

令和 6 年 9 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16301

研究課題名（和文）関節リウマチにおける高密度環境がもたらす線維芽細胞への影響の解析とその治療応用

研究課題名（英文）Analysis of the effects of high-density environment on fibroblasts in rheumatoid arthritis and its prospects for therapeutic application

研究代表者

山本 晃央（Yamamoto, Akio）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：10845366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチにおける滑膜線維芽細胞においてYAP/TAZ、TEADが重要であることを明らかにした。これらの分子は細胞増殖、生存、遊走などの関節リウマチの線維芽細胞機能において重要な機能を制御することで知られている。関節リウマチ滑膜線維芽細胞に対してTEAD阻害薬を添加し、RNAシーケンスを行った。その結果、TEAD阻害薬の影響を受ける可能性のある重要な分子の同定を試みた。これらの分子は、関節リウマチの病態形成において重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、WBや免疫細胞染色、siRNAを用いたノックダウン、阻害薬投与などの手法を用いてこれらの分子の役割を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの病態において滑膜組織の線維芽細胞は重要な役割を果たしています。本研究では細胞の密度が高いかどうかを制御することに重要なYAP/TAZとTEADという分子が、関節リウマチの滑膜線維芽細胞の増殖などの働きに重要で、それを抑制することが関節リウマチの病態制御に有効である可能性を検証しました。将来的な滑膜線維芽細胞の病態の理解、治療に貢献できる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：The importance of YAP/TAZ and TEAD in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis has been demonstrated. These molecules are known to regulate important functions in rheumatoid arthritis fibroblast function such as cell proliferation, survival, and migration. RNA sequencing was performed on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts with TEAD inhibitors. As a result, we tried to identify important molecules that may be affected by TEAD inhibitors. Some of these molecules may play important roles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. We further evaluated the role of these molecules using WB, immunocytochemistry, siRNA-based knockdown, and inhibitor administration.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：膠原病・関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 YAP/TAZ 細胞密度

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチにおいては自己免疫機序を介して滑膜線維芽細胞の増殖、活性化がおり、病的な滑膜線維芽細胞が骨・軟骨の破壊をもたらす。既存の RA 治療薬は免疫担当細胞を主な標的としており、生物学的製剤、JAK 阻害薬は大きな治療効果の向上、パラダイムシフトをもたらした。一方で不応例が一定数みられることと易感染性の問題がある。RA 滑膜組織の状態により薬剤反応性の関連をみた報告では、白血球の浸潤が多い患者では TNF 阻害薬が有効であり、白血球浸潤の少ない線維芽細胞シグナルの患者の TNF 阻害薬の反応性は不良であった(Nerviani, Front Immunol, 2020)。これは既存の抗炎症作用を主体とした作用機序とは異なる治療を要する患者層がいること、線維芽細胞を標的とした治療に実際の臨床現場でのニーズがあることを示唆している。

RA 研究においては従来から滑膜線維芽細胞を用いた研究が長年行われている。しかしながら臨床試験において関節リウマチ患者に有効性を示した薬剤は TNF- 阻害薬などの生物学的製剤に代表される抗サイトカインや獲得免疫応答を標的としたものであった。RA 滑膜炎では過剰な細胞増殖がみられており、関節炎モデルマウスでは外部からの流入ではなく滑膜局所での線維芽細胞増殖に由来することが知られている(Matsuo, Biochem Biophys Res Commun, 2016)。また RA 滑膜では線維芽細胞の状態は同じ症例の同じ関節内においても均一ではなく機能的に異なるサブセットで構成されていることが知られており(Mizoguchi, Nat Commun, 2018)。RA において過剰な細胞増殖により過密な状態にある微小環境それ自体が、線維芽細胞の機能を大きく変化させ、滑膜炎病態の維持・悪化に寄与している可能性があると考え、本研究の申請に至った。

2. 研究の目的

細胞密度の変化が RA の病態に関連する炎症性サイトカイン産生、骨・軟骨破壊、浸潤能などの病的な線維芽細胞機能に重要であることを確認し、そのメカニズムについて解析し、実際の治療候補となる標的の検索と検討を行う。

3. 研究の方法

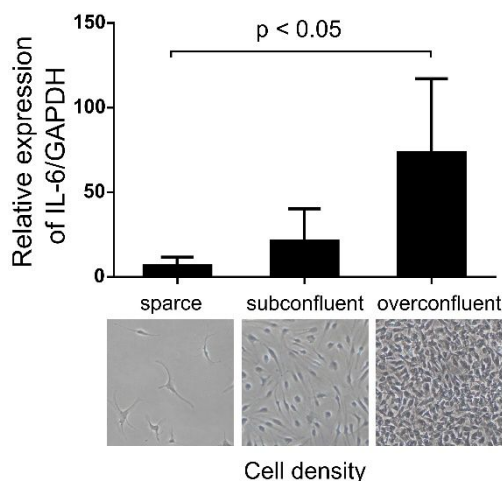
1) RA および変形性関節症(OA)患者から得た滑膜検体を用いて関節リウマチ滑膜線維芽細胞における細胞密度、形態の変化が RA において線維芽細胞が果たす病的機能にどのように寄与するかを検証し、2)細胞密度、形態の変化による線維芽細胞の機能の変化が起こるメカニズムを明らかにし、3)見出した標的に対する化合物や抗体を用いた治療が確かに関節炎の病態に重要であるかを関節炎モデルマウスに投与し明らかにする。

4. 研究成果

まず細胞間密度の変化による細胞密度の変化が滑膜線維芽細胞において重要であるかについて検証するため、細胞密度の変化が TNF- による RA 滑膜線維芽細胞の IL-6 の応答がどう変化するかを PCR で評価した。TNF- 刺激による paracrine 作用の影響を少なくするため刺激後 1 時間での IL-6 の mRNA を PCR で評価した(図 1、N=4、Friedman 検定)。線維芽細胞が重層化する高密度状態(overconfluent)、コンフルエントにならない程度(subconfluent)、細胞間の接着が見られない疎な状態(sparse)を比較すると、TNF- 刺激による IL-6 の mRNA は高密度な状態で疎な状態よりも有意に上昇した。刺激後 1 時間での変化でありタンパク合成を介した変化では説明しにくく、高細胞密度環境が細胞の状態に影響し TNF- への応答性の増強をもたらしたと

考えられた。

図1 IL-6 mRNA



一細胞毎の形態変化と細胞機能の評価を検討したものの、うまく実験系が成立せずコスト面でも追及が難しい状況であったため、発生学領域で細胞の形態、密度に影響を与えるシグナル経路として YAP/TAZ/TEAD 経路を中心に検討する方針とした。RA 滑膜線維芽細胞を $TNF\alpha/IL1\beta/IFN\gamma/TGF\beta$ (4mix) で刺激し、siRNA を用いたノックダウンし qPCR で評価したところ、特に TEAD1, TEAD3, TEAD4 を合わせてノックダウンした群で YAP/TAZ/TEAD シグナル下流の重要な分子である CTGF、ANKRD1、CCL2、CSF2 の発現が強く抑制された。

関節リウマチ滑膜線維芽細胞に対して汎 TEAD 阻害薬 K975 を添加し、RNA シークエンスを行った。TEAD 阻害薬の影響を受ける可能性のある重要な分子の同定を試みた。KEGG pathway 解析では特に細胞周期が最も抑制されていた。EdU アッセイおよびスクラッチアッセイでそれぞれ増殖能、遊走能が抑制された。

コラーゲン誘導関節炎に対して K975 を経口投与したところ、関節炎スコアの容量依存性の抑制効果を認めた(投稿準備中)。

今後はまず YAP/TAZ/TEAD 経路についてより詳細に検討を進め、将来的には滑膜線維芽細胞の高密度環境がほかのシグナル経路にどのような影響を与えるのかの検討を行うことで、線維芽細胞特異的な標的の探索のための研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田川 泰寛, 齋藤 鉄也, 岩井 秀之, 野田 聖二, 小宮 陽二, 山本 晃央, 遠藤 健太郎, 古賀 英之, 高原 康弘, 杉本 和隆, 関矢 一郎, 溝口 史高, 保田 晋助
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜線維芽細胞サブセットにおけるIL-6産生を抑制する転写因子の探索
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 元彦, 齋藤 鉄也, 小宮 陽仁, 中原 隆裕, 山本 晃央, 野田 聖二, 田川 泰寛, 高原 康弘, 杉本 和隆, 保田 晋助
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜線維芽細胞の病的サブセットに関連する転写因子の探索
3. 学会等名 第68回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------