

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10日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22790929

研究課題名（和文） 増殖因子シグナルの制御による関節リウマチ治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel therapeutic method for rheumatoid arthritis by targeting growth factor signaling

研究代表者 三枝 淳 (SAEGUSA JUN) 神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：20514970

研究成果の概要（和文）：

研究代表者らが提唱したインテグリンと増殖因子受容体の”two-receptor”モデルに関して、増殖因子とインテグリンとの直接結合から始まるシグナルによって制御されている分子とその滑膜細胞における機能を明らかにするために研究を行い、以下の知見を得た。

1. 野生型 FGF1 は培養 RA 滑膜細胞の増殖を誘導し、アポトーシスを抑制したが、インテグリン非結合 FGF1 変異体 FGF^{R50E} はそれらの作用を示さなかった。
2. 増殖因子刺激による EGR-1 の発現にはインテグリンシグナルが必須であり、EGR-1 は滑膜細胞において抗アポトーシス蛋白として働いている。

研究成果の概要（英文）：

FGF and IGF are of interest in the initiation and development of RA synovial hyperplasia. We recently demonstrated that FGF1 binds directly to integrin $\alpha v \beta 3$, and that an integrin-binding-defective FGF1 mutant (FGF^{R50E}) cannot induce cell proliferation; this is also true for IGF1. Here we investigated how the growth factor-integrin interaction is involved in growth factor signaling. The cDNA microarray analysis showed markedly reduced EGR-1 mRNA expression in the FGF^{R50E}-treated RA synoviocytes, compared to wild-type FGF1-treated cells. EGR-1 mRNA and protein were rapidly induced in RA synoviocytes in response to FGF1 or IGF1, but the EGR-1 expression was significantly impaired in FGF^{R50E}- or IGF^{R36E/R37E}-treated synoviocytes. The down-regulation of EGR-1 by siRNA facilitated the apoptosis of synoviocytes treated with H₂O₂ or etoposide.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：インテグリン、増殖因子、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、関節滑膜の慢性炎症とその結果生じる滑膜細胞の異常増殖に特徴づけられる自己免疫疾患である。滑膜が異常に増殖して形成された肉芽腫様の病変は

パンヌスとも呼ばれ、骨や軟骨に浸潤して関節を破壊し、重大な機能傷害を招く。従って、滑膜細胞の異常活性化と過増殖を制御することは RA の制圧を目指す上で極めて重要である。
線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、炎症性増殖因

子(pro-inflammatory growth factor)とも呼ばれ、RAにおいて滑膜細胞の異常増殖を引き起こす因子として注目されている。実際、RA患者の滑膜細胞ではFGFの発現が亢進しており、その発現レベルが滑膜増殖の程度と相関することが報告されている(Arthritis Rheum. 43(10):2152, 2000)。さらに、FGFに加えて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やインスリン様成長因子(IGF)といった増殖因子も、細胞増殖促進作用、抗アポトーシス作用、さらには血管新生促進作用といった機能を有しており、RAの病因病態と深くかかわっている(Clin Chim Acta. 375(1-2):10, 2007 Review)。これらの増殖因子は、それぞれ固有の受容体と結合して細胞内にシグナルを伝達して機能を発揮する。インテグリンは細胞表面タンパク質のひとつで、 α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーである。当初は細胞外マトリックスへの細胞接着に關与する細胞接着分子と考えられていたが、その後インテグリンが細胞外から細胞内への情報伝達にも關与していることが明らかとなり注目されている。研究代表者らはコンピューターを用いた結合シミュレーションから、急性期タンパクの一つである分泌型ホスホリパーゼ A2 group IIA (sPLA2-IIA)がインテグリンに結合するという仮説を得た。そして実際にインテグリン $\alpha v \beta 3$ 及び $\alpha 4 \beta 1$ がPLA2-IIAの受容体として機能していることを発見した。さらに、研究代表者らは上述の結合シミュレーションを用いて、FGF1もまたインテグリン $\alpha v \beta 3$ に結合するという仮説を得た。ただしFGFの場合は、受容体が不明であったPLA2-IIAのケースとは異なり、既にFGF受容体(FGFR)の存在が知られていた。そこで、同シミュレーションに基づいてFGF1のインテグリン結合部位に点突然変異(point mutation)を挿入して、FGFRには結合するがインテグリンには結合しないFGF1変異体(インテグリン非結合FGF1変異体)を作成して実験を行った。すると興味深いことに、この「インテグリン非結合FGF1変異体」はFGFRに結合するにもかかわらず、細胞の増殖/遊走を全く誘導しなかった。従って、FGF1が機能を発揮するためには、FGFRとの結合に加えて同時にインテグリンにも結合することが必須であることが明らかとなった。加えて、我々は別の増殖因子であるIGF1についても、IGF受容体への結合と同時にインテグリンにも結合することがその機能発揮に必須であることを明らかにした。これらの一連の成果から、研究代表者らは従来1対1と考えられていた増殖因子とその受容体の結合に加え、インテグリンもまた同時にリガンドである増殖因子に結合してその共受容体(co-receptor)として働くという

