患モデルを用いて検討する。

3) NRDC 酵素活性阻害薬の高次スクリーニングおよびモデルマウスでの有効性検証：我々は NRDC のペプチダーゼ活性阻害効果を指標にハイスループットスクリーニングを行い、33305 種類の低分子化合物のうち、33 種類が IC₅₀: 0.5 μM 以下の阻害活性を有することを示した。さらに化合物を絞り込んだ後、1)の自己免疫疾患モデルにおける薬効を検証する。

4. 研究成果

1) B, T 細胞 NRDC の自己免疫疾患における役割の解明：

ConA 負荷による自己免疫性肝炎モデルにおいて T 細胞特異的欠損マウスが肝炎減弱の傾向を呈すこと、IMQ 耳介塗布による SLE モデルにおいて B 細胞特異的欠損マウスが、自己抗体産生減弱の傾向を呈すことが示唆された。

2) NRDC の酵素活性が自己免疫疾患で果たす役割の検討：

遺伝背景が BL6 のペプチダーゼ活性欠損型変異体 NRDC ノックイン (E>A KI) マウスはほぼ 100% 周産期で死亡した。全身欠損マウスにおいても以前同様の事象を認めており、その際に他系統 (ICR) への戻し交配を行うことで生存率が有意に上昇したことから、今回も戻し交配を行い生存個体を得ることに成功した。一方組織特異的酵素活性欠損マウス (NRDC^{flox/flox}:Rosa26-Lox-Stop-Lox-NRDC-E>A) の作製も順調に進んでおり、今後 T 細胞、B 細胞で特異的に酵素活性を欠損するマウスによる解析を予定している。

