

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16134

研究課題名(和文) 滑膜線維芽細胞特異的オートファジーの制御を介した関節リウマチの新規治療法開発

研究課題名(英文) Novel Therapeutic Approach to Rheumatoid Arthritis through Regulation of Autophagy in Synovial Fibroblasts

研究代表者

加藤 将 (Kato, Masaru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10755896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、滑膜線維芽細胞においてオートファジーレセプターの1つであるオプチニューリンがTNF、IL-1 β またはIFN γ の存在下で発現上昇すること、オプチニューリンがRANKLの発現を抑制していること、滑膜線維芽細胞においてオプチニューリンをノックダウンすることによって共培養した単球の破骨細胞への分化が抑制されることが示された。これらの結果は、オプチニューリンが関節破壊を抑制する上での新たな関節リウマチの治療標的となる可能性を示唆し、関節リウマチの治療戦略、特に関節破壊の抑制における新たな知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの治療における最も重要な要素は関節破壊の抑制である。オプチニューリンが滑膜線維芽細胞においてRANKLの発現を抑制しているという今回の研究成果に加え、滑膜線維芽細胞の発現するRANKLが関節破壊に特に寄与していること(Danks L, et al. Ann Rheum Dis 2016)、オプチニューリンが単球系細胞においても破骨細胞の分化を抑制していること(Obaid R, et al. Cell Rep 2015)が報告されており、これらの知見は関節破壊を抑制する上での新たな治療戦略の基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study has clarified that (1) optineurin, one of the autophagy receptors, is increased on synovial fibroblasts upon stimulation with TNF- α , IL-1 β , or IFN- γ , (2) optineurin negatively regulates RANKL, (3) downregulation of optineurin in synovial fibroblasts suppresses the differentiation of cocultured monocytes into osteoclasts. These results are novel findings in the therapeutic approach to rheumatoid arthritis, particularly in the inhibition of joint destruction, and suggest optineurin as a novel therapeutic target in the treatment of rheumatoid arthritis.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 オートファジー 関節破壊

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TNF 阻害薬をはじめとする生物学的製剤の登場により RA の治療は近年劇的な進歩をとげた。しかしながら、依然として治療抵抗群が存在し、また、生物学的製剤が高価なこともあり生物学的製剤の休薬“バイオフリー”のニーズは高く、RA の病因、病態解明、さらには新たなアプローチによる RA の治療が現在求められている。

RA の病理は、増殖性滑膜炎、シトルリン化タンパク質に対する自己免疫、関節破壊、の3つにおおよそ要約できるが、SF は高い増殖能を有し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼや破骨細胞の分化を誘導する RANKL を産生することから RA の病態形成において中心的役割を担っていると考えられる。我々はこれまでに、RA の SF では、変形性関節症のそれと比較し、オートファジー活性が高いこと、オートファジーが SF の細胞死に関与することを報告した (Kato M, et al. Arthritis Rheumatol 2014)。我々はまた、SF が MHC class II および B7 を発現し、オートファジーの誘導により SF において RA の特異的自己抗原であるシトルリン化ピメンチンが増加することも報告した (論文未発表、学会発表済)。さらに、破骨細胞の分化がオートファジーによって促進することが報告されている (Lin NY, et al. Ann Rheum Dis 2013)。以上の背景から、オートファジーが、RA の病理である、増殖性滑膜炎、シトルリン化タンパク質に対する自己免疫、関節破壊、すべてに関与し、RA の新規治療標的となる可能性を考えた。

