

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659176

研究課題名（和文） 小胞体ストレス破綻による線維化の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecularbasis of fibrosis by ERAD CER associated protein degradation.

研究代表者

中島 利博 (NAKAJIMA TOSHIHIRO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：90260752

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）、滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見した。本研究で、約 200 万個の化合物ライブラリーよりシノビオリンの自己ユビキチン化活性を指標としたスクリーニングにより 2 種類の阻害活性を有する化合物が得られた。これらの、化合物は HeLa 細胞に比べ、RA 滑膜細胞の増殖をより強力に抑え、コラーゲン関節炎に対しても関節炎スコアの制御が可能であった。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) significantly affects quality of life. We recently cloned synoviolin, a RING-type E3 ubiquitin ligase implicated in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway. Synoviolin is highly expressed in rheumatoid synovial cells and may be involved in the pathogenesis of RA. Inhibition of synoviolin activity is a potentially useful therapeutic approach for the treatment of RA. We conducted a high-throughput screen of small molecules to find inhibitors of synoviolin autoubiquitination activity. We identified two classes of small molecules, named LS-101 and LS-102, which inhibited synoviolin activity. LS-102 selectively inhibited synoviolin enzymatic activity, while LS-101 inhibited a broad array of RING-type E3 ligases. Moreover, these inhibitors

suppressed the proliferation of rheumatoid synovial cells, and significantly reduced the severity of disease in a mouse model of RA. Our results suggest that inhibition of synoviolin is a potentially useful approach in the treatment of RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

近年の先端医療・医科学の進歩・技術革新により難治性疾患に対する画期的な治療法が開発され、患者に対してはもちろんのこと社会全体に福音がもたらされた。しかしながら慢性炎症の終末像である組織破壊と線維化は不可逆的な変化であるため依然重大な問題として残されており、線維化の制御が難治

性疾患根絶のブレークスルーとなると考えられる（「先制医療基盤を創出する炎症研究」JST-CRDS 2008, Medzhitov R. Nature 2008）。

報告者らはこれまで慢性炎症を基礎とする難治性疾患の 1 つである関節リウマチ（Rheumatoid arthritis; RA）の研究を進め、RA 滑膜細胞より E3 ユビキチン化酵素で

あるシノビオリンの発見に成功した。さらに報告者らは、シノビオリンが RA の病態に深く関与していることを細胞・個体レベルで明らかとし、RA 滑膜細胞に過剰発現したシノビオリンが小胞体関連分解を活性化させることで分泌タンパク質の産生を増加させるという仮説を立てた (Nature Clin. Prac. Rheum. 2008)。実際、RA 滑膜細胞はサイトカイン・細胞外基質・プロテアーゼなど多くのタンパク質を過剰分泌することが知られており (Ritchlin C. Arthritis Res 2000)、最近その分子基盤の証明にも成功した (J. Cell. Biol. 2010)。また、報告者らはシノビオリン遺伝子欠損 (syno<sup>-/-</sup>) マウスが肝臓でのアポトーシスの亢進により胎生致死となることを明らかとし (J. Biol. Chem. 2005)、肝臓がシノビオリンに対して感受性の高い臓器であることを示したが、最近シノビオリンが肝線維化を制御することも明らかとした (PLoS ONE 2010)。

## 2. 研究の目的

関節リウマチ (RA) は Quality of life を脅かす代表的な疾患である。現在、抗 TNF $\alpha$  抗体など生物学的製剤を用いた方法が最も有効とされているが、約 25 %はこの治療法に不応である。病因に基づいた科学的、かつ根治的な治療法確立のためにも RA の病因・病態形成の全貌を明らかにすることが求められている。その病態に関しては、免疫応答異常、滑膜細胞の過剰増殖、骨・軟骨破壊、線維化などの病的なプロセスが相互作用し時空間的に多様な病態を呈しながら症状が進行することが知られている。これまでに我々は、このうち滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、RAに関わる E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見した (Gene & Deve 2003)。シノビオリンが RA 滑膜細胞に過剰発現することにより、小胞体関連分解(ERAD) を活性化し、正確な折りたたみに失敗した不良品タンパク質の再生機能を増加させる。そして、この hyper-ERAD という状態が不良品タンパク質の蓄積による小胞体の破綻、細胞死を回避させ、結果として滑膜細胞を増殖させるという新たな病態論を展開した (Nature Rev. Rheum 2008)。近年、スイスの研究グループとの共同研究により膜結合型基質 (ERAD-L M) と可溶型基質 (ERAD-LS) に大別される小胞体内基質の分解のうち、シノビオリンが ERAD-LS で中心的役割を果たすことを明らかとした (J. Cell. Biol 2010)。すなわち、サイトカインとその受容体の関係でいえば、サイトカインの質の制御を司る E3 ユビキチン化酵素であることを証明した。これらの結果より、RA 滑膜細胞ではシノビオリンによって分泌タンパク質の産生が増加したサイトカインストームという状態が作り出され、自身が

