

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月26日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791115

研究課題名（和文） 新規プロテアソーム機能不全症から解明するプロテアソームの正常機能

研究課題名（英文） A novel function of proteasome

## 研究代表者

有馬 和彦（ARIMA KAZUHIKO）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30423635

## 研究成果の概要（和文）：

中條—西村症候群は、本邦にしか報告のない原因不明の遺伝性炎症性疾患である。その罹患患者数の少なさから本症候群の存在は広く認識されていたが、科学的原因解明の検討や特効的治療法の開発は行なわれていなかった。

我々は罹患患者とその家族の大きな協力を頂き、本症候群の原因解明に成功した。その原因とは、プロテアソームサブユニットの疾患特異的遺伝子変異であった。この発見まではプロテアソームの遺伝子変異報告は皆無であった。つまり、初めての中條—西村症候群における原因解明であり、ヒトにおける初めてのプロテアソーム機能異常症の発見である。

失われて初めてわかるプロテアソームの正常機能を理解することは、本邦特有の自己炎症症候群の新たな治療法開発のみならず、誘因のない全身炎症に関わる分子を明らかにすることを通じて、炎症を呈する他の疾患制御戦略の新展開に貢献出来ると期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

The ubiquitin-proteasome pathway is responsible for selective degradation of short-lived, misfolded and toxic proteins. It plays an important rule in tuning the intracellular environment.

Nakajo-Nishimura syndrome (NNS) (MIM 256040) is an autoinflammatory disorder with impaired proteasome function, its newly identified causative mutation and inflammatory symptoms including periodic fever and skin rash.

Our findings suggest that decrease of proteasome activity is associated with an increased expression of inflammatory cytokines. The ubiquitin-proteasome pathway would play an important rule against inflammation. This may provide a new insight into the pathogenesis of other persistent inflammatory diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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・アレルギー内化学

キーワード：炎症学、自己炎症症候群

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 中條—西村症候群は、本邦にしか報告のない原因不明の遺伝性炎症性疾患である。その罹患患者数の少なさから本症候群の

存在は広く認識されていたが、科学的原因解明の検討や特効的治療法の開発は行なわれていなかった。

我々は罹患患者とその家族の大きな協力

を頂き、本症候群の原因解明に成功した。その原因とは、プロテアソームサブユニットの疾患特異的遺伝子変異であった。この発見まではプロテアソームの遺伝子変異報告は皆無であった。つまり、初めての中條—西村症候群における原因解明であり、ヒトにおける初めてのプロテアソーム機能異常症の発見である。

(2) プロテアソームはポリユビキチン鎖を指標に選択的差別的に標的蛋白質を分解し、細胞内蛋白質の品質管理を司っている。特にシグナル伝達関連蛋白質や細胞周期制御蛋白質などの長く存在した際には細胞にとって危険な蛋白質を積極的に分解する点で、ユビキチン—プロテアソーム蛋白質分解系は最も重要な機構である。

(3) 患者皮膚生検検体にはポリユビキチン化蛋白質の蓄積と単球浸潤が認められている。Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)は単球遊走を促進する重要なケモカインである。中條—西村症候群患者の皮膚炎症機序に皮膚繊維芽細胞から産生されるMCP-1 が関与している可能性があると考えられていた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、失われて初めてわかるプロテアソームの正常機能を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 中條—西村症候群プロテアソーム機能不全細胞のクローン樹立をおこなった。

(2) アミノ末端規則に基づいた設計によるユビキチンと緑色蛍光物質の融合蛋白質をヒト胎児由来腎臓細胞に遺伝子導入を行ない、薬剤耐性遺伝子を利用して選別を行ない、限界希釈法によるクローン取得を行なった。

(3) 樹立した培養細胞を用いて最も強くプロテアソーム活性の低下を引き起こす刺激因子とその時間経過を明らかにした。

(4) 健常者及び患者皮膚由来培養細胞のMCP-1 発現量を比較した。転写量は定量的PCR、蛋白質量は免疫学的検出を用いた。不死化正常培養細胞においてプロテアソーム阻害剤処理により誘導される変化を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 混合培養細胞集団である、患者由来不死化リンパ芽球細胞から複数のクローンラインを得た。

(2) 人工融合タンパク質を用いたプロテアソーム機能不全検出クローン取得した。ラムダが 0.6 のポアソン分布に矛盾しない 22 系列の安定発現細胞クローンを得た。蛋白発現確認は蛍光顕微鏡による観察、培養上清中の緑色蛍光強度の測定、培養細胞蛍光強度測定、蛋白回収後の免疫学的検出法、蛋白溶解液の蛍光強度測定の 5 種類の方法を用いた。プロテアソーム阻害による蓄積誘導率は 84.8 であった。

(4) MCP-1 の転写発現量は、患者細胞では健常者細胞と比べて 2 倍以上だった。また、MCP-1 蛋白質分泌量は患者細胞では健常者と比べて約 3 倍だった。

MCP-1 の発現を促進する転写因子の転写発現量は、プロテアソーム阻害剤処理を行った細胞は未処理細胞と比べて発現量が増加していた。時間経過と共に両者間の差は大きくなり、プロテアソーム阻害剤処理細胞においては二相性の発現上昇を認めた。

本疾患の皮膚病変において皮膚線維芽細胞が産生する単球遊走蛋白質は罹患皮膚への単球浸潤に関与している可能性が示唆された。本疾患の特徴である誘因のない炎症を来す機序の一つと考えられた。

失われて初めてわかるプロテアソームの正常機能を理解することは、本邦特有の自己炎症症候群の新たな治療法開発のみならず、誘因のない全身炎症に関わる分子を明らかにすることを通じて、炎症を呈する他の疾患制御戦略の新展開に貢献出来ると期待される。

## 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 12 件)

(1) Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura KI. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 14914-9, 2011.

- (2) Origuchi T, Iwamoto N, Kawashiri SY, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Yamasaki S, Ida H, Kawakami A, Ueki Y, Matsuoka N, Nakashima M, Mizokami A, Kawabe Y, Mine M, Fukuda T, Eguchi K. Reduction in serum levels of substance P in patients with rheumatoid arthritis by etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Mod Rheumatol* 21: 244-50, 2011.
- (3) Iwamoto N, Kawakami A, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Kawashiri SY, Kita J, Okada A, Koga T, Kamachi M, Yamasaki S, Ichinose K, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Contribution of an adenine to guanine single nucleotide polymorphism of the matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) -77 promoter region to the production of anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with HLA-DRB1\*shared epitope-negative rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 21: 240-3, 2011.
- (4) Miura S, Ichikawa T, Arima K, Takeshita S, Muraoka T, Matsuzaki T, Ootani M, Shibata H, Akiyama M, Ozawa E, Miyaaki H, Taura N, Takeshima F, Nakao K. Branched-chain amino acid deficiency stabilizes insulin-induced vascular endothelial growth factor mRNA in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem*; 113(10):3113-21. 2012
- (5) Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, Arima K, Abiru N. Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clin Exp Immunol*; 168(3):268-73. 2012
- (6) Koga T, Fujikawa K, Horai Y, Okada A, Kawashiri SY, Iwamoto N, Suzuki T, Nakashima Y, Tamai M, Arima K, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Ishimatsu Y, Mukae H, Kuwana M, Kohno S, Eguchi K, Aoyagi K, Kawakami A. The diagnostic utility of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody testing for predicting the prognosis of Japanese patients with DM. *Rheumatology (Oxford)*; 51(7):1278-84. 2012
- (7) Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Fukushima A, Arima K, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K. Magnetic resonance imaging (MRI) detection of synovitis and bone lesions of the wrists and finger joints in early-stage rheumatoid arthritis: comparison of the accuracy of plain MRI-based findings and gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced MRI-based findings. *Mod Rheumatol*; 22(5):654-8. 2012
- (8) Origuchi T, Arima K, Kawashiri SY, Tamai M, Yamasaki S, Nakamura H, Tsukada T, Aramaki T, Furuyama M, Miyashita T, Kawabe Y, Iwanaga N, Terada K, Ueki Y, Fukuda T, Eguchi K, Kawakami A. High serum matrix metalloproteinase 3 is characteristic of patients with paraneoplastic remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema syndrome. *Mod Rheumatol*; 22(4):584-8. 2012
- (9) Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Treatment discontinuation in patients with very early rheumatoid arthritis in sustained simplified disease activity index remission after synthetic disease-modifying anti-rheumatic drug administration. *Mod Rheumatol*; 22(3):346-52. 2012
- (10) Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Aramaki T, Nakashima M, Fujikawa K, Tsukada T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Delayed treatment with tumor necrosis factor inhibitors in

incomplete responders to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs shows an excellent effect in patients with very early rheumatoid arthritis with poor prognosis factors. Mod Rheumatol. 22(2): 195-201. 2012

(1 1) Ichinose K, Origuchi T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Kamachi M, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Long-term follow-up of adalimumab monotherapy for rheumatoid arthritis in Japanese patients: a report of six cases. Rheumatol Int 32: 483-7, 2012.

(1 2) Koga T, Yamasaki S, Migita K, Kita J, Okada A, Kawashiri S, Iwamoto N, Tamai M, Arima K, Origuchi T, Nakamura H, Osaki M, Tsurumoto T, Shindo H, Eguchi K, Kawakami A. Post-transcriptional regulation of IL-6 production by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells. Clin Exp Rheumatol; 29(6):906-12. 2011

[学会発表] (計3件)

(1) Arima K, Hiroaki Ida, Tomoki Origuchi, Nobuo Kanazawa, Katsumi Eguchi. Nakajo-Nishimura syndrome (NNS) is a systemic inflammatory disorder that segregates in an autosomal recessive fashion. The 20th International Rheumatology Symposium Kobe, Japan, 2011.

(2) Arima K, Kanazawa N, Mishima H, Kinoshita A, Ida H, Murata S, Yoshiura K, Eguchi K: Decrease of proteasome activity is associated with a novel mutation of the proteasome catalytic subunit in an autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. Annual European Congress of Rheumatology London, UK, 2011.

(3) K Arima, N Kanazawa, F Furukawa, H Ida, K Yoshiura Increased expression of inflammatory cytokines in an autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. Annual European Congress of Rheumatology Berlin, Germany, 2012.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)  
該当なし

○取得状況 (計0件)  
該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>  
に我々の研究成果である遺伝子変異の登録分野が新しく作成されている

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 和彦 (ARIMA KAZUHIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30423635

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし