



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1633号
学位記番号	第1168号
氏名	河 命守
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	<p>Inhibition of IL-6 production from rheumatoid synovial fibroblasts by isoform-specific histone deacetylase (HDAC) inhibitor (アイソフォーム特異的 HDAC 阻害剤を使用した関節リウマチ滑膜線維芽細胞における IL-6 産生の抑制効果)</p> <p>Nagoya Medical Journal in Press</p>
論文審査担当者	<p>主査： 山崎 小百合 副査： 飯田 真介，大塚 隆信</p>

## 論文内容の要旨

関節リウマチ（以下 RA）は、関節滑膜に炎症が起き関節痛や腫脹をきたす原因不明の自己免疫疾患である。その発症要因として遺伝的要因と非遺伝的要素の両者が関与していると推測されている。

近年、生物学的製剤によりその治療成績と患者の ADL が改善した。しかし、生物学的製剤の non-responder も存在し、新規治療が求められている。その候補として epigenetic 制御が注目されており、近年、histone deacetylase（以下 HDAC）阻害剤により RA 滑膜線維芽細胞（以下 RSF）からの IL-6 産生が抑制されるとの報告がなされた。しかし HDAC は epigenetic 制御以外にも細胞間接着因子の翻訳後修飾にもかかわっており、その作用は一様ではない。

本研究の目的は各種 HDAC 阻害剤の RA 滑膜線維芽細胞に対する効果を IL-6 発現の面から検証し、epigenetics の観点からその治療効果を検討することである。

### 対象と方法

対象は名古屋市立大学病院にて RA と診断され、手術の際に患者より採取された RSF を使用した。対照として変形性膝関節症患者から採取した滑膜を使用した（以下 OSF）。

HDAC 阻害剤としては pan-HDAC 阻害剤として SAHA を、class I 阻害剤として 4SC-202 を、class II 阻害剤として MC1568 を使用した。また、isoform 特異的阻害剤として HDAC 3 阻害剤に RGFP966 を、HDAC 4 阻害剤として Tasquinimod を、HDAC 6 阻害剤として CAY10603 を、HDAC 8 阻害剤として PCI34051 を使用した。

薬剤による細胞毒性試験として WST-1 assay、細胞内の IL-6 mRNA を測定するために real time PCR を、細胞外の IL-6 タンパク質を測定するために ELISA を行った。

### 結果

Pan-HDAC 阻害剤は RSF、OSF とともに IL-6 の産生を mRNA とタンパク質発現の両方で抑制していた。この結果から、これまでの報告にあった HDAC 阻害剤が関節での IL-6 産生を抑制し、関節炎を抑制する働きを持つことを確認できた。

HDAC の副作用の軽減と、病態形成に関与する HDAC の class を特定するため、class 特異的な阻害剤を用いて研究を行った。その結果、class I と II の特異的阻害剤で IL-6 mRNA が有意に上昇した。Class I では OSF の IL-6 mRNA の上昇が最大濃度でもコントロールの 3 倍にとどまるのに対し、RSF では最大 6.5 倍に増加した。IL-6 タンパク質産生においては RSF、OSF とともに薬剤濃度によらず産生量は変わらなかった。

次に我々は、人体への悪影響をさらに縮小する目的で、また、どの HDAC が最も病態形成に関与しているかを明らかにするために、isoform 選択的な HDAC 阻害剤を用いた実験を行った。Class I に属する HDAC のうち、HDAC isoform 3、8 特異的阻害剤を、class II 阻害剤のうち、HDAC isoform 4、6 阻害剤を用いて、同様の条件で IL-6 の mRNA とタンパク質産生を測定した。その結果、class I の中でも特に HDAC isoform 8 阻害剤による IL-6 mRNA の誘導効果において RSF と OSF の間に有意差があった。また、興味深いことに HDAC 6 阻害剤のみが RSF、OSF の両方で濃度依存的に IL-6 発現を mRNA とタンパク質の両方の段階で抑制した。

### 考察

今回の研究で、我々は新たに開発された種々の class 特異的もしくは isoform 特異的阻害剤

化合物を使用して、RSF と OSF で IL-6 の発現に対する効果を mRNA およびタンパク質発現レベルで検討した。

Pan-HDAC 阻害剤は RSF や OSF からの IL-6 の産生を mRNA とタンパク質発現レベルの両方で抑制し、これは以前の報告と同様であった。興味深いことに class I、II 特異的阻害剤では IL-6 mRNA の上昇を引き起こしたがタンパク質レベルでは明らかな効果はみられなかった。Class I 阻害剤による IL-6 の mRNA レベルでの誘導効果は OSF とくらべ RSF で有意に高かった。その class I の中でも特に HDAC isoform 8 阻害剤による IL-6 mRNA の誘導効果には有意差があった。今回の結果から、RSF と OSF における IL-6 の epigenetic 制御に違いに HDAC 8 が強く関与している可能性を示した。HDAC 8 は、遺伝情報の安定化、および細胞の正常な発達に不可欠な遺伝子の活性の制御にも関わるとされており、RA と OA との病態の違いは前述のような HDAC 8 の機能が関与している可能性も考えられ、今後、確認が必要である。

本研究の結果、HDAC isoform 6 特異的阻害剤により IL-6 mRNA の抑制が RSF と OSF の両方で起こっており、この効果はタンパク質レベルでも見られた。Class 特異的阻害剤と逆の現象が起こっている結果は、isoform 6 阻害剤の epigenetic な効果に加え前記したような non-epigenetic な効果も関与している可能性が考えられ、今後の確認が必要である。

RSF からの IL-6mRNA、およびタンパク質を HDAC isoform 6 阻害剤が抑制したという本研究の結果から、HDAC isoform 6 阻害剤は今後、関節リウマチの治療薬として使用できる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 審査論文の要旨

【目的】関節リウマチ(RA)は関節滑膜に炎症が起き関節痛や腫脹をきたす原因不明の自己免疫疾患である。炎症が進展していくと、骨・軟骨の破壊や変形をきたす。その治療法は古くはNSAIDや副腎皮質ステロイドによる治療から始まり、MTXなどの古典的DMARDsによる治療がメインであったが、近年は生物学的製剤やtargeted DMARDの登場によりその治療成績、患者ADLが飛躍的に改善した。しかし、そのような治療に対するnon-responderも存在し、新たな治療が求められているところでもある。近年その標的としてepigenetic制御が注目されている。本研究ではRAの病態形成に関与するIL-6産生過程のepigenetic制御を標的とする化合物の効果を明らかにするために、RA患者由来滑膜線維芽細胞(RSF)を使用してIL-6産生に対する種々のHDAC阻害剤の効果を検討した。【対象と方法】手術検体より採取したRSF、変形性関節症由来滑膜線維芽細胞(OSF)を種々のヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤で刺激し、qRT-PCRを用いて細胞内IL-6 mRNA発現を調べた。また、細胞培養上清中のIL-6タンパク質産生レベルをELISAで調べた。使用したHDAC阻害剤はpan-HDAC阻害剤としてSAHA、class特異的阻害剤としてclass Iに対する4SC-202、class II阻害剤としてMC1568を使用し、isoform特異的阻害剤としてisoform 3に対するRGFP966、isoform 4に対するTasquinimod、isoform 6に対するCAY10603、isoform 8に対するPCI34051である。薬剤濃度はWST-1 assayで検討し、cell viability 80%以上確保できる濃度を使用した。【結果】RSFはOSFと比較して有意にbaselineのIL-6濃度が高かった。Pan-HDAC阻害剤は、RSFおよびOSFからのIL-6産生を抑制した。しかし、class特異的阻害剤は、RSFおよびOSFの両方からのIL-6遺伝子発現を増大させた。HDAC class I特異的阻害剤(4SC-202)、HDAC 8阻害剤(PCI34051)の刺激によりRSFはOSFと比較して有意に遺伝子発現を上昇させていた。また、HDAC 6特異的阻害剤(CAY10603)によりIL-6 mRNA発現およびタンパク質産生は有意に抑制されていた。【結論】：今回の研究結果からRAにおけるIL-6の制御にはclass IIと比較してclass Iがより強く関与している可能性を示唆した。また、HDAC isoform 6阻害剤はRSF、OSFからのIL-6発現を抑制しており、今後RAに対する新規治療薬になる可能性を示唆した。

### 2. 審査内容の要旨

発表終了後、第1副査の飯田教授から、関節内での炎症の首座となる細胞について、pan-HDAC阻害剤とclass特異的阻害剤の処理実験結果の逆転について、mRNAとタンパク質発現の解離の原因について、実験に使用できる滑膜細胞の継代数、HDAC 6がIL-6発現を抑制するメカニズム、HDAC 6阻害剤の副作用など、8つの質問がなされた。次に主査の山崎教授から、IL-6以外のサイトカインへ影響、滑膜細胞以外の細胞に対する影響や具体的な実験手技、検体間でのIL-6分泌量の差、今後の研究展望などについて、8つの質問がなされた。さらに、第2副査の大塚教授からは発育性股関節形成不全症(脱臼)治療後の寛骨臼形成不全症に対する手術治療とそのpitfallについて、先天性内反足におけるPonseti法について、先天性筋性斜頸の治療法についての3つの質問がなされた。これらの質問に対し概ね満足できる回答が得られ、申請者は学位論文の主旨を十分に理解していると同時に専攻分野(整形外科)に関する知識を習得しているものと判断された。本研究はRAに対する新規治療の候補としてHDAC 6阻害剤が活躍できる可能性を指摘し、新規のRA治療を考えるうえで有用な知見を得たと考えられる。よって本論文の著者は、博士(医学)の称号を与えるにふさわしいと判断された。