作り出したサイトカインストームによりさらに増殖の方向へ進むという仮説を立てた。本研究では、シノビオリンの有する ERAD-LS 機能により誘導される炎症の慢性化機構という仮説の検証を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウス (syno cKO mice) のサイトカイン、小胞体関連 因子の発現解析  
遺伝子改変動物を用いた解析により、すでに、シノビオリンの古典的ノックアウトマウスが ERAD の E3 ユビキチンリガーゼとしては稀有 (唯一) な胎生致死を呈し、その表現型が ERAD シグナルの全般的調節因子である XBP-1 の KO マウスと酷似していることは報告していた (J. Biol Chem. 2005)。そこで、コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成し成獣でのシノビオリンの生体機能解析を行った (論文投稿中)。本研究では、サイトカインの主要な標的、ないしは産生臓器である末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節におけるサイトカイン、小胞体関連遺伝子の網羅的解析を行った。

(2)シノビオリン阻害剤による本研究の基本概念の proof of concept (POC)

次に、シノビオリンと RA との関連性、さらにシノビオリンが創薬標的であるかを検証するために、high through put screening により得られた構造の異なる二種類のシノビオリン阻害剤 (LS-101、LS-102) を用い、以下の実験を行った。

- ① in vitro シノビオリン阻害活性の定量：我々が開発したシノビオリンの E3 ユビキチン化活性定量法に基づき 50% 抑制濃度 (IC<sub>50</sub> %) を定量した。
- ② RA 滑膜細胞の増殖活性：患者より得られた RA 滑膜細胞にそれぞれの薬剤を添加し、24 時間後の IC<sub>50</sub> % を測定した。
- ③ RA 滑膜細胞のサイトカイン分泌能：ELISA 法により定量した。
- ④ コラーゲン関節炎の抑制効果：常法に従い II 型コラーゲンを免疫し、同時に 1.3mg/kg、ならびに 4.0mg/kg の薬剤を連日、腹腔投与し二度目の免疫後、21 日目まで関節炎スコアを計測した。

(3)変異型 surfactant protein C (SP-C) による小胞体ストレスとシノビオリンの関連性の検討

SP-C 遺伝子のエクソン 4 を中心とした領域は変異のホットスポットの一つであり、かつ先天的 SP-C の遺伝子変異により出生直後からの重篤な間質性肺炎が生じることが知られている。これまでの研究により SP-C 変異タンパク質が小胞体ストレスを介して線維化・慢性炎症を引き起こしていることが示唆され

ていた。一方、我々はシノビオリンが線維化の病態に深くかかわることを証明していた(P LoS One 2010)。そこで、われわれはSP-C変異タンパク質がシノビオリンを介してその病態を形成しているのでは仮定した。その検証には

- ① シノビオリンプロモータを用いたルシフェラーゼアッセイ、real time PCR
- ② SP-C 変異タンパク質によるコラーゲン分泌亢進へのシノビオリン siRNA の効果判定
- ③ ②に対する LS-102 の効果判定を用いた。

患者より採取した検体の使用は、東京医科大学・医学倫理委員会(承認番号1497)によってすでに承認を受けているものであり、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り人間の尊厳を尊重して研究を実施した。検体は同委員会に承認を受けた書面によるインフォームドコンセントを得たうえで被験者の安全性を配慮して採取し、連結不可能匿名化した後に使用した。

#### 4. 研究成果

(1)シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウス(syno cKO mice)のサイトカイン、小胞体関連因子の発現解析

末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節におけるサイトカインの発現については共通して炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。また、小胞体関連遺伝子については臓器ごとに動態が異なっていた。

(2)シノビオリン阻害剤による本研究の基本概念の proof of concept (POC)

約 200 万個の化合物ライブラリーよりシノビオリンの自己ユビキチン化活性を指標としたスクリーニングにより 2 種類の阻害活性を有する化合物が得られた(図 1)。これらの化合物は HeLa 細胞に比べ、RA 滑膜細胞の増殖をより強力に抑えることが明らかとなった(図 2)。さらに、コラーゲン関節炎に対しても関節炎スコアの制御が可能であった(図3)。これらの結果は、学術論文(Int. J. Mol. Med. 2012)として報告されたのみならず、知的財産権としてとして成立している。

(3)変異型surfactant protein C(SP-C)による小胞体ストレスとシノビオリンの関連性の検討

変異型 SP-C の強発現によりシノビオリンプロモーター並びにその mRNA の発現が活性化された。さらに、コラーゲン分泌亢進はシノビオリン siRNA で制御され、LS-102 にて完全に抑制が可能であった(論文準備中。知財申請中)。

