



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1612号
学位記番号	第1147号
氏名	川口 洋平
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	<p>The janus kinase inhibitor tofacitinib inhibits TNF<math>\alpha</math>-induced gliostatin expression in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes (関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞において、ヤヌスキナーゼ阻害剤であるトファシチニブは TNF<math>\alpha</math> に誘導されるグリオスタチンを抑制する)</p> <p>Clinical and Experimental Rheumatology (in press)</p>
論文審査担当者	主査： 和田 郁雄 副査： 岡本 尚, 大塚 隆信

## 論文内容の要旨

### 【背景と目的】

グリオスタチン (GLS) は関節リウマチ (RA) 患者の滑液中, 血清中に高濃度に存在し, その濃度は RA の病勢を反映している. RA 線維芽細胞様滑膜細胞 (RA-FLSs) を用いた実験系において, TNF (tumor necrosis factor) $\alpha$ により GLS は誘導され, さらに GLS は vascular endothelial growth factor や matrix metalloproteinases (MMPs) を誘導する. ウサギを用いた動物実験では GLS は RA 滑膜炎の起炎作用, 血管新生作用, 軟骨破壊作用を示した. GLS の発現機序を解明し, 抑制することは新たな RA 治療につながると考えられる.

トファシチニブ (TOF) は janus kinase (JAK) のリン酸化を阻害し, 細胞内シグナル伝達を阻害する新規抗リウマチ薬である. 低分子化合物で経口投与可能であり, RA 治療薬で最初に認可された分子標的治療薬である. 臨床的に有効性が示されているが, RA-FLSs に対する作用は明らかにされていない.

本研究の目的は TOF 治療した RA 患者の血清 GLS 濃度と, RA 患者由来の FLSs における GLS 発現に対する TOF の影響を検討することである.

### 【方法】

1 種類以上の TNF 阻害剤に不応性であり, TOF を投与した RA 患者 6 名の血清を採取し, 血清 GLS 濃度, CRP, MMP-3, 疾患活動性を検討した. 疾患活動性の評価は DAS28-4[ESR]を用いた. GLS 濃度は enzyme immunoassay (EIA) を用いて測定した. 2010 年 RA 新診断基準を満たした患者 13 名より, 人工関節置換術, 滑膜切除術時に採取した滑膜組織を初代培養し, 実験には 3 代から 8 代継代した FLSs を使用した. TNF $\alpha$  刺激による GLS 発現量の変化と, TOF による抑制効果を検討するため, mRNA を RT-PCR で, 細胞内のタンパク量を EIA と細胞免疫染色にて検討した. TOF は JAK1, 2, 3 のリン酸化を抑制することから, 本研究ではそのシグナル伝達の下流である STATs のリン酸化を Western blot 法にて検討した.

### 【結果】

TOF による治療を行った症例において, DAS28-ESR は TOF 投与前平均 4.29 から 12 週後に 2.85, CRP は平均 4.53 から 0.37 (mg/dl)に, MMP-3 は平均 362.3 から 113.6 (ng/ml)に改善した. 血清 GLS 濃度は平均 6.20 から 2.21 (ng/ml) へと低下した.

RA-FLSs を用いた実験系では, TNF $\alpha$  刺激により mRNA レベル, タンパクレベルともに GLS 発現の増強を認めた. TOF による前処置にて, TNF $\alpha$  刺激で誘導されるグリオスタチンは TOF の濃度依存性に抑制された. 細胞免疫染色でも同様の結果となった. TNF $\alpha$  刺激による STATs は, STAT1 のみ 4 時間後からリン酸化が認められ, そのリン酸化は TOF 存在下で抑制された.

### 【考察】

TNF 阻害剤に不応性の RA 患者に TOF を投与したところ, 疾患活動性の改善, CRP, MMP-3 の低下に伴って, 血清 GLS 濃度が低下した. 従来型合成抗リウマチ薬を用いた治療と同様に, TOF を用いた治療においても血清 GLS 濃度は, 疾患活動性マーカーとなりうる. RA-FLSs を用いた *in vitro* の実験系にて, TNF $\alpha$  に誘導された GLS は TOF にて前処置することで mRNA, タンパクレベルともに発現が抑制され, 免疫染色でも同様の結果となった. これらの結果より RA-FLSs において, TNF $\alpha$  による GLS の誘導に JAK/STAT pathway の関与が示された. 細胞内シグナル伝達の検討では STAT1 のみが TNF $\alpha$  刺激後 4 時間から有意差をもってリン酸化され, TOF の前処置にて, そのリン酸化は抑制された. このリン酸化に 4 時間を要する理由としては TNF $\alpha$  による二次的な mediator の誘導が推測される. それが STAT1 を活性化し, GLS を誘導

