

報道関係各位

2023年7月3日
東京医科大学

細胞外アミノアシル tRNA 合成酵素は関節リウマチにおいて サイトカインおよび PAD4 を放出させることで、 自己免疫応答や炎症応答を引き起こす

～ブシラミンによる標的アミノアシル tRNA 合成酵素を介する抗リウマチ作用～

【概要】

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) は関節に炎症が起こることによって、痛みや腫れが生じる自己免疫疾患の一つです。これまでに、いくつかの抗リウマチ薬が開発されてきましたが、ブシラミン (商品名: リマチル; あゆみ製薬) は日本で開発された抗リウマチ薬として知られています。しかしながらブシラミンの作用機序についてはほとんど解明されていませんでした。

東京医科大学 (学長: 林由起子/東京都新宿区) 医学総合研究所の半田宏兼任教授らの研究グループは、国立国際医療研究センター研究所 肝炎・免疫研究センター 免疫病理研究部 鈴木春巳部長らの研究グループとの共同研究により、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetases; aaRSs) (注1) がブシラミンの標的タンパクであることを発見しました。RA と aaRSs の関連性について研究を進めたところ、RA 患者において血清や滑膜液中に aaRSs が放出されていることを発見し、さらに細胞外 aaRSs がアラミン (注2) として機能することで、マクロファージや樹状細胞からサイトカイン (注3) や Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4) (注4) を放出させていることを明らかにしました。また、ブシラミンは aaRSs によるサイトカイン産生誘導を阻害することも明らかとなり、ブシラミンは細胞外に放出された aaRSs と結合し、アラミンとしての機能を阻害することで、抗リウマチ薬の機能を発揮している可能性が示唆されました。さらに、アラミンとしての aaRSs の機能を抑制する阻害ペプチドの開発にも成功しており、この阻害ペプチドが関節リウマチのマウスモデルにおいて治療効果があることが示されました。今回の研究成果により、aaRSs が細胞外に放出されアラミンとして機能することで、RA の発症や病態の悪化に大きく関与していることが示されたことから、RA に対して aaRSs を標的とした画期的な新規治療法の確立が期待されます。

この研究成果は、2023年7月2日 (米国東部時間) の Annals of the Rheumatic Diseases 誌 (オンライン版) に掲載されました。

【本研究のポイント】

- アフィニティービーズ技術によりブシラミンの標的タンパク質として、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRSs) を発見しました。
- マクロファージを 20 種類の aaRSs で刺激すると、全てが IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導することを見出しました。
- 実際に、RA 患者においては血清中や滑膜液中に aaRSs が放出され、アラミンとして作用することを見出しました。
- HMGB1 等の他のアラミンと比べ、aaRSs は、はるかに高いサイトカイン産生を誘導することを見出しました。
- また、抗シトルリル化タンパク質抗体(ACPAs)は RA に特異性の高い抗体で、RA の診断指標や発症予測に使われている自己抗体の一つです。Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4)は ACPAs の産生誘導に中心的な役割を担っている酵素ですが、興味深いことに、aaRSs は PAD4 の放出も誘導することを見出しました。
- 以上から、aaRSs はサイトカイン産生を誘導し免疫応答を強烈に惹起するだけでなく、PAD4 の放出を介して ACPAs の産生を誘導することにより、RA において 2 つの側面から発症や病態の悪化に関与することがわかりました。
- ブシラミンは、aaRSs を標的として結合し、炎症性サイトカインの分泌および PAD4 の放出のいずれも抑制することで、抗リウマチ作用を示すことが示されました。

【研究の背景】

RA は免疫応答の異常により関節に炎症が起こる自己免疫疾患で、日本では人口の 0.5~1%が罹患し、男女比は 1:3~4 で女性の患者が多い疾患として知られています。RA の発症メカニズムに関しては不明な点も多く残されていますが、遺伝的要因と環境要因が組み合わさって起こる自己免疫疾患と考えられています。

サイトカインは免疫応答の制御において重要な役割を果たしています。これまでに多くの種類のサイトカインが発見され、このサイトカインの異常産生が自己免疫疾患の発症や病態悪化に大きく関与していることが明らかにされてきました。IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインは RA に大きく関与しており、実際にこれらサイトカインを標的とした治療薬も開発されています。従って、RA の治療においてサイトカインの異常産生を如何に制御できるかが非常に重要であるといえます。

