

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09525

研究課題名(和文)細胞内代謝制御による関節リウマチの新規治療法の開発

研究課題名(英文)A metabolic approach for discovering therapeutic target in rheumatoid arthritis synovial fibroblast

研究代表者

三枝 淳 (Saegusa, Jun)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20514970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の関節破壊に関与している滑膜細胞(RA-FLS)の細胞内代謝に着目して研究を行い、以下の知見を得た。1. RA-FLSではグルタミナーゼ(GLS)1の発現が亢進しており、GLS1阻害によりRA-FLSの増殖は抑制された。2. GLS1阻害薬の投与により、関節炎モデルマウスの関節炎は抑制された。

以上より、グルタミン代謝はRAの病態に関与していることが示唆され、GLS1は新たな治療標的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients (RA-FLS) exhibit several tumor cell-like characteristics; however, the role of glucose and glutamine metabolism in the aberrant proliferation of these cells is unclear. We evaluated the role of these metabolic pathways in RA-FLS and in mouse model of RA.

GLS1 expression was increased in RA-FLS. RA-FLS proliferation was reduced under glutamine-deprived, but not glucose-deprived, conditions. Cell growth of RA-FLS was inhibited by GLS1 siRNA or GLS1 inhibitor treatment. Treating RA-FLS with either IL-17 or PDGF resulted in increased GLS1 levels. GLS1 inhibitor ameliorated the arthritis and decreased the number of Ki-67-positive synovial cells in SKG mice. Our results suggested that glutamine metabolism is involved in the pathogenesis of RA and that GLS1 plays an important role in regulating RA-FLS proliferation, and may be a novel therapeutic target for RA.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ グルタミン代謝 滑膜細胞 解糖系 メタボロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、関節滑膜の慢性炎症とその結果生じる滑膜細胞の過増殖に特徴づけられる全身性自己免疫疾患である。滑膜が増殖して形成された肉芽腫様の病変はパンヌスと呼ばれ、骨や軟骨に浸潤して関節を破壊し、重大な機能傷害を招く。RA 患者由来の滑膜細胞は、患者の生体内でももちろん、体内から取り出して *in vitro* で培養しても高い増殖能を有し続けることがよく知られている。加えて、活性酸素やサイトカインといったアポトーシス刺激に対する抵抗性、高い遊走能、attachment-dependent growth の低下、*in vivo* における浸潤能と転移能、といったいわゆる“腫瘍様”形質を数多く有しているが、その原因は明らかではない。従って、滑膜細胞の異常活性化と過増殖のメカニズムを解明して制御することは RA の制圧を目指す上で重要である。

1924 年に Warburg は、がん細胞は酸素が十分に存在しても解糖系を使って ATP を産生することを発見した。後に“Warburg 効果”と呼ばれるこの現象はがん細胞の根源的性質の一つとされたが、長年の間、なぜがん細胞が酸化的リン酸化に比してエネルギー産生効率の悪い解糖系を使うのかは謎のままであった。しかし近年、急速に発展した分子生物学的手法やオミックス解析などの網羅的測定法によって、がん細胞が示す特徴的な代謝の機序が次々と明らかになってきている。

細胞の活動は種々の酵素反応の連鎖、すなわち代謝によって営まれており、代謝によって産生された産物の総体をメタボロームと呼ぶ。メタボローム解析あるいはメタボロミクスとは、対象とするサンプル中に存在する低分子代謝産物 (メタボライト) を網羅的に解析することによって細胞の動的な振る舞いを理解しようとする方法論であり、ポストゲノム研究の新しい手法として近年注目を浴びている。メタボライトは生命活動における最終産物であり、その変動は生物の環境応答や適応変化などを最も鋭敏に反映していると考えられる。そして、近年のがん細胞の代謝異常の解明に大きな力を発揮した。また、疾病などによって細胞内や組織内において代謝の変動が起こった場合、血液、尿などの体液中の代謝物質の組成や濃度にも変化が起こることは容易に想像できる。実際に研究代表者らは、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血清メタボロミクスを行い、診断および治療モニタリングに有用であるバイオマーカーの候補を同定した (Saegusa J et al. Clin Exp Rheum 2014)。

