

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21140

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける新規高分子Rabタンパク質の役割とその応用

研究課題名(英文) Role of a novel large Rab protein in rheumatoid arthritis and its application

研究代表者

小川 晃平(Ogawa, Kohei)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：80908533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチは自己免疫による関節破壊が起こる。主な原因は破骨細胞や免疫細胞の制御異常により惹起すると考えられている。我々は独自の研究から、破骨細胞や免疫細胞に発現する新規遺伝子Rab44を見出した。しかし、Rab44の生体内での機能は未だ明らかになっていない。本研究の目的は、関節リウマチにおけるRab44の役割を解明することである。そのためにRab44のノックアウトマウスを用いて、関節リウマチのモデル実験を行い、本マウスでの病態を解析した。本研究によって免疫細胞や破骨細胞での細胞内小胞輸送の新たな一面を解明し、予防・診断・治療への応用に繋げる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では破骨細胞や免疫系細胞にRab44が特異的に発現しているという我々の独自の知見を基盤にして関節リウマチへの応用を視野に入れた研究を展開している。Rab44の分子基盤の解明は破骨細胞の骨吸収機構や免疫細胞でのRab44の解明にとって有益な情報となるだけでなく、新しい骨代謝の予防・診断・治療薬への手掛かりになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis causes autoimmune joint destruction. The main cause is thought to be induced by dysregulation of osteoclasts and immune cells. Through our own research, we discovered a novel gene, Rab44, that is expressed in osteoclasts and immune cells. However, the function of Rab44 in vivo has not yet been elucidated. The purpose of this study is to elucidate the role of Rab44 in rheumatoid arthritis. For this purpose, we performed model experiments of rheumatoid arthritis using Rab44 knockout mice, and analyzed the pathology of these mice. Through this research, we will elucidate a new aspect of intracellular vesicle transport in immune cells and osteoclasts, leading to applications in prevention, diagnosis, and treatment.

研究分野：歯科薬理学、細胞生物学

キーワード：骨髄細胞 細胞内輸送 Rab44

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチは介護が必要となる疾患である

関節リウマチは自己免疫によって関節破壊が起こる炎症性疾患である。そのため上下肢の機能障害が起こり、日常生活動作や生活の質が低下することで、介護の対象となるために社会的負担が大きい疾患である。リウマチの病因は破骨細胞や免疫細胞の制御異常により惹起すると考えられているが、未だ十分に解明されておらず、発症の予防や根治的な治療法が無いのが現状である。厚生省の報告では60~100万人のリウマチ患者が推計されている。

(2) 破骨細胞での新規 Rab44 遺伝子の発見

私たちの研究グループでは破骨細胞の遺伝子群を独自に分析し、これまで報告されていない新規の Rab44 遺伝子を同定した(Yamaguchi et al. 2018)。Rab44 はヒトで 1021 個、マウスで 924 個 (Long form: L 型) と 725 個 (Short form: S 型) のアミノ酸から構成されている。他の Rab1 - 43 に比べて高分子量なのが特徴である。Rab44 の構造はオルガネラの係留に關与するコイルドコイルドメインと他のタンパク質と結合することができるプロリンリッチドメイン (PRD) さらにはカルシウム結合領域である EF ハンドモチーフが存在する Rab タンパク質は GTP 活性化型と GDP 不活性化型をサイクルとした分子スイッチとして機能する。

2. 研究の目的

Rab44 は分子量約 150kDa の高分子量 G タンパク質であり、構造的特徴としてアミノ末端に EF ハンドドメインやコイルドコイルドメインを持つ。しかし、これらのドメインの機能は明らかとなっていない。更に、これまでマウスに関する研究のみでヒトに関する Rab44 は全く報告されていない。本研究では、まずヒト Rab44 遺伝子の様々な欠失および点変異体を構築し、HeLa 細胞で過剰発現させて EF ハンドドメインやコイルドコイルドメインの機能に関して *in vitro* の解析を行った。

次に個体を用いた解析を行った。歯周病や関節リウマチは代表的な炎症性骨破壊疾患であり、破骨細胞や免疫細胞の制御異常により惹起する疾患である。そこで Rab44 欠損が炎症性骨破壊疾患である歯周病や関節リウマチにどの程度の影響を与えるかを明らかにすることを研究目的とした。そのために、*in vivo* の実験として歯周病および関節リウマチのモデル実験を行い、野生型マウスと Rab44 ノックアウトマウスでの病態を比較した。

3. 研究の方法

(1) ヒト Rab44 と変異体の細胞内局在機構

ヒト上皮細胞である HeLa 細胞に様々な Rab44 変異体を GFP 融合タンパク質としてレトロウイルスベクター発現システムを用いて発現させた。作製したのはヒト Rab44 野生型 (hWT)、EF ハンドドメイン欠損体 (h EF)、コイルドコイルドメイン欠損体 (h coil)、N 末端欠損変異体 (h826-1021)、Rab-GTPase 恒常不活性化型変異体 (hT847N)、Rab-GTPase 恒常活性化型変異体 (hQ892L)、C 末端脂質化修飾変異体 (hC1019A、hC1020A、hC1019/1020A) の合計 9 種類である。解析方法は Western blot 法、蛍光免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。細胞内オルガネラとの共局在は Pearson の相関係数を算出して解析した。

(2) 関節リウマチモデル実験

関節リウマチモデルの実験としては、コラーゲン関節炎による実験を行った。コラーゲン関節炎は II 型コラーゲンに対する自己抗体により惹起される慢性炎症性疾患である。具体的な方法として、II 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体カクテルをマウスに静脈投与し、さらに LPS を腹腔内投与して関節炎を誘導した。免疫後 4 週から関節炎が発症し、7-8 週で炎症のピークに達すると予想できた。このモデルを用いて、野生型と Rab44 欠損マウスの病態の比較を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト Rab44 と変異体の細胞内局在機構

