

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791006

研究課題名(和文) シトルリン化修飾による小胞体ストレスを介したリウマチ滑膜細胞増殖機構の解析

研究課題名(英文) Relationship of post-translational modifications in RA synoviocytes

研究代表者

荒谷 聡子 (Satoko, Aratani)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40387064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室では滑膜細胞から E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見し、同因子が関節リウマチ(RA)において滑膜細胞過増殖という病態に関与することを明らかにしてきた。一方、シトルリン化酵素が RA 病原因遺伝子として同定され RA におけるシトルリン化修飾が注目されている。代表者はシトルリン化が細胞内タンパク質のユビキチン化を抑制し、小胞体ストレスが軽減することを明らかにしてきた。本研究ではさらに両転写後修飾について、シノビオリン阻害剤およびノックアウトマウスを作製し細胞および個体での解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously cloned E3 ubiquitin ligase, Synoviolin, as a regulatory factor of synoviocytes proliferation in rheumatoid arthritis (RA) and suggested that endoplasmic reticulum (ER) associated degradation system via Synoviolin has important roles for overgrowth of synoviocytes. It is known that the citrullination of proteins is activated in RA and Peptidyl-Arginine Deiminases 4 (PAD14) is identified as the RA-susceptible gene. In regard to these post-translational modifications, we revealed that they associate and citrullination could decrease the ubiquitination by synoviolin and ER stress. In this study, I established synoviolin conditional knockout mice and enzymatic inhibitors of synoviolin and explored the function of post-translational modifications in vivo.

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 Synoviolin ユビキチン化 シトルリン化 転写後修飾

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性はタンパク質の一生の観点から鑑みて、転写調節から翻訳・局在・タンパク質分解、リサイクルといった段階によって調節されている。各過程においてタンパク質のリン酸化、アセチル化、ユビキチン化といった翻訳後修飾による制御が恒常性維持に重要であり、タンパク質修飾によるシグナル調節の制御異常が関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) を含む様々な疾患の病因・病態に関与していると考えられている。

RA は免疫異常・炎症および滑膜細胞の過増殖など多様な病態を示す。応募者の研究室では滑膜細胞の活性化と過増殖に着目し研究を進めてきた。その結果 Fas シグナルや転写統合装置 CBP を介した転写制御および p53 のアセチル化修飾による滑膜細胞制御メカニズムについて明らかにした。さらに滑膜細胞増殖を制御する因子として小胞体ストレスに関与する E3 ユビキチン化酵素シノビオリンをクローニングした。遺伝子改変動物やシノビオリン選択的酵素阻害剤を用いた解析から、シノビオリンが RA の発症、病態に重要な因子であることが示唆された。そこで蓄積した不良タンパク質の分解およびユビキチン化修飾によりシグナル伝達を調節し、小胞体ストレス応答や p53 を介したアポトーシスの抑制により細胞増殖を調節しているというモデルを提唱した。またこれらの結果から、すでにシノビオリンの遺伝子 (HUGO GenBank ID: AB024690)、遺伝子改変動物、抑制剤などに関する知的財産を獲得している。他の研究グループからも、RA 患者末梢血においてシノビオリンの発現が上昇しており抗 TNF 製剤感受性のバイオマーカーとなりうること、慢性炎症に重要なサイトカイン IL-17 の分子標的であること、免疫応答に重要な MHC I の形成に必要であることが報告された。これらのことから RA におけるシノビオリンの重要性が示唆された。

一方、山田・山本らによる RA におけるゲノムから組織に関する一連の解析から、シトルリン化酵素 Peptidyl-Arginine Deiminases (PADI) が病因・病態に重要であることが明らかにされた。このことは RA 患者で蓄積したシトルリン化タンパク質に対する抗シトルリン化タンパク質自己抗体 (CCP 抗体) が産生され、CCP 抗体が診断と予後に対するマーカーとして使用されているという臨床データと一致し注目されている。しかし RA におけるシトルリン化タンパク質の作用機序に関して詳細は明らかになっていない。

研究代表者はこれまでタンパク質修飾複合体である転写統合装置の研究を通じ、複合体の中心である CBP によるアセチル化に加え転写因子のリン酸化やメチル化など翻訳後修飾によって巧妙に制御されたシグナ

ル伝達の解析を行ってきた。この視点から RA に関与するとされるユビキチン化とシトルリン化の両者がクロストークすると考え、平成 22~23 年度の科学研究費若手研究において検討を行った。それにより、シトルリン化が細胞内タンパク質のユビキチン化を抑制し、小胞体ストレスが軽減した状態であるという結果を得た。

