

椎間板変性における IL-17 の役割の解析と新規 IL-17 阻害剤の探索

Effects of IL-17A on intervertebral disc degeneration and the investigation of the new small-molecule IL-17A inhibitor for treating degenerative discs

酒井 大輔^{1,3)}, 隅山 香織^{2,3)}, 平山 令明³⁾

¹⁾東海大学医学部外科学系整形外科学, ²⁾東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学, ³⁾東海大学先進生命科学研究所

Daisuke Sakai^{1,3)}, Kaori Suyama^{2,3)}, Noriaki Hirayama³⁾

¹⁾Division of Orthopaedic Surgery School of Medicine Tokai University

²⁾Division of Cellular Biology and Anatomy School of Medicine Tokai University

³⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

インターロイキン 17 (IL-17) family の一つである IL-17A は、受容体となる IL-17RA/IL-17RC 二量体に結合し、これらの下流シグナル因子を活性化し、多様な炎症反応に関与するとされる。近年、IL-17A は変性椎間板でも増加し、椎間板変性にも関与している可能性が報告されるようになった。本研究では椎間板髄核細胞における IL-17A の作用を解析し、さらに *in Silico* 解析を用いて新規 IL-17A 阻害剤候補化合物を探索し、その効果を評価した。椎間板髄核細胞において IL-17A は、IL-6、COX2、MMP-3、-13 のような椎間板細胞の変性進行や疼痛の原因物質の産生を促進し、その一部の反応には MAPK 経路が関与している可能性が示された。また、IL-17A は細胞外基質産生を抑制している可能性も認められた。今回、我々が選出した低分子 IL-17A 阻害剤候補化合物はこれらの因子の発現を有意に抑制し、細胞外基質産生を改善したため、新たな椎間板変性治療薬と成り得る可能性が示された。

[Abstract]

Interleukin-17A (IL-17) is a member of the IL-17 cytokine family, which activates many intracellular signaling factors and mediates the induction of some inflammatory cytokines and chemokines. Recently, it was reported that IL-17A levels increase in cells of the degenerative and herniated discs. We evaluated the effects of IL-17A on nucleus pulposus (NP) cells and pharmacotherapeutic potential of the new small-molecule inhibitors that block IL-17A receptor binding. We analyzed the spatial structure of the protein-protein interactions between IL-17A and IL-17A receptor (IL-17RA), and identified four small-molecule inhibitors that accessed the IL-17A-binding site of IL-17RA, as determined by *in silico* analysis of numerous drug molecules used clinically in Japan. Rat NP cells were evaluated upon culturing with 50 ng/mL IL-17A and 50 µg/mL IL-17A inhibitors under 1% oxygen. Expression levels of IL-6, COX2, matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-13 mRNAs and the expression of IL-6 and COX2 proteins significantly increased after treatment with IL-17A for 24 h, though the inhibitor of IL-17A significantly reduced their expressions. The IL-17A inhibitor decreased p38 phosphorylation in NP cells by stimulating IL-17A compared to that in cells treated with IL-17A alone. Further, IL-17A significantly decreased the extracellular matrix (ECM) of NP cells on day 8; however, IL-17A inhibitor treatment significantly suppressed the degradation of ECM compared to that in cells treated with IL-17A alone. Our result showed that IL-17A regulated the factors which mediate disc degeneration. Also, these results showed that the small-molecule inhibitor of IL-17A could be useful for pharmacotherapy of intervertebral disc disease.

[Key Words]

intervertebral disc, Interleukin 17, small-molecule inhibitor

1. はじめに

腰痛は患者の Quality of life (QOL) を下げるのみなら

ず社会生産性を低下させ医療費増加にも深く関与する。本邦における腰痛の生涯有病率は約 83%¹⁾とされ、厚

生労働省による業務上疾病発生状況等調査（休業4日以上）では腰痛の件数が最も高い。

腰痛の要因として重要となるのが椎間板の変性である。脊椎の椎間板は脊椎椎体の間に存在し、中心部の髄核とこれを取り巻く線維輪から成る無血管の器官であり、衝撃を吸収し脊椎可動性を保持する役割を有する。加齢や物理的外力等の様々なストレスに曝された椎間板組織では、IL-1 β 、IL-6、TNF α を中心としたサイトカインが上昇して様々な細胞内シグナル経路を活性化することにより変性を進行させ、椎間板ヘルニア、変形性腰椎症等の腰痛を伴う疾患を惹き起こす²。さらに近年、IL-17も変性椎間板で増加するサイトカインとして新たに注目されるようになった³。IL-17はA~Fの6つのfamilyを有し、このうちIL-17AはMAP-キナーゼ経路やNF- κ B等を活性化して多様な炎症反応に関与していると報告されている⁴。

