

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791009

研究課題名(和文) 滑膜細胞増殖関連因子 SPACIA1 複合体による遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism controlled by SPACIA1, which associated with synovial cell proliferation.

研究代表者

小松 梨恵 (KOMATSU, RIE)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究技術員

研究者番号：80517475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：SPACIA1は、関節リウマチ(RA)の主徴の一つである滑膜細胞の異常増殖に着目した先行研究で同定された新規滑膜細胞増殖関連因子である。本研究ではリウマチ滑膜炎の分子レベルでの理解を目指し、RA滑膜細胞由来のSPACIA1複合体を構成する精製タンパク質をショットガン質量分析に供し構成分子の同定を試みた。また、滑膜細胞においてSPACIA1がG1期の細胞周期調節因子CDK6のmRNA安定性を制御して発現制御することを示した。さらにCDK6の発現抑制は滑膜細胞増殖を有意に阻害したことから、CDK6がRAの病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：SPACIA1 is a novel gene associated with abnormal synovial proliferation which is one of the major characteristics of rheumatoid arthritis (RA). In this study, we aimed to a precise understanding of the molecular mechanisms behind this process. We analyzed constituents of purified SPACIA1 protein complex using shotgun proteomics. We identified CDK6, one of functional genes at G1 phase, which gene expression is regulated by SPACIA1 in mRNA turnover. CDK6 knockdown by its siRNA inhibited the proliferation of cultured RA synovial fibroblasts. These results suggested that CDK6 is functionally involved in RA synovial cell proliferation. Specific inhibition of CDK6 may be a useful therapeutic strategy for RA.

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：滑膜炎 細胞増殖 SPACIA1

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、異常な免疫・慢性的な炎症・滑膜細胞の異常増殖といった病態が複雑に関わる原因不明の疾患である。関節に痛み(関節滑膜炎)を引き起こし、最終的には骨破壊を引き起こすことによって患者の日常生活を阻む疾患である。RA の治療はサイトカイン阻害療法など、生物学的製剤による新しい治療法の出現により大きく進歩した。しかしながらこれらの治療薬は RA の炎症をターゲットとしてコントロールするばかりでなく、全身の免疫反応も抑制する可能性があり、例えば重篤な感染症や発ガンの副作用も報告されている。RA は多因子疾患であるため、個々の患者に適した治療法の開発が急務である。

RA の病態の解明は、慢性炎症性疾患としての側面については炎症細胞やサイトカインなどについて広範に解析されてきた。一方で、病態の中心と考えられる細胞増殖性疾患としての側面については未だ詳しく解明されていない。そこで我々の研究室では、RA の細胞増殖性疾患としての側面をターゲットとした研究を展開し、全く新規な滑膜細胞増殖関連因子 SPACIA1 を見出した。これまでに私たちは、SPACIA1 は RA 疾患患者の滑膜組織において滑膜過形成部位特異的に過発現が認められること、SPACIA1 の過剰発現マウスを用いた RA 疾患モデルにおいて、SPACIA1 は関節炎を増悪化しうる重要な因子であることを実証してきた (Sato T, Fujii R et al. Arthritis Rheum 2011)。したがって、SPACIA1 が関与する遺伝子発現制御機構を解明することは病態学的に非常に重要であるといえる。またこれまでの研究で、滑膜細胞に対して SPACIA1 の発現を抑制すると、G1 期の遅延が認められた。このことから SPACIA1 は、G1 期関連の細胞周期調節因子の遺伝子発現を制御していると推定されるが、その詳細は明らかになっていない。

そこで我々は、SPACIA1 の発現を抑制した滑膜細胞を用いて遺伝子発現抑制前後の遺伝子発現をプロファイリングし、特に「G1 期関連の細胞周期調節因子」に着目し解析を行うこととした。併せて、SPACIA1 の機能解析のために RA 滑膜細胞における多種類のタンパク質からなる SPACIA1 複合体の生化学的精製を行い、実際に SPACIA1 と相互作用するタンパク質の単離、同定を進めることとした。

2. 研究の目的

SPACIA1 と相互作用するタンパク質の同定および SPACIA1 による G1 期関連の細胞周期調節因子の発現調節メカニズムを細胞レベルにて検討し、SPACIA1 を介した滑膜細胞増殖の分子機構を総合的に明らかにする。さらに、SPACIA1 の制御が RA 疾患モデルにおいて関節炎を抑制しうるかを動物個体レベルにて検討し、創薬標的としての可

能性を探るとともに RA 病態の理解に貢献する。

3. 研究の方法

(1) SPACIA1 が関与する滑膜細胞増殖機構の特定

SPACIA1 により発現制御される G1 期関連遺伝子の同定

SPACIA1 に対する siRNA を RA 滑膜細胞に導入し G1 期関連の細胞周期調節因子の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて定量的に確認し、顕著な変化を認められた候補遺伝子を同定した。さらに、RA 患者由来の滑膜における発現を免疫組織化学的方法にて解析した。

細胞周期調節因子の発現低下が及ぼす滑膜細胞増殖への影響

siRNA を用いて細胞周期調節因子の発現を抑制し、FBS 刺激または TNF- α 刺激による RA 滑膜細胞増殖を抑制しうるか細胞増殖アッセイ法 (MTT 法) により評価した。

細胞周期調節因子の遺伝子発現における SPACIA1 制御機構の特定

SPACIA1 による細胞周期調節因子の制御レベルを解析した。転写調節については、プロモーター活性を検討した。転写後調節への影響については、アクチノマイシン D を用いて mRNA の半減期を検討した。

(2) SPACIA1 複合体の同定

SPACIA1 複合体の生化学的精製

大量の RA 滑膜細胞から核抽出液を調製し、イオン交換およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いてタンパク質複合体画分を得た。各精製画分は、抗 SPACIA1 抗体を用いたウエスタンブロッティング法を行い目的複合体が含まれる画分を確認した。

ショットガン質量分析法による SPACIA1 結合因子の同定

にて特定した SPACIA1 を含むタンパク質複合体を含む画分についてショットガン質量分析を行い、データベースにより解析した。

(3) RA 動物モデルにおける SPACIA1 の機能解析

RA 動物モデルの適用

SPACIA1 ホモ欠損マウスに RA モデルであるコラーゲン誘導関節炎 (CIA) を適用し、関節の腫張、発症率について野生型マウスと比較した。

RA 動物モデルにおける細胞周期調節因子の発現プロファイル

で CIA を適用した SPACIA1 ホモ欠損マウスおよび野生型マウスの足関節滑膜組織における細胞周期調節因子の発現を免疫組織化学的方法および *in situ*

hybridization 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) SPACIA1 が関与する滑膜細胞増殖機構の特定

SPACIA1 により発現制御される G1 期関連遺伝子の同定

G1 期関連の細胞周期調節因子の mRNA の発現レベルを定量的に解析した結果、SPACIA1 の発現抑制により、CDK6 の発現のみが有意に半減することを確認した(図 1)。この変化はタンパク質レベルにおいても確認された。

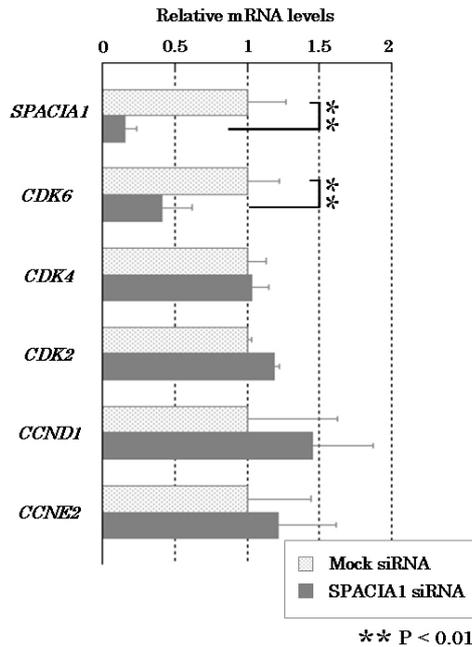


図1. SPACIA1発現抑制下で発現変動する G1期関連細胞周期因子プロファイル結果

続いて、組織レベルにおいても免疫組織化学的な検討を加え、RA 患者の滑膜表層細胞に強い CDK6 の発現を認めた(図 2) ことから、RA 滑膜における CDK6 が RA 病態特異的な機能的意義を持つ可能性が示唆された。

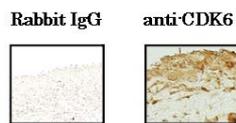


図2. RA患者滑膜におけるCDK6の局在

細胞周期調節因子の発現低下が及ぼす滑膜細胞増殖への影響

SPACIA1 が発現抑制する CDK6 について、CDK6 分子そのものが滑膜細胞増殖に及ぼす影響を検証した。その結果、他の G1 期細胞周期関連因子の発現を抑制しない CDK6 特異的な siRNA による発現抑制は、FBS 刺激のみならず TNF-誘導性の滑膜細胞増殖を有意に阻害した(図 3)。

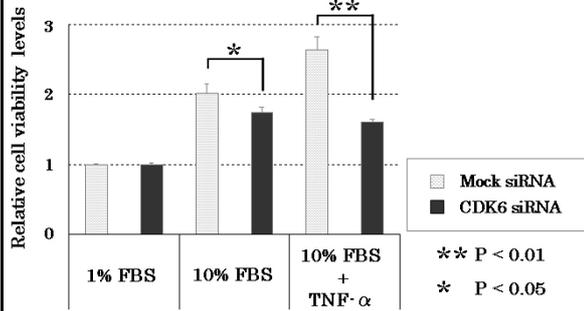


図3. CDK6のノックダウンがRA滑膜細胞の増殖に与える影響

細胞周期調節因子の遺伝子発現における SPACIA1 制御機構の特定

SPACIA1 による CDK6 の転写調節についてプロモーター活性を検討した。ルシフェラーゼのレポーター遺伝子に 2.5kb から 0.9kb 長の CDK6 プロモーター領域を組み込み、活性を測定した。しかし、SPACIA1 のノックダウンによるプロモーター活性の変化は認められなかった。一方、SPACIA1 発現抑制により CDK6 mRNA の分解が促進し、SPACIA1 は CDK6 mRNA の安定性を制御していること(図 4) が明らかとなった。

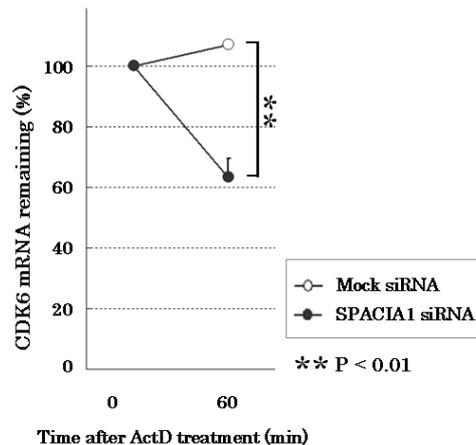


図4. SPACIA1の発現抑制によるCDK6のmRNA量の変化

(2) SPACIA1 複合体の同定

RA 滑膜細胞は初代培養細胞として用いられ、継代数が有限で増殖速度も遅くなることが知られており、遺伝子の過剰発現が困難である。そこで、過剰に発現したタグ融合 SPACIA タンパク質を含む核抽出液を高効率で得るために、Flag タグ SPACIA1 過剰発現マウスの肝臓や他の細胞株などをタンパク質精製源として検討した。その結果、他の細胞株と比較して RA 滑膜細胞のみに特異的な SPACIA1 複合体が存在することが明らかとなった。そのため最終的には、大量の RA 滑膜細胞の核抽出液を調製し、DEAE カラム、Superose6 カラムを用いて SPACIA1 タンパク質複合体を精製した。各画分は抗 SPACIA1 抗体を用いたウエスタンブロット

ング法を行い、目的とする SPACIA1 タンパク質複合体を含む精製画分を確認した(図5 *印, 画分 No.15)

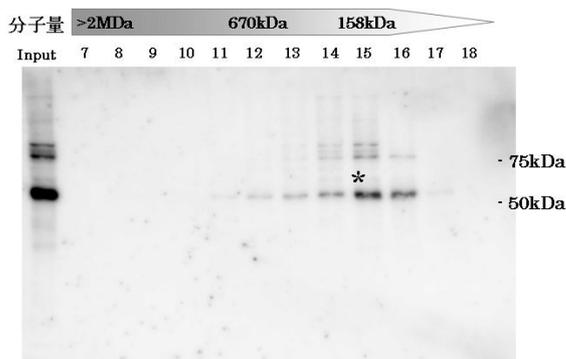


図5. SPACIA1タンパク質複合体を含む精製画分の特

この画分をショットガン質量分析に供しデータベースによる解析の結果、100 個程度の候補タンパク質を網羅的に同定した。そのうちの候補タンパク質についてはそれぞれの siRNA を RA 滑膜細胞に導入し、我々が示した SPACIA1 の下流因子である CDK6 の発現量を指標として、SPACIA1 と相互作用するタンパク質の特定を進めている。

