

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09514

研究課題名(和文) 関節リウマチ滑膜に高発現するRasGRP4が滑膜増殖を促すメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) The mechanism how RasGRP4 promotes proliferation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis

研究代表者

保田 晋助 (Yasuda, Shinsuke)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00374231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：RasGRP4はマスト細胞、単球、好中球でRasを活性化するグアニン交換因子である。我々は、RA患者の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) にRasGRP4が高発現し、その増殖を促進することを明らかにした (Kono and Yasuda et al, Arthritis Rheumatol 2015)。今回の検討でRasGRP4-Ras-MAPK経路の活性化が明らかとなり、これをターゲットとした治療の可能性を検討した。Ras活性化を阻害するtipifarnibによって、FLS増殖が濃度依存性に抑制された (Shimamura & Yasuda et al, 東アジアリウマチ学会 2017)。

研究成果の概要(英文)：RasGRP4 is a guanine exchange factor for Ras, expressed mainly in mast cells, monocytes and neutrophils. We previously found aberrant RasGRP4 expression in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with rheumatoid arthritis (RA) that controls proliferation of FLS (Kono, Yasuda et al Arthritis Rheumatol 2015). Downstream of RasGRP4, Ras, MAPK activation was confirmed. We investigated the possibility of treatment targeting RasGRP4-Ras-MAPK pathway. Tipifarnib is a farnesyltransferase inhibitor that inhibits Ras activation, mostly tested in clinical trials for neoplasms. Treatment with tipifarnib inhibited FLS proliferation in a dose-dependent manner (Shimamura, Yasuda et al, EAGOR meeting 2017). We suggest inhibition of Ras activation as a feasible treatment for RA).

研究分野：関節リウマチ・全身性自己免疫疾患

キーワード：関節リウマチ 線維芽細胞様滑膜細胞 Ras RasGRP4

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は慢性の関節滑膜の炎症と滑液貯留による関節痛、関節腫脹を特徴とする自己免疫性疾患である。メトトレキサートや生物学的製剤などによって寛解や関節破壊の抑制が可能となってきたが、依然として寛解を得られない症例は5割程度存在することから新たな治療ターゲットの探索が待たれる。

2. 研究の目的

RasGRP4 (Ras-guanyl releasing protein 4) は主に血球系細胞に発現する Ras の活性化因子であるが、最近我々は、RA 患者の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) に RasGRP4 が高発現し、その増殖を促進することを明らかにした。TNF 刺激によって RasGRP4 の発現が亢進することから、本研究では、サイトカイン刺激によって RasGRP4 が高発現し、下流のシグナル分子を活性化する経路について検討し、滑膜増殖を制御可能かどうかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

RA 滑膜における MAPK 活性化の評価; RA 滑膜における RasGRP4 および下流の MAPK である Erk, p38 MAPK および JNK のリン酸化を組織染色によって検討した。

RA-FLS における RasGRP4 下流シグナルの検討; RA-FLS はサイトカイン非存在下で継代培養を経ると RasGRP4 の発現が低下する。この状態の FLS に RasGRP4 を強制発現させ、Ras, Mef, MEK, Erk など下流シグナルの活性化を、免疫プロット法などによって検討した。

RasGRP4-Ras-MAPK 系阻害による FLS の増殖抑制; Ras は、そのトランスロケーションを阻害する farnesyltransferase inhibitor (FTI) による活性化抑制を受ける。FTI の一種である Tipifarnib は、急性骨髄性白血病 (AML) その他の癌腫で治験が行われ、RasGRP4 高発現の AML には有効であることが報告されたが、治療薬としては認可されていない。我々は、関節リウマチ患者由来 FLS を Tipifarnib 存在下で培養し、その増殖を BrDU assay で定量した

4. 研究成果

RA 滑膜における MAPK 活性化の評価; RA 滑膜組織の免疫組織化学標本において RasGRP4、リン酸化 ERK、リン酸化 p38MAPK は滑膜組織表層の FLS の重層化している部分に高発現していた。

RA-FLS における RasGRP4 下流シグナルの検討; HEK293 細胞に RasGRP4 を強制発現させることにより Raf/MEK/ERK、p38MAPK、JNK のリン酸化が検出された。継代を進めて RasGRP4 の発現が低下した

FLS に RasGRP4 を強制発現することによっても ERK および p38MAPK のリン酸化が検出された。

RasGRP4-Ras-MAPK 系阻害による FLS の増殖抑制; RA-FLS を Tipifarnib 存在下で培養し、その増殖を BrDU assay で定量したところ、濃度依存性の増殖抑制効果を確認した。

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14件)

1. Nakamura H, Odani T, Yasuda S, Noguchi A, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Sugita J, Endo T, Teshima T, Atsumi T. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for patients with severe systemic sclerosis: Long-term follow-up on a phase II trial and treatment-related fatal cardiomyopathy. *Mod Rheumatol in press* (査読あり)
2. Tanimura S, Fujieda Y, Kono M, Shibata Y, Hisada R, Sugawara E, Nakamura H, Ohmura K, Shimamura S, Mitani A, Shida H, Watanabe T, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Yasuda S, Shimizu C, Atsumi T. Clinical significance of plasma prepropepsin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol. in press* (査読あり)
3. Shimizu Y, Yasuda S, Kimura T, Nishio S, Kono M, Ohmura K, Shimamura S, Kono M, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Fukasawa Y, Tanaka S, Atsumi T. Interferon-Inducible Mx1 protein is highly expressed in renal tissues from treatment-naïve lupus nephritis, but not in those under immunosuppressive treatment. *Mod Rheumatol in press* (査読あり)
4. Kono M, Yasuda S, Kono M, Atsumi T. Tocilizumab reduced production of scleroderma-related autoantibodies and anti-cyclic citrullinated protein antibodies in two patients overlapping scleroderma and rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol. in press* (査読あり)
5. *Yasuda S, Ohmura K, Kanazawa H, Kurita K,

- Kon Y, Ishii T, Fujieda Y, Jodo S, Tanimura K, Minami M, Izumiyama T, Matsumoto T, Amasaki Y, Suzuki Y, Kasahara H, Yamauchi N, Kato M, Kamishima T, Tsutsumi A, Takemori H, Koike T, Atsumi T. Maintenance Treatment using Abatacept with Dose Reduction after Achievement of Low Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis (MATADOR) - A prospective, multicenter, single arm pilot clinical trial. *Mod Rheumatol*.2017;27(6):930-937. (査読あり)
6. Atsumi T, Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Yasuda S, Yamanishi Y, Kita Y, Matsubara T, Iwamoto M, Shoji T, Togo O, Okada T, van der Heijde D, Miyasaka N, Koike T. Clinical Benefit of 1-Year Certolizumab Pegol (CZP) Add-on Therapy to Methotrexate Treatment in Early Rheumatoid Arthritis Patients was Observed Following CZP Discontinuation: 2-Year Results of the C-OPERA Study. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(8):1348-1356. (査読あり)
7. Kono M, Kamishima T, Yasuda S, Sakamoto K, Abe S, Noguchi A, Watanabe T, Shimizu Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Atsumi T. Effectiveness of whole-body magnetic resonance imaging for the efficacy of biologic anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective pilot study. *Mod Rheumatol*. 2017;27(6):953-960. (査読あり)
8. Kato M, Ospelt C, Kolling C, Shimizu T, Kono M, Yasuda S, Michel BA, Gay RE, Gay S, Klein K, Atsumi T. AAA-ATPase p97 suppress apoptotic and autophagy-associated cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Oncotarget* 2016.7(39):64221-64232. (査読あり)
9. Oku K, Nakamura H, Kono M, Ohmura K, Kato M, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Atsumi T. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*.2016;15(10):1001-4. (査読あり)
10. Shimizu Y, Yasuda S, Kako Y, Nakagawa S, Kanda M, Hisada R, Ohmura K, Shimamura S, Shida H, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Kusumi I, Atsumi T. Post-steroid neuropsychiatric manifestations are significantly more frequent in SLE compared with other systemic autoimmune diseases and predict better prognosis compared with *de novo* neuropsychiatric SLE. *Autoimmun Rev*. 2016;15(8):786-94. (査読あり)
11. Fujieda Y, Amengual O, Kono M, Kurita T, Otomo K, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Kuroki K, Maenaka K, Matsumoto M, Hatakeyama S, Atsumi T. Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55(6):1117-26. (査読あり)
12. Oku K, Amengual O, Hisada R, Oomura K, Nakagawa I, Watanabe T, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Autoantibodies against complement component 1 q subcomponent (C1q) contribute to complement activation and recurrent thrombosis/pregnancy morbidity in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55(8):1403-11. (査読あり)
13. Atsumi T, Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Yasuda S, Yamanishi Y, Kita Y, Matsubara T, Iwamoto M, Shoji T, Okada T, van der Heijde D, Miyasaka N, Koike T. The first double-blind, randomised, parallel-group certolizumab pegol study in methotrexate-naive early rheumatoid arthritis patients with poor prognostic factors, C-OPERA, shows inhibition of radiographic progression. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):75-83. (査読あり)
14. Yasuda S, Atsumi T, Shimamura S, Ono K, Hiromura K, Sada K, Mori M, Takei S, Kawaguchi Y, Tamura N, Takasaki Y. Surveillance for the use

of mycophenolate mofetil for adult patients with lupus nephritis in Japan. *Mod Rheumatol.* 2015;25(6):854-7. (査読あり)

〔学会発表〕(計9件)

1. Yasuda S, Shimamura S, Kono M, Atsumi T. RasGRP-Ras-MAPK activation in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis and inhibition of this pathway by Ras translocation. 日本免疫学会. 2017年12月12-14日:仙台市
2. 保田晋助: シンポジウム「自己抗体が引き起こす血栓・出血性疾患」第61回日本リウマチ学会総会・学術集会、福岡, 2017年4月20-22日
3. 保田晋助, 大村一将, 金澤洋, 栗田崇史, 近祐次郎, 石井智徳, 藤枝雄一郎, 浄土智, 谷村一秀, 三浪三千男, 泉山朋政, 松本巧, 天崎吉晴, 鈴木陽子, 笠原英樹, 山内尚文, 加藤将, 神島保, 堤明人, 竹森弘光, 小池隆夫, 渥美達也「アバタセプト減量による関節リウマチ維持療法～北海道・東北地域での多施設前向き介入試験～」第61回日本リウマチ学会総会・学術集会、福岡, 2017年4月20-22日
4. Yasuda S, Ohmura K, Kanazawa H, Kurita T, Kon Y, Ishii T, Jodo S, Tanimura K, Minami M, Izumiyama T, Matsumoto T, Amasaki Y, Suzuki Y, Kasahara H, Yamauchi N, Tsutsumi A, Takemori H, Koike T, Atsumi T. Maintenance treatment using abatacept with dose reduction after achievement of low disease activity in patients with rheumatoid arthritis (MATADOR) – a prospective, multicenterred, single arm clinical trial. ACR meeting, Washington DC, USA. Nov 14, 2016
5. 保田晋助. シンポジウム「ドラッグリポジショニングが変える膠原病リウマチ性疾患治療: ループス腎炎に対するミコフェノール酸モフェチルの治療効果」第31回日本臨床リ

ウマチ学会. 東京. 2016年10月29日

6. 保田晋助. 成人ループス腎炎の予後と治療戦略. (シンポジウム) 第59回日本腎臓会学術総会: 横浜. 2016年6月17-19日
7. Yasuda S, Shimizu Y, Kanda M, Kono M, Nakamura H, Hisada R, Ohmura K, Shimamura S, Shida H, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Kusumi I, Atsumi T. Post-steroid neuropsychiatric manifestations are significantly more frequent in SLE compared with other autoimmune diseases and predict better prognosis compared with *de novo* NPSLE. 10th International Congress on Autoimmunity, Leipzig, Germany, Apr 6-10, 2016
8. Yasuda S, Shimizu Y, Kono M, Shimamura S, Noguchi A, Shida H, Watanabe T, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Atsumi T. Myxovirus resistance protein 1 (Mx1) levels are elevated in T cells of the patients with SLE and serum Mx1 is a marker of Neuropsychiatric SLE. 11th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, Viena, Austria, Sep 2-6, 2015
9. Yasuda S, Shimamura S, Shimizu Y, Kono M, Shimizu T, Takahata M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Atsumi T. Overexpression of RasGRP4 in proliferative synovitis induces activation of Erk and p38-MAPK. FOCiS meeting, San Diego, USA Jun 24-27, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://med2-hokudai.jp>

6. 研究組織
(1)研究代表者
保田晋助 (YASUDA, Shinsuke)
北海道大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：00374231

(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
()