

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25年 5月20日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591088

研究課題名（和文） リウマチ滑膜炎特異的に発現する新規滑膜増殖因子SPACIA1に関する研究

研究課題名（英文） Study of novel factor, SPACIA1 which is expressed in synovial tissue in rheumatoid arthritis.

研究代表者

藤井 亮爾 (FUJII RYOJI)

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：10333535

研究成果の概要（和文）：当研究室で見出したリウマチ滑膜炎に伴って発現する新規因子 SPACIA1 について、まず SPACIA1 遺伝子のコアプロモーターを同定した。このプロモーターに結合する転写因子の検出系を確立し精製、同定を試みている。また SPACIA1 が G1 期細胞周期因子 CDK6 の遺伝子発現に関わることを見出した。さらに SPACIA1 遺伝子改変マウスをもちいて SPACIA1 が関節炎の増悪因子であり、原因因子では無いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Recently we identified a novel factor SPACIA1 associated with synovitis. In this study we identified a core promoter of SPACIA1 gene. We have been trying purification and identification of transcriptional factor that bound the core promoter. We also discovered that SPACIA1 related a G1 phase-cell cycle factor (CDK6) gene expression. Using SPACIA1 transgenic mouse, we showed SPACIA1 is a disease-modifying, but not causal, factor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：リウマチ学

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは比較的若年に発症し、四肢関節の破壊により関節機能が廃絶する。その結果、生活の質（QOL）が著しく損なわれる。発症頻度も 0.5% から 1% と高頻度の疾患であり、多くの症例が難治性で慢性・進行性に経過するため社会的影響も大きく、早急な根治的治療法の開発が望まれている。また関節リウマチの治療は、免疫抑制作用を持つ薬剤による炎症コントロールが主であり、近年脚

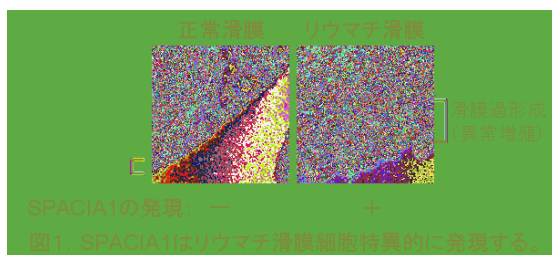
光を浴びているサイトカイン阻害療法などの生物学的製剤も大きな効果をあげている。しかしながらその副作用として重篤な感染症や発癌のリスクが報告されており、また大規模臨床試験からも明らかなように、約 3 割の患者では十分な治療効果が得られていない。関節リウマチは多因子疾患であるため個々の患者に適した治療法の選択が必須であり、副作用の少ない新規な作用点をもつ治療薬の開発が求められている。

関節リウマチは、慢性的な炎症、異常な免疫、滑膜の過形成といった主な病態が複雑に絡み合っている。正常関節部位では1層から数層の滑膜細胞からなる膜が関節腔を包んでいるが、リウマチになると滑膜細胞が異常に増殖して重層化がおり（図1）、様々な炎症性サイトカインを分泌することが報告されている。申請者らはこの滑膜細胞増殖を標的とした薬剤の開発も行っていたが（中島、藤井ら、特開 2002-293745）、滑膜細胞の異常増殖に関しては意外なほど分かっていることが少なく、滑膜増殖を標的とした薬剤開発の成功例もまだ無い。そこで申請者らはリウマチ滑膜炎の理解を目指し、まず端緒となる分子を同定した。