(3)RA 動物モデルにおける SPACIA1 の機能解析

RA 動物モデルの適用

SPACIA1 ホモ欠損マウスに CIA を適用し野生型マウスと比較した。その結果、CIA 発症の早期において野生型マウスに比べ関節の腫張(重症度)が軽く、発症が遅い傾向を示したが現状、統計的に有意な差は認められておらず CIA 発症を完全に抑制することはなかった。実験の遂行にあたり SPACIA1 ホモ欠損マウスの産子が得られにくいという問題が生じたため飼養条件および交配条件を見直すことで、最近産仔数を確保することができるようになってきた。現在、各マウスを 20 匹以上用いた CIA を予定しており、CIA 発症の早期における差異を明確にすることができると考えている。さらに、CIA を誘導した SPACIA1 ホモ欠損マウスの足関節における滑膜組織の増生、炎症細胞の浸潤、骨破壊の程度を野生型マウスと詳細に比較することにより RA における SPACIA1 の滑膜増殖への寄与を明らかにしていきたい。

RA 動物モデルにおける細胞周期調節因子の発現プロファイル

CIA を適用した SPACIA1 ホモ欠損マウスおよび野生型マウスの足関節滑膜組織における CDK6 の発現を in situ hybridization 法および免疫組織化学的方法にて検討した。in situ hybridization 法では、我々が検出に成功してきた他の臓器とは異なり、線維組織およ

び結合組織に富む滑膜ではプローブの非特異的結合がおりバックグラウンドが上昇しやすいなどの問題があり、現状特異的なシグナルが得られていない。免疫組織化学的方法についても、複数の抗体を試したが、やはり特異性の問題があり結論が得られていない。マウスの CDK6 を特異的に認識する抗体については参考文献にも乏しく、今後はマウス CDK6 のリコンビナントタンパク質を作製し、特異性の高い抗体の作製を試みる予定である。

前述(3)の結果から、SPACIA1 の全欠損変異が CIA 発症を十分抑制できなかったことから、SPACIA1 分子自体は創薬標的となり得ないと結論付けた。本研究により、SPACIA1 が発現制御する CDK6 が RA の病態に重要な役割を果たしていることが示唆されたので今後は CDK6 分子をターゲットとして関節炎の抑制を目指したい。

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 1 件)

Fujii R, Komatsu R, Sato T, Yagishita N, Araya N, Aratani S, Nishikawa H, Yamano Y, Yudoh K, Beppu M, Nishioka K, Nakajima T. Analysis of a Core Promoter Context of Synovocyte Proliferation-Associated in Collagen Induced Arthritis 1 (SPACIA1) Gene Associated with Synovitis. **J St. Marianna Univ** 2012; 40: 51-56. 査読有

[学会発表](計 5 件)

Rie Komatsu, Ryoji Fujii, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Moroe Beppu, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima. CDK6 transcripts expression control by the synovocyte proliferation gene, SPACIA1. ACR/ARHP Annual Meeting, 29 October 2013, San Diego, U.S.A. (San Diego Convention Center)
小松梨恵、藤井亮爾、佐藤知雄、山野嘉久、遊道和雄、別府諸兄、西岡久寿樹、中島利博 滑膜炎関連因子 SPACIA1 による CDK6 の遺伝子発現調節機構の解析 第 57 回日本リウマチ学会 2013 年 4 月 18 日 京都府(国立京都国際会館)
 Ryoji Fujii, Rie Komatsu, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Moroe Beppu, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima. Analysis of a transcriptional complex on the core promoter of SPACIA1 gene, which associated with synovitis. 第 57 回日本リウマチ学会 2013 年 4 月 18 日 京都府(国立京都国際会館)

小松梨恵、藤井亮爾、佐藤知雄、山野嘉久、遊道和雄、別府諸兄、西岡久寿樹、中島利博 滑膜炎関連因子 SPACIA1 による CDK6 発現調節機構の解析 日本臨床免疫学会 Midwinter Seminar 2013 2013 年 3 月 2 日 沖縄県 (ANA インターコンチネンタル万座ビーチホテル)
Ryoji Fujii, Rie Komatsu, Tomoo Sato, Naoko Yagishita, Satoko Aratani, Koji Konomi, Hiroyuki Aono, Yoshihisa Yamano, Moroe Beppu, Kazuo Yudoh, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima. Analysis of core promoter context of SPACIA1/SAAL1 gene, which is related to synovitis. 第 56 回日本リウマチ学会 2012 年 4 月 26 日 東京都 (グランドプリンスホテル新高輪)

〔その他〕

ホームページ等

聖マリアンナ医科大学

難病治療研究センター診断治療法開発部門

<http://nanchiken.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小松 梨恵 (KOMATSU, RIE)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究技術員

研究者番号 : 80517475

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし