

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461490

研究課題名(和文)新規因子SPACIA1の分子機序に基づくリウマチ滑膜増殖阻害に関する研究

研究課題名(英文)Potential of SPACIA1 as a druggable target of rheumatoid arthritis

研究代表者

藤井 亮爾 (Fujii, Ryoji)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：10333535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜細胞増殖関連分子SPACIA1はリウマチ滑膜細胞の増殖を制御し、またマウスにおける過剰発現はコラーゲン誘導性関節炎を増悪化する。SPACIA1はG1期細胞周期因子CDK6のmRNAを安定化し発現を増強する。また滑膜細胞においてCDK6遺伝子はTNF- α によって転写レベルで活性化された。残念ながらSPACIA1の欠損マウスにもコラーゲン誘導性の関節炎は発症したため、下流因子であるCDK6について創薬標的としての可能性を検証した。siRNAによるCDK6のノックダウンは培養滑膜細胞の増殖を抑制し、またCDK6阻害剤のマウスへの投与はコラーゲン誘導性関節炎の発症をほぼ完全に抑制した。

研究成果の概要(英文)：SPACIA1 is a gene associated with abnormal synovial proliferation in rheumatoid arthritis (RA). We previously showed that SPACIA1 transgenic mice exhibited early onset and rapid progression of collagen-induced arthritis (CIA). In the present study, we showed SPACIA1 could be involved in expression of CDK6 gene, a G1 phase-cell cycle factor, via mRNA stability. We also confirmed that TNF- α regulates CDK6 expression on transcriptional level in RA-synoviocytes. Unfortunately, even SPACIA1-deficient mice were investigated onset of CIA, therefore we focused CDK6, not SPACIA1, to assess the potential as a druggable target of RA. CDK6 knockdown by its siRNA inhibited the proliferation of RA-synoviocytes. Moreover, treatment of CDK6 inhibitor to mice almost completely prevented development of CIA.

研究分野：分子生物学

キーワード：関節リウマチ 滑膜 細胞増殖 炎症

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは比較的若年に発症し、四肢関節の破壊により関節機能が廃絶する。その結果、生活の質 (QOL) が著しく損なわれる。発症頻度も 0.5% から 1% と高頻度の疾患であり、多くの症例が難治性で慢性・進行性に経過するため社会的影響も大きく、早急な根治的治療法の開発が望まれている。また関節リウマチの治療は、免疫抑制作用を持つ薬剤による炎症コントロールが主であり、近年脚光を浴びているサイトカイン阻害療法などの生物学的製剤も大きな効果をあげている。しかしながらその副作用として重篤な感染症のリスクが報告されており、また大規模臨床試験からも明らかのように、約 3 割の患者では十分な治療効果が得られていない。関節リウマチは多因子疾患であるため個々の患者に適した治療法の選択が必須であり、副作用の少ない新規な作用点をもつ治療薬の開発が求められている。また生物学的製剤を含む抗炎症剤の効きにくい患者の中に滑膜細胞増殖能が過剰な場合がある可能性も十分に考えられ、当研究室では『滑膜細胞増殖』に焦点をあてて研究を行っている。

滑膜細胞増殖とそれに伴う炎症は互いが互いを増悪化して関節リウマチを進行させるが、慢性炎症や異常免疫に関する研究がよく進んでいる一方で、滑膜細胞増殖を伴う滑膜炎の分子生物学的解析は意外なほど進んでいない。当研究室では『滑膜炎の分子生物学的理解』の端緒となる分子をリウマチ疾患動物モデルであるコラーゲン誘導関節炎マウスの膝関節から見出し、SPACIA1 (Synovocyte Proliferation-Associated in Collagen-Induced Arthritis 1) と名付けた。SPACIA1 はヒトの正常滑膜組織では発現が認められず、リウマチ滑膜組織に高発現していた。また培養滑膜細胞における SPACIA1 の発現抑制は細胞増殖を阻害した。SPACIA1 過剰発現マウスにコラーゲン誘導関節炎を適用し、SPACIA1 が関節炎の増悪因子であることを実証した (Arthritis Rheum. 2011)。さらに SPACIA1 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ関節炎の発症が遅れ、同時点において症状が軽い傾向にあった。このことは滑膜細胞増殖の阻害が少なくとも関節炎の進行を遅延し得ることを示している。滑膜炎を分子レベルで理解し、副作用の少ない効果的な抗リウマチ薬の標的分子を得るために、滑膜細胞増殖の分子機構をさらに多面的に理解し、分子標的を明確にしてその抗リウマチ作用を検証する必要がある。

