

「Neddylation 制御による関節リウマチおよびリウマチ肺の新規治療法開発」

神戸大学医学部附属病院 膠原病リウマチ内科／検査部 千藤 荘

1. 研究の背景と目的

関節リウマチ (RA) は人口の約 1% に発症する関節炎を主体とした全身性自己免疫疾患で、病状の進行によって関節破壊および機能障害をきたす。また、RA に合併する間質性肺炎 (リウマチ肺) は時に致死的な経過をたどる。現在使用できる薬剤を用いても関節破壊および間質性肺炎の進行を止められない症例が存在するため新規治療法の開発が望まれる。これまで行われてきた Neddylation についての研究は癌領域におけるものが多く、炎症病態、特に RA における Neddylation の役割はほとんどわかっていない。Neddylation は炎症や細胞増殖に関わる因子の制御に関わるため、RA の病態形成に Neddylation が重要な役割を果たしている可能性は高い。申請者は、これまでに関節炎およびリウマチ肺モデルマウス (SKG マウス) における免疫細胞 (T 細胞、樹状細胞、骨髄由来抑制細胞: MDSC など) の役割について研究してきた。また、海外留学中に、ヒトの滑膜線維芽細胞 (FLS) における Neddylation の役割を研究した。これらの経験から Neddylation が FLS 以外の免疫細胞でも重要な役割を果たしているのではないかと考えた。本研究の目的は、Neddylation が RA の病態に重要な役割を果たし新規治療ターゲットとなりうるかを明らかにすることである。

2. 研究方法・研究内容

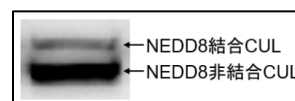
8~9 週齢の SKG マウスに Zymosan を投与し関節炎 (6~8 週間) または間質性肺炎 (10~14 週間) を誘導し、上記①②④⑤の実験を行う。in vitro の実験では、SKG マウスの脾臓、骨髄および肺から単離した細胞を用い、各種誘導条件における Neddylation 阻害剤の効果を検討する (上記③)。以下に目的①~⑤のそれぞれの実験方法を記載する。

(2023 年度)

- ① SKG マウスの関節炎において、Neddylation 経路に異常がみられるかの解明
- ② SKG-ILD において、Neddylation 経路に異常がみられるかの解明

8~9 週齢の SKG マウスに異なる量の Zymosan を投与し、それぞれ関節炎および間質性肺炎を誘導する。関節炎モデルでは Zymosan 投与後 6~8 週、間質性肺炎モデルでは投与後 10~14 週の時点で、マウスを安楽死させ、関節炎モデルでは脾臓と関節、間質性肺炎モデルでは脾臓と肺から単離した各種細胞 (Th17 細胞、Treg 細胞、マクロファージ、樹状細胞、MDSC、CD11b+Gr1dim 免疫寛容性樹状細胞など) の解析をフローサイトメーターで行う。また、関節炎モデルでは関節組織、間質性肺炎モデルでは肺組織を用いて、Neddylation 経路にかかわる遺伝子を qPCR で解析する。

さらに、E3 ユビキチンリガーゼの構成タンパク質で代表的な Neddylation のターゲットである Cullin (CUL) の Neddylation 状態 (NEDD8 が結合した CUL と非結合 CUL の比率) をウェスタンブロット (WB) で解析する (右図)。



- ③ Neddylation 阻害剤が免疫細胞の活性化を抑えるかの解明 (in vitro)

Naïve SKG マウスから脾細胞、骨髄細胞、肺細胞を単離し、in vitro で以下の実験

を行う。Neddylation 阻害剤の存在下で、T細胞の増殖/Th17 分化 (脾細胞)、マクロファージ/樹状細胞/MDSC 分化 (骨髄細胞)、MDSC/CD11b+Gr1dim 免疫寛容性樹状細胞分化 (肺細胞) を行い、コントロール (DMSO) との比較をフローサイトメトリー、qPCR、WB 等で解析する。

(2024 年度以降)

- ④ Neddylation 阻害剤が SKG マウスの関節炎を抑制するかの解明
- ⑤ Neddylation 阻害剤が SKG-ILD を抑制するかの解明

Neddylation 阻害剤の存在下で、SKG マウスに関節炎または間質性肺炎を誘導し、関節炎モデルでは Zymosan 投与後 6~8 週、間質性肺炎モデルでは投与後 10~14 週時点において、それぞれ関節炎と間質性肺炎の進行がコントロール (DMSO) と比較し抑えられているか評価する。解析方法としては、関節および肺の病理所見、フローサイトメトリーによる各種細胞の解析、qPCR による Neddylation 経路の解析、WB による Neddylation 状態の解析などを行う。

以上の実験によって、関節炎モデルおよび間質性肺炎モデルにおいて Neddylation がどのように病態形成に関わっているのか、Neddylation 阻害剤が関節炎および間質性肺炎を抑制するかを解明する。

3. 研究成果

2023 年度は、上記①②は準備段階となり、代わりに③と④を中心に研究を進めた。SKG マウスの骨髄細胞を *in vitro* で樹状細胞への分化条件である GM-CSF+IL-4 存在下で培養した。この条件下でいくつかの濃度で Neddylation 阻害剤を添加したところ、コントロール (溶媒のみ) と比較し、濃度依存的に樹状細胞への分化割合が増加した。Neddylation 阻害剤存在下で分化した樹状細胞の抑制性マーカーを調べたところ、コントロールと比較し PD-L1 の発現が増加していた。また、SKG マウスの骨髄細胞を *in vitro* で樹状細胞への分化させた後、LPS にて成熟化 (活性化) させたところ、PD-L1 の発現はコントロールの樹状細胞と Neddylation 存在下で分化、成熟させた樹状細胞との間で発現量に差がなかったのに対し、MHC class2 の発現が後者で減少していた。これらの実験結果から、Neddylation 阻害剤は *in vitro* で免疫寛容性樹状細胞への分化を亢進させる可能性が示唆された。そこで、現在、*in vitro* で Neddylation 阻害剤存在下で分化させた樹状細胞が T 細胞増殖を抑制するか実験中である。また、*in vivo* では SKG マウスに関節炎を誘導し Neddylation 阻害剤によって関節炎が抑制されるかも検討中である。今後、SKG マウスの関節炎と間質性肺炎において、Neddylation 経路に異常があるか、Neddylation 阻害剤が SKG マウスの間質性肺炎に対し抑制的に働くか、Neddylation 阻害剤が免疫寛容性樹状細胞への分化を促進した機序についてなど検討していく予定である。

4. 生活や産業への貢献および波及効果

関節リウマチの実臨床では、生物学的製剤や JAK 阻害剤など近年の治療法の進歩によって寛解に至る症例も増えてきているが、約半数の症例では寛解に至らず関節炎持続、関節破壊の進行がみられる。また、間質性肺炎に合併する間質性肺炎

(Rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease : RA-ILD) は時に難治性であり関節リウマチ患者の死因ともなりうる。最近では、複数の生物学的製剤や JAK 阻害剤に対して治療抵抗性の関節リウマチは Difficult to treat RA (D2T RA) と呼ばれ関節リウマチ診療におけるアンメットニーズの一つとなっている。また、間質性肺炎合併は D2T RA のリスク因子といわれており、RA-ILD の新たな治療法の開発も期待されている。

本研究において我々は、上記の通り Neddylation 阻害剤は免疫寛容性樹状細胞を増加させることを見出しており、この作用により Neddylation 阻害剤が関節炎または間質性肺炎、もしくは両者を抑制することが分かれば難治性関節リウマチ患者の治療への応用、発展が期待される。これにより、より多くの関節リウマチ患者が寛解状態を得られるようになれば、これまで不可能であった労働や家事など社会活動への参加が進み、関節リウマチ患者自身および社会全体への貢献があるものと考えられる。