以上の背景より、研究代表者らは、関節リウマチにおける滑膜細胞の過増殖のメカニズムにも、何らかの特徴的な代謝異常が関与しているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

RA の病態におけるグルタミン代謝の役割を解明する。また、マウス関節炎に対するグルタミン代謝阻害薬の効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

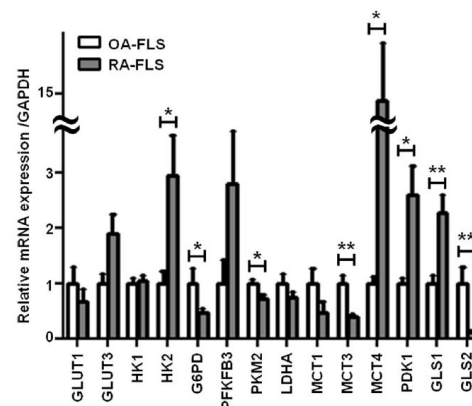
変形性関節症患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (OA-FLS) と RA 患者由来滑膜細胞 (RA-FLS) の解糖系およびグルタミン代謝 (グルタミノリシス) に関連する酵素の発現をリアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法を用いて解析した。細胞内代謝産物はガスマトグラフ質量分析計 (GC/MS) とキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いたメタボローム解析で検出した。グルコースとグルタミンが細胞増殖に与える影響についてはグルコースあるいはグルタミン不含培地を用いて検討した。GLS1 の特異的な阻害薬として compound 968 を使用した。細胞生存性は WST-8、細胞増殖能は BrdU を用いて ELISA で測定した。

SKG マウスにザイモサン A (ZyA) を腹腔内投与して関節炎を発症させた。投与後 14 日目から 42 日目にかけて compound 968 25mg/kg を週 3 回腹腔内投与した。compound 968 投与による関節炎スコアの変化を評価し、マウス足関節組織における Ki-67 の発現を抗 Ki-67 抗体による免疫組織染色で評価した。

## 4. 研究成果

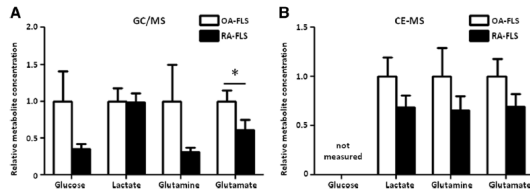
OA-FLS と RA-FLS について 14 の解糖系およびグルタミノリシスに関連する酵素の発現をリアルタイム PCR 法で測定した。Hexokinase 2 (HK2)、monocarboxylate transporter 4 (MCT4)、pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) および GLS1 の遺伝子発現が OA-FLS に比べ RA-FLS で有意に亢進していた。GLS2 の発現は GLS1 と比較し非常に低値であり RA-FLS のグルタミン代謝においては GLS1 が主要な役割を果たしていることが示唆された。(図 1)

図 1



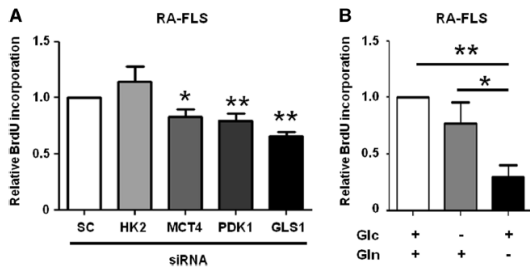
メタボローム解析ではグルコース、グルタミンおよびグルタミン酸の細胞内濃度が OA-FLS に比して RA-FLS で低値であった。RA-FLS においてこれらの代謝産物の消費が亢進していることが示唆された(図 2)。

図 2



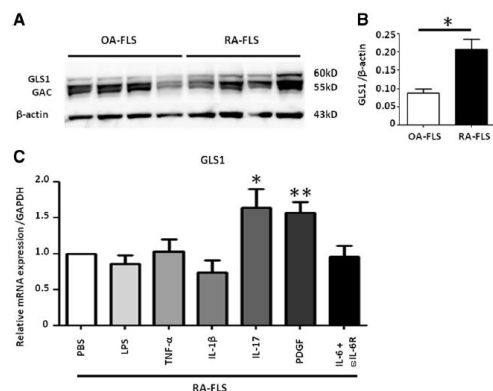
small interfering RNA (siRNA)を用いて RA-FLS の HK2, MCT4, PDK1 および GLS1 遺伝子をノックダウンしたところ、MCT4, PDK1, GLS1 遺伝子をノックダウンした RA-FLS では細胞増殖能が有意に抑制されたが、HK2 遺伝子のノックダウンでは RA-FLS の細胞増殖能は抑制されなかった。RA-FLS の細胞増殖能をグルコースとグルタミン含有培地で比較したところ、グルタミン不含培地では細胞増殖が有意に低下したが、グルコース不含培地では有意な低下は認めなかった(図 3)。

図 3



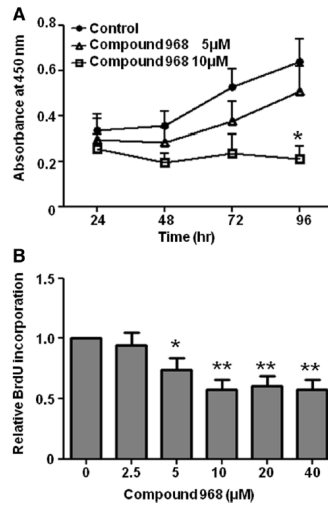
ウェスタンブロット法で滑膜細胞における GLS1 タンパクの発現量を調べたところ、RA-FLS で有意に発現が高かった。また、各種炎症性サイトカインで RA-FLS を刺激したところ、インターロイキン (IL)-17 および血小板由来増殖因子 (PDGF) 刺激にて RA-FLS の GLS1 遺伝子の発現が上昇した(図 4)。

図 4



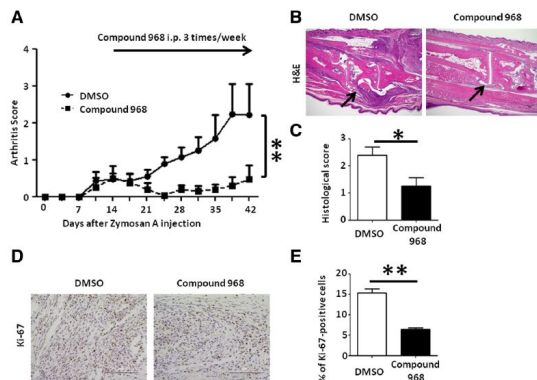
RA-FLS の細胞生存性は 10 μM の compound 968 で有意に低下し、細胞増殖能は compound 968 で用量依存性に低下した(図 5)。

図 5



ZyA を投与後の SKG マウスにおいて、compound 968 投与群は無治療群と比べ臨床的かつ組織学的にも関節炎スコアは有意に低下した。Compound 968 投与群の足関節組織では無治療群と比べ Ki-67 陽性滑膜細胞が有意に減少していた(図 6)。

図 6



以上、グルタミン代謝は RA の病態に深く関わっており、RA-FLS の増殖を制御している GLS1 は RA の新規治療ターゲットになり得ると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Nishimura K, Saegusa J, Matsuki F, Akashi K, Kageyama G, Morinobu A. Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates arthritis in SKG mice. *Arthritis Rheumatol.* 2015, 67(4):893-902 (査読有)
2. Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ann Rheum Dis.* 2015, 75(3):601-8 (査読有)
3. Kageyama G, Saegusa J, Irino Y, Tanaka S, Tsuda K, Takahashi S, Sendo S, Morinobu A. Metabolomics analysis of saliva from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2015, 182(2):149-53 (査読有)
4. Saegusa J, Matsuki F, Morinobu A. Foxp3+ regulatory T cells in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Inflamm. Regen.* 2015, 35(2):51-6 (総説)
5. Hsu DK, Yang RY, Saegusa J, Liu FT. Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2015, 1207:451-63. (総説)
6. Fukuzumi N, Osawa K, Sato I, Iwatani S, Ishino R, Hayashi N, Iijima K, Saegusa J, Morioka I. Age-specific percentile-based reference curve of serum procalcitonin concentrations in Japanese preterm infants. *Sci Rep.* 2016, 6:23871 (査読有)
7. Akashi K, Saegusa J, Sendo S, Nishimura K, Okano T, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N, Morinobu A. Knockout of endothelin type B receptor signaling attenuates bleomycin-induced skin sclerosis in mice. *Arthritis Res Ther.* 2016, 18(1):113 (査読有)
8. Morinobu A, Tanaka S, Nishimura K, Takahashi S, Kageyama G, Miura Y, Kurosaka M, Saegusa J, Kumagai S. Expression and Functions of Immediate Early Response Gene X-1 (IEX-1) in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *PLoS One.* 2016, 11(10):e0164350 (査読有)
9. Nakamachi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124: a promising therapeutic agent for various human diseases, including rheumatoid arthritis. *RNA Dis.* 2016, 3:e1252 (査読有)
10. Okano T, Saegusa J, Nishimura K, Takahashi S, Sendo S, Ueda Y, Morinobu A. 3-bromopyruvate ameliorate autoimmune arthritis by modulating Th17/Treg cell differentiation and suppressing dendritic cell activation. *Sci Rep.* 2017, 7:42412 (査読有)
11. Takahashi S, Saegusa J, Sendo S, Okano T, Akashi K, Irino Y, Morinobu A. Glutaminase 1 plays a key role in the cell growth of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017, 19(1):76 (査読有)
12. Sendo S, Saegusa J, Okano T, Takahashi S, Akashi K, Morinobu A. CD11b+ Gr1dim tolerogenic dendritic cell-like cells are expanded in interstitial lung disease in SKG mice. *Arthritis Rheumatol.* 2017, 69(12):2314-27 (査読有)
13. Takada YK, Yu J, Fujita M, Saegusa J, Wu CY, Takada Y. Direct binding to integrins and loss of disulfide linkage in IL-1 $\beta$  are involved in the agonistic action of IL-1 $\beta$ . *J Biol Chem.* 2017, 292(49):20067-75 (査読有)
14. Sendo S, Saegusa J, Morinobu A. Myeloid-derived suppressor cells in non-neoplastic inflamed organs. *Inflamm Regen.* 2018, in press (総説)
15. 自己免疫疾患のメタボローム解析の未来～新規バイオマーカーの同定と病態解明を目指して～ 三枝淳, 河野誠司, 森信暁雄 *臨床病理* 63(4): 498-505, 2015 (総説)
16. メタボロームに着目した膠原病の新規治療法および診断法の開発 三枝淳, 蔭山豪一, 森信暁雄 *BIO Clinica* 30(11):1110-5, 2015 (総説)
17. トファシチニブは骨髄由来サプレッサー細胞に作用して治療効果を発揮する 西村啓佑, 三枝淳, 森信暁雄 *リウマチ科* 55(1):115-9, 2016 (総説)
18. メタボロームに着目した膠原病の新規治療法および診断法の開発 三枝淳, 蔭山豪一, 森信暁雄 *アレルギーの臨床* 36(13):1292-7, 2016 (総説)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Taurine as a biomarker for prediction of response to biologic therapy in rheumatoid arthritis. Takahashi S, Saegusa J, Naka I, Tsuda K, Okano T, Akashi K, Nishida M, Nishimura K, Sendo S, Ueda Y, Onishi A, Kogata Y, Kageyama G, Morinobu A. American College of Rheumatology 79th Annual