していると考えられた。これまでの報告によると変形性関節症由来 FLSs よりも RA-FLSs で STAT1 の発現とリン酸化は顕著であり, さらに免疫系細胞よりも FLSs で STAT1 の発現が多い。また, STAT1 は炎症性 mediator の発現に関与し, 滑膜炎を増悪させるとの報告もある。本研究結果から TOF による STAT1 の不活性化が GLS の発現抑制をもたらしたと考えられた。FLSs における GLS 発現の抑制は, TOF の新規抗炎症作用機序であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

【背景と目的】 グリオスタチン (GLS) は関節リウマチ (RA) 患者の滑液中、血清中に高濃度に存在し、その濃度は RA の病勢を反映している。RA 線維芽細胞様滑膜細胞 (RA-FLSs) において、TNF (tumor necrosis factor) $\alpha$  により GLS は誘導され、さらに GLS は RA 滑膜炎の起炎作用、血管新生作用、軟骨破壊作用を示す。GLS の発現機序を解明し、その発現を抑制することは新たな RA 治療につながると考えられる。トファシチニブ (TOF) は janus kinase (JAK) のリン酸化を阻害し、JAK/STAT 系を介した炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する新規抗リウマチ薬である。臨床的に有効性が示されているが、RA-FLSs に対する作用は明らかではない。本研究では TOF で治療した RA 患者の血清 GLS 濃度の推移と、RA-FLSs における GLS 発現に対する TOF の影響を検討し、TOF の新規抗リウマチ作用を明らかにすることを目的とした。

【方法】 TNF 阻害剤に不応性であった RA 患者 6 名に TOF を投与し、血清 GLS 濃度、CRP、MMP-3、疾患活動性を検討した。疾患活動性の評価は DAS28-4[ESR]を用いた。GLS 濃度は enzyme immunoassay (EIA) を用いて測定した。また、RA 患者 13 名より、人工関節置換術時に採取した滑膜組織から培養した FLSs を使用した。TNF $\alpha$  刺激による GLS 発現量の変化と、TOF による抑制効果を、mRNA を RT-PCR で、細胞内のタンパク量を EIA と細胞免疫染色にて検討した。TOF は JAK3 のみならず、JAK1, 2 も阻害することから、そのシグナル伝達の下流である STATs のリン酸化を Western blot 法にて検討した。

【結果】 TOF による治療を行った症例において、DAS28-4[ESR]、CRP、MMP-3 は有意に低下し、血清 GLS 濃度も同様に低下した。RA-FLSs を用いた実験系では、TNF $\alpha$  刺激により GLS 発現の増強を認めた。TOF による前処置にて、TNF $\alpha$  刺激で誘導されるグリオスタチンは TOF の濃度依存性に抑制された。細胞免疫染色でも同様の結果となった。TNF $\alpha$  刺激による STATs は、STAT1 のみリン酸化が認められ、そのリン酸化は TOF 存在下で抑制された。

【考察】 TOF を用いた治療においても血清 GLS 濃度は、疾患活動性マーカーとなりうることが示唆された。RA-FLSs を用いた実験では、TNF $\alpha$  にて誘導された GLS は TOF の前処置で発現が抑制された。これらの結果より、RA-FLSs において、TNF $\alpha$  による GLS の誘導に JAK/STAT pathway の関与が示された。これまでの報告によると、STAT1 のリン酸化は、変形性関節症由来 FLSs や免疫系細胞よりも RA-FLSs で顕著であり、STAT1 は炎症性 mediator の発現に関与し、滑膜炎を増悪させると報告されている。本研究結果から TOF による STAT1 の不活性化が GLS の発現抑制をもたらしたと考えられた。TOF の新規抗リウマチ作用として、RA-FLSs における GLS 発現の抑制機序があることが示唆された。

【審査の内容】 主査の和田教授より、TOF の臨床的な特徴やその RA 治療薬における位置づけ、GLS の実臨床におけるバイオマーカーとしての可能性についてなど 7 項目、第 1 副査の岡本教授より、GLS の RA 病態形成における関与、細胞培養手順や実験データの解析についてなど 13 項目、第 2 副査の大塚教授より、RA の骨破壊ゼロを目指した治療法について、軟骨破壊がすすむとなぜ痛みが生じるかなど 7 項目の質問があった。これらの質問に対して、申請者からおおむね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究では、RA-FLSs において TOF の GLS 発現に対する抑制効果を解析し、RA の新規治療法への手がかりを与える新しい知見を得た。よって、本論文著者は、博士 (医学) の学位を授与するのに値するものと判定した。