

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659502

研究課題名(和文)新規ユビキチン化阻害剤による線維化制御法の開発

研究課題名(英文)Synoviolin inhibitors for treatment of fibrosis

研究代表者

八木下 尚子(YAGISHITA, Naoko)

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：40367389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ発症分子であるシノビオリンが肝線維化を制御することが明らかとなり、シノビオリンが線維化疾患の創薬標的となる可能性が考えられた。そこで本研究では、シノビオリン阻害剤による線維化治療法の開発の可能性を探った。

その結果、ユビキチン化阻害剤は、関節炎モデルマウスの発症に対して抑制的効果を示した。さらに、肝線維症モデルにおいてもシノビオリンの阻害活性作用を介して肝障害を抑制した。以上のことからシノビオリンは線維化の進行に関与する因子であり、シノビオリンの酵素活性阻害が、線維化疾患の病態・治療に重要な標的分子であることのPOCができた。このことは今後の創薬開発に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) significantly affects quality of life. We recently cloned synoviolin, an E3 ubiquitin ligase implicated in the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. Synoviolin is highly expressed in rheumatoid synovial cells and is involved in the pathogenesis of RA. Inhibition of synoviolin activity is a potentially useful therapeutic approach for the treatment of RA. We recently 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 and liver fibrosis. Our results suggest that inhibition of synoviolin is a potentially useful approach in the treatment of fibrosis.

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：関節リウマチ 滑膜細菌 シノビオリン 小胞体関連分解 線維化 阻害剤

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。

我々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。さらに我々は、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)。また我々は、シノビオリン遺伝子欠損 (syno^{-/-}) 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 (Genes Dev 2014, PLoS ONE 2010)。

2. 研究の目的

RA は慢性炎症を基礎とする代表的疾患の 1 つであり、多段階の病的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進行する。我々は滑膜細胞に過剰発現する E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見し、シノビオリンが可溶性小胞体基質および p53 を選択的にユビキチン化すること (J Cell Biol 2010, EMBO J 2005)、これらの活性を介して関節症の発症に関与することを証明した (Nature Clin Prac Rheum 2008)。さらに最近、シノビオリンが肝臓の線維化に重要な役割を示すことを明らかとし (Genes Dev 2014, PLoS ONE 2010)、これまで全く異なる病態と考えられていた両疾患に共通の発症機序が存在することを発見した。したがって、シノビオリンを標的とすること

で RA や肝線維症に代表される線維化疾患に対する治療につながる可能性が考えられるため、本研究では我々が所有するユビキチン化阻害剤を用いた線維化制御の開発を目指す。

3. 研究の方法

2 種類のシノビオリン活性阻害剤が、関節炎モデルマウスの病態発症に抑制的な効果を有するかを検討した。さらに、この活性阻害剤が他の線維化モデルマウスの病態発症に対してどのような効果を有するかを検討するため、肝線維症モデル、腎臓線維症モデルのなど各種線維症モデル動物の作製を行った。さらに比較対象として用いるためにシノビオリンコンディショナルノックアウトマウスの作製、維持を行った。

4. 研究成果

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得た 2 種類の活性阻害剤のうち、1 つはシノビオリン選択的、もう 1 つはシノビオリン非選択的ユビキチン化阻害剤であった。これら化合物の培養細胞に対する効果を検証した結果、2 つの化合物は RA 滑膜細胞に対して増殖抑制効果を示すことが明らかとなった (図 1)。

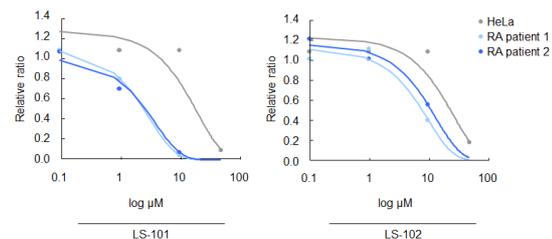


図 1. シノビオリン阻害剤の効果

さらに、これら化合物が実際に線維化モデルに対して抑制効果を有するかを検討したところ、型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスの病態発生を抑制することが明らかとなった (図 2)。

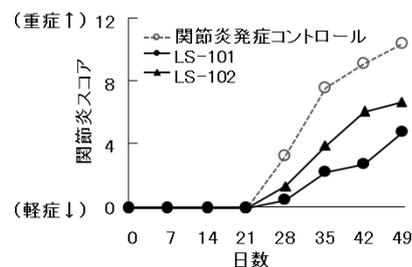


図 2. シノビオリン阻害剤の関節炎発症に対する効果

さらにこのマウスを詳細に解析すると、型コラーゲンに対する抗体はいずれのマウスも正常に産生されていることが確認された。病理学的にみても関節破壊の進行が、これら化合物により抑制されていることが明らかとなった(図 3)。

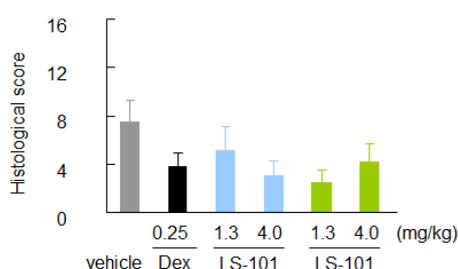


図 3. シノビオリン阻害剤の関節炎モデルマウス関節に対する影響

そこで次に、この化合物の他の線維化モデルマウスの病態発症に対する効果を検討した結果、肝障害に対しても抑制効果を有することが明らかとなった。以上のことから、シノビオリンは線維化の進行に関与する因子であり、シノビオリンの酵素活性阻害が、線維化疾患の病態・治療に重要な標的分子であることの POC ができた。このことは今後の創薬開発に大きく貢献するものと期待される。

さらに比較対象のために、Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いたタモキシフェン誘導型シノビオリンコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、タモキシフェン投与によるシノビオリンの欠損で、摂餌量はコントロールマウスと差がないにも関わらず、体重の減少、白色脂肪組織の萎縮を認め、投与後3週目までに死亡することが明らかとなった。以上のことから、シノビオリンは線維化以外にも何らかの重要な生物学的役割を果たす可能性が考えられた。

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 3 件)

Wu T, Zhao F, Gao B, Tan C, Yagishita N, Nakajima T, Wong PK, Chapman E, Fang D, Zhang DD. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. *Genes Dev*, 査

読有, 28(7):708-22, 2014.
DOI: 10.1101/gad.238246.114

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*, 査読有, 22(1):40-44, 2012.
DOI: 10.1007/s10165-012-0759-x

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*, 査読有, 30:1281-1286, 2012.
DOI: 10.3892/ijmm.2012.1129

〔学会発表〕(計 8 件)

荒谷聡子、臼井千恵、八木下尚子、西岡健弥、山野嘉久、藤田英俊、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、西岡久寿樹、中島利博. 線維筋痛症における疼痛シグナル解析モデルの構築. 日本線維筋痛症学会第4回学術集会, 2012年9月, 長崎(長崎ブリックホール).

山野嘉久、渡邊修、荒谷聡子、八木下尚子、藤田英俊、臼井千恵、西岡健弥、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、中島利博、西岡久寿樹. 線維筋痛症患者における抗 VGKC 複合体抗体の測定. 日本線維筋痛症学会第4回学術集会, 2012年9月, 長崎(長崎ブリックホール).

中島利博、荒谷聡子、臼井千恵、八木下尚子、西岡健弥、山野嘉久、藤田英俊、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、西岡久寿樹. 線維筋痛症研究プラットフォームの確立と疼痛シグナル解析モデルの構築. 日本線維筋痛症学会第4回学術集会, 2012年9月, 長崎(長崎ブリックホール).

Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T. Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis. *Bio-Rheumatology International Congress (BRIC)*

Tokyo: The 8th GARN Meeting November 15, 2011, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel).

Yagishita N, Aratani S, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T. ER stress signaling as a chronic inflammation. 2nd Tokyo-Shanghai Workshop on Rheumatology 2011, November 13, 2011, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel).

Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T. Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis. The 2011 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting. November 8, 2011, Chicago, U.S.A.

八木下尚子、中島利博. シノビオリンから見た関節リウマチの病態研究. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会カレントシンポジウム 「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」, 2011年7月18日, 神戸(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場).

八木下尚子、荒谷聡子、佐藤知雄、藤井亮爾、山野嘉久、西岡久寿樹、中島利博. E3ユビキチンリガ - ゼシノビオリンの線維化への関与. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011年7月18日, 神戸(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場).

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://nanchiken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木下 尚子 (YAGISHITA, Naoko)

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: 40367389

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし