

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20689019

研究課題名（和文）関節リウマチ原因遺伝子シノビオリンの発現調節機能の解析

研究課題名（英文）The transcriptional regulation of Synoviolin in rheumatoid synovial cells.

研究代表者

八木下 尚子（YAGISHITA NAOKO）

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：40367389

研究成果の概要（和文）：われわれは、関節リウマチ（RA）の発症に深く関与する分子シノビオリンをクローニングした。さらにシノビオリンの発現調節には ILF-3 が関与すること、シノビオリンは線維化形成にも深く関与することを明らかとし、シノビオリンの発現調節機構が重要であることを示した。シノビオリンの抑制は、RA や種々の疾患の治療につながると予想されるため、シノビオリン阻害剤を用いた検討を行った結果、RA の動物モデルで抑制的効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) significantly affects quality of life. We recently cloned synoviolin, a RING-type E3 ubiquitin ligase implicated in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway. Synoviolin is highly expressed in rheumatoid synovial cells and may be involved in the pathogenesis of RA. In this study, we found that ILF-3 up-regulates synoviolin expression with GABP α in rheumatoid synovial cells. Moreover, we demonstrated that Synoviolin is involved in not only onset of RA but also development of liver fibrosis. Inhibition of synoviolin activity is a potentially useful therapeutic approach for the treatment of RA. We recently identified two classes of small molecules which inhibited synoviolin activity. These inhibitors suppressed the proliferation of rheumatoid synovial cells, and significantly reduced the severity of disease in a mouse model of RA. Our results suggest that inhibition of synoviolin is a potentially useful approach in the treatment of RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009 年度	育休の為交付保留		
2010 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

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：関節リウマチ、滑膜細胞、滑膜細胞増殖、シノビオリン、小胞体関連分解

E3 ユビキチンリガーゼ、シノビオリンプロモーター

1. 研究開始当初の背景

RA は、自己免疫反応と滑膜細胞増殖との 2 つの側面を持つ。自己免疫疾患という観点ではこれまで広く研究がなされてきたが、滑膜

細胞の増殖の機序は解明されていない。そこで、これまでわれわれの所属する研究所では RA の根治的治療を目標に掲げさまざまな視点から研究を展開してきた。

われわれは滑膜細胞の理解を深めるため研究を進め、世界で初めて滑膜細胞にちなんだ遺伝子のクローニングに成功しシノビオリンと命名した (Amano T et al. Gens Dev 2003、HUGO GenBank ID: AB024690)。さらに一連の研究から、シノビオリンは小胞体関連分解 (Endoplasmic reticulum associated degradation; ERAD) で機能する E3 ユビキチンリガーゼであること (Amano T et al. Gens Dev 2003)、シノビオリン遺伝子過剰発現 (Tg) マウスは関節炎を発症し、逆にシノビオリン遺伝子ヘテロマウス (*syno*^{+/-}) は関節炎モデルに対し抵抗性を示す (Amano T et al. Gens Dev 2003) こと、シノビオリン遺伝子欠損マウス (*syno*^{-/-}) は、肝細胞でのアポトーシスの亢進により胎生致死となること (Yagishita N et al. J Biol Chem 2005)、RA 滑膜細胞に過剰発現し、ERAD の機能を活性化させ (Hyper-ERAD) 小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することで滑膜細胞増殖を引き起こすこと (Yagishita N et al. Nature Clin Prac Rheum 2008, Yamasaki S et al. Cell cycle 2007, Yagishita N et al. Future Rheumatol 2006, Yamasaki S et al. Int J Mol Med 2006, Amano T et al. Gens Dev 2003)、癌抑制遺伝子 p53 を基質とし、p53 依存的なアポトーシスを制御することを (Yamasaki S et al. EMBO J 2007) 明らかとした。

これらの結果より ERAD において機能するシノビオリンは、アポトーシスを介してその過剰な発現は RA という病態を、また発現の欠損は発生分化への影響を引き起こすことが明らかとなり、シノビオリンの正常な発現が生体にとって重要であることが明らかとなった。したがって、シノビオリンの発現量を規定する転写制御機構を解明することは病態学的にも生理学的にも非常に重要であるといえる。そこで応募者らはこれまでにシノビオリンプロモーターの解析を行い、生理学的な発現には Ets binding site (EBS) が必須な領域であることを発見した (Tsuchimochi K et al. Mol Cell Biol 2005)。さらにこの EBS には 20 を超える Ets ファミリー分子の中でも GABP (GA binding protein) α が選択的に結合することを同定し、シノビオリンの生理学的な発現を GABP α/β 複合体が EBS を介して制御していることを証明した (Tsuchimochi K et al. Mol Cell Biol 2005)。

しかしながらシノビオリンは RA 滑膜細胞に過剰に発現しているため、RA 滑膜細胞には生理学的な発現制御機構とは異なった病態特異的な機構が存在することが示唆される。