#### 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

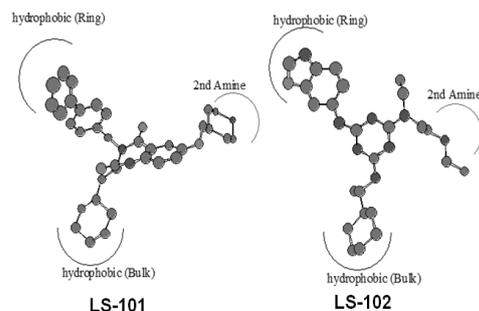


図 1 阻害剤の構造

シノビオリン抑制剤によるRA 滑膜細胞増殖の選択的抑制効果

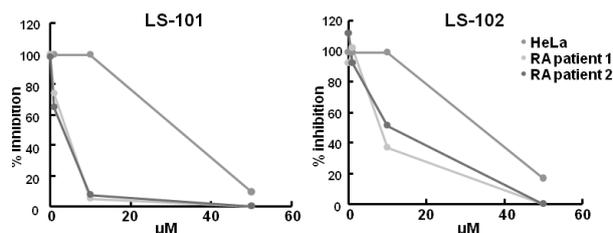


図 2 滑膜細胞増殖への影響

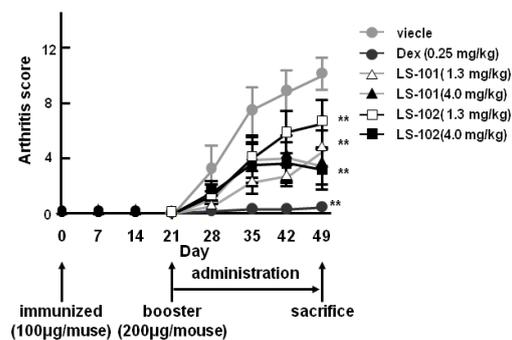


図 3 関節炎への効果

(は下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Yagishita N., Aratani S., Leach C., Amano T., Yamano Y., Nakatani K., Nishioka K. and Nakajima T.  
RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis.  
**Int. J. Mol. Med**, 30:1281-1286, 2012. 査読有  
DOI: 10.3892/ijmm.2012.1129
- 2) Tanabe C, Maeda T, Zou K, Liu J, Liu S, Nakajima T, Komano H.  
The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid  $\beta$  production by targeting a negative regulator of  $\gamma$ -secretase, Rer1, for degradation.  
**J Biol Chem**, 287(53):44203-11, 2012. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M112.365296
- 3) Araya N, Takahashi K, Sato T, Nakamura T,

- Sawa C, Hasegawa D, Ando H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Oka H, Nishioka K, Nakajima T, Mori N, Yamano Y.  
Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type1-associated neurological disease.  
**Antiviral Therapy**, 16(1):89-98, 2011. 査読有  
DOI: 10.3892/ijmm\_00000271
- 4) Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, Araya N, Yudoh K, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T.  
Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes  
**Annals of the Rheumatic Diseases**, 70(1):221-226, 2011. 査読有  
DOI: 10.1136/ard.2009.118620
- 5) 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 new gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans  
**Arthritis Rheum**, 63(12):3833-3842, 2011. 査読有  
DOI: 10.1002/art.30617
- 6) Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Kanazawa T, Ito K, Yamano Y, Nakamura H, Nakajima T, Nishioka K  
The Japanese version of the 2010 American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity.  
**Mod.Rheumatol**. 22:40-44, 2012. 査読有  
DOI: 10.1007/s10165-011-0462-3
- 7) Bernasconi R, Galli C, Calanca V, Nakajima T, Molinari M.  
Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrate  
**J Cell Biol**, 188(2):223-35, 2010. 査読有  
DOI: 10.1083/jcb.200910042

[学会発表] (計3件)

- ① Toshihiro Nakajima, Naoko Yagishita, Satoko Aratani, Hidetoshi Fujita, Kusuki Nishioka  
What tells us from Post-neonatal knock out of synoviolin  
4th Annual Ubiquitin Drug Discovery & Diagnostics Conference 2012  
2012.7.23-25

- Four Seasons Hotel Philadelphia, USA.
- ② Toshihiro Nakajima  
Synoviolin ; a novel regulator for fibrosis  
3rd Annual Ubiquitin Drug Discovery & Diagnostics Conference 2011  
2011.7.11-13  
Four Seasons Hotel Philadelphia, USA.
- ③ Satoko Aratani, Daisuke Hasegawa, Naoko Yagishita, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima  
E3 Ubiquitin Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrogenesis  
3rd Annual Ubiquitin Drug Discovery & Diagnostics Conference 2011  
2011.7.11-13  
Four Seasons Hotel Philadelphia, USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 1, 3, 5-トリアジン誘導体を有する線維化予防又は治療剤

発明者: 中島利博、瀬戸口靖弘、中島若巳、荒谷聡子、藤田英俊

権利者: 学校法人 東京医科大学

種類: 特許願

番号: 2012-283-763

出願年月日: 2012年12月26日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 利博 (NAKAJIMA TOSHIHIRO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90260752