“two-receptor”モデルを提唱した。

2. 研究の目的

上記の“two-receptor”モデルは全く新しい概念であり、そのような報告は我々を除いて全くなされていない。この成果をふまえ、今回研究代表者らは、インテグリンからのシグナルがどのように増殖因子固有の受容体からのシグナルと細胞内でクロストークしているのかを明らかにしたいと考えた。そして、増殖因子とインテグリンとの直接結合から始まるシグナルによって発現が制御されている分子(群)を網羅的解析によって明らかにし、滑膜細胞におけるその分子(群)の役割を解明することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) インテグリン非結合増殖因子変異体の細胞増殖に対する効果の検討

RA患者の滑膜切除術の検体からヒトRA滑膜細胞を分離培養する。そして、その滑膜細胞を野生型FGF1あるいはインテグリン非結合FGF1変異体FGF^{R50E}で刺激した後の細胞増殖を検討する。さらに、両者のアポトーシスに対する効果の相違を解析する。

(2) 「インテグリン非結合増殖因子変異体」からの細胞内シグナルの解析

ヒトRA滑膜細胞に野生型FGF1あるいはインテグリン非結合FGF1変異体FGF^{R50E}を滑膜細胞に添加し、細胞内シグナルの違いをcDNA microarray法、real-time PCR法、およびイムノブロットング法にて検討する。さらに、FGF以外の増殖因子についてもインテグリン非結合変異体を作成し、同様の検討を行う。この解析により、インテグリンが増殖因子との結合によりどのようなシグナルを細胞内に伝達しているのかを明らかにする。

(3) インテグリンシグナルによって制御されている分子の滑膜細胞における機能の解析

上記検討によりインテグリンシグナルによって制御されていることが判明した分子をsiRNA法によって低発現させた培養滑膜細胞を作成する。そしてその細胞の機能を解析することにより、その分子の滑膜細胞における役割を明らかにする。

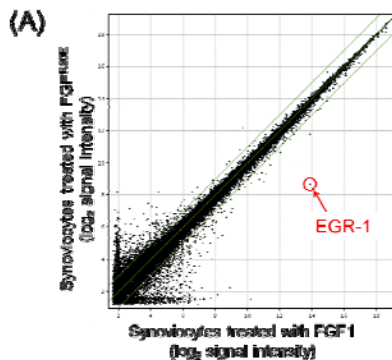
4. 研究成果

(1) serum-starvation を行ったヒト RA 滑膜細胞に野生型 FGF1 あるいはインテグリン非結合 FGF1 変異体 FGF^{R50E} を添加して培養したところ、FGF1 は滑膜細胞を増殖させたが、FGF^{R50E} は増殖を誘導しなかった。さらに、野生型 FGF1 は滑膜細胞のアポトーシスを抑制したが、FGF^{R50E} はアポトーシスを抑制しなかった。

(2) 野生型 FGF1 と FGF^{R50E} で刺激した滑膜細胞の細胞内シグナルを解析したところ、野生型 FGF1 は、ERK の持続的活性化を誘導したが、FGF^{R50E} は ERK を一時的に活性化したものの、その活性化状態を維持できなかった。

(3) FGF1 とインテグリンとの結合から始まるシグナルによって制御されている分子を明らかにするために、野生型 FGF1 あるいはインテグリン非結合 FGF1 変異体 FGF^{R50E} をそれぞれ培養 RA 滑膜細胞に添加し、time course をとって RNA を回収して cDNA microarray による解析を行った。野生型 FGF1 で刺激した滑膜細胞と、インテグリン非結合 FGF1 変異体 FGF^{R50E} で刺激した滑膜細胞との遺伝子発現を網羅的に解析して比較したところ、刺激 6 時間後に、転写因子である early growth response-1 (EGR-1) の発現が、FGF^{R50E} で刺激した細胞では明らかに低いことを発見した (図 1)

