

論文の全文要約

IL-1 β Enhances Wnt Signal by Inhibiting DKK1

(IL-1 β は DKK1 を抑制することにより

Wnt シグナルを活性化する)

Inflammation, 41(5):1945-1954,2018.

主指導教員：杉山 英二教授

(広島大学病院 リウマチ・膠原病科)

副指導教員：正木 崇生教授

(広島大学病院 腎臓内科)

副指導教員：今泉 和則教授

(医歯薬保健学研究科 分子細胞情報学)

吉田 雄介

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景と目的

自己炎症性疾患の一つであるクリオピリン関連周期熱症候群(Cryopyrin-associated periodic syndrome: CAPS)では、*NLRP3* 遺伝子がコードする蛋白質クリオピリン (Cryopyrin) の機能異常により、インフラマソーム (inflammasome) とプロカスペーゼ-1 (procaspase-1) の活性化による炎症性サイトカイン IL-1 β の過剰産生が病態に深く関わっている。その分子機序はヒト抗 IL-1 β モノクローナル抗体であるカナキヌマブが著効することからも臨床的に証明されたと言える。CAPS には3つの型があり、その中でも最重症型である慢性乳児神経皮膚関節症候群 (Chronic infantile neurologic cutaneous, and articular syndrome : CINCA 症候群) は、新生児期発症多臓器系炎症性疾患 (Neonatal onset multisystem inflammatory disease: NOMID) とも呼ばれ、皮疹、中枢神経系病変、関節症状を3主徴とする。これらの病態は生後間も無く発症し、生涯にわたり持続する。皮膚病変の病理学的特徴が IL-1 β によって制御されている好中球浸潤を特徴とする炎症性病態であるのに対して、関節病変は軟骨内骨化による骨過形成を特徴とする関節変形であり、IL-1 β による病態としては炎症背景がないことから、その詳細な機序は不明とされてきた。

NOMID / CINCA における関節病変の病理学的特徴は、別の遺伝性疾患である fibrous dysplasia に類似している。fibrous dysplasia は *GNAS* 遺伝子の機能獲得型突然変異によってもたらされるが、この変異は Wnt シグナルの異常な活性化を導くことが知られている。Wnt シグナルはこれと拮抗する分泌蛋白質 Dickkopf-1 (DKK1) と共に、骨芽細胞、軟骨細胞の分化を調整していることが示唆されている。

NOMID / CINCA における過剰な IL-1 β が、fibrous dysplasia の原因である Wnt シグナルの活性化をもたらすことで、これら2つの疾患が類似した病理学的表現形をもたらしていると仮定し、これを証明するために、本研究では IL-1 β の Wnt シグナルに対する効果を検討した。

方法と結果

最初に、関節滑膜組織の主たる構成細胞である線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLS) における *Wnt* mRNA と *DKK1* (Wnt antagonist) mRNA の発現を quantitative PCR で確認した。FLS は Articular Engineering より購入した関節リウマチ由来のものと autopsy cases から採取された変形性関節症(OA)、健常人由来のものを使用した。いずれの FLS も *WNT3A* 以外の canonical、non-canonical の *Wnt* mRNA を発現していた。また、いずれの FLS も Mesenchymal stem cell (MSC) と同程度に *DKK1* mRNA を発現していた。FLS と骨肉腫細胞株 U2OS 細胞からの DKK1 の産生を ELISA で測定すると、FLS は DKK1 を産生していた。しかし、U2OS 細胞では DKK1 の発現は極めて低く、ELISA では検出レベル以下であったため、後の T cell factor (TCF) レポーターアッセイ用の細胞として用いた。次に、FLS 上清が Wnt シグナルを活性化しているか抑制しているかを確認するためにルシフェ

ラーゼアッセイを施行した。U2OS 細胞に FLS 上清を加えると、リコンビナント Wnt3A (recWnt3A)、あるいは塩化リチウム (LiCl) による TCF レポーターの活性化が抑制された。LiCl は GSK-3 β のインヒビターであり、Wnt シグナルの強力に活性化させるため、recWnt3A のポジティブコントロールとして用いた。recWnt3A による TCF の活性化は FLS により濃度依存性に抑制された。

さらに、FLS 由来の DKK1 が Wnt シグナルを抑制するかを評価する目的で抗 DKK1 抗体を用いた。recWnt3A で誘導された TCF 活性が、FLS 上清により抑制され、この活性化は抗 DKK1 抗体により減弱した。したがって、FLS 由来の DKK1 が Wnt 活性を抑制していることが示唆された。

また、FLS において IL-1 β が WNT の発現や DKK1 の産生に与える影響を評価した。FLS ごとに個体差があったが、IL-1 β は *WNT2*、*WNT5A* の発現を有意に亢進させた。IL-6 は DKK1 の発現を抑制することが既に報告されているが、IL-1 β も DKK1 産生を抑制し、その効果は IL-6 より顕著であった。

最後に、TCF レポーターを用いて、IL-1 β が Wnt シグナルに与える影響を確認した。未処理の FLS の上清は TCF 活性を抑制したが、IL-1 β または IL-6 で培養した FLS では、この抑制効果が減弱した。その抑制効果の減弱は IL-6 より IL-1 β の方が顕著であった。

今回得られた結果から、FLS が DKK1 の産生を介して Wnt シグナルを抑制すること、そして IL-1 β は DKK1 を抑制し Wnt シグナルを活性化することが示された。

考察

骨形成において Wnt シグナルが重要であることは、Wnt 受容体の異常によって起こる疾患の存在によって明らかにされている。また、NOMID/CINCA の骨から採取された病変組織において、Wnt シグナルに関連した遺伝子の発現が亢進していることが報告されている。今回の結果を加味すると、NOMID/CINCA では過剰な IL-1 β が関節内の DKK1 産生を抑制し、Wnt シグナルを活性化することで軟骨や骨の形態異常が起こると考えられた。現在、IL-1 β の中和抗体 (カナキマブ) が NOMID/CINCA で使用可能であるが、カナキマブが使用できない例では DKK1 の投与がこの疾患の治療となる可能性もあると考えられた。この場合、外因性の DKK1 が全身に及ぼす影響についての評価が必要である。また、Wnt シグナル経路を NOMID/CINCA の骨病変の治療ターゲットとして良いかは更なる研究が必要である。