- Scientific Meeting, サンフランシスコ (アメリカ) 2015年11月8日
2. A metabolic approach for discovering therapeutic target in rheumatoid arthritis synovial fibroblast. Takahashi S, Saegusa J, Akashi K, Nishimura K, Sendo S, Morinobu A. 第44回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌 2015年11月10日
  3. Knockout of endothelin type B receptor signaling attenuates bleomycin-induced skin sclerosis in mice. Akashi K, Saegusa J, Sendo S, Nishimura K, Tsuda K, Naka I, Okano T, Takahashi S, Nishida M, Ueda Y, Morinobu A. The 17th Annual European Congress of Rheumatology - EULAR ロンドン(イギリス) 2016年6月11日
  4. 3-bromopyruvate ameliorates autoimmune arthritis by exerting a dual effect on both Th17 and Treg cell differentiation and dendritic cell activation. Okano T, Saegusa J, Nishimura K, Takahashi S, Sendo S, Ueda Y, Onishi A, Morinobu A. The 17th Annual European Congress of Rheumatology - EULAR ロンドン(イギリス) 2016年6月9日
  5. Glutamine metabolism plays a crucial role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Takahashi S, Saegusa J, Naka I, Tsuda K, Okano T, Akashi K, Sendo S, Ueda Y, Onishi A, Kogata Y, Morinobu A. American College of Rheumatology 80th Annual Scientific Meeting, ACR Basic Research Conference: Cellular Metabolism and Stress Response in Immune-Mediated Inflammatory Disease, ボストン(アメリカ) 2016年11月14日
  6. CD11b+Gr1dim cells, which are induced by GM-CSF produced by Th17 and group3 innate lymphoid cell, may facilitate the progression of pneumonitis in SKG mice. Sendo S, Saegusa J, Okano T, Takahashi S, Morinobu A. American College of Rheumatology 80th Annual Scientific Meeting, ボストン(アメリカ) 2016年11月13日
  7. Dual effect of 3-bromopyruvate on both Th17 and Treg cell differentiation and dendritic cell activation ameliorates autoimmune arthritis in mice. Okano T, Saegusa J, Nishimura K, Ueda Y, Sendo S, Takahashi S, Akashi K, Onishi A, Morinobu A. American College of Rheumatology 80th Annual Scientific Meeting, ボストン(アメリカ) 2016年11月13日
  8. Glutaminase1 inhibitor inhibits synoviocytes proliferation and ameliorates inflammatory arthritis in mice. Takahashi S, Saegusa J, Naka I, Tsuda K, Okano T, Akashi K, Nishida M, Sendo S, Ueda Y, Nishimura K, Onishi A, Kogata Y, Morinobu A. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜 2016年4月21日
  9. Glutamine metabolism plays a key role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Takahashi S, Saegusa J, Ueda Y, Okano T, Sendo S, Akashi K, Morinobu A. 第45回日本免疫学会総会・学術集会, 那覇 2016年12月6日
  10. CD11b+Cr1dim tolerogenic dendritic cell-like cells are expanded in interstitial lung disease in SKG mice. Sendo S, Saegusa J, Ichise Y, Yamada H, Naka I, Okano T, Takahashi S, Ueda Y, Akashi K, Onishi A, Morinobu A. The 18th Annual European Congress of Rheumatology - EULAR マドリード(スペイン) 2017年6月16日
  11. Glutamine metabolism plays a key role in the cell growth of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Takahashi S, Saegusa J, Yamada H, Ichise Y, Naka I, Okano T, Akashi K, Sendo S, Ueda Y, Onishi A, Morinobu A. The 18th Annual European Congress of Rheumatology - EULAR マドリード(スペイン) 2017年6月16日
  12. CD11b+Gr1dim tolerogenic dendritic cell-like cells suppress the progression of interstitial lung disease in SKG mice. Sendo S, Saegusa J, Yamada H, Ichise Y, Naka I, Ueda Y, Okano T, Takahashi S, Akashi K, Onishi A, Morinobu A. American College of Rheumatology 81th Annual Scientific Meeting, サンディエゴ(アメリカ) 2017年11月5日
  13. Inhibition of the mechanistic target of rapamycin pathway and glutaminolysis facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and synergistically ameliorates arthritis in SKG mice. Ueda Y, Okano T, Yamada H, Ichise Y, Naka I, Takahashi S, Sendo S, Akashi K, Onishi A, Saegusa J, Morinobu A. American College of Rheumatology 81th Annual Scientific Meeting, サンディエゴ(アメリカ) 2017年11月6日
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
三枝 淳 (SAEGUSA JUN)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 20514970

(2)研究分担者

森信 暁雄 (MORINOBU AKIO)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10294216

河野 誠司 (KAWANO SEIJI)  
神戸大学・医学部附属病院・特命教授  
研究者番号：20351512