

主論文

Inhibitory effect of JAK inhibitor on mechanical stress-induced protease expression by human articular chondrocytes

(JAK 阻害剤のメカニカルストレスによるヒト軟骨細胞からの蛋白分解酵素発現抑制)

【緒言】

Janus Kinase (JAK) は約 130kDa の非受容体型チロシンキナーゼである。受容体の重合に伴って近接し、互いにリン酸化しあうことで活性化され、STAT や MAPK 経路など様々な細胞内情報伝達分子がリン酸化を受け、核内で様々な転写を促進する。Tofacitinib は、JAK1-3 を阻害標的とする低分子化合物であり、経口内服薬でありながら関節リウマチ (RA) に対して高い治療効果が認められる薬剤である。種々の細胞内シグナル伝達に対する作用を有する薬剤であるが、軟骨細胞における蛋白分解酵素発現に対する効果については報告されていない。

我々は、メカニカルストレスは軟骨細胞自身からの ADAMTSs や MMPs などの蛋白分解酵素発現を誘導することや、その発現に NF- κ B、MAPKs を介する RUNX-2 といった転写因子や、IL-1 β などの炎症性サイトカインが重要な役割を担うことが示唆されることを報告してきた。本研究では、JAK 阻害剤である tofacitinib のメカニカルストレスによる転写因子の発現や蛋白分解酵素の発現に対する影響を調査し、軟骨変性から軟骨を保護することが可能かどうかについて検証を行った。

【対象と方法】

周期的伸張刺激

正常ヒト軟骨細胞を I 型コラーゲンコーティングを施したシリコンチャンバー上で単層培養し、ST-140 (STREX 社) を用いて周期的伸張刺激 (CTS; 0.5Hz、10% strain、30 分) を加えた。対照群および tofacitinib (100nM または 1000nM) を CTS の 12 時間前に添加した群に分け調査を行った。CTS 後 30 分で蛋白の単離、免疫染色を行うための細胞を回収した。PCR および real-time PCR に用いる RNA は CTS 後 1,6,12,24 時間で細胞を回収し単離した。また、ELISA に用いる培養上清は CTS 後 12, 24 時間で回収した。

Reverse transcription PCR と real-time PCR

CTS 後 1,24 時間で回収した細胞より単離した RNA より、RUNX-2, ADAMTS4, ADAMTS5, MMP13, II 型コラーゲン α 1 鎖 (COL2A1), aggrecan の発現を reverse transcription (RT) PCR を用いて調査した。

また、同様に CTS 後 1,6,12,24 時間で回収した細胞より単離した RNA を用いて、経時的な RUNX-2, ADAMTS4, ADAMTS5, MMP13 の発現については real-time PCR を行い確認した。

免疫染色

CTS 後 30 分で単層培養された細胞を回収し、転写因子 RUNX-2 および NF- κ B p65 の核内移行を観察するために、免疫染色を行った。核内移行は、染色された細胞数の割合を計算し評価を行った。

ウェスタンブロット

CTS 後 30 分で回収した蛋白を用いて、MAPK (ERK, JNK, p38), STAT3 の発現量、およびそれらのリン酸化の割合について調査を行った。

ELISA

CTS 後 12, 24 時間で回収した培養上清内における IL-1 β , IL-6, TNF- α の発現について、ELISA 法で調査を行った。

【結果】

CTS による遺伝子発現に対する tofacitinib の効果

CTS によって COL2A1, aggrecan の発現は減少したが、tofacitinib 添加群では減少を認めなかった。また、RUNX-2 の発現は CTS 後1時間、ADAMTS4, MMP13 の発現は 24 時間で有意に増加、ADAMTS5 は 1,12 時間で二峰性に有意な増加を認めたが、いずれも tofacitinib 添加群で有意に抑制された。

CTS による RUNX-2, NF- κ B の核内移行に対する tofacitinib の効果

CTS により、軟骨細胞内での RUNX-2, NF- κ B の核内移行の有意な増加を認めたが、tofacitinib 添加によって、いずれも有意に抑制された。

CTS による MAPK, JAK/STAT 経路の活性化に対する tofacitinib の効果

CTS によって、MAPK (ERK, JNK, p38), STAT3 のリン酸化の割合は有意に増加したが、tofacitinib によって、いずれも有意に抑制された。

CTS によるサイトカイン発現に対する tofacitinib の効果

CTS により、培養上清後の IL-1 β , IL-6 の濃度は経時的に上昇を認め、tofacitinib 添加群では、IL-6 の濃度上昇は有意に抑制されたが、IL-1 β については有意な影響は認めなかった。また、TNF- α の濃度は測定下限以下であった。

【考察】

関節軟骨は、活動性の RA では滑膜から産生される前炎症性サイトカインおよびマトリックスプロテアーゼに曝露される。一旦軟骨の変性が始まると、滑膜炎が DMARDs によって治療されても、メカニカルストレスによって軟骨の損傷は進行する。特に荷重を受ける大関節においては、Larsen grade III 以上の変形を伴う場合には、生物学的製剤などで治療を行っても関節破壊は進行してしまうため、軟骨損傷を来す前に早期診断、早期治療を行うことが重要となる。本研究では正常軟骨細胞を用いて、正常あるいはあまり損傷を受けていない軟骨に対するメカニカルストレスに対する JAK 阻害剤; tofacitinib の効果を確認した。

JAK は、様々なサイトカインの細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たす。Tofacitinib は、RA 治療に承認された経口薬であり、JAK1-3 を阻害する。滑膜炎に対する抗炎症効果は *in vitro* および臨床成績において証明されているが、軟骨細胞代謝に対するその直接的な影響は不明である。

メカニカルストレスの伝達における、JAK/STAT 経路の関与は、軟骨細胞ではあまり報告されていないが、本研究では、メカニカルストレスによって JAK/STAT3 経路が活性化されることが示された。さらに、tofacitinib はメカニカルストレスによる JAK が関与するシグナル伝達の少なくとも一部を阻害することで、ADAMTS-4, ADAMTS-5、および MMP-13 の遺伝子発現を阻害し、II 型コラーゲンやアグリカンの減少を抑制することが示された。これらの結果より、メカニカルストレス下における軟骨細胞代謝において、JAK-STAT3 経路を阻害することで有益な影

響が得られることが示唆された。また、**tofacitinib** による **JAK** 阻害が、軟骨細胞による老化に関連する蛋白分解酵素発現を抑制することで、変形性関節症の疾患修飾薬開発にとっても有用な情報となることが推測された。

メカニカルストレスによって活性化された転写因子; **NF-κB** がいくつかのサイトカインおよびマトリックス分解酵素の発現を調節することが報告されている。さらに、**ERK**、**JNK**、および **p38** を含む **MAPK** 経路は、様々な外部刺激によって調節されることが知られている。我々は、ヒト軟骨細胞への **CTS** によって、**MAPK** の活性化を介した **NF-κB** および **RUNX-2** の核内移行が誘導され、**ADAMTS-4**、**ADAMTS-5**、**MMP-13** などの発現を誘発することを以前に報告しており、今回の *in vitro* 研究では、**tofacitinib** が、少なくとも部分的に **NF-κB** および **RUNX-2** のメカニカルストレスによる核内移行や活性化を阻害することによって、蛋白分解酵素発現を阻害することが示された。

JAK-STAT 経路および **STAT** シグナル伝達は、軟骨細胞および軟骨細胞様細胞において活性化され、**IL-1β**、**オンコスタチン M**、**IL-7**、**IL-6** などのサイトカインを介して **MMP** 発現を誘導することが報告されている。また、我々は **CTS** 後 12 時間で、ヒト軟骨細胞による **IL-1β** 産生が誘導されることを以前に報告している。本研究では、**CTS** 後の上清中の **IL-1β** の濃度は **CTS** 後 12 時間で増加しており、これは **ADAMTS-5** の二相性の発現に影響していると考えた。しかし、**tofacitinib** は **CTS** による **IL-1β** 産生に対しては有意な影響は示さなかった。また、軟骨細胞に対する剪断力負荷によって、**COX-2** および **PGE2** 産生の増加を介して、**IL-6** が増加することが報告されている。本研究では、上清中の **IL-6** の濃度は、**CTS** 後 24 時間で有意に増加し、**tofacitinib** 添加によって抑制された。従って、**tofacitinib** は、**IL-6** 濃度の上昇による **COX-2** および **PGE2** 産生を阻害する可能性が示唆され、**tofacitinib** は **IL-1β** を介した異化作用を直接には阻害しないが、メカニカルストレス後に惹起されるサイトカインループによる **NF-κB** 活性化の低下に寄与し得ると推測することができる。

【結論】

JAK は軟骨細胞におけるメカニカルストレス誘導シグナル伝達経路に関与している。我々の *in vitro* 研究により、**JAK** を介した **STAT** および **MAPK** 活性化を阻害することで、*in vitro* でのメカニカルストレスによるヒト軟骨細胞における蛋白分解酵素の発現を抑制し得ることが示された。