リウマチの動物モデルであるコラーゲン誘導関節炎マウスの膝関節において過剰発現し、既存の薬剤によって発現抑制可能な遺伝子としてマウス全遺伝子から 81 遺伝子を同定し、さらにアンチセンス DNA や siRNA を用いた各遺伝子の発現抑制により培養滑膜細胞の増殖に関与する遺伝子の候補を絞り込んだ。その中の機能未知な新規遺伝子に SPACIA1 (Synovocyte Proliferation-Associated in Collagen-Induced Arthritis 1) と名付け、以下のことをすでに明らかにした。①リウマチ性疾患患者の滑膜組織において SPACIA1 は滑膜過形成部位特異的に発現誘導が認められた（図1）。②siRNA による SPACIA1 発現抑制は TNF- α 誘導性の滑膜細胞増殖を阻害した。③コラーゲン誘導性関節炎モデルにおいて SPACIA1 過剰発現マウスは野生型マウスに比べ早期に発症し、また重症化した（図2）。以上のように網羅的なスクリーニングの結果得られた機能未知分子 SPACIA1 が疾患に関連 (disease-associated factor) し疾患モデルを重篤化する (disease-modifying factor) ことを示した。このことは創薬標的分子としての高いポテンシャルを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点について明らかにすることを目的とする。①「新規滑膜細胞増殖因子 SPACIA1 の発現制御メカニズム」—まず SPACIA1 遺伝子プロモーターのコア領域を特定し、そこに結合する転写因子を同



定する。将来的に転写因子からシグナルをさかのぼり、リウマチ滑膜の異常増殖を引き起こす滑膜炎マスター因子の同定を目指す。②「SPACIA1 による滑膜細胞増殖制御メカニズム」—SPACIA1 結合因子を分子生物学的手法により同定し、その結合因子から機能を類推し実証する。③「SPACIA1 は関節リウマチの原因因子か？」—SPACIA1 ノックアウト (KO) マウスに対してコラーゲン誘導関節炎モデルを適用し、SPACIA1 の発現が関節炎の原因か否かを明らかにする。

3. 研究の方法

①「新規滑膜細胞増殖因子 SPACIA1 の発現制御メカニズム」

SPACIA1 遺伝子の第1エクソン内にある翻訳開始点から上流 5kbp のプロモーター領域をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) の上流にクローン化し、さらにこのプロモーター領域を部分的に欠損させたコンストラクトを作製した。レポーターアッセイ法によりコアプロモーター活性のある領域を特定した。コアプロモーター領域の配列より既知転写因子の結合配列を検索し、可能性のある配列について塩基置換により変異を導入して転写因子の結合配列を明らかにした。次にこの配列をプローブとしたゲルシフトアッセイ法により標的とする転写因子複合体の結合を検出し、生化学的に精製、質量分析機による転写因子複合体の同定を試みた。

②「SPACIA1 による滑膜細胞増殖制御メカニズム」

SPACIA1 が直接結合する因子を Yeast two-hybrid 法によりスクリーニングした。次にイオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて生化学的手法により SPACIA1 複合体の精製をおこない、その精製画分を質量分析器によりショットガン解析をおこなった。さらに SPACIA1 の siRNA を用いて培養滑膜細胞の遺伝子発現解析を DNA アレイにより網羅的に解析した。SPACIA1 がその発現制御に関わる細胞増殖因子を特定しその制御をリアルタイム PCR 法にて確認した。

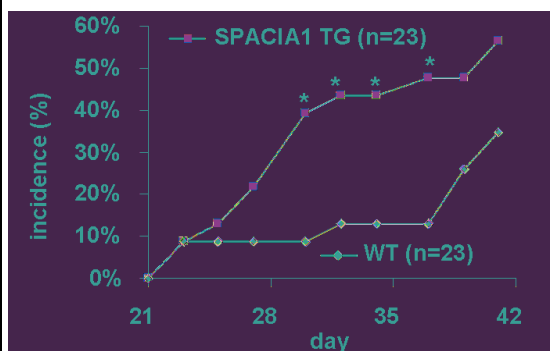


図2. SPACIA1過剰発現マウス(TG)はコラーゲン誘導関節炎を早期に発症し、より重篤化する。

③ 「SPACIA1 は関節リウマチの原因因子か？」

C57BL/6 系統の SPACIA1 KO マウスをコラーゲン誘導関節炎 (CIA)モデルに適した DBA1J 系統へ 10 世代戻し交配した。その後 CIA を適用し、3 週間発症率と重傷度を観察した。観察終了後、関節の組織染色を行なった。

