

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893198

研究課題名(和文) 関節リウマチの「免疫学的寛解」を目指したCaMK4を標的とした治療の開発

研究課題名(英文) CaMK4 inhibition in rheumatoid arthritis for the immunological remission

## 研究代表者

古賀 智裕 (KOGA, Tomohiro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：90537284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の発症と患者CD4陽性T細胞におけるCaMK4の発現との関連の検討において、RA患者(n=21)は健常人(n=20)と比較して有意にCaMK4が高発現であった。T細胞におけるCaMK4の異常活性化がRAの発症に寄与していることが示唆された。RA患者間においてCaMK4の発現と疾患活動性についての関連を検討したが、エントリー時にはRAの活動性とCaMK4の発現量との有意な相関は認めなかった。コラーゲン誘導関節炎マウスを用いてCaMK4阻害剤の投与による関節炎の抑制効果の検討を行った。治療群では有意な関節炎スコアの改善を認め、新規治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between RA development and the expression of CaMK4 in CD4 T cell and found that the level of Camk4 mRNA was significantly higher in patients with RA. This data indicated the abnormal CaMK4 expression and function contributes to the pathogenesis of RA. We further examined the relationship between CaMK4 expression and disease activity among RA patients but there was no significant difference. To determine the protective effect on collagen induced arthritis in mice, we treated with the CaMK4 inhibitor. Importantly, the group treated with CaMK4 inhibitor exhibited the significant improvement of arthritis indicating the possible therapeutic target for RA.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：関節リウマチ CaMK4 関節炎誘導マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA)は関節炎と骨破壊を主体とした難治性の自己免疫疾患である。原因は未解明であるが、遺伝的因子と環境因子の相互作用により免疫寛容の破綻が発症に関わるとされる。

(2) RA の遺伝的因子として最も重要なのはヒト白血球型抗原 (HLA) であり HLA-DR4 や HLA-DR1 を有する人は RA を発症し易いと言われている。HLA 以外の遺伝的因子としては、近年の日本人の RA に関するゲノムワイド関連解析 (GWAS: genome-wide association study) により疾患発症に関わる遺伝子領域が次々と明らかになり、その中には T 細胞のシグナルに関わる遺伝子や T 細胞の分化に関わるサイトカインのプロモーター等の異常が含まれている。T 細胞 (その内ほとんどが CD4 陽性ヘルパー T 細胞) は RA 患者滑膜組織の 50% を占め、局所でのマクロファージの活性化、破骨細胞への分化誘導および B 細胞における自己抗体産生に寄与しており RA の病態に深く関わっている。

(3) CD4 陽性ヘルパー T 細胞のうち IL-17 を産生する Th17 細胞は、RA、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬等の自己免疫疾患の発症に重要であるとされる。一方で免疫抑制機能を有し免疫寛容において重要な役割を果たす制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は RA を含む自己免疫疾患においてその機能が破綻しているとされるが、これらの疾患における Th17 細胞および Treg 細胞の分化や機能に関するメカニズムは依然として不明な点が多い。

(4) CaMK4 は、種々のタンパク質を基質とする多機能型  $Ca^{2+}$ /calmodulin 依存性プロテインキナーゼ (CaMKs) の 1 つであるが CaMK4 は活性化すると核内に豊富に局在することが特徴であり、cAMP response-element binding protein (CREB) のような転写因子をリン酸化することで遺伝子発現の制御に関与すると考えられている。近年、自己免疫疾患における CaMK4 の重要性が示唆されるようになっており、Juang らは、全身性エリテマトーデス (SLE) の T 細胞の核内で CaMK4 が高発現し、IL-2 産生低下に関与していること (文献 )、Sato らは破骨細胞の分化と機能維持に CaMK4-CREB 経路が重要であること (文献 ) を報告している。

(5) さらに申請者は米国留学中に動物モデルおよび SLE 患者 T 細胞において CaMK4 は Treg の機能および Th17 細胞の分化に重要であることを明らかにした (文献 )、しかし現在、RA 発症過程での T 細胞の活性化および分化における CaMK4 の役割については不明であり、治療応用に関しての検討も十分になされていないのが現状であり本研究を着想するに至った。

(6) TNF- $\alpha$  や IL-6 等のサイトカインを阻害する生物学的製剤の登場により RA の治療は大きな発展を遂げたが、RA 患者の医療費負担増加や安全性に関する問題は依然として未解決であり新たな作用機序を有する治療薬が待ち望まれる。RA の病態に関しては不明な点が多いが、IL-17 を産生するヘルパー T 細胞 (Th17) は骨破壊の進展および自己抗体の産生に大きく寄与しており、Th17 細胞は新たな治療標的となりうる。

2. 研究の目的

最近私たちは、T 細胞シグナル伝達に重要な酵素である Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMK4) が Th17 細胞の分化および病原性を司る分子であることを明らかにしており (文献 )、CaMK4 が持つ RA 患者への治療薬としての可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) RA の発症および RA の進展と、患者 T 細胞中の CaMK4 活性化との関連

書面による同意が得られた RA 患者および健常者から採取した全血から分離キットを用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞を単離し、RNA 抽出後の quantitative PCR (qPCR) およびフローサイトメトリーにて CaMK4 の発現を観察する。

末梢血のフローサイトメトリー解析により、CD4 陽性細胞のうち、Naïve (CD45RA+CCR7+)、TEM (CD45RA-CCR7-)、TCM (CD45RA-CCR7-) のサブセットの解析を行い CaMK4 の発現量との相関を解析する。

CaMK4 の発現パターンと RA 患者における疾患活動性 (DAS、CDAI、SDAI) 罹病期間、生物学的製剤の使用の有無、単純 X 線所見との相関を統計的に解析し CaMK4 活性化と RA 病態との関連について検討する。

(2) CIA、CAIA マウスを用いた CaMK4 阻害剤の治療応用の検討

臨床的な治療応用への検討を行うため上記検討に加え、関節炎誘導マウスにおける CaMK4 阻害剤の投与による関節炎の抑制効果の検討を行う。

CaMK4 阻害剤として、現在利用可能な KN-93 を初回免疫時と追加免疫時に投与し、臨床的評価 (関節炎スコア)、病理学的評価 (組織標本による活動性スコア)、免疫学的評価 (自己抗体価の測定) および安全性 (末梢血中の赤血球数・白血球の評価、血清を用いた肝機能、腎機能の評価) を行い、治療応用への可能性について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) RA 患者 CD4 陽性 T 細胞における CaMK4 の意義

RA の発症と患者 CD4 陽性 T 細胞における CaMK4 の発現との関連の検討において、RA 患者 (n=21) は健常人 (n=20) と比較して有意に CaMK4 が高発現であった。T 細胞における CaMK4 の異常活性化が RA の発症に寄与していることが示唆された(図 1)。

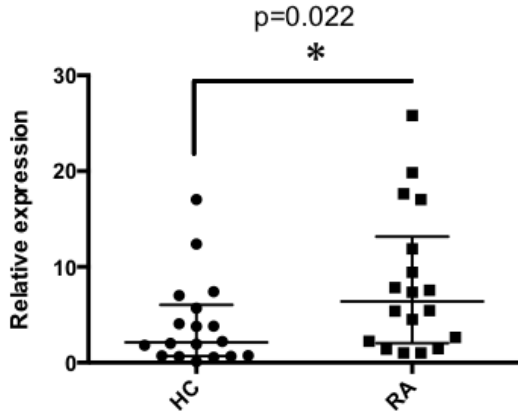


図 1 健常人と RA 患者における CaMK4 の発現

CaMK4 の CD4 陽性細胞における mRNA の発現と、エフェクターメモリー Th17 細胞 (CD3+CD4+CD45RA-CCR7-CCR6+CXCR3+) とは有意な正の相関を認めた (図 2)。

