

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		MIYASAKA NOBUYUKI					
①研究代表者氏名		宮坂 信之			②所属研究機関・部局・職		東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
③研究課題名	和文	慢性関節リウマチの細胞周期制御療法の開発と実用化の検討					
	英文	Clinical Application of Cell Cycle Control Therapy to Rheumatoid Arthritis					
④研究経費 金額単位：千円		平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
		31,400	15,300	15,600	16,000	16,200	94,500
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
宮坂 信之	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授	膠原病内科学		実験の遂行・データの解析・総括			
上阪 等	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教授	膠原病内科学		実験の遂行・データの解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>関節リウマチ（RA）は、関節滑膜を病変の主座とする慢性炎症性疾患であるが、関節組織の破壊にはリンパ球の活性化に加えて滑膜細胞の活性化と増殖が深く関与していることが推測されている。一方、現在のRAの薬物療法は、主に消炎鎮痛とリンパ球機能抑制のみを目的としているが、その有効性は必ずしも十分ではない。そこで、これまでの細胞周期制御分子によるRA治療研究の成果を臨床に直接還元することを目的とし、以下の研究を行った。</p> <p>(1)関節炎治療用ウイルスベクターの開発 (2)生物学的製剤によるCDKI療法の開発 (3)CDKI誘導性およびCDK阻害性低分子化合物の探索 (4)CDKI療法の安全性の検討 (5)他の滑膜細胞周期抑制分子の探索とこれを利用した治療法の開発 (6)滑膜細胞での選択的p16^{INK4a}誘導機序の解析 (7)CDKI療法の効果発現機序の詳細な解析</p>							