4. 研究成果

① 「新規滑膜細胞増殖因子 SPACIA1 の発現制御メカニズム」

滑膜炎に伴って発現する SPACIA1 の遺伝子発現機構を解明するために、まず SPACIA1 遺伝子のコアプロモーターを同定した (図 3)。SPACIA1 転写開始点の近位にコアプロモーターが存在し、1 次配列上 NF- κ B 結合部位様の配列が認められた。この配列を欠損するプロモーターや塩基置換変異体 (m κ BL) はそのプロモーター活性がほぼ消失した。しかしながら、NF- κ B を活性化するサイトカインや NF- κ B 阻害剤はこのコアプロモーターにほとんど作用しなかった。以上より、NF- κ B の作用は認められなかったが、同定した SPACIA1 遺伝子コアプロモーター上の NF- κ B 結合部位様の配列が、主要な転写因子の結合部位であることが明らかとなった。

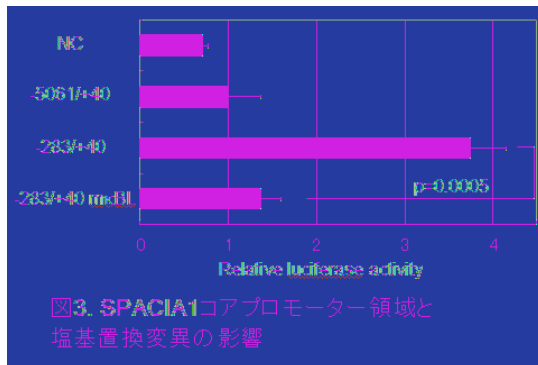


図3. SPACIA1コアプロモーター領域と塩基置換変異の影響

次にこの主要な転写因子複合体を同定するためゲルシフトアッセイ法による検出系を確立した (図 4)。同定した結合配列をプローブとして転写因子複合体のバンドが検出され、塩基置換変異を含むプローブ (m κ BL) ではこのバンドが消失した。特異的な検出系が確立できたので、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いてリウマチ滑膜細胞の核抽出タンパクから目的の転写因子複合体の精製を行ない、最後に結合配列を固定化したアフィニティーカラムの吸着面分を質量分析器により解析した。その結果、55 種類のタンパク質が同定され、その中に 7 種の DNA 結合因子が認められた。今後、この 7 種について機能的な側面から真の転写因子を特定していく。

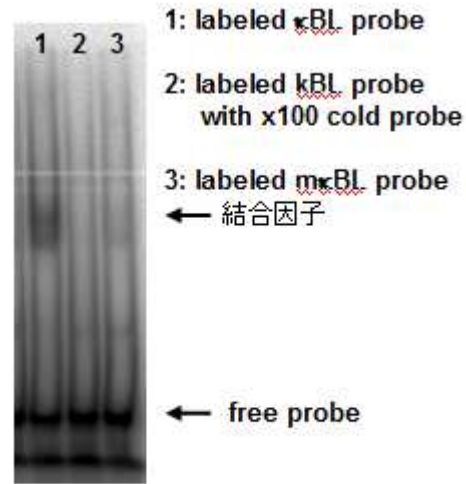


図4. ゲルシフト法によるプロモーター結合因子の検出

② 「SPACIA1 による滑膜細胞増殖制御メカニズム」

SPACIA1 による滑膜細胞増殖の制御を分子レベルで明らかにするために、まず SPACIA1 が直接結合する因子を Yeast two-hybrid 法により特定することとした。その結果、ジンクフィンガータンパクなどいくつかの転写因子や転写後調節に関わる因子が得られ、SPACIA1 は細胞増殖に関わる遺伝子の発現を制御すると予想された。しかしながら数十の結合因子が得られ、この手法のみでは真の結合因子を同定することができなかった。次に生化学的手法により SPACIA1 複合体の精製を試みた。培養滑膜細胞の核抽出タンパク質をイオン交換カラム、ゲル濾過カラムで精製した。その後のアフィニティー精製で決め手が無く、ゲル濾過カラム後の画分を用いて質量分析器による解析を行ったが 100 を超えるタンパク質が検出された。しかも前述の Yeast two-hybrid 法で得られた因子との重複もなく結合因子を絞り込むことはできなかった。一方で SPACIA1 が細胞周期因子 CDK6 mRNA の安定性に関わっていることを見出した (図

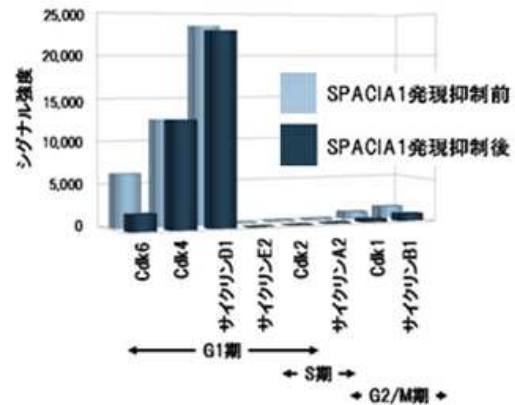


図5. SPACIA1が関わる細胞周期因子の発現制御

5)。まず CDK6 mRNA 上に SPACIA1 複合体が存在するかを明らかにし、その場合 mRNA の結合配列を特定して、そのオリゴ RNA を用いたアフィニティー精製を行っていく予定である。

③「SPACIA1 は関節リウマチの原因因子か？」

リウマチ動物モデルの1つである CIA を用いて SPACIA1 遺伝子の役割をしらべるため、まず SPACIA1 KO マウスを CIA に適した DBA1/J 系統へ戻し交配を行なった。この SPACIA1 KO マウスに CIA を適用したところ、野生型マウスに比較して若干症状が軽い傾向も見られたが有意差は認められず関節炎が発症した。組織染色においても野生型マウスと同様に滑膜組織の重層化が認められた。SPACIA1 過剰発現マウスの結果から SPACIA1 が関節炎の増悪因子であることは明らかであるが、今回の KO マウスの結果より関節炎の発症に必須の原因因子ではないことが明らかとなった。このことは関節炎を悪化させる原因が SPACIA1 の上流ではなく下流にあることを示している。今回明らかとなった下流因子である CDK6 の解析に今後特に注力していきたい。

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5件)

- ① Fujii R, Komatsu R, Sato T, Yagishita N, Aratani S, Araya N, Nishikawa H, Yamano Y, Yudoh K, Beppu M, Nishioka K, Nakajima T, Analysis of a Core Promoter Context of Synovocyte Proliferation- Associated in Collagen Induced Arthritis 1 (SPACIA1) Gene Associated with Synovitis. J St. Marianna Univ. 査読有り、2012;40(2):51-56.
DOI, URL: なし
- ② Sato T, Fujii R, Konomi K, Yagishita N, Aratani S, Araya N, Aono H, Yudoh K, Suzuki N, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T. Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a newly identified gene that is involved in synovocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. Arthritis Rheum. 査読有り、2011;63(12):3833-42.
DOI: 10.1002/art.30617.

[学会発表] (計5件)

- ① 小松梨恵、滑膜炎関連因子 SPACIA1 によ

る CDK6 発現調節機構の解析、日本臨床免疫学会 Midwinter seminar 2013 (口演)、2013年3月2日、ANA インターコンチネンタル万座ビーチホテル (沖縄県)

- ② 藤井亮爾、Analysis of a core promoter context of SPACIA1/SAAL1 gene which is related to synovitis、日本リウマチ学会、2012年4月26日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)
- ③ 藤井亮爾、A newly identified gene, SPACIA1, that is related to synovitis、Tokyo-Shanghai Workshop on Rheumatology 2011 (招待講演)、2011年11月13日、ヒルトン東京ベイホテル (千葉県)
- ④ 藤井亮爾、リウマチ滑膜新規増殖因子 SPACIA1 のプロモーター解析、日本炎症・再生医学会、2011年6月3日 京都国際会館 (京都府)
- ⑤ 藤井亮爾、リウマチ滑膜炎特異的に発現する新規滑膜増殖因子 SPACIA1、日本リウマチ学会、2010年4月24日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

<http://nanchiken.jp/shindan/achievement/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 亮爾 (FUJII RYOJI)

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: 10333535

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山野 嘉久 (YAMANO YOSHIHISA)

聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・准教授

研究者番号: 80445882

佐藤 知雄 (TOMOO SATO)

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: 30387063

(4) 研究協力者

小松梨恵 (KOMATSU RIE)

聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・研究技術員

研究者番号: 80517475