

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20001

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける小胞体ストレス応答機構の役割

研究課題名(英文) Role of Endoplasmic reticulum stress response in rheumatoid arthritis

研究代表者

金本 聡自 (Kanemoto, Soshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師

研究者番号：90611913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、関節リウマチの発症機序について小胞体機能の観点から解析を行った。関節リウマチにおいては破骨細胞や樹状細胞の機能異常が報告されているため、破骨細胞および樹状細胞に発現している小胞体膜局在転写因子Lumanが病態発症に関与しているかコンディショナルノックアウトマウスによる関節リウマチモデルを用いて解析した。

残念ながらマウス個体レベルでは関節リウマチ発症に関して小胞体機能が関与しているか明確な答えを得ることが出来なかったものの、細胞レベルにおいてはLumanが樹状細胞の抗原提示機能に重要な役割を果たしていることを明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that dysfunction of osteoclasts and dendritic cells occurs in rheumatoid arthritis(RA). However, it remains unclear whether function of endoplasmic reticulum (ER) in osteoclasts and dendritic cells is involved in pathogenesis of RA. In this study, analysis of mouse model for RA using conditional knockout mouse of ER-resident transcription factor Luman has been performed. Although in vivo investigation by RA mouse model was not able to obtain a concrete answer, in vitro investigation has revealed that Luman deficient dendritic cells attenuate the antigen-presenting ability, compared with wild type dendritic cells.

研究分野：生化学

キーワード：関節リウマチ 小胞体ストレス 破骨細胞 樹状細胞 小胞体膜局在転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは罹患率が人口の約1%近くにもものぼる、発症頻度の高い疾患である。自己の免疫システムが正常に機能せず、自分自身の細胞を攻撃してしまう自己免疫疾患の一つと考えられており、その主な症状は、関節の炎症と骨の破壊である。関節リウマチの治療薬として TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインを標的とした抗体による生物学的製剤の開発がなされ、これまで難しかった寛解の例が少なからず報告されるようになった。しかしながら疾患発症メカニズムについては未だ完全には明らかとなっていない。関節リウマチは主症状として骨破壊が認められることから、破骨細胞の機能亢進が起きていることが報告されている。破骨細胞は機能的に骨吸収能を発揮するために、骨マトリクスを分解する各種プロテアーゼの産生亢進や骨吸収窩を酸性化するプロトンポンプの機能亢進が起こる。この際、大量のタンパク質合成を伴うことから、膜タンパク質及び分泌タンパク質の成熟化の場として働く小胞体の機能も亢進していると考えられる。また、関節リウマチは自己免疫疾患であり、自己を異物と認識して免疫反応を引き起こすことから、抗原提示のプロフェッショナル細胞である樹状細胞の機能異常も報告されている。樹状細胞は抗原提示を行う際に、異物を貪食し分解した後、小胞体において抗原を MHC クラス I あるいは MHC クラス II 分子に取り込み、細胞膜表面へこれらの複合体を輸送し抗原提示を行う。このことから分かるように抗原提示の過程において小胞体は重要な働きをしている。しかしながら、関節リウマチにおける小胞体の役割や、小胞体機能の観点から破骨細胞や樹状細胞の機能について研究している例は少ない。

小胞体は膜結合型タンパク質あるいは分泌型タンパク質が折りたたみや糖鎖付加など種々の修飾を受けて成熟していく場として機能する。ところが、細胞が栄養飢餓状態やウイルス感染、細胞内カルシウム濃度の攪乱といった細胞の恒常性維持に不利な刺激を受けると、新たに合成されたタンパク質は自身の折りたたみや修飾が正常に行われなくなり、不良タンパク質として小胞体内腔に蓄積していく。この状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞にとって小胞体機能異常は極めて重篤な事態であるため、直ちにストレスから回避するために小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーを起点として不良タンパク質を排除する防御システムを活性化させる。この応答系を小胞体ストレス応答と呼び、酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されている。近年、小胞体ストレスは糖尿病、虚血性疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患、慢性炎症、癌の発症に深く関与していることが明らかとなっている。しかしながら、関節リウマチにおける小胞体ストレス応答の役

割について研究している例は多くなく、疾患発症と小胞体ストレスとの詳細な関連性は不明である。

### 2. 研究の目的

関節リウマチの発症に小胞体機能が関与するかどうか、特に関節リウマチにおける破骨細胞および樹状細胞の機能に小胞体がどのように関与するかを明らかにする目的で研究を行う。

