

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670646

研究課題名(和文) C1q活性抑制による新規関節リウマチ治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new anti-rheumatic therapy with suppression of C1q

研究代表者

富田 哲也 (Tomita, Tetsuya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：30283766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：type IIコラーゲンで免疫し関節炎を発症させたラットコラーゲン関節炎モデルにおいて明らかに関節発症後に新規ペプチドを腹腔内投与しその治療効果を検討した。C1qペプチド投与群では明らかに関節炎は抑制されており、関節局所での炎症性サイトカインTNF alphaの発現が抑制されていた。治療したマウスの大腿骨骨髓細胞を用いた破骨細胞誘導では治療群で明に破骨細胞誘導が抑制された。ヒト滑膜細胞培養系における新規ペプチドによる作用機序の検討を行いC1qペプチドによりヒトリウマチ滑膜細胞からの炎症性サイトカインならびにMMP-3産生抑制が認められた。

研究成果の概要(英文)：Using type II collagen induced arthritis model, we confirmed the suppressive effect of C1q peptide on destructive progression of affected joints, and local expresso of TNF alpha was suppressed by C1q peptide compared to control group. Induction of trap positive multinuclear cells (osteoclasts) from mouse bone marrow cells with RANKL, osteoclast induction was prohibited in C1q therapy group compared to control group. In vitro study using fibroblast cells derived from human rheumatoid arthritis, adding C1q peptide resulted significant inhibition of pro-inflammatory cytokines and matrix metallo-proteinase production.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節リウマチ 関節破壊 C1q peptide 炎症性サイトカイン MMP-3 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)は世界中で人口の 0.5-1.0%という高率の発症を認め、日本でも 70 万人以上の患者が存在する。重度の関節機能の低下をきたし、その障害を防止する治療法の開発は社会的にも急務である。近年では抗体療法に代表される生物学的製剤が注目されており、従来の抗 RA 剤では期待できなかった骨・関節破壊の進行を抑制する可能性が示唆されているが、有効率(60%)や重篤な副作用の出現頻度が高いこと、患者の経済的負担など、まだまだ問題点が山積しているのが現状である。一方補体 C1 の構成成分 C1q は、RA 患者における予後の重篤性と正の相関関係を持つほか、SLE 病態の疾患活動性と負の相関関係を持つなど、自己免疫疾患の病態に深く関わっていることが明らかにされている。RA 患者はその関節破壊の重篤度により、小関節破壊 (LES) 型と呼ばれる罹患後 10 年以上が経過しても関節破壊の軽度な群と、多関節破壊 (MES) 型やムチランス (MUD) 型などの多関節に及ぶ重篤な関節破壊に陥る群の 2 つに大別される。その自然経過予後を有効に診断する方法として血清中の C1q レベルが有用であることが報告されている (Ochi T et al, Arthritis Rheum.1988 Jan;31(1):37-73)。本研究で使用する主なペプチドは、RA 予後診断の目的で開発された C1q に特異的に結合する抗 C1q モノクローナル抗体の作製過程で実施した抗体認識エピトープ解析により、本提案シーズのリード化合物である、6 残基を基本とする新規アミノ酸配列を有するペプチドが発見された。その後の基礎的検討で、本ペプチドは IgG に結合することにより、IgG と C1q の結合を阻害する作用を有することが明らかとなり、本ペプチドが IgG と C1q との結合を

阻害し、C1q の活性化を抑制するという作用機序に基づいて免疫複合体による補体活性化を抑制することが推定された。本研究で用いるペプチド自体に新規性がりかつ補体活性抑制により関節炎による関節破壊抑制を試みる類似の研究は国内外において現時点で行なわれていない。

2. 研究の目的

本研究は C1q 由来の新規 6 残基アミノ酸配列を有するペプチドによる IgG と C1q の結合阻害による補体活性抑制を原理とした関節リウマチ治療薬の開発を目的としている。関節リウマチに代表される自己免疫疾患において、自己抗体の産生やそれに伴う免疫複合体の形成による補体系の活性化が主たる病因、病態の一つとされてきた。本研究で開発するペプチドには、IgG に結合することで抗原抗体複合体への補体の結合を阻害する作用があり、これによって以降の補体系の活性化を抑制し、関節リウマチの治療に寄与する可能性があると考えている。

3. 研究の方法

実験的関節炎モデル動物での新規ペプチドによる治療効果の検討

type II コラーゲンで免疫し関節炎を発症させたラットコラーゲン関節炎モデルにおいて明らかに関節発症後に新規ペプチドを腹腔内投与しその治療効果を検討する。対照薬として現在関節リウマチ治療でゴールドンスタンダードとして使用されているメトトレキサートを使用する。我々はこれまで本実験的関節炎モデルを 15 年以上使用しており、ラットにおける発症率は 98%以上であり、かつ視覚的に初回免疫後 10-12 日で関節炎を発症する。したがって初回免疫後 14 日よりペプチド投与を開始し 49 日をエンドポイントとして経時的に関節炎スコアを調査し、49 日での画像 (X-p およびマイクロ CT)、組織学的検討を行なう。組織学的には通常の H&E