先行研究において SPACIA1 の発現抑制は TNF- α 誘導性の滑膜細胞増殖をより強く阻害することを報告した。TNF- α の炎症における役割がよく研究されている一方で、細胞増殖の誘導作用は滑膜細胞でも古くから知られているが、その分子機構は様々な細胞で NF- κ B や AP-1 のシグナル経路が重要であるとの報告がある程度であり、他はほとんど不

明である。すでに SPACIA1 の標的細胞周期因子として CDK6 を同定している (図. 1)。SPACIA1 と TNF- α による協調的な滑膜細胞増殖制御機構を分子レベルで明らかにし、複数の候補分子についてリウマチ疾患マウスモデルを用いて抗リウマチ薬分子標的としての可能性を見極めたい。

2. 研究の目的

関節リウマチの慢性炎症や異常免疫の研究にくらべ滑膜細胞増殖の分子生物学的理解は立遅れているのが現状である。そこで当研究室では滑膜細胞増殖機構解明のための端緒となる分子として、新規滑膜増殖関連因子 SPACIA1 を見出し、その過剰発現マウスやノックアウトマウスを用いて関節炎における重要性を示してきた。SPACIA1 が TNF- α 誘導性の滑膜細胞増殖に関与することもすでに報告しており、本研究計画は以下の 2 点を明らかにすることを目的とする。

研究 : 滑膜細胞増殖における SPACIA1 と TNF- α の協調的制御機構の解明

研究 : 滑膜細胞増殖関連分子の抗リウマチ薬標的分子としての有効性の検証

本研究の成果として滑膜炎の分子レベルでの理解が深まるだけでなく、既存薬で問題となっている免疫抑制の副作用と無関係な滑膜細胞増殖を標的とする全く新しい抗リウマチ薬の創薬につながることを期待される。

3. 研究の方法

本研究計画では、まず TNF- α が誘導するリウマチ滑膜細胞の増殖について、TNF- α が制御する G1 期細胞周期因子を同定してシグナル経路を明らかにする。さらに先行研究で明らかになりつつある SPACIA1 の細胞周期遺伝子に対する作用と TNF- α の協調的制御機構の全容を分子レベルで明らかにする。次に明らかにした滑膜細胞増殖に関与する分子を標的とする特異的な薬剤を既存の細胞増殖阻害剤の中から見出し、有望なものについてリウマチ疾患モデル動物を用いてその有効性を検証する。

(1) SPACIA1 が制御する G1 期細胞周期因子の同定

SPACIA1 特異的な siRNA を用いて、培養滑膜細胞中で SPACIA1 の発現量をノックダウンした後、全 mRNA 中の細胞周期因子 (CDK2, CDK4, CDK6, CCND1, CCNE2) mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(2) TNF- α による CDK6 発現増強のシグナル経路