図 1

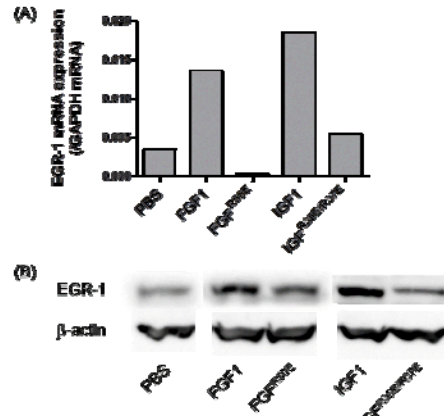


さらに real-time PCR 法及び Western blot 法にて FGF1 刺激あるいは FGF^{R50E} 刺激を受けた滑膜細胞の EGR-1 の発現を解析した。すると、FGF^{R50E} で刺激された滑膜細胞は、野生型 FGF1 で刺激された細胞に比べて、EGR-1 の発現が mRNA 及びタンパクの両方のレベルで大きく低下していた (図 2)。

そして、別の増殖因子であるインスリン様成長因子 1 (insulin-like growth factor-1; IGF1) についても、FGF1 と同様にインテグリン非結合 IGF1 変異体 IGF1^{R36E/R37E} を作成し、野生型および同変異体で刺激された RA 滑膜

細胞の EGR-1 発現を解析した。すると、やはり FGF1 の場合と同様に、インテグリン非結合 IGF1 変異体 IGF1^{R36E/R37E} で刺激された細胞では、野生型 IGF1 で刺激された細胞に比して、EGR-1 の発現が mRNA およびタンパクレベルの両方で大きく低下していた (図 2)。

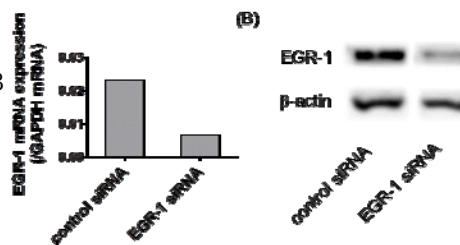
図 2



これらの結果から、滑膜細胞における EGR-1 の発現は、FGF や IGF とその固有の受容体である FGF 受容体や IGF 受容体との結合ではなく、増殖因子とインテグリンとの結合から始まるシグナルによって制御されていることが明らかとなった。

(5) EGR-1 は、Zn フィンガードメインを有する初期応答性の転写調節因子であり、増殖因子やストレス刺激で早期に誘導されることが知られている。EGR-1 は細胞増殖や細胞周期の制御に関与しており、動脈硬化や血管新生に関わっていることが示されている。また、EGR-1 は細胞の種類によって、プロアポトーシス、あるいは抗アポトーシスタンパクとして働くことが報告されている。しかし、EGR-1 の滑膜細胞における役割は明らかではない。従って、我々は滑膜細胞における EGR-1 の役割を明らかにする目的で、siRNA によって EGR-1 の発現を低下させた (EGR-1^{low}) 滑膜細胞を作成して解析を行った (図 3)。

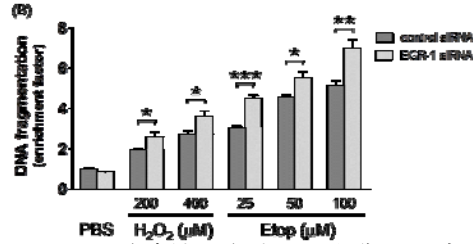
図 3



作成した EGR-1^{low} 滑膜細胞及び野生型滑膜細胞に etoposide や hydrogen peroxide (H₂O₂) でアポトーシスを誘導したところ、EGR-1^{low} 滑膜細胞の方がアポトーシスに陥る細胞数が有意に多いことを発見した。すなわち、滑膜細胞において EGR-1 は抗アポトーシスタンパ

クとして働くと考えられた (図4)。

図4



従来の RA の治療法は免疫系を制御して炎症を抑制しようとするものがほとんどであり、滑膜細胞の増殖をターゲットとした治療法は未だ実用化には至っていない。

以上、増殖因子とインテグリンとの直接結合からのシグナルは、EGR-1 の発現を介して滑膜細胞のアポトーシスを制御していることが明らかとなった。今後、このシグナルあるいは EGR-1 の発現を制御することにより、関節リウマチ滑膜細胞のアポトーシスをコントロールして過増殖を抑える治療法の開発につなげたい。

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 17 件)

英文 原著論文

- ① Miyamoto Y, Uga H, Tanaka S, Kadowaki M, Ikeda M, Saegusa J, Morinobu A, Kumagai S, Kurata H. Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints. *Mol Immunol.* 54(2):199-207, 2013
- ② Onishi A, Sugiyama D, Tsuji G, Nakazawa T, Kogata Y, Tsuda K, Naka I, Nishimura K, Misaki K, Kurimoto C, Hayashi H, Kageyama G, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. Mycophenolate mofetil versus intravenous cyclophosphamide for induction treatment of proliferative lupus nephritis in a Japanese population: a retrospective study. *Mod Rheumatol.* 23(1):89-96, 2013
- ③ Nishimura K, Saegusa J, Kawano S, Morinobu A. Anti TNF- α agent-induced anti-GBM antibody disease in a patient with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 39(9):1904-5, 2012
- ④ Jauharoh SNA, Saegusa J, Sugimoto T, Ardianto B, Kasagi S, Sugiyama D, Kurimoto C, Tokuno O, Nakamachi Y, Kumagai S, Kawano S. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1):582-7, 2012
- ⑤ Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic Accuracy of Serum 1,3- β -D-Glucan for Pneumocystis Jiroveci Pneumonia, Invasive Candidiasis and Invasive Aspergillosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol.* 50(1):7-15, 2012
- ⑥ Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci.* 64(2):85-91, 2011
- ⑦ Kasagi S, Saegusa J, Tsuji G, Sendo S, Miura N, Hayashi H, Sugimoto T, Kawano S, Nishida K, Kakutani K, Morinobu A, Kumagai S. Epidural spinal tumor and periaortitis as rare complications of Wegener's granulomatosis. *Mod Rheumatol.* 21(6):678-83, 2011
- ⑧ Liu FT, Yang RY, Saegusa J, Chen HY, Hsu DK. Galectins in regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 705:431-42, 2011
- ⑨ Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Kasagi S, Fujita M, Miyamoto Y, Matsuki F, Kumagai S. Histone deacetylase inhibition alters dendritic cells to assume a tolerogenic phenotype and ameliorates arthritis in SKG mice. *Arthritis Res Ther.* 13(3):R77, 2011
- ⑩ Norisada K, Tanaka H, Onishi T, Kaneko A, Tsuji T, Yamawaki K, Ryo K, Tatsumi K, Matsumoto K, Miura N, Saegusa J, Morinaga Y, Hara S, Kawai H, Hirata K. Nonbacterial thrombotic endocarditis associated with cancer of unknown origin complicated with thrombus in the left auricular appendage: case report. *Cardiovasc Ultrasound.* 9:8, 2011
- ⑪ Morinobu A, Tsuji G, Kasagi S, Saegusa J, Hayashi H, Nakazawa T, Kogata Y, Misaki K, Nishimura K, Sendo S, Miura N, Kawano S, Kumagai S. Role of imaging studies in the diagnosis and evaluation of giant cell arteritis in Japanese: report of eight cases. *Mod Rheumatol.* 21(4):391-6, 2011
- ⑫ Oyabu C, Morinobu A, Sugiyama D, Saegusa J, Tanaka S, Morinobu S, Tsuji G, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S. Plasma Platelet-derived

Microparticles in Patients with Connective Tissue Diseases. *J Rheumatol.* 38(4):680-4, 2011

- ⑬ Yamaji S, Saegusa J, Ieguchi K, Fujita M, Takada YK, Takada Y. A novel fibroblast growth factor-1 (FGF1) mutant that acts as an FGF antagonist. *PLoS One.* 5(4):e10273, 2010
- ⑭ Takada Y, Ono Y, Saegusa J, Mitsiades C, Mitsiades N, Tsai J, He Y, Maningding E, Coleman A, Ramirez-Maverakis D, Rodriguez R, Takada Y, Maverakis E. A T cell-binding fragment of fibrinogen can prevent autoimmunity. *J Autoimmun.* 34(4):453-9, 2010

和文 原著論文

- ① 福住典子, 林伸英, 三枝淳, 木下承皓, 河野誠司, 熊谷俊一 使用抗原に 52kD 蛋白を加えた蛍光酵素免疫測定法による抗 SS-A/Ro 抗体測定法の臨床的有用性臨床病理, 59(4): 352-9, 2011
- ② 熊谷俊一, 辻剛, 三枝淳 チオレドキシンと自己免疫疾患 (後編) *Schneller* 78:22-7, 2011
- ③ 熊谷俊一, 辻剛, 三枝淳 チオレドキシンと自己免疫疾患 (前編) *Schneller* 77:22-9, 2011

[学会発表] (計 11 件)

- ① Matsuki F, Saegusa J, Miyamoto Y, Misaki K, Kumagai S, Morinobu A. Regulatory and pro-inflammatory properties of CD4+ T-cell subsets defined by CD45RA, CCR7, CD27, and CD28 in patients with rheumatoid arthritis. The 12th meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (アジア臨床病理・臨床検査医学会), Kyoto, Nov. 26-Dec. 1, 2012
- ② Saegusa J, Irino Y, Yoshida M, Tanaka S, Kogata Y, Kageyama G, Kawano S, Tsuji G, Kumagai S, Morinobu A. Serum Metabolomics As a Novel Diagnostic Approach for Systemic Lupus Erythematosus. American College of Rheumatology 76th Annual Scientific Meeting (アメリカリウマチ学会), Washington DC, Nov. 9-14, 2012
- ③ Tanaka S, Saegusa J, Kawano S, Takada Y, Kumagai S, Morinobu A. Early Growth Response-1 (EGR-1) Controls Synovial Cell Apoptosis, and Its Expression Is Regulated by the Direct

Binding of Fibroblast Growth Factor-1 (FGF1) or Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF1) to Integrin $\alpha v \beta 3$. American College of Rheumatology 76th Annual Scientific Meeting (アメリカリウマチ学会), Washington DC, Nov. 9-14, 2012

- ④ Jauharoh SN, Kawano S, Saegusa J, Sugimoto T, Sugiyama D, Tokuno O, Kurimoto C, Nobuhara Y, Nakamachi Y, Ardianto B, Kumagai S. The Sjogren's Syndrome-Related Autoantigen Ro52 Is a Pro-Apoptotic Molecule Upon Oxidative Stress. American College of Rheumatology 75th Annual Scientific Meeting (アメリカリウマチ学会), Chicago, Nov. 5-9, 2011
- ⑤ Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Kasagi S, Fujita M, Miyamoto Y, Matsuki F, Kumagai S. Trichostatin A Induces CD8 α Positive Tolerogenic Dendritic Cells, Regulatory T Cells in SKG Mice, and Ameliorates the Severe Arthritis. American College of Rheumatology 75th Annual Scientific Meeting (アメリカリウマチ学会), Chicago, Nov. 5-9, 2011
- ⑥ Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Miyamoto Y, Kasagi S, Kumagai S. Histone Deacetylase Inhibitor (HDai) Ameliorates Chronic Arthritis in SKG Mice by Altering Conventional Dendritic Cells (cDCs) Phenotype into Tolerogenic DCs. American College of Rheumatology 74th Annual Scientific Meeting (アメリカリウマチ学会), Atlanta, Nov. 7-11, 2010
- ⑦ Saegusa J, Morinobu A, Kawano S, Kumagai S, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Liu FT. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. International Congress of Immunology (国際免疫学会), Kobe, 2010
- ⑧ Saegusa J, Morinobu A, Kawano S, Takada Y, Kumagai S. THE PROINFLAMMATORY ACTION OF PHOSPHOLIPASE A2 GROUP IIA IS MEDIATED THROUGH INTERACTION WITH INTEGRINS (ALPHA)v(BETA)3 AND (ALPHA)4(BETA)1. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR (欧州リウマチ学会), Rome, 2010
- ⑨ Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Miyamoto Y, Kasagi S, Kumagai S. HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR (HDAI)

AMELIORATES CHRONIC ARTHRITIS IN SKG MICE BY ALTERING CONVENTIONAL DENDRITIC CELLS (CDCS) PHENOTYPE INTO TOLEROGENTIC DCS. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR (欧州リウマチ学会), Rome, 2010

- ⑩ Saegusa J, Fujita M, Morinobu A, Misaki K, Kawano S, Kumagai S. An integrin-binding-defective FGFR50E mutant promotes synoviocyte apoptosis by activating caspase-9 through modulation of Bcl-2 and Bim expression. International Workshop, Annual general Assembly and Scientific Meeting of Japan College of Rheumatology (日本リウマチ学会総会・学術集会 国際ワークショップ), Kobe, 2010
- ⑪ 三枝 淳 インテグリンと増殖因子受容体の“two-receptor” model. 日本リウマチ学会 カレントシンポジウム4 若手研究者が語るリウマチ性疾患の病態とシグナル伝達 第55回日本リウマチ学会総会学術集会 神戸 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 淳 (SAEGUSA JUN)
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号：20514970

(2) 研究分担者

- ① 森信 暁雄 (MORINOBU AKIO)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10294216
- ② 河野 誠司 (KAWANO SEIJI)
神戸大学・医学部附属病院・特命准教授
研究者番号：20351512