

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09536

研究課題名(和文) 関節リウマチ滑膜の上皮間葉移行の分子機構の解析と新規治療法への応用

研究課題名(英文) Molecular analysis aiming therapeutic application of epithelial-mesenchymal transition in rheumatoid arthritis synovium

研究代表者

田中 真生 (TANAKA, MASAO)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：10332719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチの自己抗原であるFSTL1の結合蛋白で機能未知のDIP2Aと、関節滑膜など組織の形質転換/上皮間葉転換(EMT)に関わるSNAI1との結合を実証した。次に米国GEOデータベースにある関節リウマチ、変形性関節症、健康人の滑膜マイクロアレイデータを解析した結果、3者で発現が有意に異なる遺伝子グループを9つ見出した。その中にDIP2AとSNAI1の側系遺伝子DIP2CとSNAI2が含まれていた。DIP2CとSNAI2は各々NFKB1とTGFB1と同じグループにありながら発現方向が逆であり挙動が似ていた。SNAI2はTGFB1で誘導されると考えられているため、滑膜での制御不全が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies revealed that FSTL1 is one of the autoantigens in rheumatoid arthritis and DIP2A is its binding partner. In this study, we demonstrated molecular interaction between DIP2A and SNAI1, which is involved in epithelial-mesenchymal transition. Next, we analyzed synovial gene expression microarray data in US NCBI GEO database, which were from 79 subjects of three groups comprising rheumatoid arthritis, osteoarthritis patients and healthy controls. As a result, we found 9 gene groups in each of which genes had closely-related expression and those group genes had significantly different expression among the three groups. They include DIP2C and SNAI2, which are paralogs of DIP2A and SNAI1. Though DIP2C and SNAI2 belonged to the same groups as NFKB1 and TGFB1, respectively, they had inverted expression to those same members and similar behavior. As this contradicts the fact that TGFB1 induces SNAI1/2, there may be some dysregulation in rheumatoid synovium.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：上皮間葉移行 関節滑膜細胞 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は関節の慢性炎症と破壊を特徴とする自己免疫疾患である。病変の主体は滑膜炎であり、RAの病態では基本的に関節滑膜の存在しない組織で炎症は生じない。滑膜は関節腔を包む単一細胞層で、滑液中へのヒアルロン酸の供給、関節腔内の老廃物除去および免疫反応の制御などを行っている。滑膜は形態的に上皮に似るが、密着結合(tight junction)や接着斑(desmosome)などを欠くため、間葉組織(mesenchymal tissue)と表現される。RAの滑膜では、その特異的な炎症によって滑膜細胞がある意味で形質転換を起こし増殖してパンヌスを形成、周囲の組織に浸潤する。Steenvoordenらは、この滑膜が過形成をきたす機転で上皮間葉移行(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)に相当する変化が起ると報告した。このEMT様変化を経て、異常に増殖したRA滑膜は、T細胞、B細胞、単球・マクロファージや顆粒球を引き寄せて炎症の環境を形成し、関節や骨を破壊する。この炎症の環境の成立を抑止できればRAの関節炎・関節破壊を抑えること可能と思われる。

研究代表者はRAの自己抗原の一つとしてホリスタチン関連タンパク(FRP/FSTL1)をクローニングして以来、その機能を解明するためFRPのリガンドとしてDIP2A(DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A)やCD14などを同定してきた。近年、FRPがEMTに関与する報告がなされている。だがそれらの分子レベルでの機序は未解明である。一方、EMTを促進する転写因子SNAIL1はDMAP結合ドメインを有する蛋白分子と結合することが知られている。上述のDIP2Aは機能不明だが、N末端にDMAP結合ドメインをもつことから、SNAIL1と結合する可能性が考えられた(図1)。そこで研究代表者は、RA滑膜EMT様変化の分子制御機構を解明するため、DIP2AとSNAIL1を中心に解析する着想を得た。

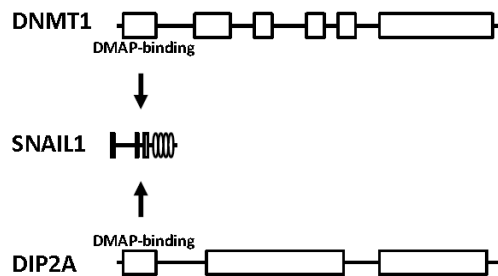


図1 DMAP結合ドメインを介したDNMT1およびDIP2AのSNAIL1との結合

2. 研究の目的

RA滑膜のEMT様変化の分子制御機構を解析し、RAの病態形成機序を解明する。そして関節リウマチの新規治療ターゲットに

つなげる。

3. 研究の方法

(1) プルダウンアッセイによるDIP2AとSNAIL1の結合解析 - DMAP結合ドメインを含むDIP2AのN末端99アミノ酸残基からなるN末GSTタグ付きリコンビナント蛋白を使用した(GST-DIP2A-N99, Abnova社)。一方SNAIL1はC末Mycタグ付きリコンビナント蛋白を使用した(SNAIL1-Myc, ORIGENE社)。これら2分子の混合液に、非特異的結合の少ないグルタチオンシリカビーズ(Bioclone社)を添加しGSTタグ部分を結合させた後に洗浄、ビーズとの結合物を溶出し抗Myc抗体でイムノプロットを行った。対照としてGST(Sigma社)を使用した。

(2) 滑膜でのDIP2A, SNAIL1および関連遺伝子の発現解析 - 米国NCBI GEOデータベース登録の関節リウマチ患者(RA), 変形性関節症患者(OA), 健常人(HC)の滑膜組織マイクロアレイデータをダウンロードし、加重型遺伝子共発現網解析(Weighted Gene Co-expression Network Analysis, WGCNA)を行った。個々の遺伝子発現は、RA, OA, HC滑膜total RNA(Cell Applications社)を用いたqPCRで評価した。

4. 研究成果

(1) SNAIL-MycはGST-DIP2A-N99の共存時にグルタチオンシリカビーズで沈降し、コントロールのGSTの共存時では沈降しなかった。従ってSNAIL1とDIP2Aの結合が確認された(図2)。

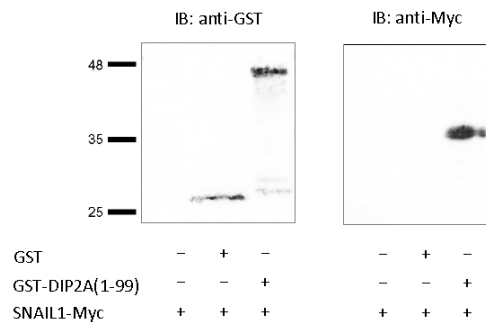


図2 SNAIL(SNAIL1-Myc)はDIP2A(GST-DIP2A-N99)と結合活性をもつ

(2) RA, OA, HCの計79例のデータでWGCNAを行った結果、3者で発現変化が有意に異なる遺伝子グループを9つ見出した(black, brown, darkred, midnightblue, royalblue, saddlebrown, sienna3, steelblue, yellow)(図3)。その中にDIP2AおよびSNAIL1の側系遺伝子(相同遺伝子)であるDIP2C(darkred)およびSNAIL2(yellow)が含まれ、関節リウマチ滑膜ではDIP2Cと

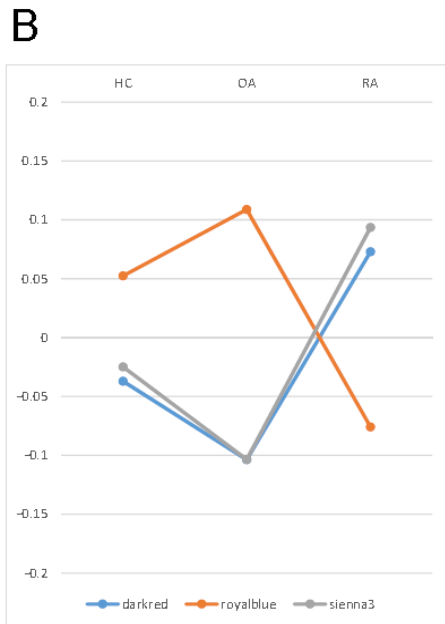
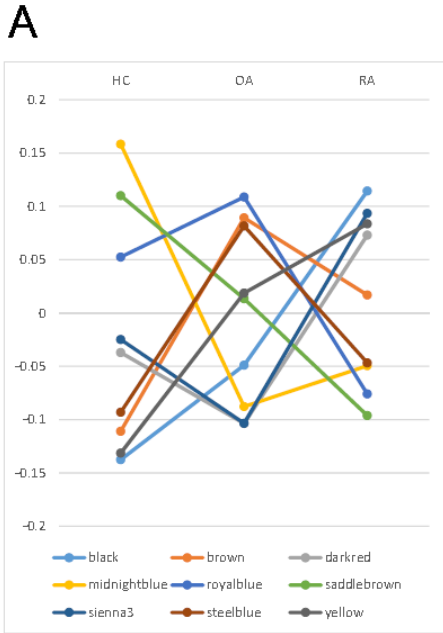


図3 HC, OA, RAの3群間でいずれも有意差のあるMEgene ($p < 0.05$) (A). Aのうち (RA-HC) \times (OA-HC) が負のもの, HCを基準にRAとOAで対極的に変動するMEgene. (グラフの色が名称と異なっていることに注意)

SNAI2の相互作用が重要であることが示唆された.

DIP2CとSNAI2は挙動が似ていた. すなわちNFKB1とICAM1はDIP2Cと同じdarkredに属し, 互いに逆向きに変動していた. 一方, TGFB1とMMP3はSNAI2と同じyellowに属し, これも互いに逆向きに変動していた(図4). しかしRAとOAとはHCを基準に同じ向きに変動していた(図3).

qPCRではマイクロアレイデータと同様にDIP2C, SNAI2が他の側系遺伝子よりも多

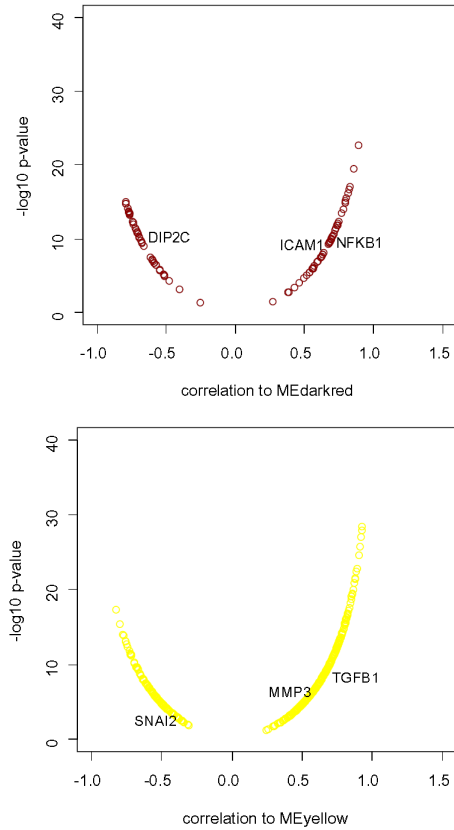


図4 MEdarkred (darkredのeigen gene) とのcorrelationを示すvolcano plot(上の図). MEyellowとのcorrelationを示すvolcano plot(下の図).

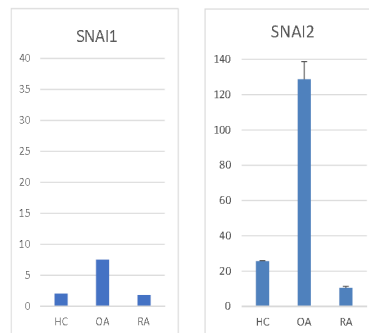
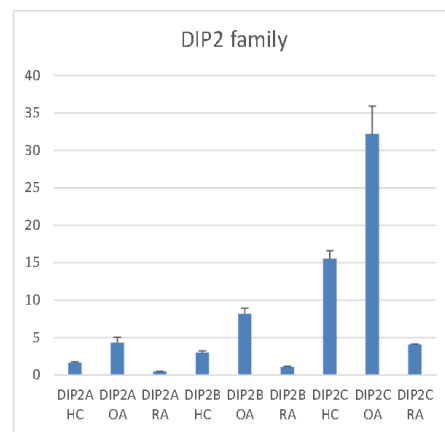


図5 DIP2, SNAI family 遺伝子の滑膜発現 1AU: expression ratio to 18S rRNA $\times 10^{-5}$

く発現していた(図5)。
尚, DIP2C と SNAIL2 との結合活性は現在解析準備中である。TGFB1 は SNAIL1/2 を誘導し, EMT を促進するものと考えられているが, RA 滑膜で SNAIL1/2 はむしろ抑制されており, 何らかの制御不全があるのかもしれない。他の EMT 誘導系実験を対照に今後さらに解析を進める予定である。

<引用文献>

M. Steenvoorden et al., Arthritis Research & Therapy 8, R165 (2006).

M. Tanaka et al., FEBS J 277, 4278-4289 (2010).

K. Murakami and M. Tanaka et al., FEBS letts 586, 319-324 (2012).

S. Liu et al., Exp Mol Pathol 80, 132-140 (2006).

Q. Chan et al., Carcinogenesis 30, 114-121 (2009).

W. Zhao et al., Int J Biochem Cell Biol 43, 1459-1468 (2011).

C. Kudo-Saito et al., Cancer Res 73, 6185-6193 (2013).

J. Espada et al., Nucleic Acids Res 39, 9194-9205 (2011).

H. Peinado et al. J Biol Chem 278, 21113-21123(2003)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 真生 (TANAKA, Masao)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号: 1 0 3 2 2 7 1 9

(2)研究分担者

山本 靖彦 (YAMAMOTO, Yasuhiko)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 2 0 3 1 3 6 3 7

杉本 直俊 (SUGIMOTO, Naotoshi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 8 0 2 7 2 9 5 4

(3)連携研究者

清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 8 0 3 0 0 9 2 9

(4)研究協力者

なし