

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 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591685

研究課題名（和文）

関節リウマチにおける直鎖状ポリユビキチン化による新規NF- κ B活性化機序の解明研究課題名（英文） Novel activation pathway of NF- κ B via LUBAC in patient with rheumatoid arthritis

研究代表者

富田 哲也 (TOMITA TETSUYA)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30283766

研究成果の概要（和文）：

関節リウマチ患者(RA)の培養滑膜細胞でのLUBACの発現を確認するため、採取した滑膜組織のLUBAC(HOIP/HOIL-1L)の免疫染色を行った。対照群には変形性関節症(OA)の患者とした。HOIP/HOIL-1LはRA患者群・OA患者群共に炎症性滑膜における広範な発現を認め、さらにRA患者群でHOIP、HOIL-1L共に高い発現傾向を示した。関節リウマチ患者(RA)の血液および骨髄中の単核球分画でのHOIP/HOIL-1Lの発現は、RA患者群・OA患者群共にHOIP/HOIL-1Lの発現を認め、HOIPはRA患者群でより高い発現を示したが、HOIL-1Lでは疾患群間での差は認めなかった。さらに骨髄液における結果は、HOIP/HOIL-1Lは共にRA患者群で高い発現を示した。また下流シグナル(I-CAM、V-CAM)についても同様にRA患者群で高い傾向を示した。以上の結果からRAの炎症におけるNF- κ B経路の活性化過程において、そのmaster regulatorであるHOIP/HOIL-1Lの発現はRA患者の滑膜細胞および骨髄単核球において有意に高いことが示された。これら事実から本研究はRAの病態解明に資する研究であると同時にHOIP/HOILがRAにおける治療標的となり得ることを示唆し、RAの新たな治療戦略としての展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the expression of LUBAC in patients with rheumatoid arthritis. OA samples were used as control in this study. Both in RA and OA synovium, the expression of LUBAC (HOIP/HOIL-1L) was confirmed using immuno-histochemistry. The expression in RA was up-regulated compared to OA. Furthermore, the expression of LUBAC (HOIP/HOIL-1L) was confirmed in the serum of both RA and OA patients. The expression in RA was significantly higher compared to OA. The results in this study suggested that the expression of HOIP/HOIL-1L may play an important role in the activation pathway of NF- κ B in patients with rheumatoid arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：arthritis, inflammation, NF kappa B, LUBAC

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は世界中で人口の 0.5-1.0% という高率の発症を認め、日本でも 70 万人以上の患者が存在する。重度の関節機能の低下をきたし、その障害を防止する治療法の開発は社会的にも急務である。近年では抗体療法に代表される生物学的製剤が注目されており、従来の抗 RA 剤では期待できなかった骨・関節破壊の進行を抑制する可能性が示唆されているが、有効率 (60%) や重篤な副作用の出現頻度が高いこと、患者の経済的負担など、まだまだ問題点が山積しているのが現状である。RA の腫脹関節内では異常な滑膜増殖が生じ、炎症性サイトカイン、接着因子、MMP などが産生され、局所の関節破壊に重要な役割を果たしている。増殖滑膜より産生される炎症因子の発現には転写調節因子 nuclear factor- κ B (NF κ B) が密接に関与していることが明らかにされており、また一方 RA 滑膜細胞の異常増殖のメカニズムとして細胞周期を調節する p53 の mutation が認められている (Firestein GS, Proc Natl Acad Sci USA, 1997)。我々は RA 滑膜細胞増殖には細胞周期の制御において重要な役割を果たす E2 promoter binding factor (E2F) の関与を見だし (Tomita T, Arthritis Rheum, suppl, 1999) さらに細胞を G1 停止期に誘導する p21 遺伝子導入により関節破壊が抑制されることを示してきた (Tomita T, Arthritis Rheum, suppl, 2000)。我々はこれら転写調節因子 NF κ B、E2F の結合部位への結合を阻害するおとり型核酸医薬 (デコイ) を開発し、NF κ B に対するデコイ型核酸医薬の関節破壊抑制効果についてはすでに明らかにした。(Tomita T, Arthritis

Rheum, 1999, Rheumatology, 2000, Curr Drug Targets, 2003, Jpn J Clin Immunol 2009)。

近年、NF κ B 経路の制御には直鎖状ポリユビキチン化という新たなユビキチン修飾系が関与していることが明らかになった。そして HOIL-1L と HOIP からなる RING 蛋白質複合体 LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) がユビキチンの N 末端 α -NH₂ 基を介する直鎖状ポリユビキチン鎖という、まったく新しいユビキチン鎖を生成するユビキチンリガーゼとして同定された。さらにこの LUBAC ユビキチンリガーゼは NEMO (NF- κ B essential modulator) を直鎖状ポリユビキチン化することで古典的 NF- κ B 経路を活性化することが明らかとなった。(Kirisato, T. et al., EMBO J. 2006/Tokunaga, F, et al., Nature Cell Biology 2009/Iwai, K. et al., EMBO R. 2009) この新規 NF- κ B シグナル伝達経路における LUBAC の機能は RA の病態においても重要な役割を担う予想され、LUBAC の制御は治療上のターゲットとなりうると思われる。

そこで本研究は RA 患者において、LUBAC を介した新規 NF- κ B シグナル伝達経路の機能を解明し、リウマチ治療のターゲットとして NF κ B 経路における LUBAC の制御を検討することを目的としている。LUBAC の制御を目的とした治療法が確立されればこれを機に整形外科領域難治性疾患である関節リウマチに対する治療は画期的な新展開を見せると考えられる。本研究では RA の関節破壊機序に関する基礎的研究成果を基に、整形外科領域で問題となっている既存の治療法では対

処できない関節破壊の予防を行い臨床の場へ実現させることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は関節リウマチにおけるLUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) の発現と機能の解明である。また関節リウマチ治療のターゲットとして、LUBACを介した新規NF- κ Bシグナル伝達経路によるNF- κ Bの制御が病態に与える影響を検討することを目的としている

3. 研究の方法

(1) ヒトRA滑膜組織、滑膜細胞でのLUBACの発現と機能を解析する。In vitroで培養滑膜細胞に遺伝子工学的手法を用いて、LUBACの過剰発現または抑制を行い、NF- κ B活性、細胞増殖、細胞周期、炎症性サイトカイン、MMPの産生について遺伝子、蛋白レベルで検討する。ヒトRA骨髄および血液細胞においてもLUBACの発現を解析する。ヒトや齧歯類の骨髄細胞よりの破骨細胞誘導系において、LUBAC制御が与える影響についても解析する。

(2) 関節炎モデル動物の関節局所

HOIL-1L ノックアウトマウスはNF κ B活性が著しく低下している。(Tokunaga, F, et al., Nature Cell Biology 2009) このマウスに抗タイプIIコラーゲンモノクローナル抗体カクテルおよびLPSを播種し、コラーゲン関節炎における関節炎スコア、組織学的評価およびX線学的評価を行う。また各組織におけるリウマチ関連蛋白の発現の解析も行う。

4. 研究成果

人工膝関節置換術を行った際に膝関節滑膜組織を採取しサンプルの収集を進めた。関節リウマチ患者(RA)の培養滑膜細胞でのLUBACの発現を確認するため、採取した滑膜組織のLUBAC (HOIP/HOIL-1L) の免疫染色を行った。対照群には変形性関節症(OA)の患者とした。HOIP/HOIL-1LはRA患者群・OA患者群共に炎症性滑膜における広範な発現を認め、さらにRA患者群でHOIP、HOIL-1L共

により高い発現傾向を示した。関節リウマチ患者(RA)の血液および骨髄中の単核球分画でのHOIP/HOIL-1Lの発現を確認するため、採取した血液および骨髄から蛋白抽出を行いwestern blot analysisによる発現解析を重ねた。対照群を変形性関節症(OA)とした。血液における発現解析からは、RA患者群・OA患者群共にHOIP/HOIL-1Lの発現を認め、HOIPはRA患者群でより高い発現を示したが、HOIL-1Lでは疾患群間での差は認めなかった。さらに骨髄液における結果は、HOIP/HOIL-1Lは共にRA患者群で高い発現を示した。また下流シグナル(I-CAM、V-CAM)についても同様にRA患者群で高い傾向を示した。以上の結果からRAの炎症におけるNF- κ B経路の活性化過程において、そのmaster regulatorであるHOIP/HOIL-1Lの発現はRA患者の滑膜細胞および骨髄単核球において有意に高いことが示された。これら事実から本研究はRAの病態解明に資する研究であると同時にHOIP/HOILがRAにおける治療標的となり得ることを示唆し、RAの新たな治療戦略としての展開が期待できる。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① Moriguchi Y, Zhang DW, Shiba T, Kunugiza Y, Yoshikawa H, Asamori C, Tomita T; A novel peptide inhibiting the binding between C1q and immunoglobulin ameliorates joint destruction in rats with collagen-induced arthritis. Spotlight session (口頭発表);2013年1月25日サンアントニオ(米国)、米国整形外科研究学会(ORS)、

- ② Moriguchi Y, Zhang DW, Shiba T, Kunugiza Y, Yoshikawa H, Tomita T A novel peptide inhibiting the binding between C1q and immunoglobulin ameliorates joint destruction in rats with collagen-induced arthritis. (口頭発表);2012年11月12日、ワシントンDC(米国)、米国リウマチ学会(ACR)
- ③ 富田哲也、森口悠、Zhang DW、梶座康夫、朝森千永子、吉川秀樹
コラーゲン誘導関節炎ラットにおける C1q-IgG 結合阻害ペプチドの治療効果
第 33 回日本炎症・再生医学会、
平成 24 年 7 月 5 日、福岡
- ④ 富田哲也、森口悠、梶座康夫、徳永文稔、岩井一宏、吉川秀樹；関節リウマチにおける NF κ B 活性化経路の新規ユビキチンリガーゼ LUBAC の発現 第 32 回日本炎症・再生医学会、平成 23 年 6 月 3 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 哲也 (TOMITA TETSUYA)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号：30283766

(2) 研究分担者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60191558
岩井 一宏 (IWAI KAZUHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60252459
梶座 康夫 (KUNUGIZA YASUO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60507193