

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592225

研究課題名(和文) グリオスタチン産生抑制の機序解明により関節リウマチの関節破壊制御をめざす

研究課題名(英文) Sp1 interference prevents joint destruction of RA through inhibitory effects of gliostatin

研究代表者

永谷 祐子 (Nagaya, Yuko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90291583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、関節リウマチ(RA)の発症に、グリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。これまでの基礎研究成果に基づき、グリオスタチン遺伝子の発現から関節炎惹起活性の発現に至る諸相を阻害することにより、RA病勢を緩和する方法を確立することを最終目標としている。本研究ではRA滑膜炎増悪の一翼を担っているグリオスタチン発現制御分子機構の解明を目標とした。滑膜培養細胞では、TNFによってグリオスタチンが誘導される。グリオスタチンのプロモーター領域にはSp1結合部位が7か所あり、このSp1結合部位を阻害することで、TNFによるグリオスタチンの発現を制御することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Gliostatin/thymidine phosphorylase (GLS/TP) has angiogenic and arthritogenic activities, and aberrant GLS production has been observed in the active synovial membranes of rheumatoid arthritis (RA) patients. The human GLS gene promoter contains at least seven consensus binding sites for the DNA binding protein Sp1. Here we examined whether Sp1 is necessary for GLS production in RA. Mithramycin is an aureolic-acid anti-neoplastic antibiotic used for treating cancer-related hypercalcaemia, leukemia and testicular cancer, which prevents Sp1 binding to its cognate site in DNA by modifying CG sequences. We also studied the effects of the Sp1 inhibitor mithramycin on GLS production in RA fibroblast-like synoviocytes.

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：関節リウマチ 滑膜細胞 グリオスタチン Sp1

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の治療はこの10年で劇的に進歩し、発症早期からの抗リウマチ薬の導入、炎症性サイトカインやT細胞をターゲットにした生物学的製剤の導入により、寛解をめざす治療が可能になってきた。しかしながらいづれの治療にも反応しない薬剤耐性難治性患者や炎症が鎮静化されたにもかかわらず骨びらんの進行がみられる患者が存在する。

我々は、RAの病態形成にグリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。すなわち、RA患者の関節液中には高濃度にグリオスタチンが存在し、血清グリオスタチン濃度はRAの病勢も反映している。グリオスタチンの関節内投与によりウサギの膝にRA様の滑膜炎と関節軟骨破壊が惹起されることを確かめた。RA由来の培養滑膜細胞をグリオスタチンにて刺激すると血管新生作用をもつ蛋白質の遺伝子群の発現が誘導され、血管新生抑制作用をもつ蛋白質の遺伝子群の発現が抑制された。また炎症性サイトカインネットワークの上流のサイトカインであるtumor necrosis factor (TNF) によりグリオスタチンが誘導されることがわかっている。このグリオスタチンを標的とし、RAによる関節破壊を防止する治療方法を確立することを最終目標としている。

2. 研究の目的

RA由来の滑膜培養細胞のグリオスタチン産生は、TNFなど炎症性サイトカインによって誘導された。さらにグリオスタチンには autocrine 作用があり、これにより RA 病態の慢性化、炎症の持続性が生じると考えられる。TNFによるグリオスタチンの誘導を抑制する因子を解明することを目標とした。またグリオスタチンのプロモーターを組み込んだ luciferase assay vectorを構築し、グリオスタチン産生がいかなるシグナル伝達を介しているのかを解析する。

3. 研究の方法

(1)滑膜培養細胞の樹立。人工膝関節置換術の際に患者の承諾を得て採取した滑膜を培養し、3から6代継代して*in vitro*の実験系に供する。本研究は当大学院医学研究科倫理審査委員会にて承認されている(受付番号#262)

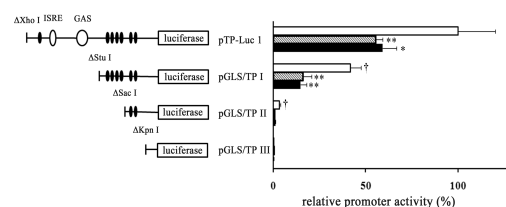
(2) luciferase assay を用いて GLS のプロモーター解析。グリオスタチンのプロモーターを組み込んだ luciferase assay vector を作製し、炎症性サイトカイン刺激によるグリオスタチン発現の転写調節活性部位を特定する。