各発現体のタンパク質レベルをウエスタンブロットティングで解析したところ、h826-1021、hT847N、hC1019A は、hWT に比べて発現レベルが低い事が分かった。

hWT はリング状構造を形成し、部分的にリソソームに局在し、小胞体にも一部局在した。hT847N

は主に細胞質に局在しており、一部リソソームや小胞体に局在していた。hQ892L はリング状構造を形成し、部分的にリソソーム、エンドソーム、形質膜、核にも局在した。hC1019A および hC1020A は大部分細胞質に検出され、ごく一部小胞体にも存在していた。hC1019/1020A は細胞質に検出され、核にも存在していた。h EF はリング状構造を形成し、部分的にリソソームに局在したが、その他のオルガネラとは共局在していなかった。h coil 及び h826-1021 はリング状の構造を形成し、大部分リソソームに局在した。

LysoTracker を用いたライブイメージング解析により、LysoTracker 陽性小胞の面積は、コントロール(Mock)に比べ、hWT 発現により大きくなることが分かった。更に、野生型の LysoTracker 陽性小胞の面積に比べて hT847N、hC1020A、h826-1021 では小さくなり、hQ892L、hC1019/1020A、h coil では大きくなり、hC1019A 及び h EF では変化しなかった(図1)

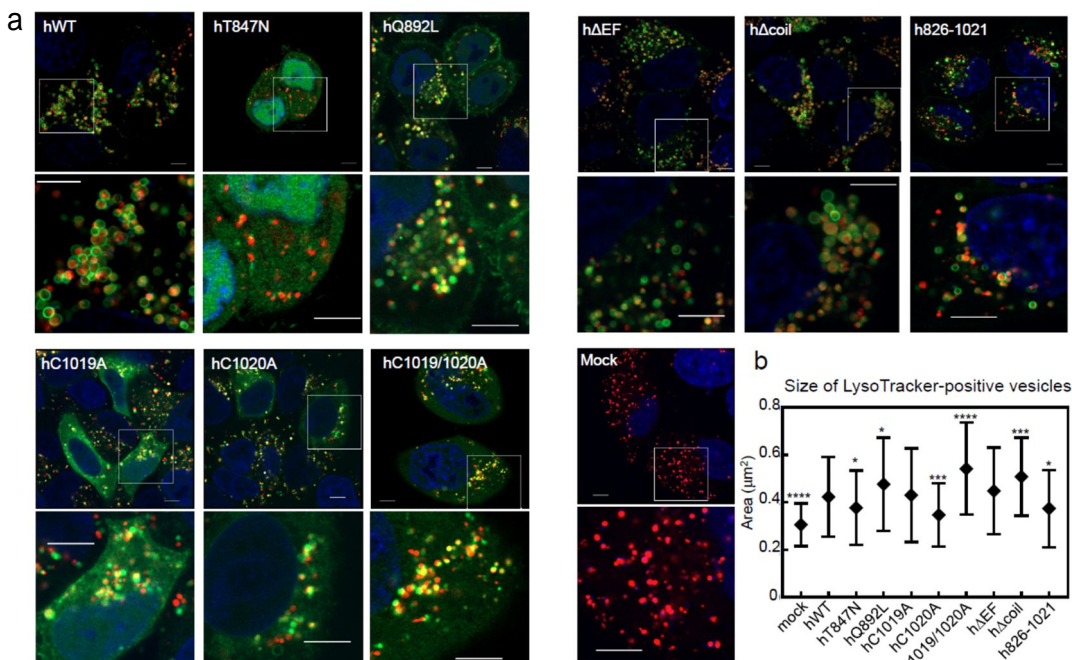


図 1. hWT および変異体を発現した HeLa 細胞における LysoTracker の細胞内局在 (a) LysoTracker-Red で処理した HeLa 細胞の共焦点レーザー顕微鏡分析(b) HeLa 生細胞内の LysoTracker 陽性小胞の大きさ

細胞内の Ca^{2+} 流入を惹起するイオノマイシン、タブシガルギン、ML-SA1 で処理を行ったところ、hWT は一部形質膜および細胞質への局在変化を起こし、リソソームとの共局在が減少した。変異体に関して調べてみると、イオノマイシン処理により、h coil も hWT と同様に一部形質膜および細胞質への局在変化を起こした。しかし同じ条件下で、hT847N、hQ892L、h EF および h826-1021 の局在は変化しなかった。

ヒト Rab44 遺伝子に関して、HeLa 細胞に hWT 及び種々の変異体を発現させることで局在とオルガネラ形成について解析を行った。今回の結果をまとめると、脂質化修飾変異体は膜への結合が弱まり、細胞質への局在化が顕著になった。EF ハンドドメインが欠損する変異体では、 Ca^{2+} 流入により、hWT に比べて形質膜や細胞質へ局在変化が殆ど起こらなかった。コイルドコイルドメインが欠損する変異体では、hWT に比べてリソソームへの局在化が増大し、LysoTracker 陽性小胞の大きさが変化した。従って、EF ハンドドメインは Ca^{2+} 流入による局在変化に必要であり、コイルドコイルドメインは局在化やオルガネラ形成に重要であることが示された。

(2) Rab44 欠損マウスでの関節リウマチモデル実験

関節リウマチモデルについて実験を行った。II 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体カクテルをマウスに静脈投与して関節炎を誘導したところ、野生型と Rab44 欠損マウス共に関節炎が認められた。しかし、野生型に比べて Rab44 欠損マウスの炎症の程度は低い傾向にあった。現在、関節部分の病理組織学的解析を行っており、詳細な結果については検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------