

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861319

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるMDM2の役割

研究課題名(英文) The role of MDM2 in rheumatoid arthritis

研究代表者

川畑 智子 (Kawabata, Tomoko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90600669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチは自己免疫性の慢性炎症により多関節が罹患し骨や関節の破壊を生じる疾患である。最近の治療ではTNF やIL-1 をターゲットとした生物製剤が使用でき、治療内容も大きく変化した。しかし、まだ病態が不明で、新しい治療薬が望まれている。以前、我々はリウマチ性滑膜線維芽細胞(RASF)ではHDAC1の活性がTNF と正の相関をすることを報告。今回我々はHDAC1と複合体を作っていると想定されているMDM2に注目した。実験では、RASFにてTNF 等のサイトカイン刺激下でMDM2阻害剤を使用。蛋白レベルではp53の発現が上昇し、アポトーシスの誘導を示し新しいIRAの治療薬となる可能性を考えた。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation of the synovial tissues in multiple joints that leads to bone and joint destruction. Recent clinical application of biologic agents targeted to inflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF) or interleukin-1 (IL)-1 dramatically changed the treatment strategy for RA. Nevertheless, the etiology of RA inflammation still remains unknown, and there is a demand for developing new therapies with alternative targets. We reported that expression of HDAC1 were significantly higher in RA than in OA synovial tissues, and they were upregulated by TNF stimulation in RASFs. Previous report indicated that Mdm2-HDAC1 complex deacetylates p53. Our result showed that the protein level of nuclear p53 was higher in RASF which treated MDM2 inhibitor and apoptosis of RASF was induced in TUNEL staining. MDM2 inhibitor may induce cell cycle arrest and/or apoptosis as new RA therapies.

研究分野：リウマチ膠原病内科

キーワード：MDM2 HDAC1 関節リウマチ TNF アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

わが国における関節リウマチ患者は約70万人であり、人口の約1%弱となっている。関節リウマチ(以下RA)は関節の滑膜組織に慢性炎症が生じる自己免疫性疾患であるが、未だ原因は究明できていない。2002年よりわが国でもTNF やIL-6等をターゲットとした分子治療薬である生物製剤が続々と発売され、RAの治療を抜本から変え、一部の患者では従来の抗リウマチ薬では成し得なかった骨破壊抑制などを効果として認めている。しかし、有効率は約7割程度で、高価であり、感染症の合併や悪性腫瘍罹患率の上昇などの問題点も多いため、依然として新しい治療が求められている。

RAの発症には、遺伝子の後修飾性変化(エピジェネティクス)が関与している可能性が高いと考えられている(*Journal of Autoimmunity* 30:12-20, 2008)。中でもヒストンアセチル化などのエピジェネティックな調節異常が注目されている。遺伝子の発現は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の2つの拮抗した酵素のバランスにより調整されている(図1)。我々は、コラーゲン誘導関節炎モデルマウスにて、FK228(HDAC阻害剤)の投与による関節炎の改善を明らかにした。さらに、滑膜組織のTNF やIL-1は著明に低下していた(*Nishidaら Arthritis Rheum*, 2004)。HDAC1-8の8種のうち、どのHDACがRAの炎症に関与しているかは不明であった。そこで、我々はRAと変形性関節症のヒト滑膜組織におけるHDACのプロファイルを検討し、特にHDAC1がRA滑膜やRASF(リウマチ由来滑膜線維芽細胞)で優位な上昇を示し、さらにTNF投与にて二次的にHDAC1が上昇することを明らかにした。(Kawabataら *Arthritis Res Ther*, 2010) HDAC1はすべての細胞に対する影響が推測され、オフターゲット効果と呼ばれる標的以外の分子への影響を排除することは困難である。そこで、HDAC1がp53(癌抑制遺伝子)とMDM2(murine double-minute protein 2)と複合体を形成し相互に調整していることに注目し、特にp53に特異性の高いMDM2

を新たなRAの治療ターゲットとしてすることを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、関節リウマチの原因として考えられている遺伝子の後修飾性変化(エピジェネティクス)に注目し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)1、癌抑制遺伝子p53と複合体を形成するMDM2について検討を行い、関節リウマチにおけるMDM2の役割を明らかにする。さらに、副作用の少ないMDM2阻害剤の関節リウマチ治療薬としての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

関節リウマチと変形性関節症患者の手術検体から得たヒト滑膜組織とリウマチ由来滑膜線維芽細胞(RASF)にて、HDAC1、p53、アセチル化p53、MDM2、p21をmRNAレベル、蛋白レベルで確認をする。RASFに対してはTNFとIL-1刺激やMDM2拮抗薬使用有無にて経時的に比較検討を行う。MDM2拮抗薬使用下にてRASFのcaspase3/7活性を測定し、RASFのTUNEL染色を行いアポトーシスの程度を確認する。コラーゲン誘導関節炎モデルマウスにてMDM2拮抗薬を使用し、関節炎の改善の有無やその副作用についても検討する。