3) NRDC 酵素活性阻害薬の高次スクリーニングおよびモデルマウスでの有効性検証：

1 次スクリーニングで IC₅₀<5 μM を示した 140 化合物について、1. 消光性基質切断による NRDC 阻害活性の再確認、2. NRDC と同じ M16 ファミリーに属する類似酵素 insulin degrading enzyme (IDE) の阻害活性、3. 2 つのがん細胞株に対する細胞毒性、を検討し、これらの高次スクリーニングで 9 種類の化合物に絞り込んだ。その上で、2 種類の基質ペプチドを用い、選別した化合物の NRDC 阻害活性を高速クロマトグラフィで確認し、最終的に 3 種類のヒット化合物を選別した。さらにこれらと類似構造を有する計 42 種類の化合物を検討し、最終的に 2 つの化合物を選別し、現在自己免疫疾患モデルでの薬効検証を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Li SY, Yoshida Y, Kubota M, 他10名, Ohno M, Nishi E, Kitamura K, Kamitsukasa I, Takizawa H, Sata M, Yamagishi K, Iso H, Sawada N, Tsugane S, Iwase K, Shimada H, Iwadata Y, Hiwasa T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Utility of atherosclerosis-associated serum antibodies against colony-stimulating factor 2 in predicting the onset of acute ischemic stroke and prognosis of colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2023.1042272	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 Yamaguchi Akihiko, Takahashi Toshifumi, Kato Takeshi, Tanaka Toshihiro, Nishi Eiichiro, Fujimoto Noriki	4. 巻 10
2. 論文標題 Immunohistochemical and clinicopathological study regarding nardilysin on extramammary Paget's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Dermatological Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00403-023-02579-5	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 Tomita Issei, Tsuruta Hiroaki, Yasuda Yamahara Mako, Yamahara Kosuke, Kuwagata Shogo, Tanaka Sasaki Yuki, Chin Kanasaki Masami, Fujita Yukihiro, Nishi Eiichiro, Katagiri Hideki, Maegawa Hiroshi, Kume Shinji	4. 巻 in press
2. 論文標題 Ketone bodies: A double edged sword for mammalian life span	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/accel.13833	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 Tomita Issei, Tsuruta Hiroaki, Yasuda Yamahara Mako, Yamahara Kosuke, Kuwagata Shogo, Tanaka Sasaki Yuki, Chin Kanasaki Masami, Fujita Yukihiro, Nishi Eiichiro, Katagiri Hideki, Maegawa Hiroshi, Kume Shinji	4. 巻 22
2. 論文標題 Ketone bodies: A double edged sword for mammalian life span	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aging Cell	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) 10.1111/accel.13833	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 Takashima Satsuki, Okamura Eiichi, Ichiyama Yusuke, Nishi Kiyoto, Shimizu Akio, Watanabe Chisato, Muto Masanaga, Matsumoto Shoma, Tsukiyama-Fujii Setsuko, Tsukiyama Tomoyuki, Ogita Hisakazu, Nishi Eiichiro, Ohji Masahito, Sugiyama Fumihito, Takahashi Satoru, Mizuno Seiya, Mizutani Ken-ichi, Ema Masatsugu	4. 巻 73
2. 論文標題 Null mutation of exocyst complex component 3-like does not affect vascular development in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 93 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.23-0105	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 Oshima Shinichiro, Sinha Rahul, Ohno Mikiko, Nishi Kiyoto, Eto Koji, Takaori-Kondo Akifumi, Nishi Eiichiro, Yamamoto Ryo	4. 巻 693
2. 論文標題 Nardilysin determines hematopoietic stem cell fitness by regulating protein synthesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149355 ~ 149355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.149355	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 Nakatsuma Kenji, Ozasa Neiko, Ohno Mikiko, Ishiguro Hiroshi, Minami Manabu, Nishi Eiichiro, Toi Masakazu, Ono Koh, Kimura Takeshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Subclinical myocardial damage after anthracycline chemotherapy in Japanese patients with breast cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	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) 10.1016/j.jjcc.2024.03.005	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西 清人、西 英一郎、Rong Tian
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝産物はビルビン酸輸送を介して糖新生を抑制する
3. 学会等名 第24回・第25回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyoto Nishi, Eiichiro Nishi, Rong Tian
2. 発表標題 The regulatory roles of branched-chain amino acid metabolites in pyruvate metabolism
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶谷 元晴, 藤井 貴之, 藤堂 景史, 大野 美紀子, 西 清人, 平田 多佳子, 西 英一郎, 安藤 朗
2. 発表標題 ナルディライジンによる抗体産生調節機構の解明およびDSS腸炎モデルでの検討
3. 学会等名 第59回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 美紀子, 松浦 博, 牧山 武, 糀谷 泰彦, 西 清人, 西 英一郎
2. 発表標題 ナルディライジン酵素活性の生体内における意義
3. 学会等名 第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 美紀子, 松浦 博, 牧山 武, 糀谷 泰彦, 西 清人, 西 英一郎
2. 発表標題 多機能プロテアーゼによる洞機能制御機構
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyoto Nishi, Hirotaka Iwasaki, Mikiko Ohno, Shintaro Matsuda, Eiichiro Nishi
2. 発表標題 Nardilysin in hepatocyte regulates diet-induced thermogenesis via the modulation of brown adipose tissue activity
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 美紀子、西 清人、西 英一郎
2. 発表標題 タコツボ症候群における多機能プロテアーゼの役割
3. 学会等名 第32回日本循環薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eiichiro Nishi
2. 発表標題 Role of a multifunctional peptidase nardilysin in homeostasis
3. 学会等名 12th General Meeting of the International Proteolysis Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kiyoto Nishi, Hirotaka Iwasaki, Mikiko Ohno and Eiichiro Nishi
2. 発表標題 Nardilysin in hepatocyte regulates diet-induced thermogenesis via the modulation of brown adipose tissue activity
3. 学会等名 12th General Meeting of the International Proteolysis Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mend Amar Batbaatar, Mikiko Ohno, Takeshi Kinoshita, Kiyoto Nishi, Eiichiro Nishi
2. 発表標題 NRDC in vascular smooth muscle cells regulates vascular contraction and blood pressure
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 晋也, 西 清人, 里岡 大樹, 大野 美紀子, 平田 多佳子, 安藤 朗, 西 英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンに着目した自己免疫性肝炎の病態解明
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野芳珠季, 西清人, 大野美紀子, 西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンの酵素活性阻害薬のスクリーニング
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大野 美紀子, 西 清人, 西 英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによる循環動態制御機構
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikiko Ohno, Shigeyuki Esumi, Tetsuya Obayashi, Takayuki Fujii, Kiyoto Nishi, Shinya Ikeda, Eiichiro Nishi
2. 発表標題 Enzymatic activity of nardilysin plays significant roles in the regulation of central nervous system activity
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kiyoto Nishi, Hiroataka Iwasaki, Mikiko Ohno, Eiichiro Nishi
2. 発表標題 Nardilysin in hepatocyte regulates brown adipose tissue activity
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 晋也、里岡 大樹、西 清人、大野 美紀子、平田 多佳子、安藤 朗、西 英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンは制御性T細胞を介して自己免疫性肝炎に関与する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mend Amar Batbaatar, Mikiko Ohno, Takeshi Kinoshita, Kiyoto Nishi, Shinya Ikeda, Eiichiro Nishi
2. 発表標題 NRDC in vascular smooth muscle cells controls vascular contraction and blood pressure via the regulation of calcium mobilization
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大野 美紀子, 松浦 博, 西 清人, 梶谷 泰彦, 牧山 武, 池田 真也, 西 英一郎
2. 発表標題 M16メタロエンドペプチダーゼによる洞機能制御機構
3. 学会等名 第33回日本循環薬理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西 清人, 大野 美紀子, 西 英一郎, Rong Tian
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝産物による ピルビン酸代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第33回日本循環薬理学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学 薬理学講座 ホームページ http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/index.html
--

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
---------	---------