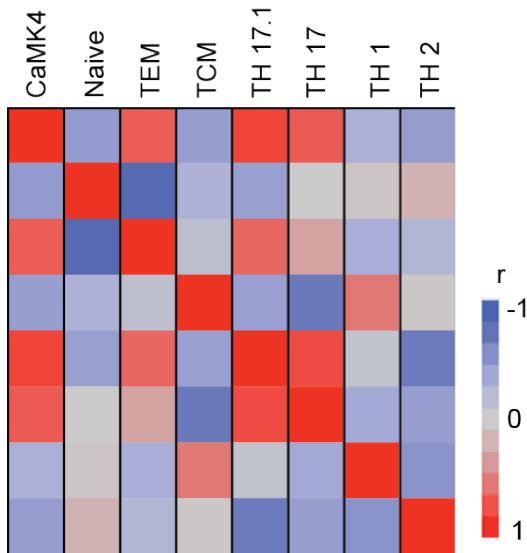


図 2 CaMK4 の発現と T 細胞のサブセットとの相関

RA 患者間において CaMK4 の発現と疾患活動性についての関連を検討したが、エントリー時には RA の活動性と CaMK4 の発現量との有意な相関は認めなかった。以上の結果より、CaMK4 は RA の病態に関与していることは示唆された。今後は RA の病

態進展と CaMK4 発現との関連について検討を予定している。

##### (2) 関節炎モデルマウスにおける CaMK4 阻害剤の有用性についての検討

コラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスを用いて CaMK4 阻害剤 (KN-93) の投与による関節炎の抑制効果の検討を行った。治療群では有意な関節炎スコアの改善を認め (図 3)、RA に対する CaMK4 阻害剤の新規治療薬としての可能性が示唆された。

今後は、CaMK4 欠損マウスにおける検討や、自己抗体価、T 細胞の機能解析を行う予定としている。

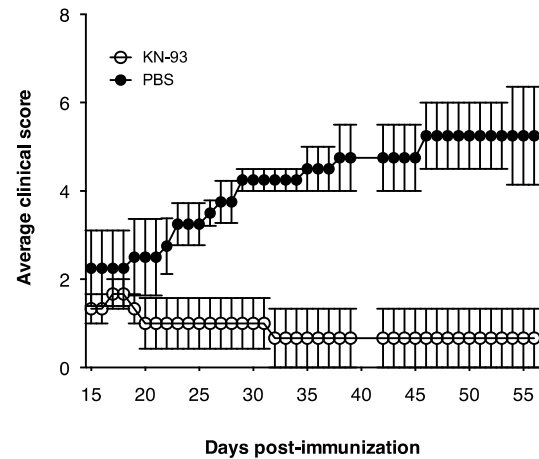


図 3 CaMK4 阻害剤の CIA マウスに対する効果

#### < 引用文献 >

Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):996-1005.  
 Juang YT1, Wang Y, Solomou EE, Li Y, Mawrin C, Tenbrock K, Kyttaris VC, Tsokos GC.

Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1410-6.

Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H.

CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- $\alpha$  underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J Clin Invest.* 2014 Mar 25; Koga T, Hedrich CM, Mizui M, Yoshida N, Otomo K, Lieberman LA, Rauen T, Crispín JC, Tsokos GC

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV suppresses IL-2 production and regulatory T cell activity in lupus. *J Immunol.* 2012 Oct

1;189(7):3490-6.

Koga T, Ichinose K, Mizui M, Crispin JC, Tsokos GC.

## 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. CaMK4 facilitates the recruitment of IL-17-producing cells to target organs through the CCR6/CCL20 axis in Th17-driven inflammatory diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Mar 4; Koga T, Otomo K, Mizui M, Yoshida N, Umeda M, Ichinose K, Kawakami A, Tsokos GC. doi: 10.1002/art.39665. (査読有り)

2. Histological improvement in salivary gland along with effector memory Th17-1 cell reduction in a primary Sjogren's syndrome patient with dermatomyositis and diffuse large B-cell lymphoma by R-CHOP therapy. *Clin Immunol.* 2016 Mar 4; Koga T, Mizokami A, Nakashima M, Shimizu T, Nakashima Y, Nakamura H, Chiwata M, Daisuke N, Kawakami A. doi: 10.1016/j.clim.2016.03.005. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 60 回 日本リウマチ学会総会 (2016 年 4 月 21 日、パシフィコ横浜 神奈川県横浜市) 古賀智裕他、「Role of CaMK4 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis」ポスター発表

米国リウマチ学会 (2015 年 11 月 8 日、サンフランシスコ 米国) Tomohiro Koga et al. 「CaMK4 inhibition prevents recruitment of IL-17 producing cells to target organs through CCR6/CCL20 axis in Th17 driven inflammatory diseases」口演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 智裕 (KOGA, Tomohiro)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号 : 9 0 5 3 7 2 8 4