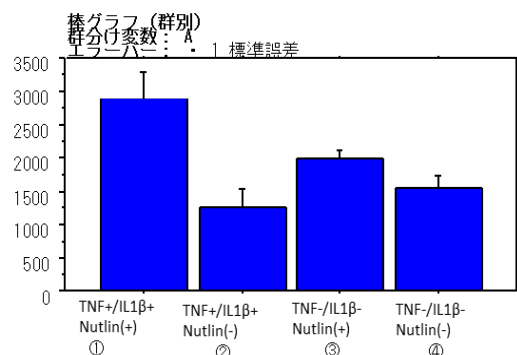
4. 研究成果

MDM2、p53、HDAC1の発現
MDM2拮抗薬であるnutlin-3を使用し、TNF、IL-1刺激後6時間、12時間、24時間のp53の蛋白発現の上昇を示した。

Caspase3/7を測定

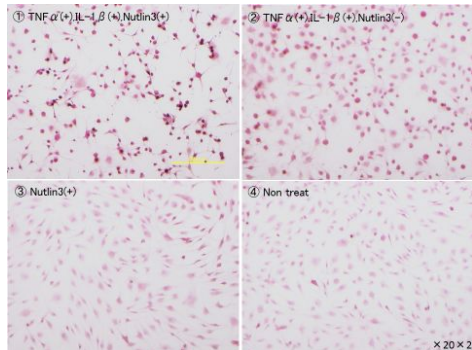
caspase 3/7活性をRASF(n=4)にてMDM2使用有無、TNFなどの炎症性サイトカインによる刺激有無の条件で夫々測定(図1)。TNF等の刺激のみではCaspase3/7活性は低く、そこにnutlin-3を加えると活性が有意に高い傾向を認めた(p=0.016)。一方、刺激がない状態でのnutlin-3使用は使用しないコントロールと比較して優位差を認めなかった(p=0.104)。

【図1】



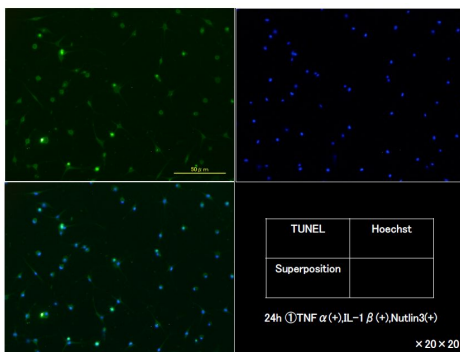
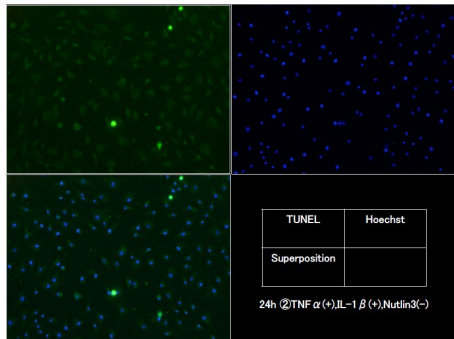
HE 染色、TUNEL 染色

【HE 染色】TNF 等の刺激下では RASF の細胞形態が変化しており、Nutlin-3 投与にて細胞数減少が確認された。



【TUNEL 染色 Hoechst 染色】

Nutli-3 使用下では染色された細胞の増加を認め、アポトーシス誘導が示唆された。



MTS アッセイ

MTS アッセイを RASF (n=4) にて MDM2 使用有無、TNF などの炎症性サイトカインによる刺激有無の条件にて施行。有意差は出なかったが (p=0.075) TNF 等刺激下にて MDM2 使用した場合、細胞増殖が抑えられる傾向を認めた。

以上より、RASF において TNF 刺激下であっても MDM2 阻害剤の使用により、細胞増殖は抑えられ、アポトーシスを誘導していることが判明した。その役割としては MDM2 阻害剤による p53 の発現亢進が寄与していると考えられた。MDM2 阻害剤は RA の新しい治療薬としての候補と考えられた。

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 2 件)

Bilateral Abducens Nerve Palsy due to Idiopathic Intracranial Hypertension as an Initial Manifestation of Systemic Lupus Erythematosus.

Katsuyama E, Sada KE, Tatebe N, Watanabe H, Katsuyama T, Narazaki M, Sugiyama K, Watanabe KS, Wakabayashi H, Kawabata T, Wada J, Makino H.

Intern Med. 2016;55(8):991-4. (査読有り)

Long-term observation of osteomalacia caused by adefovir-induced Fanconi's syndrome.

Terasaka T, Ueta E, Ebara H, Waseda K, Hanayama Y, Takaki A, Kawabata T, Sugiyama H, Hidani K, Otsuka F.

Acta Med Okayama. 2014;68(1):53-6.

(査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 智子 (KAWABATA, Tomoko)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

地域医療人材育成講座・助教

研究者番号：90600669

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

岡山大学医歯薬学総合研究科

地域医療人材育成講座・助教 小川 弘子

(OGAWA Hiroko)

岡山大学医歯薬学総合研究科

機能再生・再建科学講座 人体構成学分野

・准教授 西田 圭一郎

(NISHIDA Keiichiro)