2. 研究の目的

シトルリン化 ユビキチン化 により小胞体ストレスが減弱するという現象が、応募者が提唱した「シノビオリンの強発現による不良タンパク質の分解を介して、最終的には小胞体ストレスが軽減し細胞増殖および分泌が活性化される」というモデルと合致することが考えられた。そこで本研究計画ではシトルリン化によるユビキチン化および小胞体ストレスの抑制の病態生理への関与、生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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

シノビオリンの Exon 2-14 の前後に flox 配列を挿入した時期特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製した。同マウスを CAG プロモーター依存的に Cre recombinase を発現するマウスと交配し時期特異的ノックアウトマウスを得た。8 週齢のマウスの腹腔にタモキシフェンを投与しシノビオリン欠損マウスの解析をおこなった。

(2) シノビオリン阻害剤のスクリーニング

大腸菌内で細胞膜貫通領域を欠損したシノビオリンおよびユビキチン化酵素の精製を行った。精製したシノビオリン、E1、E2、Ubiquitin を混ぜて反応させ、in vitro でユビキチン化を検出した。低分子化合物を反応系に添加し、ユビキチン化阻害活性を測定した。

(3) 細胞増殖に対する影響

得られた化合物を滑膜細胞およびシノビオリンノックアウトマウスマウス胎児線維芽細胞 (MEF) に添加し Cell counting kit にて増殖に対する影響を検討した。

(4) タンパク質の過分泌に対する影響

シノビオリンノックアウト細胞における遺伝子発現プロファイルを DNA array により解析する。

4. 研究成果

シノビオリンによるユビキチン化の個体内における生理的作用を明らかにするため、生体内における生理的な機能意を明らかにするため 時期特異的および組織特異的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を行った。タモキシフェン投

与により シノビオリン遺伝子を欠損させ、タンパク質および RNA レベルで発現が低下していることを確認した。タモキシフェン投与後 2 週間のマウスから組織を採取し HE 染色にて形態的な異常を検討した。その結果、膝関節において野生型マウスでは滑膜細胞が層構造を成し厚みのある滑膜組織を形成するのに対し、シノビオリン欠損マウスにおいては滑膜細胞の数が減るだけでなく細胞質が委縮し層が薄くなっていることが明らかとなった。また滑膜組織だけでなく、骨膜や軟骨組織の形成にも異常が認められた。次にノックアウトマウスの組織から RNA を調整し、DNA アレイを用いてさまざまな遺伝子の発現の変化を検討したところ、炎症性サイトカインの発現の低下が認められた。これらのことから シノビオリンが滑膜細胞の増殖や炎症反応さらには骨・関節の形成に重要であることが明らかになった。

シノビオリンによるユビキチン化を特異的に抑制するツールとしてシノビオリン阻害剤を単離しその効果を検証した。シノビオリンのユビキチン化酵素活性を指標に 200 万個の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い IC₅₀=20, 30 μM の阻害活性を有する 2 個の候補化合物が得られた (LS-101, 102) (図 1)。さらにこれらの化合物の構造をもとにスクリーニングを行いさらに、IC₅₀=0.15, 0.27 μM と活性の高い候補化合物が得られた。これらの化合物は シノビオリンノックアウト由来の MEF と比較し野生型の MEF の細胞増殖を優位に抑制した。次に関節炎に対する同化合物の影響を検討したところ、RA 患者由来の滑膜細胞の増殖を抑制した。さらに個体における効果の検討としてコラーゲン関節炎モデルマウスを作製し、そこに同化合物を連日投与した。その結果、シノビオリン酵素阻害剤を投与した個体では関節炎の重症度が抑制されることが明らかになった(図 2)。

以上のことから今回のスクリーニングにおいて、シノビオリンに対して特異的に作用し、有用な解析ツールとなりうるシノビオリン阻害剤が得られた。RA において PADI の基質としてシトルリン化されていることが知られる細胞外マトリックスは、分泌タンパク質を基質とするシノビオリンの基質でもありと考えられる。実際にコラーゲンは RA においてシトルリン化されていることが知られているが、一方でシノビオリンの基質であり今回得られたシノビオリン阻害剤によってその発現や成熟が抑制される。今後、シノビオリンによる修飾を特異的に阻害し、これらの基質に着目し解析を進めることでさらに二元的な調節機構が明らかになると考えられる。

シノビオリンは関節炎だけでなく組織線維化や肥満など様々な疾患に関与することが示唆されている。またシトルリン化酵素も RA だけでなく癌や神経変性疾患に関与する

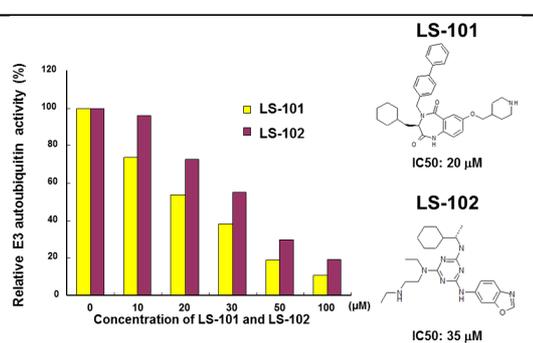


図 1 シノビオリン性阻害剤の単離

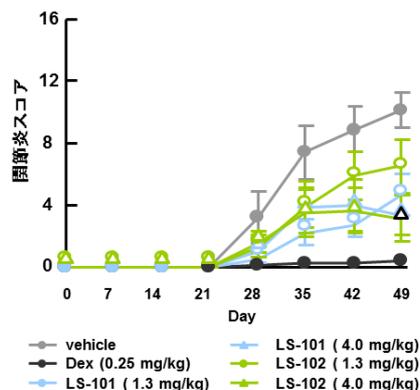


図 2 シノビオリン阻害剤による関節炎の抑制

ことが報告されている。これらのことから同化合物が様々な疾患に対して新しい治療役の開発につながると期待される。

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 4 件)

Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Kanazawa T, Itoh K, Yamano Y, Nakamura H, Nakajima T, Nishioka K, The Japanese version of the modified ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity., *Mod Rheumatol* 23(5): 846-850 (2013) 査読有 doi: 10.1007/s10165-012-0759-x

Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, T, Ito K, Yamano Y, Nakamura H, Asukai N, Nakajima T, Nishioka K and Okamura S, Vulnerability to traumatic stress in fibromyalgia patients: 19 months follow-up after the Great East Japan Disaster, *Arthritis Research & Therapy*, 15, R130, (2013) 査読有, doi: 10.1186/ar4310

Yagishita N, Aratani S, Leach C, Amano T, Yamano Y, Nakatani K, Nishioka K, Nakajima T, RING finger type E3

ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis, Int J Mol Med, 30 (6):1281-1286 (2012) 査読有 doi: 10.3892/ijmm.2012.1129

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(1):40-4 (2012) 査読有 doi: 10.1007/s10165-011-0462-3

〔学会発表〕(計 5 件)

荒谷聡子、藤田英俊、八木下尚子、西岡久寿樹、中島利博、リウマチと肥満を標的としたシノビオリン阻害剤の創薬開発研究の展開、第 3 回 医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム 2013 年 12 月 14 日 東京薬科大学

荒谷聡子、臼井千恵、山野嘉久、西岡健弥、藤田英俊、八木下尚子、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、西岡久寿樹、中島利博、日本線維筋痛症学会 第 5 回 学術集会 2013 年 10 月 5-6 日 横浜 (横浜開港記念館)

Aratani S, Fujita H, Yagishita N, Nishioka K, Nakajima T, Synoviolin inhibitors have anti-obesity activity, Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics 2013, 23-24 July 2013, Philadelphia, U.S.A.

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 15 ~ 16 日 長崎 (長崎ブリックホール)

Nakajima T, Yagishita N, Aratani S, Fujita H, Nishioka K, What tells us from Post-neonatal knock out of synoviolin Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics 2012, 23-25 July 2012, Philadelphia, U.S.A.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：小胞体ストレスシグナルを抑制することによる、薬剤の副作用としての体重増加や肥満を防止するために用いられる肥満防止剤

発明者：中島利博、荒谷聡子、臼井千恵、山野嘉久、西岡健弥、藤田英俊、八木下尚子、伊藤健司、中村郁朗、西岡久寿樹

権利者：株式会社エム・エス・エス

種類：特許

番号：特願 2013-121694

出願年月日：2013 年 6 月 10 日

国内外の別：国内

名称：IL-2 産生抑制

発明者：中島利博、荒谷聡子、青野浩之、西岡久寿樹

権利者：参天製薬株式会社

種類：特許

番号：特願 2013-060584

出願年月日：2013 年 3 月 22 日

国内外の別：国内

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

番号：特許、2012-283-763

出願年月日：2012 年 12 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med-ims.com/> 組織 / 運動器科学研究部門 /

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

荒谷 聡子 (ARATANI SATOKO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40387064