(3)Sp-1阻害によるグリオスタチン産生抑制を real time PCR, Western blotting, 免疫細胞染色により検証する。

4. 研究成果

研究の主な成果、

RA患者10例の人工膝関節置換術時に採取した滑膜組織からRA由来線維芽細胞様滑膜細胞 (FLSs) を培養し、実験に使用した。GLS promoterと3種のdeleted promoterを組み込んだ luciferase vectorを作成し、vectorをtransfectした FLSsにミスラマイシンを加えて、その後細胞を回収し luciferase assayを施行して promoter活性を測定した。GLS promoterである pTP-Luc 1 活性を100%とし、最上流の Sp1 binding siteを deleteした pGLS/TP1 promoterでは活性を約 60%抑制した。さらに Sp1 binding siteを deleteした pGLS/TP 2 promoterでは活性をさらに約 60%抑制した。pTP-Luc1 promoter活性はミスラマイシン処置を行うと、100nMと300nMともに約50%抑制した。pGLS/TP1と2もミスラマイシン処置を行うと同様に約50%抑制した。

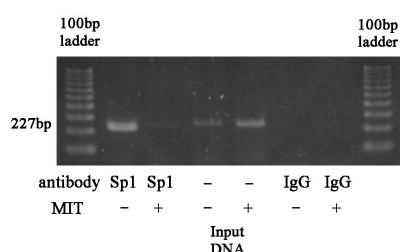


ミスラマイシン 0 nM

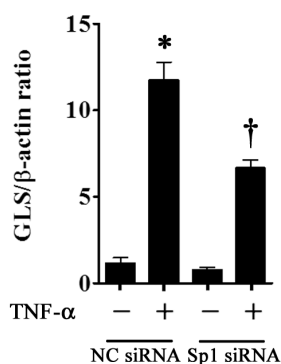
■ミスラマイシン 100nM

ミスラマイシン 300nM

GLS promoter最上流のSp1 binding siteをはさむようにprimerを作成し、FLSsをミスラマイシンで処置後ホルムアルデヒド固定し、DNAを断片化した。抗Sp1抗体にて免疫沈降を行い、回収したDNAをPCR解析するクロマチン免疫沈降法を施行した。抗Sp1抗体で免疫沈降すると、ミスラマイシン処置なし群ではprimer長に一致する227bp部にバンドが検出された。ミスラマイシン処置群ではバンドを検出できなかった。IgG抗体はnegative controlとして使用し、バンドを検出できなかった。最上流のSp1 binding siteへのSp1の結合と、ミスラマイシンによりその結合が阻害されることを示している



FLSs に Sp1siRNA または negative control(NC) siRNA を transfect し、TNF- 刺激を行い 48 時間後に細胞を回収し、GLS mRNA を測定し、Sp1 RNA 干渉につき検討した。Western blotting を行い、Sp1 siRNA により Sp1 蛋白の発現を抑制することを確認した。RT-PCR を行い、Sp1 siRNA 群では NC siRNA 群における TNF- 刺激による GLS 発現の増強と比較して、有意に抑制した。



予備実験にて TNF 阻害薬治療中患者の血清中グリオスタチン濃度の推移を観察すると、TNF 阻害薬に対して不応性の患者では血清中グリオスタチン濃度は高濃度にて推移することがわかっている。本研究ではグリオスタチンのシグナル伝達機構の一端を解明した。炎症性サイトカインネットワークの下流に位置するグリオスタチン産生を制御できれば、TNF 阻害薬に対して不応性の RA 患者に対しても、さらに有効な治療の道が開かれる。関節リウマチの病態形成にグリオスタチンが関与していることを報告してきた研究グループはこれまで我々だけであったが、2014年に徳島大学の研究グループによりグリオスタチンが関節リウマチの骨破壊にも関与していること (Arthritis Rheumatol. 201;66:560-8. doi: 10.1002/art.38263.)が明らかにされた。グリオスタチン制御の重要性がさらに深まったと考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Nomura T, Aoyama M, Waguri-Nagaya Y, Goto Y, Suzuki M, Miyazawa K, Asai K, Goto S. Tumor necrosis factor stimulates osteoclastogenesis from human bone marrow cells under hypoxic conditions. *Exp Cell Res* 2014; 321: 167-177. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.11.020. (査読あり)
2. Adachi M, Okamoto S, Chujo S, Arakawa T, Yokoyama M, Yamada K, Hayashi A, Akita K, Takeno M, Ito S, Takii T, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Hayakawa K, Miyazawa K, Onozaki K. Cigarette smoke condensate extracts induce IL-1 beta production from rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes, but not osteoarthritis