染色、アリザリン染色に加え C1q および IgG の免疫染色を行い罹患関節局所での新規ペプチド投与による C1q, IgG 複合体形成への影響を検討する。使用するペプチドはその濃度を少なくとも 2、3 ドーズで設定し検討する。安全性を検討する目的で各種主要臓器も摘出し組織学的に異常の有無につき検討を行なう。

実験的関節炎モデル動物における新規ペプチドによる作用機序の検討

新規ペプチドの作用機序を調べる目的で上記実験的関節炎モデルを用い、同様のプロトコルで治療を開始し、初回免疫より 21 日後にラットを屠殺し、足関節部より RNA を抽出し TNF alpha, IL-1 beta, MMPs の発現を real-time PCR を用いて行なう。

同時に血清を採取し、血清中の C1q, TNF alpha, IL-1 beta タンパクレベルを ELISA を用い検討する。さらに関節破壊に重要な役割を果たす破骨細胞系への影響を検討する目的で、屠殺したラット大腿骨骨髓内より骨髓細胞を採取し、M-CSF, RANKL で刺激し破骨細胞を誘導し、新規ペプチド投与による破骨細胞誘導に対する影響を TRAP 染色による多核細胞数や pit formation による骨吸収活性を検討し明にする。

ヒト RA 培養滑膜細胞に対する新規ペプチドの作用機序および反応性の検討

リウマチ患者の手術時に得られた滑膜組織を使用し培養滑膜細胞を樹立する。対照群は変形性関節症の患者より得られた培養滑膜細胞とする。ヒト RA 培養滑膜細胞を TNF alpha で刺激し新規ペプチドを添加し 24hr 後に RNA を抽出し RNA レベルの各種炎症性サイトカイン、MMP3 発現レベルを real-time PCR で検討する。

4 . 研究成果

関節炎モデルでの検討に記載したコラーゲン関節炎を惹起させたラットから試験終了時に

足関節部位を採取し、罹患関節局所における画像評価、組織学的評価を行い、炎症サイトカインの遺伝子レベルでの発現についても検討を行った。その結果、C1qペプチド投与により画像および組織学的に関節破壊は有意に抑制されていた。罹患足関節局所でのTNF alpha の発現は有意に抑制されていた。また、同関節炎モデルの罹患関節局所から大腿骨骨髓細胞を採取し、M-CSF、RANKL で誘導を行い、破骨細胞の誘導阻害能につきTRAP 染色を用い検討した。その結果、C1qペプチド投与と個体からの破骨細胞誘導は未治療個体に比べて有意にTRAP positive 細胞数および多核化が抑制されていた。

リウマチ患者から採取した滑膜細胞を用いた検討を行った。その結果、ヒト関節リウマチ患者から採取した滑膜細胞をTNF alphaで刺激することにより分泌が促進されるサイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼなどの産生が、ペプチドの添加により有意に抑制された。

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8件)

1. Tsuji S, Tomita T, Yoshikawa H. 他 4名 Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces level of a bone resorption marker in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. Epub ahead of print.2014.Jan.44-49 (査読有)
2. Shimizu N, Tomita T, Yoshikawa H. 他 2名 In vivo movement of femoral flexion axis of a single-radius total knee arthroplasty. J Arthroplasty, Epub ahead of print.2014.Dec.29.2407-2411 (査読)

- 有)
3. Iwamoto K, Shi K, Tomita T, Yoshikawa H. 他3名 In vivo kinematics of threecomponent mobile-bearing total ankle replacement in rheumatoid ankle with talocalcaneal arthrodesis and spontaneous talocalcaneal fusion. Mod Rheumatol. Epub ahead of print. 2014.Dec.21.1124-1128 (査読有)
 4. Yamazaki T, Futai K, Tomita T, Yoshikawa H. 他3名 3D kinematics of mobile-bearing total knee arthroplasty using X-ray fluoroscopy. Int J Comput Assist Radiol Surg, Epub ahead of print. 2015.Apr.10.487-495 (査読有)
 5. Hirohata S, Tomita T, Yoshikawa H, Kyogoku M. TNF inhibitors induce discoid fibrosis in the sublining layers of the synovium with degeneration of synoviocytes in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 33(10):2473-81, 2013. (査読有)
 6. Shimizu N, Tomita T, Yoshikawa H. 他2名 Posterior Sliding of the Femur During Stair Ascending and Descending in a High-Flex Posterior Stabilized Total Knee Arthroplasty. J Arthroplasty. 28(10):1722-27,2013. (査読有)
 7. Nampei A, Shi K, Ebina K, Tomita T, Yoshikawa H. 他3名 Prevalence of gastroesophageal reflux disease symptoms and related factors in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Biochem Nutr. 52(2):179-84, 2013. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富田哲也 (Tetsuya Tomita)

大阪大学医学系研究科 寄附講座准教授

研究者番号 : 30283766

(2)研究分担者

梶座康夫 (Yasuo Kunugiza)

大阪大学医学系研究科

研究者番号 : 60507193