オートファジーを標的とした治療戦略を考える上で問題となってくるのが、臓器あるいは細胞の特異性である。オートファジーは飢餓適応を主な役割とした細胞内タンパク質分解システムであり、ほぼすべての細胞に認められる。よって、単純にオートファジーを促進あるいは抑制する治療は多くの有害事象が懸念される。そこで、これらの問題を解決するため、今回、オートファジーレセプターに着目した。オートファジーレセプター(ユビキチン結合型)は分解基質のタグとして機能するユビキチン、オートファジー隔離膜の構成成分である LC3、双方に結合し、オートファジーによる基質分解を補助する役割を持つ。これまでに、p62、NBR1、OPTN、NDP52、TAX1BP1、TOLLIP と 6 種類のユビキチン結合型オートファジーレセプターが同定されている。我々はすでに、その中の 1 つ、p62 の発現が TNF α の刺激により SF において強く上昇することを見出した (論文未発表、学会発表済)。

これらの結果から、炎症性サイトカイン、とりわけ TNF α の刺激により SF で誘導されるオートファジーレセプターは SF のオートファジーを特異的に制御する標的となる可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は、RA の病態形成において中心的役割を担っている SF のオートファジーを特異的に制御する方法を開発すること、および、RA の新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) **滑膜線維芽細胞の分離、培養**: 当該施設の倫理委員会の承認 (臨床研究番号 008-0103) ならびに文書による手術検体提供者の同意を得た上で、RA または変形性関節症に対する人工膝関節置換術の際に得られた検体より SF を分離、培養した。4~8 継代の細胞を実験に用いた。
- (2) **炎症性サイトカイン刺激とオートファジーレセプター発現**: TNF α などの炎症性サイトカインは RA の病態に深くかかわるため、炎症性サイトカインによる刺激がオートファジーレセプターの発現に与える影響を検討した。SF を TNF α 、IL-6、IL-1 β で刺激した後、cDNA 溶液、タンパク質溶液を作製し、オートファジーレセプターの発現を real-time PCR、ウェスタンブロットにより解析した。
- (3) **オートファジーレセプターのノックダウンと RANKL 発現**: SF の発現する RANKL は、関節局所における破骨細胞の分化促進を介し、RA の関節破壊にかかわるため、オートファジーレセプターが RANKL 発現に与える影響を検討した。siRNA を用いてオートファジーレセプターをノックダウンした SF の培養上清、細胞表面、mRNA における RANKL の発現を、それぞれ ELISA、フローサイトメトリー、real-time PCR により解析した。

4. 研究成果

SF を TNF α または IL-1 β で刺激したところ、オートファジーレセプターのうち、p62、OPTN、TAX1BP1 の発現上昇が認められた。これら 3 つのオートファジーレセプターのうち、OPTN (オプチニューリン) は NF- κ B の調節因子であることが報告されていることから、その後の実験においては SF における OPTN の機能に着目した。siRNA を用いて SF において OPTN をノックダウンしたところ、TNF- α によって誘導される細胞表面の RANKL の発現亢進がフローサイトメトリー法により確認された (図 1)。また、OPTN をノックダウンした SF では TNF- α によって誘導される I κ B α の分解、NF- κ B の核内移行が亢進していた。

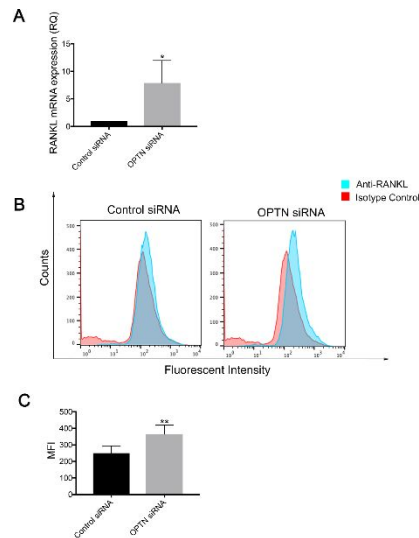


図 1 . OPTN は SF において RANKL の発現を負に調節する。

OPTN が RA の関節破壊において果たす役割をさらに検討するため、健康人血液より CD14 陽性単球を分離し、OPTN をノックダウンした SF またはコントロール siRNA を移入した SF と共培養した。OPTN をノックダウンした SF と共培養した単球は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ陽性の多核の細胞に分化していた。この細胞はリコンビナント RANKL との共培養でも認められることから、破骨細胞であると考えられた (図 2)。

