

令和元年9月2日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09908

研究課題名(和文) 関節リウマチ病態形成におけるSMAD-STATシグナル伝達ネットワーク

研究課題名(英文) SMAD-STAT signaling network in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

真村 瑞子 (Mamura, Mizuko)

東京医科大学・医学部・兼任教授

研究者番号：60400686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$  とIL-6は協調してTh17細胞分化を誘導するが、標準的TGF- $\beta$  信号伝達分子であるSmad3とSmad4は、IL-6信号伝達分子であるSTAT3の負の制御因子であるSOCS3、SHP1、SHP2の転写を誘導してSTAT3リン酸化を抑制することにより寧ろTh17細胞分化を抑制することを試験管内実験とコラーゲン誘導性関節炎モデルで示した。さらに、関節リウマチ患者末梢血単核球におけるこれら分子の発現様式が、TNF- $\alpha$  またはIL-6を標的にした生物学的製剤の治療感受性と相関性を示し、治療効果予測因子となり得ることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性サイトカインを標的にした生物学的製剤は関節リウマチの治療成績を飛躍的に改善しましたが、ある製剤が無効で他の製剤に切り替えなければならない場合も少なからずあります。生物学的製剤は高価である為、患者様別にどのサイトカインを標的にした製剤が有効であるか治療前に判定することが望まれますが、現時点で明確に予測できる方法はありませんでした。本研究は、関節リウマチの病態に重要な炎症性細胞の分化のコントロールについて新しいメカニズムを明らかにし、生物学的製剤の治療効果を予測し得るマーカーを発見しました。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that TGF- $\beta$  in cooperation with IL-6 induces Th17 differentiation. However, we have found that canonical TGF- $\beta$  signaling pathway via Smad3 and Smad4 rather suppresses Th17 differentiation by inducing the negative regulators of the crucial signaling molecule of IL-6, STAT3 such as SOCS3, SHP1 and SHP2 using in vitro culture and a murine collagen-induced arthritis model. We have further discovered that the expression patterns of these molecules in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from rheumatoid arthritis patients significantly correlate with the efficacy of the biologics targeting TNF- $\alpha$  or IL-6.

研究分野：膠原病リウマチアレルギー内科

キーワード：関節リウマチ Th17 TGF-

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

TNF- $\alpha$ 、IL-6、CTLA-4を標的とした生物学的製剤や細胞内信号伝達阻害薬は関節リウマチ患者の予後を飛躍的に改善したが、治療感受性を予測し得る因子は未だ同定されていない。

IL-6とTGF- $\beta$ により分化誘導されるIL-17を産生するTh17細胞が関節炎の発症機序に重要な役割を果たすことが明らかになり、IL-6の信号伝達分子JAK/STATによるTh17分化誘導機序が解明されてきた (O' Shea et al, JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*. 2012 36(4):542-550)。一方、TGF- $\beta$ は、I型受容体によってSmad2、Smad3のC末端がリン酸化されSmad4と複合体を形成して核内に移行し標的遺伝子発現を制御するが、これらTGF- $\beta$ 細胞内信号伝達分子のTh17分化制御機序については多くの異なる報告がなされ一定の見解を得られていなかった。我々は先行研究において、リンカーリン酸化Smad2と非リン酸化Smad3を介した非標準的TGF- $\beta$ 信号伝達経路が、各々STAT3の転写補助活性化因子と転写補助抑制因子として関節炎病原性TNF- $\alpha$ 産生Th17細胞分化を相反制御する新規の機序を明らかにした (Yoon JH, Mamura M et al, Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nat Commun*. 6:7600, 2015)。しかしながら、C末端リン酸化Smad2/Smad3とSmad4の複合体を介した標準的TGF- $\beta$ 信号伝達経路によるTh17分化誘導機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) SMADsとJAK/STATによるTh17分化誘導機序：TGF- $\beta$  I型受容体によってC末端がリン酸化されたSmad2/Smad3およびTGF- $\beta$ 受容体特異的Smadsと複合体を形成するSmad4とJAK/STAT信号伝達経路が相互作用し関節炎惹起性TNF- $\alpha$ 産生Th17細胞を分化誘導する機序を解明する。

(2) 関節リウマチ患者末梢血単核球(PBMC)におけるSMAD-STAT信号伝達ネットワーク：関節リウマチ患者PBMCにおけるSMAD/STAT発現様式と生物学的製剤治療感受性の相関性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) C末端リン酸化Smad2/Smad3とSTAT3によるTNF- $\alpha$ 産生Th17細胞分化誘導機序