TNF- α の転写活性化経路阻害剤として AP-1 阻害剤、NF- κ B 阻害剤を培養滑膜細胞

に作用させ、TNF- による CDK6 発現増強のシグナル経路を特定した。

(3) コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおける SPACIA1 ノックアウトの効果

関節炎抑制における SPACIA1 発現量抑制の効果を検証するため、SPACIA1 遺伝子のノックアウトマウスを作製しコラーゲン誘導関節炎モデルを適用した。

(4) 培養滑膜細胞の細胞増殖における CDK6 遺伝子ノックダウンの効果

細胞周期における CDK6 のパートナーはサイクリンDであり、同様に CDK4 もサイクリンDと協調的に働くことが知られている。分子的にも両者は非常に良く似たキナーゼである。つまり CDK6 の働きは CDK4 で補い得るため CDK6 の阻害は細胞増殖の抑制につながる可能性も考えられた。そこでまず培養滑膜細胞レベルで CDK6 遺伝子に対する siRNA を用いて CDK6 をノックダウンし、滑膜細胞増殖に対する影響を MTT アッセイにより測定した。

(5) コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおける CDK6 阻害剤の効果

関節炎抑制における CDK6 発現量抑制の効果を検証するため、コラーゲン誘導関節炎モデルを適用し、CDK6 阻害剤を投与した。

4. 研究成果

(1) SPACIA1 が制御する G1 期細胞周期因子の同定

当研究室のこれまでの成果から SPACIA1 が滑膜細胞の G1 期細胞周期の制御に関わっていることが明らかであり、その標的因子の特定を試みた。SPACIA1 をノックダウンした培養滑膜細胞において全 mRNA を抽出し、G1 期細胞周期因子の発現変動を測定したところ、唯一 CDK6 遺伝子のみ、その発現量が半減した(図1)。

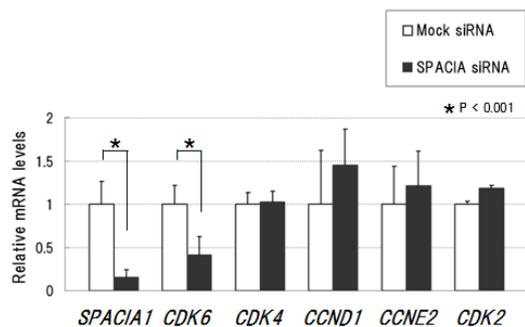


図1. G1 期因子の発現量に対する SPACIA1 ノックダウンの影響

(2) TNF- による CDK6 発現増強のシグナル経路

他の培養細胞でも報告があるように、培養滑膜細胞においても TNF- が CDK6 の発現を

増強することを確認した。そのシグナル経路を阻害剤を用いて検証したところ、培養滑膜細胞においても、NF- κ B 経路が CDK6 発現増強に関わっていることが明らかとなった。TNF- は滑膜細胞においても既知の転写レベルにおいて CDK6 を発現増強する。その一方で SPACIA1 は翻訳レベルの mRNA 安定化により CDK6 遺伝子の発現に関わっていることをすでに報告している。つまり TNF- と SPACIA1 は互いに独立した経路を用いて滑膜細胞中の CDK6 遺伝子発現を協調的に制御していると考えられる。このことは TNF- を標的とした既存の生物学的製剤が効果不十分となる場合において、CDK6 が新たな薬剤標的となり得ることを示す。

(3) コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおける SPACIA1 ノックアウトの効果

SPACIA1 ノックアウトを作製し、コラーゲン誘導関節炎モデルを適用したところ、野生型マウスと比較して炎症スコアや発症率において部分的な有意差が認められ、SPACIA1 の欠損は関節炎の病態を軽減することを明らかにした(図2)。しかしながら SPACIA1 の発現量ゼロの状態であっても、最終的に発症率は 100%であり、SPACIA1 そのもの自体やその上流シグナル因子の創薬標的としての可能性は低いと判断した。