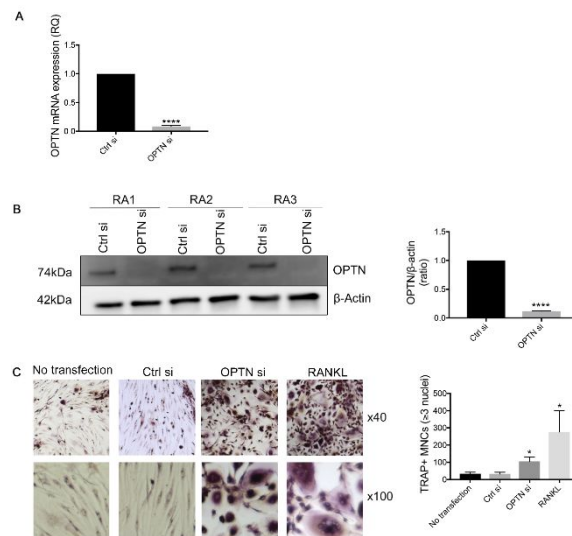


図 2 . SF の OPTN は共培養した単球の破骨細胞への分化を抑制する。

一方、OPTN のノックダウンは内因性の破骨細胞分化抑制因子で RANKL のデコイ受容体として働くオステオプロテグリンの発現には影響を与えなかった。さらに、OPTN をノックダウンした SF では軟骨破壊に寄与する MMP-3 の発現が亢進し、一方、関節、骨を保護する役割を持つ GATA3、CHST15、HAS1 の発現は低下していた。これらの結果より、OPTN は RANKL の発現、破骨細胞の分化のみならず MMP-3、GATA3、CHST15、HAS1 といった様々な分子を介して多面的に RA における関節破壊を抑制する役割を有すると考えられ、OPTN が関節破壊を制御する上での新たな RA の治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato M	4. 巻 -
2. 論文標題 New insights into IFN- in rheumatoid arthritis: role in the era of JAK inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2020.1751908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugawara Eri, Kato Masaru, Kudo Yuki, Lee Wenshi, Hisada Ryo, Fujieda Yuichiro, Oku Kenji, Bohgaki Toshiyuki, Amengual Olga, Yasuda Shinsuke, Onodera Tomohiro, Hatakeyama Shigetsugu, Atsumi Tatsuya	4. 巻 16
2. 論文標題 Autophagy promotes citrullination of VIM (vimentin) and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 946 ~ 955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2019.1664144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sugawara E, Kato M, Kudo Y, Lee W, Fujieda Y, Bohgaki T, Amengual O, Oku K, Yasuda S, Atsumi T
2. 発表標題 Autophagy promotes citrullination of vimentin and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts
3. 学会等名 The 82nd American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugawara E, Kato M, Kudo Y, Lee W, Kono M, Fujieda Y, Bohgaki T, Amengual O, Oku K, Yasuda S, Atsumi T
2. 発表標題 Autophagy promotes citrullination of vimentin and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts
3. 学会等名 The 63rd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee W, Kato M, Sugawara E, Kono M, Hisada R, Kudo Y, Kono M, Fujieda Y, Bohgaki T, Amengual O, Oku K, Yasuda S, Atsumi T
2. 発表標題 The autophagy receptor optineurin negatively regulates RANKL expression in synovial fibroblasts derived from patients with rheumatoid arthritis
3. 学会等名 The 63rd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee W, Kato M, Sugawara E, Kono M, Kudo Y, Kono M, Fujieda Y, Bohgaki T, Amengual O, Oku K, Yasuda S, Atsumi T
2. 発表標題 Autophagy receptor optineurin in synovial fibroblasts plays a protective role against joint destruction in rheumatoid arthritis
3. 学会等名 The 83rd American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	リー ウェンシー (Lee Wen Shi)		