現在、IL-17阻害薬として臨床現場で実際に使用されている薬剤は、いずれも2015年以降に認可された新しい抗体製剤（生物学的製剤）である。これら生物学的製剤の問題点としては、高分子タンパク質製剤であることから投与方法が血管内への注射に限定され経口薬や外用薬としての使用が困難であること、また、製造コストが高いことから医療費が高額になることが挙げられている。さらに、生物学的製剤による重篤な副作用としては免疫作用低下による日和見感染がしばしば問題となっている。

そこで本研究は、①椎間板髄核細胞におけるIL-17Aの作用を解析し、椎間板疾患においてIL-17Aが治療標的と成り得るかについて評価する、②既存の薬剤の問題点を克服した新規低分子IL-17A阻害剤の効果を評価し、変性椎間板の治療薬としての可能性を検討する、以上の2点を目的として行った。

2. 結果の概要

①椎間板髄核細胞におけるIL-17Aの作用の解析

ラット椎間板より採取した髄核細胞（NP細胞）を生体内における椎間板の環境と近似した1%の低酸素条件下で培養し、IL-17Aの作用、及び、IL-17A活性を抑制した場合の反応を解析した。NP細胞にIL-17Aを50ng/ml投与して24時間培養し、サイトカインや細胞内シグナル因子の発現を、リアルタイムPCR、ウェスタンブロット法、プロモーターアッセイ法で評価した。IL-17A活性抑制実験では、抗IL-17A中和抗体をIL-17Aと共に投与して評価した。

また、手術時に採取したヒト椎間板髄核組織を用い

てIL-17Aの免疫組織染色を行った。

IL-17A刺激により、IL-6、COX-2、MMP-3、MMP-13のmRNA発現が無処置群と比較して有意に増加し、IL-6とCOX-2のタンパク質発現も無処置群より有意に増加した(n=4, p<0.05)。また、IL-17AによってmRNAの著明な増加を呈したIL-6をNP細胞に50ng/ml投与して同様の条件で培養すると、24時間後のCOX-2、MMP3、MMP13のmRNA発現は無処置群と比較して有意に増加した(n=4, p<0.05)。

次に、抗IL-17A中和抗体0.5 μ g/mlとIL-17A 50ng/mlを共に投与すると、24時間後のIL-6、COX-2、MMP-3、MMP-13のmRNA発現がIL-17A単独投与と比較して有意に抑制される現象を認めた(n=4, p<0.05)。

同様に、IL-17A投与群におけるCOX-2の転写活性は無処置群と比較して有意に増強し、IL-17A中和抗体投与条件下では、IL-17A投与群と比較して有意に抑制された(n=3, p<0.05)。

また、ヒト変性椎間板から採取した組織の評価では、術前のMRI画像診断においてPfirrmann分類grade3以上の髄核組織でのIL-17A染色陽性髄核細胞が、grade1,2の髄核組織と比較して有意に増加していることを確認した(n=5, p<0.05)。

②新規低分子IL-17A阻害剤候補化合物の作用評価

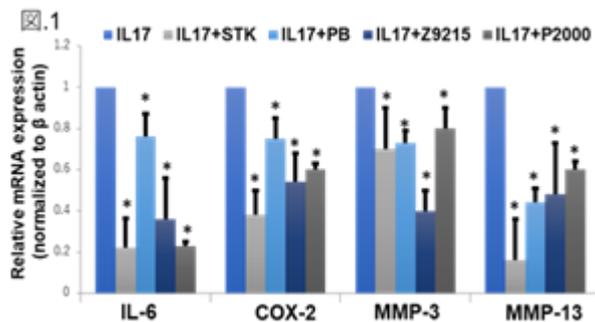
#②-1. In Silico解析を用いた新規低分子IL-17A阻害剤の探索

IL-17Aタンパク質の立体構造をX線解析して、その受容体結合部分に結合可能な化合物の立体構造を予測し、さらにその予測された構造の結合シミュレーションをコンピューター上で行なった。これらにより得られた情報を用いてIL-17A結合阻害剤として適した化合物、すなわち候補化合物を医薬品低分子化合物データベースの中から探索し、4種類の低分子化合物；STK630921 (STK), PB203263256 (PB), Z92151850 (Z9251), P2000N-53454 (P2000)をIL-17A結合阻害剤候補化合物として評価した。