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

- 1) **関節炎治療用ウイルスベクターの開発**: 研究開始後、欧米においてアデノウイルスやレトロウイルスによる臨床試験で生命を脅かす副作用が報告され、ウイルスベクターによる遺伝子治療実施環境が急速に変化した。これを受け、本研究では実績・欠点ともに明らかとなっているアデノウイルスベクターを最も臨床に近いベクターとして焦点を当て、その感染効率と遺伝子発現効率とを改良することにより、副作用の少ない遺伝子導入法を模索した。その結果、5型ウイルスのファイバー部分をDNA組換えにより35型ファイバーやRGD配列を含むものに改変することで、滑膜細胞への遺伝子導入効率を上昇させることができた。また、遺伝子発現制御配列を工夫することで発現効率も向上させることができた。これらにより関節炎モデル治療においても同じウイルス量で従来法を上回る治療効果を得ることができた。
- 2) **生物学的製剤によるCDKI療法の開発**: アデノウイルスベクターによる遺伝子治療において死亡例があり、遺伝子治療によらない細胞周期制御療法を検討した。アンテナペディア蛋白ないしHIV tat蛋白のprotein transduction domain(PTD)は融合タンパクとして結合したタンパクとともに細胞内に入る。HIV transmembrane domain (TAT)を加えたタンパクは細胞膜を透過して細胞内に到達することが知られており、TAT-p16^{INK4a}, TAT-p21^{Cip1}, TAT-p27^{Kip1}などの組み替えタンパクを作成し、滑膜細胞内へ導入し、その効率、発現期間、増殖抑制作用などを確認した。
- 3) **CDK阻害性低分子化合物の探索**: p16^{INK4a}遺伝子のプロモーター領域をクローン化し、この下流にルシフェラーゼ遺伝子をつけたレポータープラスミドを構築した。これを線維芽細胞に導入して約2万の化合物をスクリーニングしたが、最終的に滑膜細胞にp16^{INK4a}を誘導する化合物はなかった。一方で、p16^{INK4a}と同じ薬理作用をもつCDK4阻害薬の全身投与はその副作用が懸念されたが、抗癌剤として開発される過程で、副作用は少ないが抗癌作用も乏しいことが判明した。そこで、急遽、低分子CDK4阻害剤のうち、免疫系を抑制することなく増殖性滑膜炎に治療効果を示す薬剤を探索し、その結果、2つの化合物について用法特許を申請した。
- 4) **CDKI療法の安全性の検討**: *in vitro*でCDKI強制発現が滑膜細胞に及ぼす影響をDNAアレイ法による網羅的解析法で調査したが、細胞死の誘導その他、細胞の基本機能に影響を及ぼすような遺伝子発現変化は認められなかった。また、CDK4阻害剤のマウス*in vivo*投与でも、目視上の変化はなく、免疫抑制も認められなかった。
- 5) **他の滑膜細胞周期抑制分子の探索とこれを利用した治療法の開発**: 老化細胞に発現し、不死化細胞に発現しない遺伝子としてクローニングされたREICなどの細胞周期制御遺伝子 (BBRC268,20,2000) に注目して検討を進めたが、この論文の結果に再現性は乏しく、滑膜細胞では細胞周期制御に有用ではなかった。p16^{INK4a}、p21^{Cip1}以外のCDKI分子については、それぞれの遺伝子をクローン化しアデノウイルスに搭載し、関節炎モデル*in vitro*で滑膜細胞増殖抑制活性に差は認められなかった。
- 6) **滑膜細胞での選択的p16^{INK4a}誘導機序の解析**: p16^{INK4a}誘導機序として一般に知られる経路としてRas-Raf-MEK-ERK-Ets-1/2を介する経路、転写因子SP1を介する経路、p16^{INK4a}promoter領域の脱メチル化を介する経路の3つのみが明らかにされている。そこで、滑膜細胞でp16^{INK4a}が誘導される場合に、これらの経路が活性化しているかを検討したが、これらの経路の分子群に変化は認められなかった。そのため、p21^{Cip1}発現とp16^{INK4a}発現を結ぶ未知の分子を探索するために、p21^{Cip1}遺伝子発現後から経時的に蛍光ディフュージョン・ディスプレイ法やGeneChip法により解析を行い、約30個の候補遺伝子を同定した。これらの遺伝子をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイによりp16^{INK4a}プロモーター活性を亢進させるものを絞り込むことにより、妊婦血清中に多く存在する蛋白ひとつが最終候補となった。
- 7) **CDKI療法の効果発現機序の詳細な解析**: ラットアジュバント関節炎における検討では、p21^{Cip1}関節内遺伝子治療は滑膜細胞の増殖を直接抑制し、アポトーシスにはよらなかった(*Int Immunol*, 2001)。 *In vitro*において、滑膜細胞にp21^{Cip1}を強制発現させるとサイトカイン、ケモカイン、組織破壊性蛋白分解酵素などの発現が低下していた。これらの炎症性メディエーター産生抑制には、IL-1R1発現低下による経路と、IL-1R1非依存性のc-Jun N-terminal kinase (JNK)と結合してキナーゼ活性を抑制する経路が関与していた(*J Immunol*, 2003)。さらに、CDKIはcyclin D/CDK4活性を抑制してretinoblastoma (Rb) 蛋白のリン酸化を抑制するが、cyclin D/CDK4がRb依存性と非依存性の経路で炎症性メディエーターの産生を制御していることを明らかにした (*Arthritis Rheum, in press*)。これらの成果は、CDKIのみならず低分子CDK4,6阻害剤もRAの治療薬として有用である可能性を示す。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

(1)ファイバー部分を改良したアデノウイルスは従来型ウイルスに比して約10倍、滑膜細胞に感染しやすい。また搭載遺伝子の発現制御配列を改良することで、遺伝子発現効率も一般的な発現ユニットに比べて最高10倍改善することができた。従って、両者あわせるとアデノウイルスによる遺伝子治療効率を従来法に比して最高で100倍向上させることが出来る。これは、臨床で用いる際に患者に注射するウイルス量を100分の1に減量できることを意味する。現在、アデノウイルスによる遺伝子治療が反省期にあるのは、大量のウイルス注射が生むことに起因する問題が多いためであり、この成果は臨床応用を考える上で意義深い。かかる飛躍的改良が明日の臨床応用への足がかりとなると考えられる。

(2)細胞周期調節因子とされるCDKI発現は、細胞の老化、分化、損傷DNA修復のための一時的細胞増殖停止に関わるものと信じられてきた。ところが、これまでの申請者らの研究でCDKI p16^{INK4a}、p21^{Cip1}発現がサイトカイン、ケモカイン、組織破壊性タンパク分解酵素の遺伝子発現の制御を介して免疫や炎症を担う細胞の機能をも調節することが明らかになった。さらに、その経路がCDKIとシグナル伝達分子との直接作用によるもの、cyclinD/CDK4,6活性を介し、Rb依存/非依存性のものと、多様な経路を介することが明らかとなった。本研究が細胞周期と免疫を結ぶ新たなパラダイムを明示した。

(3) 本研究において、ウイルスベクターを用いない低分子化合物CDK4阻害剤や組換えタンパクによる関節炎の治療効果の可能性を示した。前述の通り、既に低分子CDK4阻害薬は悪性腫瘍治療のための臨床試験が行われているが、細胞増殖を停止させるだけでは腫瘍退縮効果は認められず、多くの薬剤が開発中止になっている。しかし、注目すべきは副作用の少なさである。細胞周期抑制を主作用とする薬剤はホメオスターシス維持のための細胞増殖をも抑制し重大な副作用を及ぼすであろうとの予想は当たらなかった。この薬剤を低用量用いることで、免疫抑制を来さずに関節炎モデル動物を治療することが出来た。我々が見いだしたように、CDK4活性阻害が細胞増殖のみならず炎症性メディエーター産生をも阻害しているためと考えられる。我々は、この薬効機序が従来薬とは全く異なるため、CDK4阻害剤を新しいクラスの抗リウマチ剤と位置付けた。我々の開発した2剤のみならず、今後、このクラスの新規関節炎治療薬が数多く開発される可能性がある。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術論文

- ① Nonomura Y, Kohsaka H, Nasu K, Terada Y, Ikeda M, Miyasaka N. Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase Inhibitor p21^{Cip1} gene into the joints. *Int Immunol* 13(6): 723-731, 2001.
- ② Nonomura Y, Kohsaka H, Nagasaka K, Miyasaka N. Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in the treatment of arthritis. *J Immunol* 2003; 171: 4913-4919.
- ③ Nonomura Y, Nagasaka K, Hagiyaama H, Sekine C, Nanki T, Tamamori-Adachi M, Miyasaka N, Kohsaka H. Cyclin-dependent kinase 4/6 directly modulates expression of rheumatoid inflammatory mediators in retinoblastoma protein-dependent and independent pathways *Arthritis Rheum in press*.

国際会議、学会

1. Miyasaka N. Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor genes into the joint. The 15th Naito Conference in Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases. Kanagawa. October 2-5, 2002
2. Miyasaka N. Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor genes into the joint. The 2nd Hakone-yama Symposium on Frontier in Translational Research. Tokyo. January 16-17, 2003
3. Kohsaka H, Nonomura Y, Nagasaka K, and Miyasaka N. Effects of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Gene Induction on Gene Expression by Fibroblast-like Synoviocytes Derived from Rheumatoid Joints. Arthritis Research Conference, San Diego, California, March 23-25, 2001
4. Nonomura Y, Kohsaka H, Nagasaka K, and Miyasaka N. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Cip1} gene induction into rheumatoid synovial fibroblasts regulates expression of genes related to cell cycle, inflammation and joint destruction. 7th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Awaji Island, September 26-29, 2001.
5. Nonomura Y, Kohsaka H, Nagasaka K, and Miyasaka N. Multiple Molecular Effects of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21^{Cip1} Gene Induction for Treatment of Arthritis American College of Rheumatology 66rd National Meetings, New Orleans, LA, October 22-29, 2002
6. Kohsaka H, Nonomura Y, Nagasaka K, Miyasaka N Gene transfer of p21^{Cip1} exerts multiple molecular effects in treatment of arthritis. Keystone Symposium on Cellular Biology of Immune Cells, Keystone, CO, March 5-10, 2003
7. Kohsaka H, Hagiyaama H, Nonomura Y, Sekine C, Miyasaka N: Gene transfer of cell cycle regulator genes for treatment of rheumatoid arthritis the 11th Asia Pacific League of Association for Rheumatology Congress Jeju(Korea) September 11-16, 2004
8. Sekine C, Sugihara T, Miyake S, Miyasaka N, Kohsaka H. Small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors as a new class of anti-rheumatic drugs Frontiers of Clinical Investigation Symposium Autoimmunity, San Diego, September, 2005.