

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390283

研究課題名（和文）アネキシン7を中心とした関節リウマチ病態と治療法の研究-プロテオミクスの応用-

研究課題名（英文）Studies on the role of annexin7 in the pathophysiology and therapies of rheumatoid arthritis using proteomics

研究代表者

加藤 智啓 (KATO TOMOHIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80233807

研究成果の概要（和文）：関節リウマチは関節を主病巣とする難治性炎症性疾患である。生物学的製剤等が用いられるようになったが、引き続き新規治療法の開発が求められている。我々はリン酸化プロテオミクスを用いて新しい病態関連蛋白質アネキシン7を同定し、遺伝子導入マウス等を用いて関節炎を正に制御すること、治療標的になりうること、機序としてIL-8の分泌増加を介することなどを見出した。関節リウマチの新たな治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease, involving multiple joints. In addition to the biologics, novel therapies should be established. We identified a novel RA-related protein of annexin 7 by proteomics, evidenced arthritogenicity of annexin7 and its role as a therapeutic target using transgenic mice. Further, we evidenced annexin 7 contributed to arthritis through IL-8. Our study would be useful to establish a new therapy for RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：①プロテオミクス②アネキシン7③関節リウマチ④翻訳後修飾⑤治療標的

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは関節を主病巣とする難治性炎症性疾患である。最近になり抗TNF α 抗体などサイトカインを標的とした治療法が行われるようになり、治療成績は向上を見ている。一方で、易感染性になるなどの問題もあり、引き続き新規の治療法の開発が求められている。我々はこれまで蛋白質の翻訳後修飾の差異を検出できる網羅的解析法であるプロテオミクスを用いて、滑膜のリン酸化蛋白質のスクリーニングを行った。そして、

関節リウマチで優位にリン酸化されている蛋白質を多数検出し、さらに実験的関節炎抵抗性マウスを感受性に変えることのできる分子アネキシン7を同定し、これについての詳細を検討する。本研究の目的は、この関節リウマチ関連分子である。

2. 研究の目的

本研究においては同定したアネキシン7がどのような機序で関節炎の病態にかかわるかを検討すること、アネキシン7が関節炎

の治療標的分子として有用か否かを検討すること、さらにアネキシン7に加えて新たな関節リウマチ治療標的分子を同定することを目標とした。

3. 研究の方法

アネキシン7遺伝子導入C57BL/6マウスの戻し交配によりアネキシン7遺伝子導入DBA/1を作成し、コラーゲン誘導性関節炎(CIA)の発症におけるアネキシン7の役割を検討する。また、アネキシン7遺伝子導入B6マウス、および野生型DBA/1(CIA感受性である)において抗アネキシン7抗体がCIAの発症やその重症度を抑制するか否かを検討する。さらに、それらの過程において各種サイトカイン産生への影響をサイトカインアレイあるいはELISAを用いて検討する。同様に、細胞レベルでsiRNAによりアネキシン7の産生を抑制し、各種サイトカイン産生への影響をサイトカインアレイを用いて検討する。また、2次元電気泳動を用いた検出を行う。

4. 研究成果

一般にCIAに抵抗性であるC57BL/6マウスはアネキシン7遺伝子導入によりCIAに感受性になり高頻度にCIAを発症するが、抗アネキシン7抗体を投与することで、CIAは抑制されることが判明した。また、元来CIAに感受性で関節炎に対する薬効研究等で用いられる野生型DBA/1Jマウスにおいても、CIAの誘導過程において抗アネキシン7抗体を投与することで、CIAが抑制されることが判明した。これらのことからアネキシン7が関節炎病態に関与するのみでなく、治療標的としての有用性を持っていることが示された。アネキシン7は元来関節リウマチ患者滑膜細胞で高度にリン酸化されているタンパク質をスクリーニングしたことから得た物質であることを考えると、ヒト関節リウマチにおいてもアネキシン7が治療標的となりうることを期待される。さらに、抗アネキシン7抗体は上記CIAを抑制するが、その作用は、IL-6、TNF- α など現在、生物学的製剤の治療標的となっているサイトカインの血中濃度変化を伴わないことがわかり、アネキシン7は上記サイトカインとは独立した治療標的となりうると思われた。また、その作用機序として、抗アネキシン7抗体が細胞膜上のアネキシン7に結合することが示された。さらに関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の表面にアネキシン7が存在することが示された。また、滑膜肉腫細胞および関節リウマチ患者由来滑膜細胞において、アネキシン7のsiRNAによるノックダウンによりIL-8の分泌は減少するが、IL-6の分泌は変化しないことが示された。さらに上記細胞で、アネキシン7の過剰発現により、IL-8の分泌が増

加することも判明した。このことから、アネキシン7は一部にはIL-8の制御を介して関節炎病態に関わっていると考えられた。今後、細胞表面のアネキシン7だけでなく、細胞内のアネキシン7と起関節炎機序との関連についても解明する必要がある。なお、本研究の主要部分はAnnals of the Rheumatic Diseasesに掲載予定となっている。

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13件)

1. Matsuo K, Arito M, Yudoh K, Kato T, et al. Arthritogenicity of annexin VII revealed by phosphoproteomics of rheumatoid synoviocytes. Ann Rheum Dis. in press. (査読有)
2. Karasawa R, Yudoh K, Kato T, et al. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with systemic vasculitis: our research using proteomics. Expert Opin Biol Ther. 11(1):77-78. 2011. (査読有)
3. Karasawa R, Yudoh K, Kato T, et al. Peroxiredoxin 2 is a novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis. Clin Exp Immunol. 161(3):459-470. 2010. (査読有)
4. Ooka S, Kato T, et al. Proteomic surveillance of autoantigens in patients with Behcet's disease by a proteomic approach. Microbiol Immunol. 54(6):354-361. 2010 (査読有).
5. Iizuka N, Kato T, et al. Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nerve system involvement. Lupus. 19:717-726. 2010. (査読有)
6. Masuko K, Kato T, et al. Prostaglandin E2 regulates the expression of connective tissue growth factor(CTGF/CCN2) in human osteoarthritic chondrocytes via the EP4 receptor. BMC Res Notes. 3(5). 2010. (査読有)
7. Fukasawa M, Kato T, et al. Proteomic analysis of the rat cerebellar flocculus during vestibular compensation, J. Vestibular Res. -Equil. 19(3-4):83-94. 2009. (査読有)
8. Hatsugai M, kato T, et al. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for

- differential diagnosis of ulcerative colitis from Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology*. 45(5):488-500. 2009. (査読有)
9. 加藤 智啓. プロテオミクス/ペプチドミクスによる血管炎関連自己抗原とペプチドの検索. *日本脈管学会*. 49(1):39-43. 2009. (査読有)
 10. Masuko K, Kato T, et al. A suppressive effect of prostaglandin (PG) E2 on the expression of SERPINE1/plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in human articular chondrocytes - an in vitro pilot study. *Open Access Rheumatology Research and Reviews*. 1:9-15. 2009. (査読有)
 11. Fujisawa H, Kato T, et al. Involvement of Post-Translational Modification of Neuronal Plasticity-Related Proteins in Hyperalgesia Revealed by a Proteomic Analysis. *Proteomics*. 8(8):1706-1719. 2008. (査読有)
 12. Okunuki Y, Kato T, et al. Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain type creatine kinase as novel autoantigens. *Molecular Vision*. 14:1094-1104. 2008. (査読有)
 13. Duc PA, Kato T, et al. Development and characteristics of pannus-like soft tissue in osteoarthritic articular surface in rat osteoarthritis model. *Clin Exp Rheumatol*. 26(4):589-595. 2008. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 有戸 光美、松尾 光祐、加藤智啓、他、関節リウマチ関連分子アネキシン VII (Anx7)の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日~10 日, 神戸ポートアイランド
2. 永井宏平、加藤智啓、他、自己抗原 U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k subunit における疾患特異的翻訳後修飾亜型の解析, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日~10 日, 神戸ポートアイランド
3. Nagai K, Kato T, et al. Comprehensive Analysis of Serum Peptides in Patients with Alzheimer's Disease. HUP0 2010. 2010 年 9 月 19 日~23 日. オーストラリア
4. Arito M, Kato T, et al. Acetyl-Proteomics for the Investigation of Pathological Molecules in Rheumatoid Arthritis. HUP0 2010. 2010 年 9 月 19 日~23 日. オーストラリア
5. Yoshioka T, Kato T, et al. Comprehensive Analysis of Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from patients with Behcet's Disease. HUP0 2010. 2010 年 9 月 19 日~23 日. オーストラリア
6. 有戸光美、加藤智啓 他、「アセチル化」プロテオミクスによる関節リウマチ (RA) 関連分子の探索, 日本プロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010) / 第 7 回日本臨床プロテオーム研究会, 2010 年 7 月 26 日~27 日, 東京ベイホテル東急
7. 永井宏平、加藤智啓 他、自己抗原蛋白質 U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k subunit における疾患特異的翻訳後修飾の解析, 日本プロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010) / 第 7 回日本臨床プロテオーム研究会、2010 年 7 月 26 日~27 日, 東京ベイホテル東急
8. 深澤雅彦、加藤智啓、他、片側内耳破壊後の前庭代償におけるラット小脳片葉タンパク質のプロテオーム解析, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21~24 日
9. 初谷守朗、加藤智啓、他、末梢血単核球のプロテオーム解析による潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別診断, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21~24 日. 神戸ポートアイランド
10. 有戸光美、加藤智啓、他、関節リウマチ関連分子アネキシン A7 の機能解析, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21~24 日. 神戸ポートアイランド
11. Hatsugai M, Kato T, et al. Protein Profiles of Peripheral Blood Mononucleocytes are Useful for Discrimination of Ulcerative Colitis from Crohn's Disease. HUP0. 8th Annual World Congress. 2009 年 9 月 26 日~30 日. カナダ
12. Kato T. Analysis of Brain Proteome in SART Rat's, a Model of Hyperalgesia. APLAR 2008. 2008 年 9 月 25 日. パシフィック横浜
13. Xiang Yang, Kato T, et al. Disease-Specific Serum Peptides In Patients With Systemic Sclerosis. HUP0 2008. 2008 年 8 月 18 日. オランダ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 智啓 (KATO TOMOHIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80233807

(2) 研究分担者

遊道 和雄 (YUDO KAZUO)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科

(研究院)・教授

研究者番号：60272928

(3) 連携研究者

なし