ブシラミンは抗リウマチ薬として知られており、サイトカイン産生を抑制することなどが知られていますが、その作用メカニズムはほとんど解明されていませんでした。研究グループは、ブシラミンの標的タンパクとして aaRSs の同定に成功しましたが、RA において aaRSs がどのように関与しているかは不明であったことから、RA と aaRSs の関連性を解明すべく研究を進めました。

【本研究で得られた結果・知見】

これまでの報告において、tyrosyl-tRNA synthetase (YRS)をはじめとした一部の aaRSs が細胞外に放出され、さまざまな生理活性を有していることが報告されていました。研究グループはまず、細胞外 aaRSs が RA の発症や症状の悪化に大きく関与しており、ブシラミンはその細胞外 aaRSs の機能を阻害しているのではないかと考えました。マクロファージにおいて aaRSs 刺激後、IL-6 などのサイトカイン産生を調べたところ、非常に興味深いことに 20 種類全ての aaRSs がサイトカイン産生を誘導できることが判明しました。また、aaRSs によるサイトカイン産生には LPS の受容体として知られている TLR4 を介していることや、ブシラミンが aaRSs によるサイトカイン産生を抑制することも明らかにしました。aaRSs はアラミンとして作用していることが示されたことから、aaRSs とこれまで知られている他のアラミン(HMGB1 など)によるサイトカイン産生量を比較したところ、それぞれ同じ濃度でマクロファージを刺激した場合、aaRSs は他のアラミンに比べ 20~100 倍量近いサイトカインを誘導できることが明らかになりました。

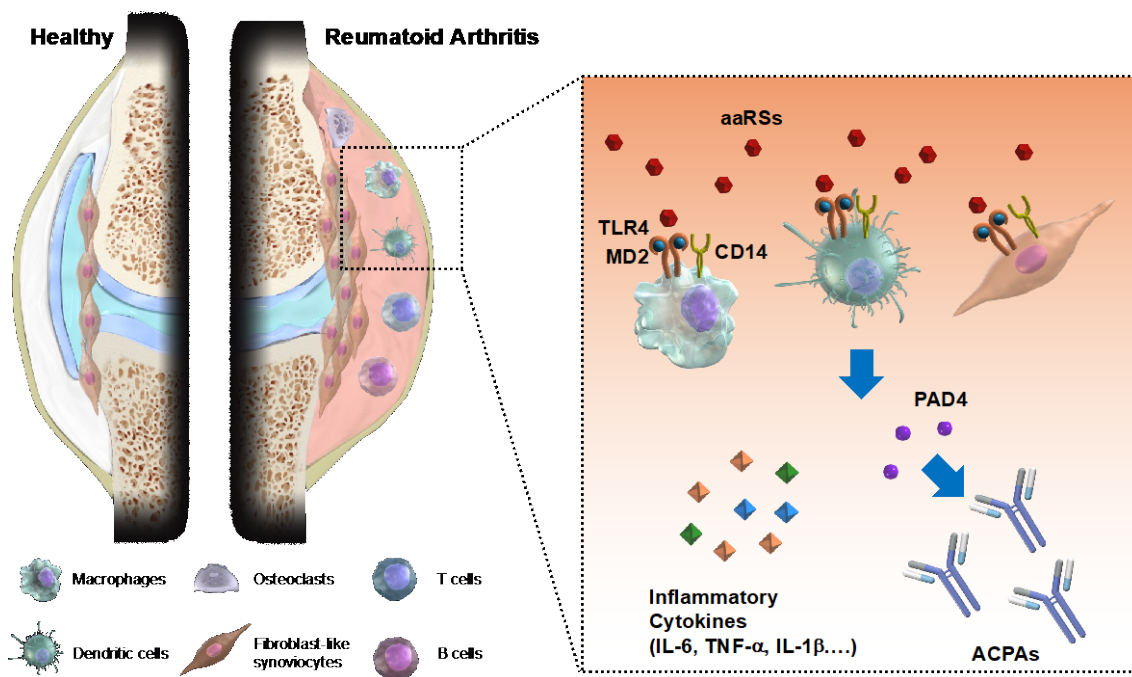
aaRSs にアラミン活性があることが確認されたことから、実際に RA において aaRSs が細胞外に放出され、血中や病変部位に存在しているのかについて解析を進めました。健康人と RA 患者血清中の aaRSs 濃度を比較したところ、YRSをはじめとした一部の aaRSs の濃度が RA 患者血清において有意に高くなっていることが判明しました。また、病変局所である関節の滑膜液中においては、変形性関節症の患者よりも RA 患者の方が、aaRSs 濃度が劇的に高いことも示されました。これらの結果から、RA 患者では病変局所および全身において aaRSs が細胞外に放出されていることが判明しました。