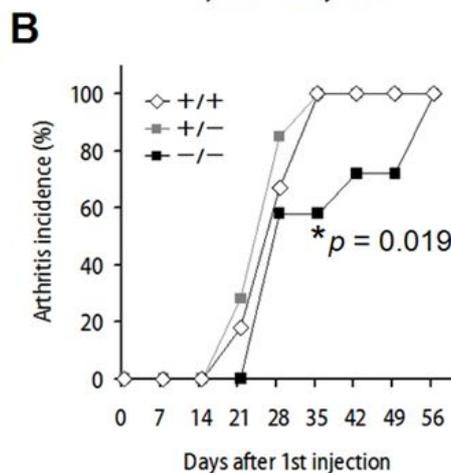
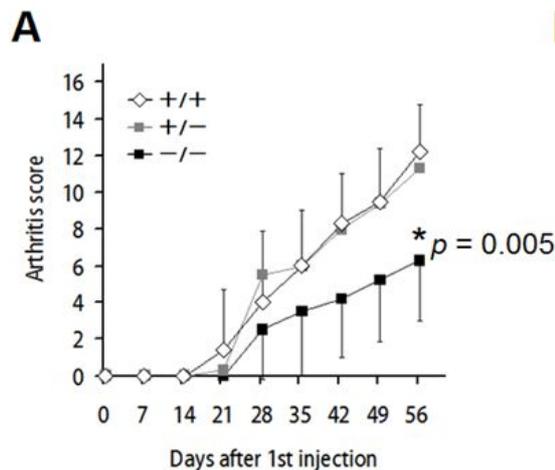


図2. コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおける SPACIA1 ノックアウトの効果

(4) 培養滑膜細胞の細胞増殖における CDK6 遺伝子ノックダウンの効果

CDK6 に対する siRNA を 3 種作製したところ、その中から CDK6 の発現量には影響せず、CDK6 だけを発現抑制する siRNA が 1 つ得られた。その siRNA を用いて CDK6 をノックダウンし培養滑膜細胞の増殖を測定したところ、コントロールと比較して有意な増殖抑制が観察された(図 3)

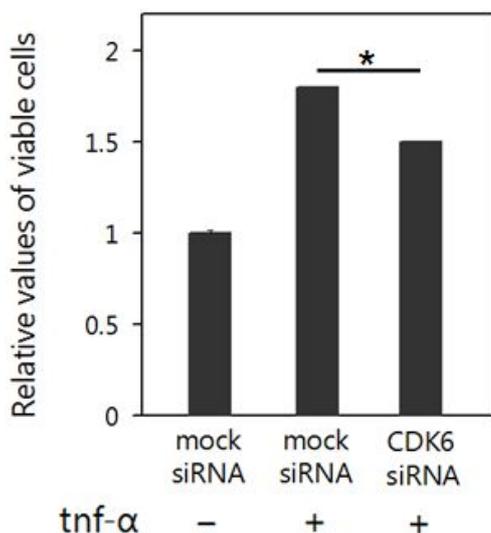


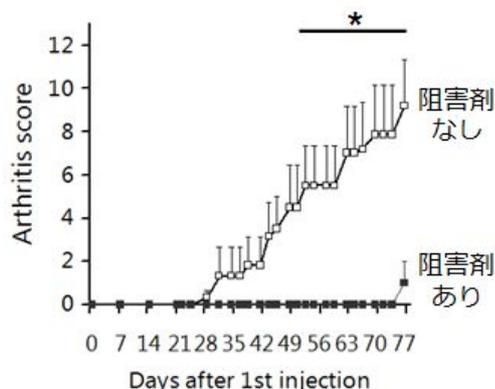
図 3 .培養滑膜細胞の細胞増殖における CDK6 遺伝子ノックダウンの効果

(5) コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおける CDK6 阻害剤の効果

前述の(3) SPACIA1 ノックアウトマウスを用いた検討から SPACIA1 それ自体や上流シグナル因子ではなく、(1)で見出した SPACIA1 が制御する下流因子 CDK6 の創薬標的としての可能性を検証するため、コラーゲン誘導マウス関節炎モデルに対して CDK6 阻害剤投与実験を行った。その結果十分量の阻害剤を投与すればコラーゲン誘導性の関節炎は、ほぼ 100%抑制できることが明らかとなった(図 4)。このことは、CDK6 を標的とした滑膜細胞増殖阻害が関節リウマチの新たな治療法となる可能性を示す。サイトカインストームが起こっているような炎症レベルの高いリウマチ患者において、TNF- 等炎症因子を標的とした生物学的製剤による治療の効果があらわれづらいケースにおいて、CDK6 阻害剤を併用することによる新たな治療法をもたらす可能性がある。

今後は実験的に用いた CDK6 阻害剤の効果が副作用ではなく、確かに CDK6 発現抑制をもとにした効果であることを確認するため、CDK6 ノックアウトマウスを用いた関節炎モデル実験を行う予定である。

関節炎スコア



発症率

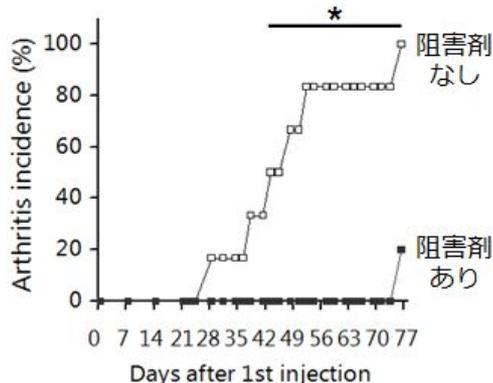


図 4 .コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおける CDK6 阻害剤の効果

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)

Fujita H, Aratani S, Fujii R, Yamano Y, Yagishita N, Araya N, Izumi T, Azakami K, Hasegawa D, Nishioka K, Nakajima T. Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF-κB regulates NF-κB signaling in cells subjected to ER stress. *Int J Mol Med*. 査読有、37 巻(6)、2016、1611-1618. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2566.

[学会発表](計 7 件)

Rie Komatsu, Kazuo Yudoh, Hisateru Niki, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima, Ryoji Fujii.

SPACIA1/SAAL1 が制御する CDK6 発現量の減少は RA 滑膜細胞の増殖を抑制する
第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2017 年 4 月(福岡).

Rie Komatsu, Iwao Seki, Tomoo Sato, Hiroyuki Aono, Yoshihisa Yamano, Kazuo

Yudoh, Hisateru Niki, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima, Ryoji Fujii.
Mice deficient in SPACIA1/SAAL1 ameliorates the progression of collagen-induced arthritis.
第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016 年 4 月(横浜).

Ryoji Fujii, Iwao Seki, Rie Komatsu, Miwa Takai, Tomomi Kohara, Tomoo Sato, Kohji Konomi, Hiroyuki Aono, Kazuo Yudoh, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima.
SPACIA1/SAAL1-Deficient Mice Show Reduced Disease Progression in Collagen-Induced Arthritis.
American College of Rheumatology November 2015(San Francisco).

Rie Komatsu, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Moroe Beppu, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima, Ryoji Fujii.
Effect of CDK6 inhibitor on mice collagen-induced arthritis model.
第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2015 年 4 月(名古屋).

Rie Komatsu, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Moroe Beppu, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima, Ryoji Fujii.
Functional CDK6 expression controlled by SPACIA1 in RA synovioocyte proliferation.
第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月(東京).

Rie Komatsu, Ryoji Fujii, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Moroe Beppu, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima
CDK6 transcripts expression control by the synovioocyte proliferation gene, SPACIA1.
American College of Rheumatology October 2013(San Diego).

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総会・学術集会 2013 年 4 月(京都).

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nanchiken.jp/shindan/achievement/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 亮爾 (FUJII, Ryoji)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：10333535

(2)連携研究者

遊道 和雄 (YUDO, Kazuo)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60272928

小松 梨恵 (KOMATSU, Rie)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・

研究技術員

研究者番号：80517475