

平成 28 年 5 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860751

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける時計遺伝子の役割

研究課題名(英文) Role of the clock genes in rheumatoid arthritis

研究代表者

吉田 幸祐 (Yoshida, Kohsuke)

神戸大学・保健学研究科・研究員

研究者番号：80452499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、炎症が関節リウマチ(RA)の日内リズムを攪乱する機構の一部が明らかになった。すなわち関節破壊の主役である滑膜細胞において、炎症誘導物質TNFは時計遺伝子Per2発現量を減少させ、Bmal1発現量を亢進させるが、発現リズムには影響しなかった。特にBmal1遺伝子の発現量増加は、Bmal1転写促進因子が亢進することで引き起こされていた。この現象はCaシグナル伝達経路を遮断することで消失したが、これは転写因子NFATを介していなかった。したがってTNFがRA滑膜細胞へ作用すると、細胞内Caイオンの上昇により転写促進因子が増加、これがBmal1の増加へつながることが示された。

研究成果の概要(英文)：I found a novel mechanism between inflammation and circadian rhythm in rheumatoid synovial cells as follows; A pro-inflammatory cytokine, Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) reduced the mRNA expression of a circadian core clock gene, Per2, and induced those of Bmal1. However, TNF- $\alpha$  did not affect the oscillation of Bmal1 gene expression. Up-regulation of Bmal1 gene, induced by TNF- $\alpha$ , was associated with ROR alpha, an activator of Bmal1 gene expression. These results were cancelled by an intracellular calcium chelator, BAPTA-AM but not a calcineurin inhibitor FK-506, suggesting that TNF- $\alpha$ -induced up-regulation of Bmal1 gene is independent of a transcriptional factor NFAT.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ 時計遺伝子 炎症性サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: 以下 RA) の諸症状には日内変動が認められ、例えば、炎症性サイトカインや自己抗体の分泌は RA 患者に特有な「朝の関節のこわばり」に一致して午前中にそのピークを形成する。そのため、夜間に副腎皮質ステロイドホルモン剤を服用することは、これら夜間の RA 増悪因子に作用して、早朝の RA 関節炎の症状を抑制する有効な治療とされている。また RA 患者は睡眠障害を訴えることが多く、RA 治療薬の服用によって睡眠障害が改善することが示されている (Advances in Neuroimmune Biology, 4:7-11, 2013)。このように、RA の病態を理解する上で病態の日内変動や個々の患者に特有な日内リズムの変調は重要な位置づけにあることが予想されてはいたが、その詳細は不明であった。

近年、時計遺伝子の発見により疾病における日内リズムの解析が可能となり、関節炎モデルマウスを用いた実験から、申請者らは関節炎と時計遺伝子との相互的調節を明らかにした (The Journal of Immunology, 184:1560-1565, 2010)。すなわち、健常マウスに関節炎を誘導すると時計遺伝子の発現量や周期が変調すること、また、時計遺伝子 Cry1/2 を欠損させたマウスに関節炎を誘導した場合、健常マウスに誘導した場合よりも関節炎が悪化することを見出した。しかし、関節炎などの炎症状態がどのようなメカニズムによって滑膜細胞など末梢細胞の日内リズムへ作用しているかは未だ明らかではなかった。

そこで RA の治療標的である炎症性サイトカイン TNF- に着目し、時計遺伝子に及ぼす影響を検討したところ、本来ならシーソーのようにバランスをとりながら時計遺伝子 Period (Per) 2 の転写を制御しているはずの転写促進因子 PAR (Dbp, Tef, Hlf) と転写抑制因子 E4BP4 の関係が、TNF- によって E4BP4 優位になり、その結果 Per2 は転写抑制へ傾いていることを見出した (Scandinavian Journal of Rheumatology, 42:276-80, 2013)。一方最近、マウス由来の細胞である NIH3T3 細胞を用いた実験により、TNF- による Dbp 遺伝子の低下はカルシウムシグナルを介することが示された (Journal of Biological Rhythms, 24:283-94, 2009)。

このことは、我々が見出した TNF- による Per2 発現量の低下が、カルシウムシグナルを介した PAR 発現量の変化によって誘導されている可能性を示すものであった。また、抗リウマチ薬であるタクロリムスやシクロスポリンは、カルシニューリン阻害薬としてカルシウムシグナルに関与する。したがって、これらの薬剤を用いることによって RA 滑膜細胞における時計遺伝子の発現を制御できる

可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究は、炎症と日内リズムという新たな視点からアプローチし、RA における時計遺伝子の役割を通して、RA 滑膜細胞の増殖機構を解明しようとするものである。また、タクロリムス (FK506) などを用いて、カルシウムシグナルを阻害することによる時計遺伝子への作用を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) RA 滑膜細胞の単離: 手術時に得られた RA 患者由来の滑膜組織を、コラゲナーゼにより単離、培養した初代培養系の滑膜線維芽細胞を使用する。培養継代数が 3~6 継代した滑膜細胞を実験に使用した。

(2) 時計遺伝子発現周期の同期: 滑膜細胞内の時計遺伝子発現周期を同期させるため、高濃度ウマ血清培地 (本研究では 50% ウマ血清培地) を用いて、2 時間培養した。

(3) 細胞内カルシウムイオンの流入阻害、カルシニューリン阻害: 細胞内カルシウムイオン濃度を低下させる薬剤として BAPTA-AM を、カルシニューリン-NFAT 経路の阻害薬として FK506 を使用する。高濃度ウマ血清培地により時計遺伝子の発現周期を同期後、各薬剤含有無血清培地にて 1 時間前処理した。

(4) TNF- による刺激: TNF- 含有無血清培地にて培養し、8 時間おきに 32 時間までサンプリングを行なった。

(5) 時計遺伝子発現の評価: 各時点におけるトータル RNA を抽出し、相補的 DNA に逆転写した後、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法によって mRNA 発現量を評価する。本研究で評価する時計遺伝子は、Per2 と Per2 の転写に関わる Dbp, Hlf, Tef, E4bp4、また Bmal1 と Bmal1 の転写に関わる ROR, Reverb である。また、内在性コントロールとして TATA-box binding protein (Tbp) を用いて、各時計遺伝子の相対的な mRNA 発現量を評価した。

(6) 細胞増殖活性の評価: BAPTA-AM, FK-506 により前処理した RA 滑膜細胞を、TNF- 存在下、非存在下で 24 時間培養した。各群における細胞増殖活性を WST-8 試薬を用いて評価した。

### 4. 研究成果

(1) TNF- による Per2 遺伝子発現調節機構の解明:

細胞内カルシウムイオンキレート剤 BAPTA-AM により前処理しておくこと、TNF- による Per2 mRNA 発現抑制が阻害された。一方、カルシニューリン阻害薬 FK506 では、その効

果は認められず、転写因子 NFAT を介した現象ではなかった。また、これらの現象は Per2 の発現を直接制御する転写促進因子 PAR (Dbp, Hlf, Tef) でも認められた一方、転写抑制因子 E4bp4 では認めなかった。

したがって、TNF- による Per2 発現抑制にはカルシウムシグナルが関与しているが、それは転写促進因子 PAR を介したものであり、転写抑制因子 E4bp4 には関与しないことが明らかとなった (図 1)。

(2) TNF- による Bmal1 遺伝子発現調節機構の解明:

TNF- により Bmal1 の mRNA 発現量は増加していたが、発現リズム (位相) は未刺激群と同様のリズムを示していた。すなわち、TNF- は Bmal1 の発現量にのみ作用し位相には作用しないことが考えられた。

そこで Bmal1 を転写調節する転写促進因子 ROR と転写抑制因子 Reverb を見てみると、ROR は TNF- によって恒常的に増加する一方、Reverb は一時的に減少するものの発現の位相は保たれていた。したがって、ROR の増加が TNF- による Bmal1 の増加に重要であることが示唆された。

(3) カルシウムシグナルが時計遺伝子に及ぼす影響:

TNF- は細胞内カルシウムイオンの流入を亢進させることから、カルシウムシグナル伝達を阻害すると TNF- の作用を無効化できるのではないかと考えた。

まずカルシウムイオンキレート剤 BAPTA-AM により細胞内カルシウムイオン濃度を低下させると、転写抑制因子 Reverb は発現の位相が 72 時間をかけて 1 回のようなリズムを示し、通常 24 時間で概ね 1 回の位相が完全に消失した。また転写促進因子 ROR は恒常的に増加した。

その結果 Bmal1 も 72 時間をかけて 1 回の位相、そして発現量は増加したままであった。

カルシニューリン阻害薬 FK506 を用いても上記のような現象は起こらなかった。

(4) TNF- による Bmal1 遺伝子発現調節機構の解明 (カルシウムシグナルの関与):

次にカルシウムキレート剤により細胞内カルシウムイオン濃度を低下させた状態で TNF- 刺激すると、ROR、Bmal1 の増加の大部分が抑制された一方、カルシニューリン阻害薬 FK506 では抑制されなかったため、これらの作用は (1) の Per2 の現象と同様に NFAT 非依存的であることが示された。

当初の予想に反し、細胞内カルシウムイオン濃度を低下させた状態でも、TNF- によって Bmal1 遺伝子がわずかに増加しており、この時の Bmal1 転写抑制因子 Reverb は著明に減少していた。

したがって、TNF- による Bmal1 遺伝子発現調節機構には、カルシウムシグナル伝達経路を介した転写促進因子 ROR の増加と、カルシウムシグナル伝達経路を介さない転写抑制因子 Reverb の減少によって誘導されていることが示唆された (図 1)。

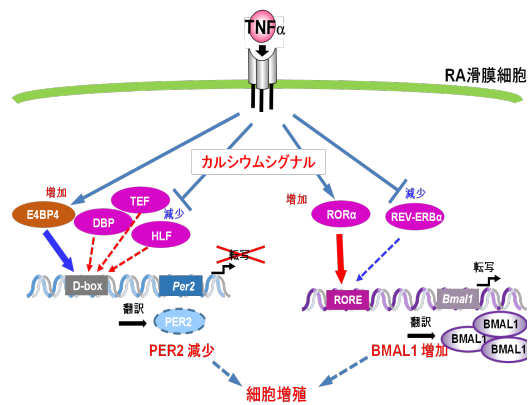


図1. TNF-αによるカルシウムシグナル伝達を介した時計遺伝子調節機構

(5) TNF- による細胞増殖活性誘導におけるカルシウムシグナル伝達経路の関与:

TNF- 存在下では RA 滑膜細胞活性は増加した一方、BAPTA-AM によりあらかじめ細胞内カルシウムイオン濃度を低下させた状態で TNF- 刺激しても、細胞増殖活性は増加しなかった。この現象は FK506 を用いても認めず、時計遺伝子に影響しなかった上記結果と同様であった。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

これまで申請者らのグループを含め、RA 滑膜細胞において、炎症性サイトカインによって時計遺伝子の発現量が変化することが複数報告されていたが、その詳細は不明であった。今回の研究で、TNF- による時計遺伝子発現パターンの変調には、カルシウムシグナル伝達が関与する経路と、関与しない経路が存在することが明らかとなり、炎症による日内リズムの攪乱機構の一部が解明されたことになる。また、この現象には転写因子 NFAT は介しておらず、別のタンパク質を介していることが示唆された。さらに、RA 滑膜細胞の特徴である '腫瘍様' ともいえる過剰増殖をカルシウムイオン流入阻害によって抑制することができたため、本研究がカルシウムシグナル-時計遺伝子を標的とした新たな RA 治療を提示出来る最初の知見となるかもしれない。興味深いことに、カルシウムシグナル伝達に関わるタンパク質には、時計遺伝子の発現リズムを調節する酵素が数多く存在しており、これらの酵素と時計遺伝子、そして TNF- の関係を理解することが今後の課題と考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoshida K, Hashimoto T, Sakai Y, Hashiramoto A. Circadian rhythm and joint stiffness/destruction in rheumatoid arthritis. International Journal of Clinical Rheumatology, 2015;10;335-344. (DOI: 10.2217/ijr.15.35)

Yoshida K, Hashimoto T, Sakai Y, Hashiramoto A. Involvement of the Circadian Rhythm and Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Journal of Immunology Research, 2014;2014:282495. (DOI: 10.1155/2014/282495)

〔学会発表〕(計 3 件)

中井 綾子、吉田 幸祐、橋本 哲平、金城 健太、橋本 尚憲、鈴木 行人、川崎 善子、立石 浩司、中川 夏子、柴沼 均、立石 博臣、柱本 照、Ca<sup>2+</sup>イオンによる時計遺伝子発現リズムの制御、第 60 回日本リウマチ学会学術集会、2016 年 4 月 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

中井 綾子、吉田 幸祐、橋本 哲平、柴沼 均、金城 健太、橋本 尚憲、柱本 照、カルシウムシグナルを介した TNF- $\alpha$  による時計遺伝子発現制御、第 59 回日本リウマチ学会学術集会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

Yoshida K, Shibamura N, Hashimoto T, Kawasaki Y, Hashimoto N, Nakai A, Kaneshiro K, Tateishi K, Nakagawa N, Hashiramoto A. TNF modulates the expression of circadian clock genes via calcium signaling in rheumatoid synovial cells. American college of Rheumatology, 78<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting. 2014 年 11 月 17 日、ボストン (アメリカ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 幸祐 (YOSHIDA, Kohsuke)

神戸大学・大学院保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：80452499

### (2) 研究協力者

柱本 照 (HASHIRAMOTO, Akira)

橋本 哲平 (HASHIMOTO, Teppei)

柴沼 均 (SHIBANUMA, Nao)

中川 夏子 (NAKAGAWA, Natsuko)