#②-2. 新規IL-17A阻害剤によるIL-6, COX2, MMP-3, MMP-13の発現抑制作用

上述したin silicoスクリーニングにより選出された4種類のIL-17A結合阻害剤候補化合物50 μ g/mlを、IL-17A50ng/mlと共にラットNP細胞に投与し評価した。その結果、前年度までの評価においてIL-17A投与24時間後に上昇したIL-6, COX-2, MMP-3、

MMP-13 の mRNA 発現が、これら4つの IL-17A 阻害剤により有意に抑制されることを確認した。(図 1. n=3~5,*p<0.05)。

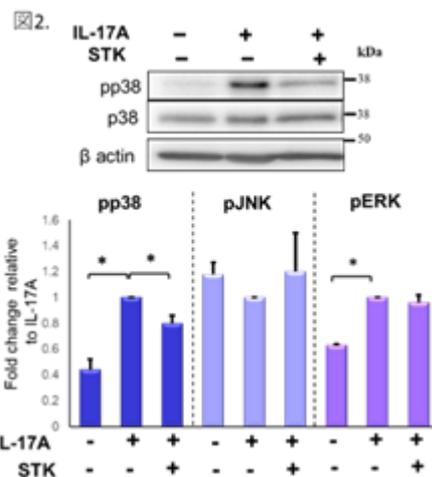


次に IL-17A 候補化合物の内、最も結合親和性の高い STK630921(STK)50μg/ml を IL-17A50ng/ml と共に NP 細胞に投与し、IL-17A 刺激による mRNA の発現が著明に増加した IL-6 と COX-2 のタンパク質発現を解析した。STK 投与により、24 時間培養後の IL-6 と COX-2 のタンパク質発現が IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制されることを確認した (n=3,p<0.05)。同様の条件下において、STK は COX-2 の転写活性を有意に抑制することも確認された (n=3,p<0.05)。

#②-3. 新規 IL-17A 阻害剤 STK630921(STK)の MAPK 活性の抑制作用

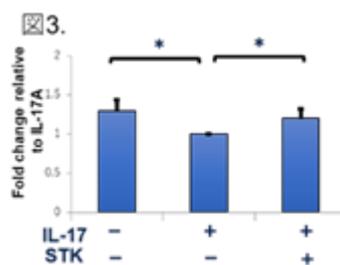
細胞内で IL-17A が関与する Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) シグナル経路に対する阻害剤の効果を評価した。50ng/ml の IL-17A と MAPK 因子 (p38, ERK, JNK)活性阻害剤 10 μM を投与して 24 時間培養した NP 細胞において、IL-6 は p38 と ERK の活性阻害剤投与下で、COX-2 はすべての活性阻害剤投与下で、mRNA 発現が IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制されたことから、IL-6 と COX-2 の発現には MAPK 経路が関与していることが確認された。

次に、STK50μg/ml を IL-17A50ng/ml と共に NP 細胞に投与した。投与 30 分後には、STK 投与群で IL-17A による p38 のリン酸化が有意に抑制された (図 2. n=3,*p<0.05)。従って、STK は p38 活性化を抑制することにより COX-2, IL-6 の発現を抑制している可能性が考えられた。



#②-4. 新規 IL-17A 阻害剤 STK630921(STK)の細胞外基質産生改善作用

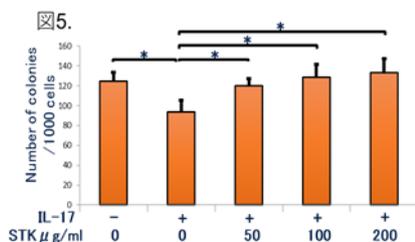
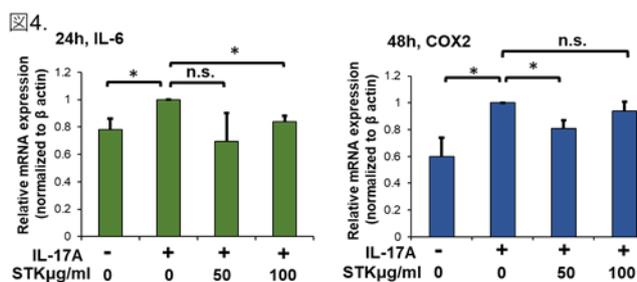
アルシアンブルー染色を用いて、細胞外基質の主体成分であるグリコサミノグリカン産生量を評価した。IL-17A50ng/ml 単独投与下で 8 日間培養した NP 細胞群では、グリコサミノグリカン産生が無処置群と比較して有意に減少したが、STK50μg/ml と IL-17A を共に投与した群では有意な改善を示した (図 3. n=3,*p<0.05)。



#②-5. ヒト椎間板髄核細胞に対する新規 IL-17A 阻害剤 STK630921(STK)の効果

ラット NP 細胞を用いた上記の実験結果を基に、ヒト椎間板髄核 (NP) 細胞に対する STK の効果を検討した。50ng/ml の IL-17A を投与したヒト NP 細胞において、IL-6 の mRNA 発現は STK100 μg/ml 投与から 24~48 時間後に、COX2 の mRNA 発現は STK100 μg/ml 投与 48 時間後に、それぞれ IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制された (図 4. n=4, *p<0.05)。

また、コロニーアッセイ法による細胞外基質産生能の評価では、培養 10 日後に、IL-17A50ng/ml 単独投与群と比較して STK50~200 μg/ml 投与群におけるコロニー形成能が有意に改善することを認めた (図 5. n=3,*p<0.05)。



3. 考察

IL-17A 刺激により発現が増加した因子は何れも椎間板変性の進行や疼痛の誘因に関与する可能性が度々報告されている。

IL-6 は椎間板髄核細胞自身からも分泌され、椎間板における細胞外基質の産生の抑制や炎症性メディエーターの発現の促進等⁵⁷、椎間板変性の進行やこれに伴う症状に対して重要な役割を果たしている。COX-2 は炎症反応や疼痛の原因物質の一つであり、COX-2 阻害剤は消炎鎮痛剤として既に臨床の現場で使用されている。MMP-3、MMP-13 は炎症性サイトカインにより発現が促進され、椎間板組織のマトリックスの変性を進行させる因子として知られている^{8,9}。

本研究の結果から、IL-17A は椎間板変性に関わる因子の発現や、疼痛の原因物質の産生を制御している可能性が示され、IL-17A は椎間板変性の有効な治療標的と成り得ると考えられた。

今回、我々が *in Silico* 解析を用いて選出した新規低分子 IL-17A 阻害剤候補化合物は、IL-17A に誘導される炎症反応因子や椎間板変性促進因子の発現を有意に抑制し、細胞外基質の減弱を有意に改善することが確認され、椎間板変性疾患に対する新たな治療薬と成り得る可能性が示唆された。

今後は、これまでの結果を基に、培養細胞による評価に加え動物モデルも用いて、化合物の作用や生体内における薬理動態、細胞・生体毒性等を評価し、必要に応じて化合物の構造の最適化を行い、新規 IL-17A 阻害剤としての開発と実用化を目指す予定である。

4. 引用文献

- [1] 松平ら, 日本職業・災害医学会誌. **63**, 329-336, (2015)
- [2] Risbud et al., *Nat Rev Rheumatol.*, **10**, 44-56 (2014)
- [3] Shamji, et al., *Arthritis Rheum.*, **62**, 1974-1982, (2010)
- [4] Gu et al., *Cytokine*, **64**, 477-485 (2013)
- [5] Rand et al., *Spine* **22**, 2598-2601, (1997)
- [6] Patel, K. P. et al., *Spine* **32**, 2596-2603, (2007)
- [7] Phillips, K. L. et al., *Arthritis research & therapy* **15**, R213, (2013)
- [8] Weiler et al., *Eur Spine J.*, **11**, 308-320 (2002)
- [9] Wang et al., *Am J Pathol.*, **184**, 2560-2572 (2014)

5. 業績

【論文発表】

Suyama, K. *et al.*, *J Cell Mol Med.* Nov; **22** :5539-5551 (2018).

【学会等発表】

- 1) 隅山香織、酒井大輔、平山令明、坂部貢、渡辺雅彦：椎間板変性に対する新規低分子化合物を用いた IL-17A 阻害療法の評価。第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会、2018.10. 奈良
- 2) Kaori Suyama, Daisuke Sakai, Noriaki Hirayama, Kou Sakabe, Masahiko Watanabe : The potential utility of interleukin-17A inhibitors for the intervertebral disc disease treatment. Orthopaedic Research Society 2019, February, Austin, TX.
- 3) 隅山香織、酒井大輔、平山令明、坂部貢、渡辺雅彦：新規低分子 IL-17A 阻害剤を用いた椎間板変性治療法の評価。第 32 回 日本軟骨代謝学会、2019.3. 大阪