

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591749

研究課題名 (和文) I κ B β 2 を標的とした関節リウマチ滑膜炎の治療戦略に関する研究研究課題名 (英文) Strategies for treatment of rheumatoid synovitis on the focus of I κ B β 2 expression.

研究代表者

平野 史倫 (HIRANO FUMINORI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60250552

研究成果の概要 (和文)：関節リウマチ (RA) は、持続的な関節滑膜炎の炎症によって軟骨破壊・骨破壊から関節変形をきたす難治性自己免疫疾患である。そこで、本研究において、その原因物質の一つと考えられている NF- κ B を抑制できる I κ B β 2 蛋白の発現異常を明らかにし、I κ B β 2 蛋白の発現異常はその産生経路に異常があるためであることを解明した。特に、I κ B β 2 蛋白の産生異常は主として遺伝子から RNA が産生されたあとの RNA に結合する蛋白やマイクロ RNA と呼ばれる物質の発現異常であることを明らかにした。今後この研究成果によって、従来ないタイプの新しい RA 治療が開発される可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease to cause joint and cartilage destructions by the inflammation of a sustained synovium. NF- κ B is a transcription factor and plays a pivotal role in regulating synovitis in RA. In unstimulated cells, NF- κ B binds to inhibitory molecules I κ Bs and exists in cytoplasm. Especially, I κ B β 2 has the strongest inhibitory effect against NF- κ B activation in I κ Bs. Therefore, in this study, we found abnormal expression of the I κ B β 2 protein which could restrain NF- κ B and elucidated that the abnormal expression of the I κ B β 2 protein was due to produce RNA-binding protein and microRNA expression. The new RA treatment of the few type may be developed conventionally in future by these results of research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：リウマチ病学、関節リウマチ、滑膜炎、転写因子、NF- κ B、

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患であり、持続的な滑膜炎によって軟骨破壊・骨破壊から関節変形をきたす難治性疾患である。滑膜炎は滑膜細胞増殖と炎症性細胞浸潤・血管新生などを特徴とし、tumor necrosis factor (TNF)- α など炎症性サイトカインによって惹起されていることが報告されている。近年、TNF- α をターゲットにした抗 TNF- α 抗体あるいは可溶性 TNF- α 受容体を用いた生物学的治療が RA の制圧に向けて使用され有効性が示されているものの、寛解率は約 60%程度であり「制圧された」と言えるまでには至っていない。

この TNF- α による細胞内情報伝達系の中で重要な転写因子として NF- κ B が言われている。実際、滑膜細胞において TNF- α によって活性化された NF- κ B は、(1) TNF- α 遺伝子自身の転写活性化 (TNF- α \rightarrow NF- κ B \rightarrow TNF- α : 炎症の悪循環の完成)、(2) 炎症に関与する他のサイトカインや接着分子の活性化、(3) 細胞増殖の誘導—cell cycle の活性化と抗アポトーシス作用、などの作用を介して滑膜炎を増悪させることが知られている。一方、研究者は一貫して NF- κ B 活性化機構の解明に取り組み、I κ B ファミリーの一つである I κ B β には 2 種類の splicing variant form (I κ B β 1, I κ B β 2) が存在し、I κ B β 2 は I κ B α の非分解性人工変異体と同じ NF- κ B 不活化作用を有することを報告してきた (F.Hirano et al, Mol Cell Biol 18: 2596-607, 1998)。また、研究者はこの I κ B β 2 が NF- κ B の抑制分子であるとともに、転写因子の co-factor としての役割も担っていることを明らかにした (F.Hirano et al, Mol Cell Biol 18: 2596-607, 1998)。つまり、I κ B β 2 は co-repressor 機能としても NF- κ B の活性化を抑制していることが推測さ

れている。

2. 研究の目的

本研究は、(1) I κ B β 2 の細胞内特性と安定性および RNA 結合蛋白同定、(2) I κ B β 2 の細胞内機能解析と in vivo 実験による臨床応用の検討、(3) I κ B β 2 による転写因子活性化制御機構の検討、を推進することによって RA 患者滑膜炎における NF- κ B 活性化機序を I κ B β 2 の発現機構の観点から明らかにし、RA 滑膜炎の病態を解明するとともに新規治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各疾患における I κ B ファミリーの細胞内特性の検討。

健常者・OA および RA 滑膜細胞において、³⁵S-methionine を用いて細胞内蛋白をラベル後、経時的に細胞抽出液を採取し抗 I κ B α 抗体/抗 I κ B β 1 抗体/抗 I κ B β 2 抗体による免疫沈降法で解析する。さらに、I κ B β 2 mRNA の安定性に与える 3'-非翻訳領域の影響を解析するため、内因性に発現していない luciferase 遺伝子に 3'-非翻訳領域を結合させた発現プラスミドを作成し細胞内に導入発現後、TNF- α ・アクチノマイシン存在下で mRNA の安定性を経時的に検討する。

(2) I κ B β 2 mRNA における RNA 結合因子の同定と機能解析。

I κ B β 2 mRNA の 3'-非翻訳領域に結合する蛋白を解析するため、3'-非翻訳領域を in vitro transcription にて [α -³²P]UTP でラベルし RNA-ゲルシフト法で検討する。さらに、RNase T1 mapping と UV Cross-linking を用いて RNA 結合蛋白の RNA 塩基配列と分子量を解析後、アミノ酸配列を解析し、RNA 結合蛋白を決定する。同定された RNA 結合蛋白は、滑膜組織お

よび滑膜細胞を用いて免疫組織染色法、ウェスタンブロット法、ノーザンブロット法で検討する。さらに、RNA 結合蛋白のプロモーターを同定し、転写レベルでの発現機構もルミノメーターを用いたルシフェラーゼ法にて並行して解析する。

(3) NF- κ B 活性化における I κ B β 2 の細胞内機能解析の検討。

滑膜細胞に I κ B β 2 発現プラスミドを細胞に導入後、非刺激下および TNF- α 存在下での NF- κ B ゲルシフト法によって検討する。また、TNF- α 産生量は RT-PCR 法あるいはノーザンブロット法、随時 ELISA 法で検討する。

(4) I κ B β 2 による転写因子活性化制御機構の検討

I κ B β 2 の結合蛋白を同定するために、yeast two-hybrid 法を用いる。候補遺伝子の同定後、各遺伝子の細胞内発現、蛋白相互作用、および機能解析を実施する。

4. 研究成果

(1) 各疾患における I κ B ファミリーの細胞内特性および I κ B β 2 の結合活性の検討。

免疫沈降法を用いた検討から、OA 滑膜細胞内での I κ B ファミリー (I κ B α /I κ B β 1/I κ B β 2) の発現については、p65 結合性 I κ B α 、I κ B β 1 および I κ B β 2 の発現は同等であったが、RA 滑膜細胞内での I κ B ファミリー (I κ B α /I κ B β 1/I κ B β 2) の発現については、p65 結合性 I κ B α および I κ B β 1 の発現は同等であったが、I κ B β 2 の発現は有意に低下していた。また、I κ B β 2 発現プラスミドを使用した強制発現実験において、I κ B α /I κ B β 1 と同様に、I κ B β 2 は NF- κ B の DNA 結合活性を非刺激下で有意に低下させた。一方、TNF- α 存在下における同様の実験では、I κ B α /I κ B β 1 はユビキ

チン分解され、NF- κ B の DNA 結合活性は上昇するのに対して、I κ B β 2 はユビキチン分解を受けずに NF- κ B の DNA 結合活性は低下したままであった。従って、TNF- α によって増悪することが知られている RA 滑膜炎は、I κ B β 2 発現コントロールによって制御可能であることが示唆された。

(2) I κ B β 2 mRNA の細胞内安定性と RNA による転写後機能調節機構の検討。

I κ B β 2 蛋白の安定性は、遺伝子データベースによる解析から I κ B β 2 遺伝子が特異構造を有することに起因する可能性が示唆された。すなわち、I κ B β 2 遺伝子発現における mRNA の 3' 非翻訳領域の構造は通常の poly-A 構造がない代わりに非常に長い 3' 非翻訳領域を有していることが明らかになった。そこで、I κ B α /I κ B β 1/I κ B β 2 mRNA それぞれの 3' 非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合させて、滑膜細胞内におけるルシフェラーゼ遺伝子の安定性について検討した結果、I κ B β 2 mRNA の 3' 非翻訳領域を結合させたルシフェラーゼ遺伝子は I κ B α /I κ B β 1 と比較して明らかに半減期が延長していた。特に I κ B β 2 mRNA の 3' 非翻訳領域を介した I κ B β 2 mRNA の発現の調節機構については、従来から報告されている RNA 結合蛋白による調節に加えて、近年注目されている microRNA の関与も示唆されるデータも得られている。その中でも RA 滑膜細胞において TNF- α 刺激によって発現が増加する miR-146a が NF- κ B 活性化機構に密接に関与していることも明らかにした。さらに、現在、I κ B β 2 mRNA 安定性に関わる I κ B β 2 mRNA 結合性 microRNA の存在も見出している。

(3) I κ B β 2 の細胞内機能調節作用および I κ B β 2 による転写因子活性化調節作用の検

討。

細胞内でユビキチンあるいは非ユビキチンで分解されにくく安定した蛋白として存在している I κ B β 蛋白は、炎症性転写因子 NF- κ B の活性化を効率的に抑制していること、さらには NF- κ B や核内ホルモン受容体である甲状腺ホルモン受容体の転写活性化部位を介して結合することによってコリプレッサーとして作用している可能性についても明らかにした。まず、細胞に I κ B β 発現プラスミドを導入し細胞内に I κ B β を強制発現させて、各種刺激による NF- κ B の活性化をゲルシフト法と、NF- κ B の DNA 結合部位をタンデムに 2 個結合させた上でルシフェラーゼ遺伝子と融合したプラスミドを同時に導入したルシフェラーゼアッセイにて検討した。その際、I κ B β 作用の対照として、I κ B α と I κ B β 1 発現プラスミドを使用した。細胞内に強制発現させた I κ B α 、I κ B β 1、I κ B β 蛋白はそれぞれを認識する特異抗体および発現プラスミド作成時にプログラミングした FLAG を認識する抗体を用いて検討した結果、いずれの抗体においても細胞内に発現していた。さらに、各種発現プラスミドを導入し蛋白を発現させたのちに炎症性サイトカインである TNF- α あるいは IL-1 β を作用させると、I κ B α と I κ B β 1 発現プラスミドを導入した細胞は NF- κ B の活性化が確認されたが、I κ B β 発現プラスミドを導入した細胞では NF- κ B の活性化が認められなかった。また、この I κ B β 蛋白は、yeast two-hybrid 法および特異的免疫沈降法にて細胞内で NF- κ B と同様に、甲状腺ホルモン受容体に結合していること、および甲状腺ホルモン受容体が結合する DNA 結合配列を用いたルシフェラーゼアッセイにおいても、I κ B β は NF- κ B と同様に甲状腺ホルモン受容体によるルシフェラーゼ活性を低下させることを明らかにした。

以上の結果は、従来、遺伝子導入（遺伝子治療）で実現していた NF- κ B の不活化法が内在性 I κ B β 2 の発現を制御することによって可能であることを明らかにした。現在、国内外において RA における活性化された NF- κ B の不活化法は実験動物において抑制分子である I κ B α の非分解性人工変異体を細胞内に人為的に導入する遺伝子治療が試みられ滑膜炎の消失が報告されているが、未だ患者への臨床応用レベルには達していないと言える。さらに、NF- κ B を不活化させることが、RA 治療のキーポイントとなり得ることは周知の事実であるが、NF- κ B 制御における各種機能分子の解析と滑膜炎制御の臨床的検討を融合した報告は国内外を問わず現在までに報告がなく、新しい NF- κ B 制御法としてインパクトも高いと考えられる。また、その I κ B β 2 の発現制御は転写後の発現調節によって担われていることが明らかとなり、RNA 結合蛋白のみならず、さらに内在性 microRNA による調節機構の関与も示唆する結果も得られ、蛋白分子の発現調節機構として従来から知られている転写調節機構と、新しい概念である内在性 microRNA による転写後調節機構と複雑な調節機構によって制御されていることが示唆された。今後、これら調節機構を介した、特に内在性 microRNA による転写後調節機構について検討し、実地臨床への応用も可能と思われる。

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 4 件）

(1) Takahashi K, Hirano F, Matsumoto K, Aso K, Haneda M. Homeobox gene CDX2 inhibits human pancreatic cancer cell

proliferation by down-regulating cyclin D1 transcriptional activity. *Pancreas* 38(1):49-57, 2009 (査読有)

(2) 平野史倫、羽田勝計：特集「禁煙を科学する」喫煙による内分泌代謝機能への影響：総合臨床 57(8)：2149-2152, 2008 (査読無)

(3) 平野史倫：特集「古くて新しい胆汁酸 最近の話題」胆汁酸による転写因子活性化機構：臨床化学 36(3)：205-214, 2007 (査読無)

(4) Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem* 282(19):14073-14082. 2007 (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

(1) F. Hirano, Glucocorticoid and tumor necrosis factor- α additively up-regulate RANKL mRNA expression in human osteoblast-like cells: Influence of glucocorticoid treatment on generalized osteoporosis in rheumatoid arthritis. 2nd Joint Meeting of International Bone & Mineral Society, 21-25 Mar, 2009, Sydney, Australia.

(2) 平野史倫：エタネルセプト効果減弱関節リウマチ患者における白血球除去療法の有効性とその作用機序に関する検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 23 日-26 日、東京.

(3) F. Hirano, Effectiveness of

leukocytapheresis for etanercept-resistant rheumatoid arthritis: Decreased responsiveness to lipopolysaccharide-induced stimulation of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2009), 10-13 Jun, 2009, Copenhagen, Denmark.

(4) 平野史倫：膠原病における甲状腺自己抗体の出現頻度に関する検討. 第 52 回日本甲状腺学会総会、2009 年 11 月 3 日-5 日、名古屋.

(5) F. Hirano, Parathyroid hormone and glucocorticoid cooperatively induce RANKL mRNA expression in osteoblasts through different mechanisms. 10th European Congress of Endocrinology, 3-7 May, 2008, Berlin, Germany.

(6) 平野史倫：RA線維芽滑膜細胞における TNF α とステロイドによる RANKL 発現調節機構に関する検討. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008 年 4 月 20 日-23 日、札幌.

(7) F. Hirano, Regulation of RANKL Expression by Glucocorticoid in Human Osteoblast-like Cells. 29th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 12-16 Sep, 2007, Honolulu, USA.

(8) K. Takahashi, The homeodomain transcription factor CDX2 inhibits human pancreatic cancer cell proliferation by repressing cyclin D1 transcription. 15th United European Gastroenterology Week (UEGW2007), 27-31, Oct, 2007, Paris, France.

(9) 平野史倫：RA線維芽滑膜細胞における RANKL と osteoprotegerin 発現の検討. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2007 年 4

月 26 日-29 日、横浜.

〔図書〕(計 4 件)

- (1) 平野史倫：ファーマナビゲーターシリーズ「リウマチへ生物学的製剤編へ」(竹内勤編集)“呼吸器合併症のスクリーニング検査について”印刷中. メディカルレビュー社、2010
- (2) 平野史倫：シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル(住田孝之、江口勝美編集)“臨床症状—腺外症状—甲状腺病変”P. 132-137. 診断と治療社、2009

〔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〕(計 0 件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 史倫 (HIRANO FUMINORI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：6 0 2 5 0 5 5 2

(2) 研究分担者

牧野 雄一 (MAKINO YUICHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：9 0 3 4 5 0 3 3

岡本 健作 (OKAMOTO KENSAKU)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：8 0 3 9 6 8 7 9

(3) 連携研究者

()

研究者番号：