patient-derived synoviocytes, through aryl hydrocarbon receptor-dependent NF-kappa B activation and novel NF-kappa B sites. J Interferon & Cytokine Research 2013; 33: 297-307. doi: 10.1089/jir.2012.0107. (査読あり)

3. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Kikuchi K, Yamagami T, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The Sp1 transcription factor is essential for the expression of gliostatin/thymidine phosphorylase in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Arthritis Res Ther. 2012; 14(2):R87. doi: 10.1186/ar3811. (査読あり)
4. Otani M, Nozaki M, Kobayashi M, Goto H, Tawada K, Waguri-Nagaya Y, Okamoto H, Iguchi H, Watanabe N, Otsuka T. Comparative risk of common peroneal nerve injury in far anteromedial portal drilling and transtibial drilling in anatomical double bundle ACL reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012; 20: 838-843. doi: 10.1007/s00167-011-1632-8. (査読あり)
5. Yamagami T, Waguri-Nagaya Y, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. FK506 inhibition of gliostatin/thymidine phosphorylase production induced by tumor necrosis factor- α in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Rheumatol Int (Clinical and Experimental Investigations). 2011; 37:903-909. doi: 10.1007/s00296-010-1411-8. (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

1. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki

M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Gliostatin regulates vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology, 2014.6.11-14, Le Palais des Congres de Paris, France. (発表確定)

2. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kawaguchi Y, Kobayashi M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The importance of gliostatin as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology, 2014.6.11-14, Le Palais des Congres de Paris, France. (発表確定)
3. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Nagahara M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Aquaporin expression in the synovial tissues of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology, 2013.6.13, Feria de Madrid, Spain.
4. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Terazawa M, Aoyama M, Asai K, Kobayashi M, Otsuka T. The Sp1 transcription factor is essential for the expression of gliostatin/thymidine phosphorylase in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology, 2013.6.13, Feria de Madrid, Spain.
5. 生田憲史, 永谷祐子, 菊池可絵, 青山峰芳, 浅井清文, 小林正明, 大塚隆信. 転写因子 Sp1 は関節リウマチ由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるグリオスタチン発現を制御する. 第 57 回日本リウマチ学会 2013.04.18 京都国際会議場.

6. 山上貴也, 永谷祐子, 生田憲史, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. 関節リウマチと変形性関節症での膝関節軟骨における gliostatin/thymidine phosphorylase の発現分布. 第 27 回日本整形外科基礎学術集会 2012.10.27. 名古屋国際会議場.
7. 生田憲史, 永谷祐子, 菊池可絵, 青山峰芳, 浅井清文, 小林正明, 大塚隆信. 関節リウマチ サイトカインネットワークにおけるグリオスタチン. 第 27 回日本整形外科基礎学術集会 2012.10.26. 名古屋国際会議場.
8. 生田憲史, 永谷祐子, 菊池可絵, 大塚隆信, 青山峰芳, 浅井清文. p38 MAPK が関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞におけるグリオスタチン発現に関与する. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.21. 前橋ベイシア文化ホール.
9. 生田憲史, 永谷祐子, 菊池可絵, 小林正明, 大塚隆信, 青山峰芳, 浅井清文. Sp1 転写因子が関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞でのグリオスタチン発現に関連する. 第 55 回日本リウマチ学会 2011.07.24 神戸国際会議場.

〔図書〕(計 1 件)

1. 永谷祐子, 大塚隆信. 達人はこうみる四肢関節画像診断 関節リウマチ(RA)と RA 類似疾患の画像診断. Monthly Book Orthopaedics 2013;26 (5):78-86.

6. 研究組織

(1)研究代表者

永谷 祐子 (Nagaya Yuko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90291583

(2)研究分担者

大塚 隆信 (Otsuka Takanobu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10185316

(3) 研究分担者

浅井 清文 (Asai Kiyofumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70212462