そこで RA 滑膜細胞における病態特異的なシノビオリンの発現制御を明らかにすることを目的として EBS 領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った結果、RA 滑膜細胞特異的な複合体が存在することが明らかとなった。

2. 研究の目的

RA 滑膜細胞特異的にシノビオリンプロモーターに結合するタンパク質複合体を精製・同定することを目的とした。さらに、デオキシ核酸等を用いた人為的な制御により関節炎発症を抑制できるかを細胞レベルにて検討し、今後の研究につなげることを目指した。

3. 研究の方法

(1) シノビオリンプロモーター結合タンパク質複合体の精製

培養 RA 滑膜細胞より核画分タンパク質を採取し、DEAE カラム・陰イオン交換カラム・陽イオンカラム等を用いて、シノビオリンプロモーター結合タンパク質を精製する。各精製段階において EBS 領域をプローブとしたゲルシフトアッセイによりシノビオリンプロモーターとの結合を確認する。

(2) シノビオリンプロモーター結合タンパク質複合体の同定

(1)にて精製したタンパク質複合体を構成するタンパク質をマスマスペクトル (MS-MS) により同定する。

(3) シノビオリンプロモーター結合タンパク質複合体を用いた検討

(2)にて同定したタンパク質が滑膜細胞に発現しているかをウエスタンブロッティング法にて確認する。さらに、この同定したタンパク質がシノビオリンプロモーターに直接結合するかをゲルシフトアッセイにより検討する。また、このタンパク質のシノビオリン遺伝子の転写活性化に対する効果をシフェラーゼアッセイにより検討する。

次いで、(2)にて同定したタンパク質の発現量がデオキシ核酸や siRNA を用いて人為的に制御できるかを検討する。

4. 研究成果

(1) シノビオリンプロモーター結合タンパク質複合体の精製

シノビオリンの生理学的な発現は Ets binding site を介した GA binding protein α/β 複合体により制御されることをこれま

で明らかとしているため、RA 滑膜細胞における病態特異的なシノビオリンの発現制御を明らかにすることを目的として EBS 領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。その結果、コントロールとなる OA 滑膜細胞と比較して RA 滑膜細胞特異的な複合体が存在することが明らかとなった。この RA 滑膜細胞特異的にシノビオリンプロモーターに結合するタンパク質複合体の精製・同定を進めることとしたが、RA 滑膜細胞は初代培養細胞であり、継代数が限られてくることから、細胞数に使用制限のない各種細胞株を用いて RA 滑膜細胞と同じゲルシフトアッセイのパターンを示す細胞株の探索を行った。その結果、NIH3T3 細胞において RA 滑膜細胞特異的なバンドと同様のバンドが確認されたため、この細胞を以下の実験に供することとした。

NIH3T3 細胞より核抽出液を作成し、P11 カラム、DE52 カラム、Mono Q カラム、Superose 6 カラムを使用して目的とするタンパク質複合体の精製を行った。

(2) シノビオリンプロモーター結合タンパク質複合体の同定

最終的に (1) の Superose 6 カラムより得られた目的とするタンパク質複合体を含むフラクションを用いてマスペクトルによるタンパク質複合体の同定を行った結果、このタンパク質複合体には GABP α / β のみならず転写因子の 1 つである interleukin enhancer binding factor 2 (ILF-2) および interleukin enhancer binding factor 3 (ILF-3) を含んでいることが明らかとなった。

(3) シノビオリンプロモーター結合タンパク質複合体を用いた検討

RA 滑膜細胞核抽出液を用いて、EBS 領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行ったところ、RA 滑膜細胞特異的なバンドは抗 ILF-3 抗体による競合を受け減少した。さらに ILF-3 が GABP α と複合体を形成するかを免疫沈降実験にて確認したところ、両者の結合が確認された。以上のことから、ILF-3 と GABP α が EBS 領域に結合する複合タンパク質の構成タンパク質であることが証明された。

次に ILF-3、GABP α が RA 滑膜細胞におけるシノビオリン遺伝子の転写活性化能を検討するため、GABP α 、GABP β 、ILF-2、ILF-3 発現プラスミドを用いてプロモーターアッセイを行った。その結果、それぞれ単独の発現プラスミドを用いてプロモーターアッセイを行った際には、シノビオリンの転写活性化

はほとんど認められなかったにも関わらず、GABP α 、ILF-3 の発現ベクターを用いた場合にはコントロールと比較してシノビオリンの転写活性化が有意に上昇した。さらに 4 つの発現プラスミドを全て用いた場合には、GABP α 、ILF-3 のみの場合と比較してシノビオリンの転写活性化が有意に上昇した。以上のことから、GABP β 、ILF-2 が協調的に働きシノビオリンの転写を活性化していることが明らかとなった。

さらに、NIH3T3 細胞に ILF-3 siRNA を 72 時間処理した際のシノビオリンの発現を確認すると、コントロール siRNA に比較してシノビオリンの発現が有意に減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、ILF-3 が RA 滑膜細胞における病態特異的なシノビオリンの発現制御を担っていることが明らかとなった。さらに近年われわれは、肝硬変の病態形成の中心的細胞となる線維芽細胞（星細胞）にシノビオリンが強発現し、シノビオリン遺伝子ヘテロマウスは肝線維化に抵抗性を示すことを明らかとした (図 1)。

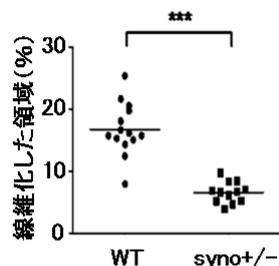


図1. CCl₄投与による肝硬変モデル

すなわち星細胞でシノビオリンが過剰に機能することにより、星細胞の過増殖と活性化が生じ線維化が起きることを明らかとしたのである。これはわれわれが提唱した RA 滑膜細胞での病巣形成機序と一致するものであり、これまで接点があると考えられることもなかった両疾患には、共通の発症機序が存在することを示唆している。したがって、今回明らかにしたシノビオリンの発現制御機構が肝臓をはじめとした線維化疾患にも適応する可能性が考えられ、広く線維症の病態形成論が明らかになることが示唆された。

さらにシノビオリンを標的とすることは、RA や肝線維症など線維化疾患に対する革新的治療法の開発につながる可能性があると考えられるため、われわれが有するシノビオリン酵素活性阻害剤 2 種により RA 発症制御が可能かを検討した。その結果、両化合物は

in vitro の系では μM のオーダーで選択的にシノビオリンの酵素活性を阻害すること(図2)、また滑膜細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

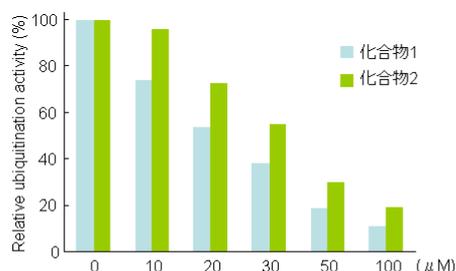


図2. シノビオリン阻害剤によるシノビオリン自己ユビキチン化活性の阻害効果

また、これらの化合物が関節炎の発症に対して抑制的な効果を示すかを検討するため、DBA/1 系統のマウスに CIA モデルを適応し、追加免疫時よりこれらの化合物を連日腹腔内投与した結果、II 型コラーゲン抗体の産生はいずれの群でも同等に認められたものの、関節炎の重症度は化合物投与群において有意に抑制されることが明らかとなった。

したがってこれらの化合物はシノビオリン阻害剤として有効な薬剤となる可能性が強く示唆された。これらの結果については現在論文を投稿中で、化合物に関しては米国の企業との共同研究によりさらなる最適化を進めている段階である。

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 2 件)

- Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, Matsumoto N, Aratani S, Izumi T, Azakami K, Nakazawa M, Fujita H, Sato T, Araya N, Koike J, Tadokoro M, Suzuki N, Nagata K, Senoo H, Friedman SL, Nishioka K, Yamano Y, Itoh F, Nakajima T. E3 Ubiquitin Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrogenesis. *PLoS One*, 5(10): e13590, 2010. 査読有
- Izumi T, Fujii R, Izumi T, Nakazawa M, Yagishita N, Tsuchimochi K, Yamano Y, Sato T, Fujita H, Aratani S, Araya N, Azakami K, Hasegawa D, Kasaoka S, Tsuruta R, Yokouti M, jiri K, Beppu M, Maruyama I, Nishioka K, Maekawa T, Komiya S, Nakajima T. Activation of Synoviolin Promoter in Rheumatoid Synovial Cells by a Novel Transcription Complex of Interleukin

Enhancer Binding Factor 3 and GA Binding Protein. *Arthritis Rheum* 60(1): 63-72, 2009. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T. Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis. Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo: The 8th GARN Meeting, 15 November 2011, Tokyo, Japan. (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- Yagishita N, Aratani S, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T. ER stress signaling as a chronic inflammation. 2nd Tokyo-Shanghai Workshop on Rheumatology 2011, 13 November 2011, Tokyo, Japan. (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T. Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis. The 2011 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, 8 November 2011, Chicago, U.S.A.
- 八木下尚子、中島利博 シノビオリンから見た関節リウマチの病態研究 第55回日本リウマチ学会カレントシンポジウム「若手研究者が語るリウマチ性疾患の病態とシグナル伝達」2011年7月18日 神戸(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場 神戸国際展示場)
- 八木下尚子、荒谷 聡子、佐藤 知雄、藤井 亮爾、山野 嘉久、西岡 久寿樹、中島 利博 E3ユビキチンリガーゼシノビオリンの線維化への関与 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011年7月18日 神戸(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場 神戸国際展示場)

[その他]

ホームページ等

<http://nanchiken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木下 尚子 (YAGISHITA NAOKO)
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 40367389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし