

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08791

研究課題名（和文）オートファジー受容体オプチニューリンを標的とした新しい関節破壊制御法の開発

研究課題名（英文）Novel Approach to Prevent Joint Destruction through Targeting the Autophagy Receptor Optineurin

研究代表者

加藤 将（Kato, Masaru）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：10755896

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000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、オートファジー受容体オプチニューリンのノックダウンによりNF- κ Bシグナル伝達経路の活性化および軟骨破壊や骨修復にかかわる分子のdysregulationが起こること、TNFやINF- γ の刺激によりオプチニューリンのリン酸化が亢進することが示された。また、別のオートファジー受容体であるp62の細胞内タンパク質のシトルリン化における役割も併せて検討した。これらの結果は、オートファジー受容体が関節破壊やタンパク質のシトルリン化を制御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

関節リウマチはシトルリン化タンパク質に対する自己免疫、増殖性滑膜炎、関節破壊の3つで特徴づけられる疾患であるが、今回の研究成果はオプチニューリンやp62といったオートファジー受容体が関節破壊およびシトルリン化タンパク質に対する自己免疫にかかわっていることを示唆するものであり、関節リウマチの新たな治療戦略を立てるのみならず、いまだ明らかとなっていない関節リウマチの病態を解明する上で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 in synovial fibroblasts, (1) downregulating optineurin, one of the autophagy receptors, leads to the activation of NF- κ B signaling pathway and the dysregulation of molecules related to cartilage destruction and bone repair and (2) TNF and INF- γ increase the phosphorylation of optineurin. Moreover, the role of another autophagy receptor p62 in the citrullination of intracellular proteins was evaluated. These results are novel findings in the therapeutic approach to rheumatoid arthritis, particularly in the inhibition of joint destruction and protein citrullination, and suggest autophagy receptors as novel therapeutic targets.

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 オートファジー受容体 オプチニューリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物学的製剤、JAK 阻害剤の登場により関節リウマチ (rheumatoid arthritis; 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、安全面や経済面への懸念から休薬“ドラッグホリデー”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、滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts; 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、オートファジーの活性が高いこと、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ビメンチンが増加し、かつ、MHC class II と相互作用することも報告した (Sugawara E, Kato M, et al. Autophagy 2020)。オートファジー受容体 (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、オプチニューリン (optineurin; OPTN) など、20 以上のオートファジー受容体が同定されている。オートファジー受容体は基質分解補助以外にもさまざまな機能を持つことが報告されており、例えば、OPTN は破骨細胞の分化を抑制し (Obaid R, et al. Cell Rep 2015)、その遺伝子多型は骨パジェット病のリスク因子である (Albagha OM, et al. Nat Genet 2010)。

これらの結果から、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を考えた。

2. 研究の目的

本研究は、オートファジー受容体の1つである OPTN を標的とし、RA により生じる関節破壊を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) **OPTN のノックダウンと NF- κ B シグナル伝達経路の活性化**: 炎症のキーマediatorである NF- κ B シグナル伝達経路とオプチニューリンとの関連を検討するため、siRNA により OPTN をノックダウンした SF における TNF α 刺激下の細胞質内 I κ B α 、核内 NF κ B1/p50、RelA/p65 の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。
- (3) **炎症、軟骨破壊、骨修復にかかわる分子の発現解析**: OPTN が破骨細胞分化のみならず多面的に関節破壊に関与している可能性を検討するため、siRNA により OPTN をノックダウンした SF における軟骨破壊、骨修復にかかわる分子 MMP3、IL6、GATA3、CHST15、HAS1、GATA1 の発現を real-time PCR により解析した。
- (4) **OPTN の翻訳後修飾**: OPTN は、例えば 177 番目のセリンがリン酸化を受けることによりオートファジー隔離膜との親和性が強くなるなど (Wild P, et al. Science 2011)、翻訳後修飾によってもその機能が調整されている。SF において、TNF α 、IFN γ の刺激の有無でリン酸化 OPTN の発現をウェスタンブロッティングにより比較した。
- (5) **p62 のノックダウンおよびビメンチンのシトルリン化**: シトルリン化タンパク質に対する自己免疫とオートファジー受容体との関連を検討するため、incomplete autophagy と関連が指摘されている p62 (Zhang) に着目した。p62 をノックダウンした SF におけるアミノ酸飢餓 2 時間後またはプロテアソーム阻害 24 時間後のシトルリン化ビメンチンの発現をウェスタンブロッティングにより検討した。

4. 研究成果

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 B1/p50、RelA/p65 の核内移行が亢進しており (図 1)、OPTN は SF において NF- κ B シグナル伝達経路の活性を負に調節していると考えられた。

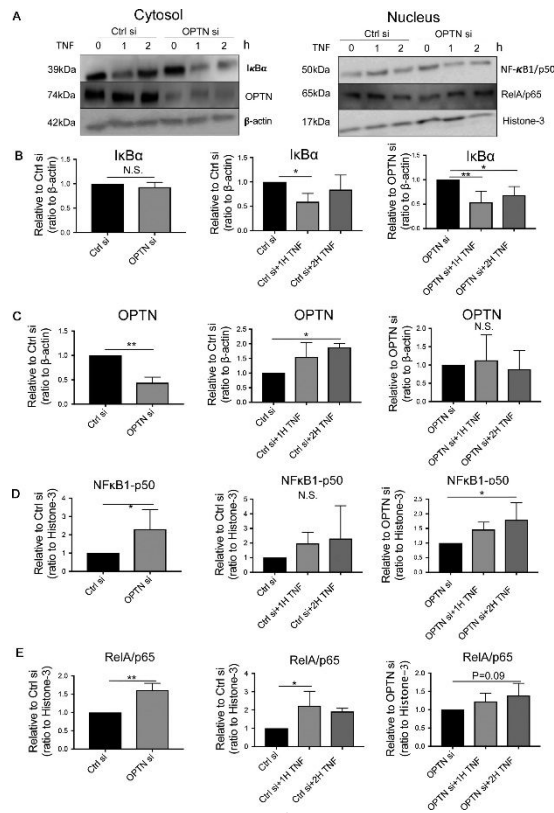


図 1 . OPTN は SF において NF-κB シグナル伝達経路の活性を負に調節する。

OPTN をノックダウンした SF では軟骨破壊に寄与する MMP3、炎症に寄与する IL6 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 の発現は低下しており (図 2)、OPTN は多面的に 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た。

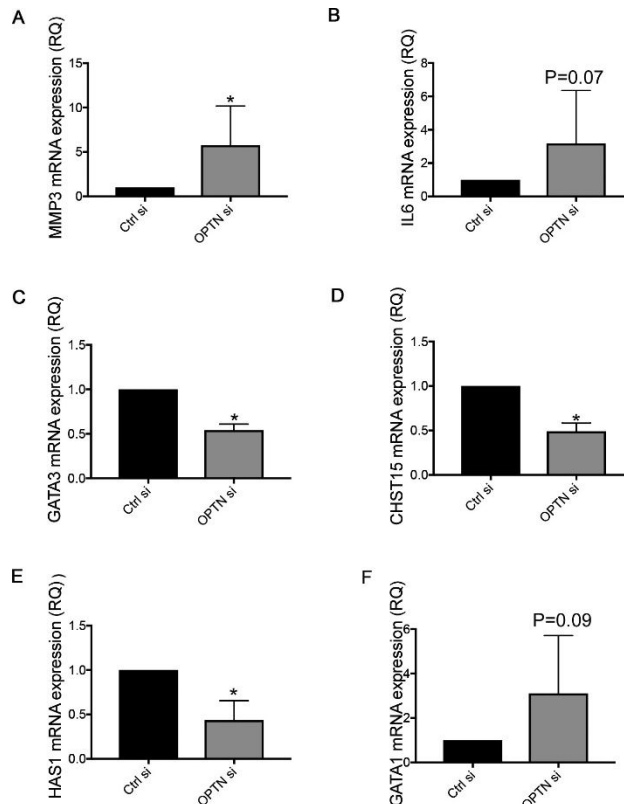


図 2 . OPTN は SF において炎症、軟骨破壊、骨修復にかかわる分子の発現を調節する。

TNF、IFN の両者を用いて刺激した SF においてリン酸化 OPTN の発現が上昇しており (図 3) SF において OPTN の翻訳後修飾が炎症性サイトカインにより制御されている可能性が示唆された。

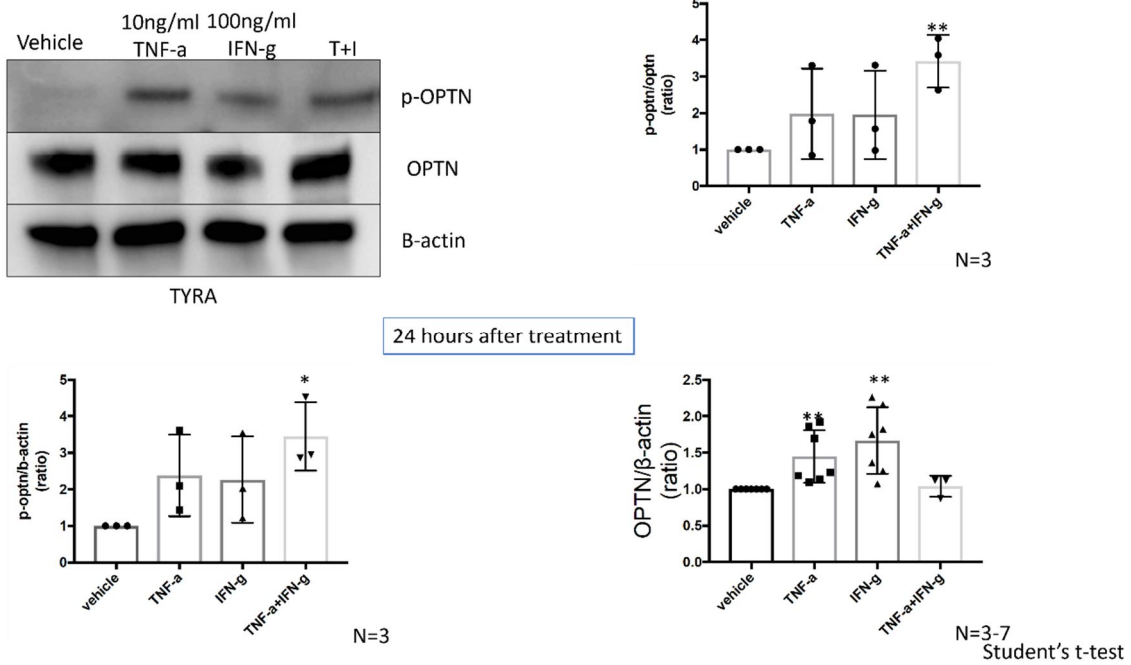


図 3 . TNF α 、IFN γ は SF において OPTN のリン酸化を誘導する。

p62 をノックダウンした SF ではシトルリン化ビメンチンの発現がやや低下したが統計学的有意差には至らなかった (図 4)。

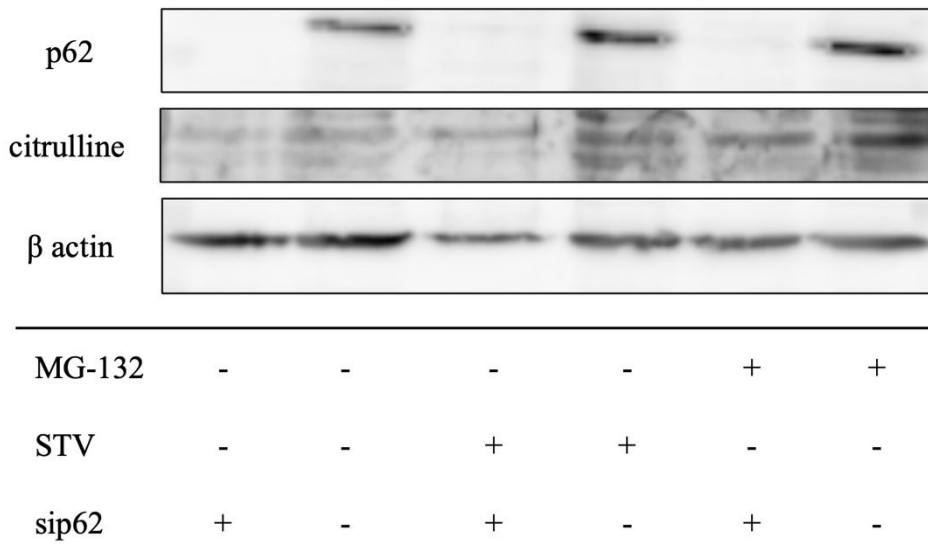


図 4 . p62 の SF におけるビメンチンのシトルリン化への影響。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Lee Wen Shi, Kato Masaru, Sugawara Eri, Kono Michihiro, Kudo Yuki, Kono Michihito, Fujieda Yuichiro, Bohgaki Toshiyuki, Amengual Olga, Oku Kenji, Yasuda Shinsuke, Onodera Tomohiro, Iwasaki Norimasa, Atsumi Tatsuya	4. 巻 72
2. 論文標題 Protective Role of Optineurin Against Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1493 ~ 1504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41290	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaru Kato, Wenshi Lee, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題 Optineurin in synovial fibroblasts protects the joint by suppressing osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis
3. 学会等名 12th International Congress on Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2021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)		
研究協力者	吉村 大 (Yoshimura Masaru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------