本研究では小胞体膜上に局在する膜貫通型転写因子である Luman に焦点を当てて研究する。研究代表者の先行研究によって、Luman が破骨細胞の分化過程で重要な機能を果たしていることを明らかにした。そこで Luman ノックアウトマウスを作成し、当該マウスを用いて関節リウマチモデルを作成する。作成した Luman ノックアウトマウス関節リウマチモデルを用いて、個体レベルおよび細胞レベルで関節リウマチ発症と小胞体機能の関連性を解析する。

### 3. 研究の方法

コンディショナルノックアウトマウス作成用の Luman flox マウスを既に作成済みであるので、Luman flox マウスと破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する RANK-Cre マウスを交配し、破骨細胞特異的 Luman ノックアウトマウス(Luman flox/flox, RANK-Cre マウス)を作成する。Luman flox/flox, RANK-Cre マウスの関節領域に外来抗原を注射することで関節リウマチ様症状を惹起するアジュバント関節炎(AIA)モデルを作成し、マウス個体レベルで解析する。

細胞レベルでの解析には、マウス脛骨から骨髄マクロファージを単離し、サイトカインを投与することで破骨細胞、あるいは樹状細胞へ分化させ、解析に用いる。

### 4. 研究成果

#### 「実施内容」

#### (1) 破骨細胞特異的 Luman コンディショナルノックアウトマウスの解析

研究代表者の先行研究から、Luman が破骨細胞分化時の多核化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。そこで、マウス個体レベルでも Luman が同様な機能を有するか検討するために破骨細胞特異的に Luman をノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウスを作成した。破骨細胞特異的 Luman ノックアウトマウスの骨組織について組織解析するために、ヘマトキシリン・エオジン染色および酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行った。組織レベルにおいてはコントロールマウスと比べて破骨細胞特異的 Luman ノックアウトマウスにおける骨形成に顕著な差を見出すことはできなかった。

#### (2) 全身性 Luman ノックアウトマウス

### の作成と関節リウマチモデル解析

破骨細胞特異的 Luman コンディショナルノックアウトマウスでは野生型との表現型の顕著な違いを観察することが出来なかったため、全身性に Luman を欠失するマウスの作成に方針転換して解析を行うことにした。全身性に Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスと Luman flox マウスを交配し、Luman flox/flox, CAG-Cre マウスを作成した。このマウスの各組織から RNA およびタンパク質を抽出し、RT-PCR およびウェスタンブロット解析を行った結果、解析した各組織において RNA レベルおよびタンパク質レベルで Luman がノックアウトされていることを確認した。Luman flox/flox, CAG-Cre マウスはメンデルの法則に従い出生し、表現型に関して幼若期においては野生型マウスと顕著な差は見られなかった。

8週齢の Luman flox/flox, CAG-Cre マウスと同腹・同週齢の野生型マウスを用い、関節腔内に外来抗原としてウシ血清アルブミンを直接刺入投与により関節炎を惹起するアジュバント関節炎 (AIA) モデルを作成した。モデル作成後、関節領域を摘出し組織観察を行ったが、野生型と Luman flox/flox, CAG-Cre マウスにおいて明確な違いを観察することはできなかった。

### (3) 破骨細胞および樹状細胞における Luman の機能解析

関節リウマチでは破骨細胞や樹状細胞の機能異常が起きていることが報告されている。そこで、破骨細胞および樹状細胞の機能における Luman の役割について細胞レベルで解析した。

破骨細胞の解析については前研究課題において Luman ノックダウンによる機能欠失によって破骨細胞の多核化が阻害されることを明らかにしたので、本研究課題では主に樹状細胞における Luman の機能について解析した。

4週齢雄の野生型マウスの脛骨から骨髓マクロファージを単離した。単離した骨髓マクロファージに対しサイトカイン GM-CSF を投与し、投与後 8 - 10 日間培養し樹状細胞へ分化誘導し解析に用いた。GM-CSF 投与後の Luman mRNA およびタンパク質の発現レベルを RT-PCR およびウェスタンブロットングによって経時的に解析したところ、Luman mRNA は GM-CSF 投与後 4 日目以降に発現が誘導されることが分かった。Luman タンパク質については、GM-CSF 投与後 6 日目以降にタンパク質発現の誘導が認められた。また、Luman がプロセッシングを受け活性型フォームとして検出されるのは GM-CSF 投与 6 日目以降にピークであることが分かった(図 1)。

樹状細胞における Luman の機能を検討するために、4 週齢雄の野生型あるいは Luman flox/flox, CAG-Cre マウスの脛骨から骨髓マ

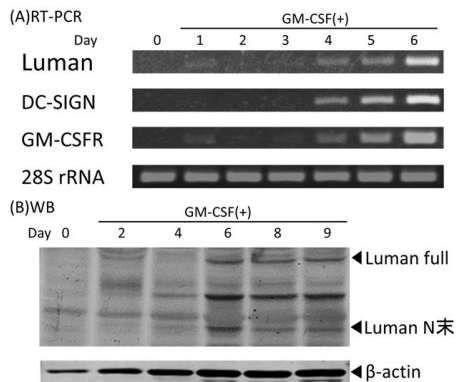


図 1. Luman は樹状細胞の分化過程で発現誘導される。

(A) 樹状細胞分化時の RT-PCR 解析。野生型マウス脛骨から骨髓細胞を単離し、サイトカイン GM-CSF を添加した培養液で培養後、Day0,1,2,3,4,5,6 の細胞を回収し RT-PCR 解析を行った。樹状細胞のマーカである DC-SIGN や GM-CSFR の発現と同じタイミングで Luman mRNA の発現が誘導された。(B) 樹状細胞の分化時におけるウェスタンブロット(WB)解析。GM-CSF 添加後 Day0,2,4,6,8,9 の細胞を回収しウェスタンブロット解析を行った。Luman 全長型の発現量が Day6 以降増加した。Luman N 末(活性型フォーム)は全長型と連動し Day6 以降に検出された。

クロファージを単離した。GM-CSF を投与後 10 日間培養し、樹状細胞へ分化誘導した後に野生型樹状細胞および Luman ノックアウト樹状細胞の表面マーカーの発現を検討するために FACS 解析を行った。FACS 解析の結果、樹状細胞マーカーである CD11c の発現量は野生型と Luman ノックアウト樹状細胞間で有意な差は認められなかったが、抗原提示に関わる MHC クラス II 分子の細胞膜表面上の発現量が Luman ノックアウト樹状細胞において亢進していた。

樹状細胞は免疫応答の際に T 細胞へ抗原提示を行い活性化させる抗原提示のプロフェッショナル細胞である。Luman ノックアウト樹状細胞で抗原提示に関与する MHC クラス II 分子の発現が亢進していたことから、野生型および Luman ノックアウト樹状細胞間で抗原提示機能に差があるか検討してみた。樹状細胞と T 細胞の共培養による抗原提示アッセイを行ったところ、Luman ノックアウト樹状細胞では MHC クラス II 分子の細胞膜上の発現が上昇しているにも拘らず、抗原提示能が野生型に比べて有意に低下していることが分かった(図 2)。

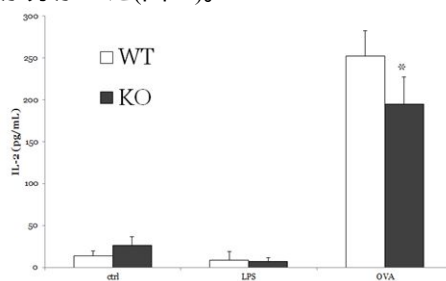


図 2. Luman(-/-) 樹状細胞において抗原提示能が低下する。

WT の樹状細胞および Luman(-/-) の樹状細胞の抗原提示能を調べるために、T cell に対する活性化能を比較した。野生型樹状細胞と Luman(-/-) 樹状細胞に対しオボアルブミン(OVA)で刺激した後、刺激した樹状細胞と共に OVA 抗原に特異的に反応する T cell を共培養し、T cell の産生するインターロイキン 2(IL-2) 量を ELISA 法により測定した。Luman(-/-) 樹状細胞では野生型に比べて抗原提示能(T cell を活性化させる能力)が低下した。

本研究課題においては、関節リウマチの発

症機序について小胞体機能の観点から解析を行った。残念ながらマウス個体レベルでは関節リウマチ発症に関して小胞体機能が関与しているか明確な答えを得ることが出来なかったものの、細胞レベルにおいては小胞体膜局在転写因子 Luman が破骨細胞および樹状細胞の機能に重要な機能を果たしていることを明らかにすることが出来た。

#### 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 10 件)

Cui X, Cui M, Asada R, Kanemoto S, Saito A, Matsuhisa K, Kaneko M, Imaizumi K.: The androgen-induced protein AlbZIP facilitates proliferation of prostate cancer cells through downregulation of p21 expression. *Scientific Reports*, 査読有, 6: 37310, 2016. doi: 10.1038/srep37310.

Kanemoto S, Nitani R, Murakami T, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Saito A, Imaizumi K.: Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 480(2):166-172. 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.019.

Matsuhisa K, Saito A, Asada R, Kanemoto S, Kaneko M, Imaizumi K.: The physiological roles of ER stress transducer BBF2H7/CREB3L2 and its potential as a target of disease therapy. *Medical Research Archives*, 査読有, 4(4), 2016.

Kaneko M, Iwase I, Yamasaki Y, Takai T, Wu Y, Kanemoto S, Matsuhisa K, Asada R, Okuma Y, Watanabe T, Imaizumi K, Nomura Y.: Genome-wide identification and gene expression profiling of ubiquitin ligases for endoplasmic reticulum protein degradation. *Scientific Reports*, 査読有, 6: 30955, 2016. doi: 10.1038/srep30955.

Kanemoto S, Kobayashi Y, Yamashita T, Miyamoto T, Cui M, Asada R, Cui X, Hino K, Kaneko M, Takai T, Matsuhisa K, Takahashi N, Imaizumi K.: Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. *Journal of Cell Science*, 査読有, 128(23): 4353-4365, 2015. doi: 10.1242/jcs.176057.

Asada R, Kanemoto S, Matsuhisa K, Hino K, Cui M, Cui X, Kaneko M, Imaizumi K.: IRE1a-XBP1 is a novel branch in the transcriptional regulation of Ucp1 in brown adipocytes. *Scientific Reports*, 査読有, 5: 16580, 2015. doi: 10.1038/srep16580.

Cui M, Kanemoto S, Cui X, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Tanimoto K,

Yoshimoto Y, Shukunami C, Imaizumi K.: OASIS modulates hypoxia pathway activity to regulate bone angiogenesis. *Scientific Reports*, 査読有, 5: 16455, 2015. doi: 10.1038/srep16455.

金本聡自, 今泉和則. 小胞体ストレス応答、*生体の科学*, 査読無, 66 巻, 2015, pp492-493.

Iwamoto H, Matsuhisa K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Hino K, Takai T, Cui M, Cui X, Kaneko M, Arihiro K, Sugiyama K, Kurisu K, Matsubara A, Imaizumi K\*.: Promotion of cancer cell proliferation by cleaved and secreted luminal domains of ER stress transducer BBF2H7. *PLoS One*, 査読有, 10(5): e0125982, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0125982.

##### [学会発表](計 8 件)

金本聡自, 今泉和則. 小胞体ストレス条件下で増加する多胞体(Multivesicular body)形成機構の解明と生理的意義の検討、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

金本聡自, 今泉和則. 神経系細胞における小胞体ストレス依存的な多胞体(Multivesicular body)形成機構、第 59 回日本神経化学会(福岡)大会、2016 年 9 月 9 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

金本聡自, 崔旻, 今泉和則. 破骨細胞の多核化に参与する小胞体膜局在転写因子 Luman は樹状細胞の抗原提示能を制御する、第 34 回日本骨代謝学会学術集会、2016 年 7 月 23 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

金本聡自, 今泉和則. 新たな小胞体ストレス応答経路——多胞体形成 - エクソソーム分泌、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 17 日、京都テルサ(京都府京都市)

金本聡自, 松久幸司, 崔旻, 仁谷亮太, 村岡賢, 田原栄俊, 今泉和則. 小胞体ストレスによる多胞体(multivesicular body)形成とエクソソーム分泌、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 4 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

金本聡自, 松久幸司, 崔旻, 今泉和則. Multivesicular body is formed after endoplasmic reticulum stress、第 58 回日本神経化学会(大宮)大会、2015 年 9 月 11 日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

金本聡自, 小林泰浩, 山下照仁, 宮本健史, 高橋直之, 今泉和則. 小胞体膜局在転写因子 Luman と破骨細胞融合因子 DC-STAMP の結合による破骨細胞分化制御機構、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015 年 7 月 25 日、京王プラザホテル(東

京都新宿区)

**金本聡自**、崔旻、今泉和則. 樹状細胞における小胞体局在転写因子 Luman の機能解析、第1回日本骨免疫学会、2015年6月30日、ホテルブリーズベイマリーナ(沖縄県宮古島市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/imaizumi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金本 聡自 (KANEMOTO Soshi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：90611913