

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09911

研究課題名 (和文) 関節炎に対する抗Tim-1抗体の治療戦略への応用について

研究課題名 (英文) The Strategy of anti Tim-1 antibody ameliorates disease in a murine model of rheumatoid arthritis

研究代表者

野崎 祐史 (NOZAKI, Yuji)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90411595

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要 (和文) : 関節炎モデルマウスを用いた実験を行った。関節炎発症モデルを確立し、炎症程度も安定していることから投与実験を繰り返し施行することが可能となった。投与実験においてRMT1-10投与群ではコントロール群に比べて関節炎スコア改善の再現性が確認された。血清TNF、IL-6抑制効果も認めており、RMT1-10は炎症性サイトカイン伝達経路に影響することが確認された。今後において炎症性滑膜部位における炎症性サイトカインや細胞内伝達経路について検討する予定であり、関節リウマチに対するRMT1-10が新規薬剤として有用であるか継続実験する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、投与実験においてRMT1-10投与群ではコントロール群に比べて関節炎スコア改善の再現性が確認された。血清TNF、IL-6抑制効果も認めており、RMT1-10は炎症性サイトカイン伝達経路に影響することが確認された。以上の基礎実験からRMT1-10は関節炎に対して有効性が証明され、今後においてサイトカイン伝達経路や詳細な作用機序を解明することで将来的に関節リウマチに対して新規治療薬としての可能性についての検討を継続実験することで、学術的・社会的に貢献し得ると考える。

研究成果の概要 (英文) : We performed the experiment in collagen-induced model mice. I established the methods to an incidence of arthritis in our model mice. We could performed the experiment repeatedly because the inflammatory degree was stable. The score of the arthritis improvement was confirmed in the experiment in comparison with control group in the RMT1-10 administrated group. Serum TNF, IL-6 levels were also decreased, and it was confirmed that RMT1-10 influenced the inflammatory cytokine productions. We will examine the signaling pathway in inflammatory cytokine in the inflammatory cells and the inflammatory synovium in the next stage. We will conduct RMT1-10 for the rheumatoid arthritis is useful as a new drug or is going to test it continuously.

研究分野：リウマチ・膠原病・腎臓

キーワード：自己免疫性関節炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の原因は未だ不明であるが発症・病態形成に炎症性サイトカイン関与を示す報告は多く(McInnes IB et al. *N Engl J Med* 365, 2205-2219, 2011)、TNF・IL-6・IL-17A・GM-CSFなどが主要なサイトカインと考えられている。現在、これらのサイトカインを標的とする生物学的製剤が開発され、RAの臨床症状改善と関節破壊抑制効果に対する高い有効性が証明されている(Takeuchi et al. *Ann Rheum Dis* 70, 1208-2115, 2011)。また、近年においてRAの病態形成におけるT細胞の重要性も明らかとなり、従来のサイトカインを標的とする薬剤と作用機序の異なるCTLA-Igなどの薬剤の有効性や、大規模なゲノムワイド関連解析により、様々な免疫細胞のうち制御性T(regulatory T; Treg)細胞のRAの病態形成における強い関与が示唆されている。現在において我々は作用機序の異なる生物学的製剤を選択することが可能であり、RAの治療にはパラダイムシフトと呼ばれる革命的な進歩もたらされた。しかし、それらの治療にも関わらず、中疾患活動性以上の症例は約20%程度みられる。また、副作用のためこれらの薬剤が使用できない症例も存在することから、新たな作用機序の異なる治療法の開発は現在においても必要とされている。今回の研究テーマであるTim-1(T cell immunoglobulin mucin domains-1)とは活動性T-cellまたはhepatitis A virus cellular receptor-1に発現する膜貫通型の蛋白である。しかしTim-1は、刺激によりTh2細胞上に発現し、細胞内刺激伝達経路を活性化させることで炎症性サイトカイン分泌を亢進させ、T細胞増殖を亢進させると報告されている(Umetsu SE, et al. *Nat Immunol.* 2005, 447-54)。また、Tim-1のligandであるTim-4-Igは高濃度であるとT細胞の活性化を抑制し、低濃度であると促進するとされている。つまり、Tim-1は細胞刺激伝達経路においてCD28やICOSのようにpositive costimulatory moleculeとして、またCTLA-4やPD-1のようにnegative costimulatory moleculeとして作用するユニークな性質をもつことが知られている。今回の実験において抗Tim-1抗体を関節炎モデルマウスに投与する予定であるが、現時点で抗Tim-1抗体は世界に2つしか存在しない。1つはハーバード大学のKuchrooらを中心としたグループから樹立された3B3という抗体であり、もう1つは順天堂医学部免疫学教室 秋葉 久弥先生らが中心となり樹立されたRMT1-10である。3B3とRMT1-10は全く異なる性質をもつ抗体であり、3B3はTim-4へ結合するaffinityが強いためpositive costimulatory moleculeとして細胞活性化を促進し、炎症性サイトカイン産生を亢進する働きをもつことでワクチンへの応用が期待される抗体である。一方RMT1-10はTim-4へ結合するaffinityが弱いためnegative costimulatory moleculeとして細胞活性化を抑制し、炎症性サイトカイン産生を阻害する働きをもつことで自己免疫疾患に対する治療応用が期待される抗体である。

## 2. 研究の目的

今回、我々はTim-1に注目し、生物学的製剤の可能性を持つ抗Tim-1抗体(RMT1-10)を関節炎モデルマウスとして確立しているDBA/1Jマウスに投与する実験系を確立した。我々の過去の報告において秋葉 久弥先生から提供して頂いた抗Tim-1抗体(RMT1-10)を用いてシスプラチンによる急性尿細管性壊死による急性腎障害、抗GBM抗体による急性糸球体腎炎、ループス腎炎モデルマウスであるMRL-Fas<sup>lpr</sup>マウスに投与した結果、RMT1-10投与群において腎障害の改善効果があることが証明されている(Nozaki Y et al. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301, 1098-1104, 2011. Nozaki Y et al. *Kidney Int*, 82, 892-902, 2011. Nozaki Y et al. *Am J Physiol Renal Physiol*, 15, 1210-1221, 2014)。我々が報

告した異なる動物モデルマウスの結果では RA の病態形成において重要なサイトカインである TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A 産生・chemokine 発現 (CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10) は RMT1-10 投与群においてコントロール群に比べ有意に低下していた。また、RMT1-10 投与群において Treg 細胞の発現がリンパ節や腎組織において亢進しており、RMT1-10 は病態改善にサイトカイン産生抑制のみならず、制御性 T 細胞の発現への何らかの影響を持つことが示唆されている。このことは RMT1-10 が従来の生物学的製剤 TNF・IL-6R 阻害剤の特徴であるサイトカイン産生抑制効果と CTLA4-Ig の特徴である T 細胞伝達阻害効果を併せ持つことを示唆している。以上から今回の実験では関節炎モデルマウスにおいて RMT1-10 投与実験を行い、どのような免疫応答を介して関節炎発症・病態形成へ影響するか検討した。

### 3. 研究の方法

DBA/1J マウスへ抗 TIM-1 抗体 (RMT1-10, IgG2a) あるいはコントロールとして Rat IgG 250  $\mu$ g/body を週 2 回腹腔内投与する。2 群間において毎週関節腫脹の程度をスコア化し (0-4)、35 日後に処分し以下の項目を検討した。

### 4. 研究成果

関節炎モデルマウス (Collagen Induced Arthritis; CIA mice) を用いた実験を行った。関節炎発症モデルを確立し、炎症程度も安定していることから投与実験を繰り返し施行することが可能となった。投与実験において RMT1-10 投与群ではコントロール群に比べて関節炎スコア改善の再現性が確認された。血清 TNF、IL-6 抑制効果も認めており、RMT1-10 は炎症性サイトカイン伝達経路に影響することが確認された。

今後において炎症性滑膜部位における炎症性サイトカイン mRNA 発現、FACS 法における脾細胞 CD4+ T 細胞内 IL-6・TNF 染色を施行し、リンパ球サブセットやマクロファージにおける影響や、pSTAT4/6 発現を Western Blot 法で細胞内伝達経路について検討する予定である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。