抗シトルリン化タンパク抗体 (Anti-citrullinated protein antibodies; ACPAs)は関節リウマチに特異性の高い抗体で、関節リウマチの診断の指標や発症予測に使われている自己抗体の一つです。PAD4 はこの ACPAs の産生誘導において中心的な役割を担っている酵素の一つとして知られています。非常に興味深いことに、aaRSs はマクロファージからサイトカインだけでなく、PAD4 放出も誘導することが明らかになりました。実際に、PAD 活性の高い患者や ACPAs 陽性患者において、RA 患者滑膜液中の aaRSs 濃度がコントロール群に比べ有意に高くなっていました。これらの結果から、aaRSs はサイトカイン産生を誘導し免疫応答を強烈に惹起するだけでなく、PAD4 の放出にも関与することで、ACPA の産生誘導にも関与していることが示され、関節リウマチにおいて 2 つの側面から発症や病態の進行に関与している可能性が示唆されました。

ここで重要となるのが、aaRSs をターゲットとした RA に対する治療法の確立です。ブシラミンは aaRSs によるサイトカイン産生を抑制しましたが、低濃度の LPS 刺激によるサイトカイン産生も抑制しました。このことから、ブシラミンが aaRSs 特異的な阻害剤としては使用しにくいのが現状です。本来であれば、アラミンとして機能する aaRSs を特異的にブロックする aaRSs 中和抗体を作製するのが常道ですが、20 種類すべての aaRSs (あるいはそれぞれの RA 患者血清において高い値を示している aaRSs) に対する中和抗体を作製するのは現実的ではありませんでした。そこで研究グループは、阻害ペプチドの作成を試みました。ヒト YRS タンパクを 53 分割し、分割されたそれぞれのペプチドの中で aaRSs によるサイトカイン誘導を阻害できるペプチドがあるか探索しました。その結果、いくつかの阻害ペプチドが発見され、特に YP51 と呼ばれるペプチドは RA のマウスモデルである collagen-induced arthritis や collagen antibody-induced arthritis に対して高い治療効果が認められました。また、この YP51 を投与された RA マウスモデルでは血中のサイト

カインや aaRSs、PAD4 の濃度がコントロール群に比べ劇的に減少していることも示されました。現在のところメカニズムは不明ですが、YP51 は YRS だけでなく、他のいくつかの aaRSs によるサイトカイン誘導も抑制できることが判明しています。

本研究によって、aaRSs はアラミンとして機能しサイトカインを誘導する一方で、PAD4 の放出にも関与することで、RA の発症や病態悪化に関わっていることが明らかになり、aaRSs が RA の新しい治療標的になり得ることが示されました（下図参照）。



（図）RA において病変部位（滑膜液）や血中に aaRSs が放出され、放出された細胞外 aaRSs がマクロファージや樹状細胞に作用することでアラミンとして機能し、さまざまな炎症性サイトカインの産生を誘導します。また、aaRSs は PAD4 の放出も誘導することで、RA におけるタンパク質のシトルリン化の誘導にも関与しています。マウス RA モデルにおいて、YRS 阻害ペプチドは血中の aaRSs、炎症性サイトカイン、および PAD4 濃度を減少させることで、高い治療効果を示すことも示されました。

【今後の研究展開および波及効果】

これまでに、RA をはじめ筋炎などの自己免疫疾患においていくつかの aaRSs に対する自己抗体が産生されていることは報告されていました。ところが、aaRSs そのものが自己免疫疾患に関与しているかどうかについては殆ど解明されていませんでした。今回、研究グループは aaRSs が RA 患者において病変局所や血中に高濃度で放出されていることを発見しました。細胞外 aaRSs がアラミンとして作用し、炎症性サイトカインや PAD4 を放出させることで RA の病態悪化に関与していることを明らかにしました。これらの発見は、RA において初めて細胞外 aaRSs の作用機構を明らかにしたもので、非常に意義深い研究成果であると考えられます。

今後は、RA だけでなく他の自己免疫疾患における細胞外 aaRSs のはたらきも解明していくことで、さまざまな自己免疫疾患に対して aaRSs をターゲットとした新規治療法の開発が期待されます。

【用語解説】

(注1) アミノアシル tRNA 合成酵素

タンパク合成の過程において重要な酵素で、特定のアミノ酸を tRNA に結合させることでアミノアシル tRNA を合成する。原核生物から真核生物まですべての生物において保存されており、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸それぞれに対応する 20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素が存在する。

(注2) アラーミン

組織障害や細胞死によって細胞外に放出され炎症を誘導する分子の総称である。HMGB1 (high mobility group box 1)や HSP (heat shock protein)をはじめとし、IL-1 や IL-33 といったサイトカインもアラーミンとして知られている。

(注3) サイトカイン

免疫細胞をはじめとしたさまざまな細胞から分泌される低分子タンパク質で、細胞間情報伝達分子としてはたらく。IL-6 や TNF- α は炎症を惹起する炎症性サイトカインとして知られており、免疫細胞の活性化や分化において重要な役割を担っている。

(注4) Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4)

タンパク質内のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する酵素で、全部で 5 種類の PAD が存在する(PAD1, 2, 3, 4, 6)。中でも PAD4 は RA の発症や病態悪化に深く関与している。本来、PAD4 は核内に存在しており、ヒストンのシトルリン化に関与しているが、PAD4 が細胞外に放出されると細胞外のタンパク質をシトルリン化させることで関節リウマチの発症や増悪化に関与する。

【掲載誌名・DOI】

掲載誌名：Annals of the Rheumatic Diseases

DOI：10.1136/ard-2023-224055

【論文タイトル】

Extracellular aaRSs drive autoimmune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis via the release of cytokines and PAD4

【著者】

Akihiro Kimura¹, Takumi Ito², Satoshi Sakamoto², Takeshi Takagi², Iwao Seki³, Masahiro Okamoto³, Hiroyuki Aono³, Satoshi Serada⁴, Tetsuji Naka⁴, Hiroaki Imataka⁵, Kensuke Miyake⁶, Yoshiaki Fujii-Kuriyama⁷, Takuya Ueda⁸, Keisuke Wakasugi⁹, Noriko Iwamoto¹⁰, Norio Ohmagari¹⁰, Hiroyuki Yamashita¹¹, Hiroshi Kaneko¹¹, Haruka Tsuchiya¹², Keishi Fujio¹², Hiroshi Handa^{2*}, Harumi Suzuki^{1*} *：責任著者

¹Department of Immunology and Pathology, Research Center for Hepatitis and Immunology, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Chiba 272-8516, Japan.

²Department of Chemical Biology, Tokyo Medical University, Shinjyuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan.

³Research and Development Department, AYUMI Pharmaceutical Corporation, Shimogyo-ku,

Kyoto 600-8008, Japan.

⁴Institute for Biomedical Sciences Molecular Pathophysiology, Iwate Medical University, Yahaba, Iwate 028-3694, Japan.

⁵Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, University of Hyogo, Himeji, Hyogo 671-2280, Japan.

⁶Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

⁷Medical Research Institute, Medical Genomics, Tokyo Medical Dental University, Tokyo, Japan.

⁸Department of Integrative Bioscience and Biomedical Engineering, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan.

⁹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

¹⁰Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan.

¹¹Division of Rheumatic Diseases, National Center for Global Health and Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan.

¹²Department of Allergy and Rheumatology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

*Corresponding author. Email: handa@tokyo-med.ac.jp (H.H.); lbhsuzuki@hospk.ncgm.go.jp (H.S.)

【主な競争的研究資金】

科学研究費 基盤研究(S)

国際連携研究費 from BMS/Celgene

○研究内容に関するお問い合わせ先

東京医科大学 医学総合研究所 未来医療研究センター 分子薬理学研究部門

兼任教授 半田宏

TEL : 03-3351-6141 (代表) 内線 : 478

E-mail : handa@tokyo-med.ac.jp

○取材に関するお問い合わせ先

学校法人東京医科大学 企画部 広報・社会連携推進室

TEL : 03-3351-6141 (代表)

E-mail : d-koho@tokyo-med.ac.jp

大学 HP : <https://www.tokyo-med.ac.jp/>