Smad2/Smad3C末端の活性型/非活性型変異体またはコントロールDNAをTh17分化誘導条件下で培養したマウスTh17細胞にトランスフェクションシフローサイトメトリーによって比較解析、C末端リン酸化Smad2/Smad3とSTAT3との結合をproximity ligation assay (PLA)を行い、共焦点顕微鏡にて観察。結合部位を同定するため、SMAD/STAT3の各種欠損変異体をTh17細胞に導入し、PLA及び免疫沈降ウェスタンブロットティングを行う。同定された結合部位の各種変異体をTh17細胞にトランスフェクションし、IL-17A/TNF- $\alpha$ 産生細胞の分化機能を比較解析する。

(2) Smad4とSTAT3によるTNF- $\alpha$ 産生Th17細胞分化誘導機序

T細胞特異的Smad4欠損マウスと野生型同腹子にコラーゲン誘導性関節炎を誘導し、経時的病勢評価を行う。所属リンパ節細胞及び関節組織浸潤免疫細胞をフローサイトメトリーにて評価し、SMAD/STATの発現、リン酸化と結合状態をPLAにて評価する。関節を固定し、HE、トルイジンブルー、サフラニンO染色、免疫染色を行い、光学顕微鏡で観察する。

(3) Smad2/Smad3/Smad4標的遺伝子の同定とプロモーター解析

Th17細胞におけるC末端リン酸化Smad2/Smad3、Smad4の標的遺伝子をクロマチン免疫沈降シーケンスにより同定し確認する。同定された標的遺伝子のプロモーター領域をクローニング、コンストラクトを作成し、各種SMAD/STATプラスミドを用いてプロモーターアッセイを行う。

(4) 関節リウマチ患者PBMCにおけるSMAD/STAT発現様式と生物学的製剤治療感受性の解析

関節リウマチ患者PBMCからRNAを抽出、cDNAを作成し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

によってSMAD/STATと標的遺伝子の発現様式を解析し、生物学的製剤への感受性、抵抗性との相関を検討する。

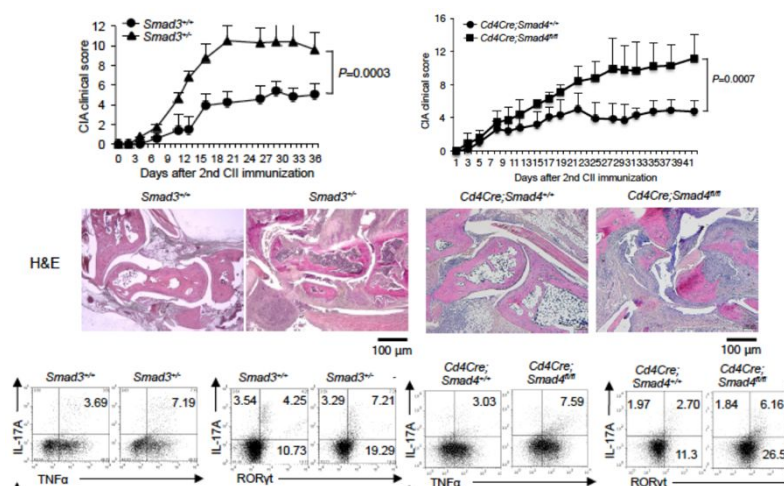
#### 4. 研究成果

##### (1) C末端リン酸化Smad2/Smad3とSTAT3によるTNF- $\alpha$ 産生Th17細胞分化誘導機序

TGF- $\beta$ 刺激により形成されたC末端リン酸化Smad3とSmad4の複合体は、STAT3を介したIL-6によるTh17細胞分化を寧ろ抑制した。

##### (2) Smad4とSTAT3によるTNF- $\alpha$ 産生Th17細胞分化誘導機序

T細胞特異的Smad4欠損マウスにおいては、Smad3欠損マウスと同様に、TNF- $\alpha$ 産生Th17細胞が炎症関節所属リンパ節および炎症局所において増加し、コラーゲン誘導性関節炎が増悪した。Smad3ならびにSmad4欠損を欠損した関節炎マウスのT細胞においては、STAT3経路が活性化されていた。



##### (3) C末端リン酸化Smad3/Smad4標的遺伝子の同定とプロモーター解析

STAT3の負の制御因子であるSOCS3、SHP1、SHP2の転写がC末端リン酸化Smad3/Smad4に誘導されることを見出した。

##### (4) 関節リウマチ患者PBMCにおけるSMAD/STAT発現様式と生物学的製剤治療感受性の解析

新規発症の疾患活動性の高い関節リウマチ患者で診断後早期に生物学的製剤を導入した患者を抽出し、TNF- $\alpha$ を標的にした生物学的製剤の治療反応性が良好であった患者、TNF- $\alpha$ を標的にした生物学的製剤に対して治療抵抗性でIL-6を標的にした生物学的製剤に切り替え有効であった患者、IL-6を標的にした生物学的製剤を当初より処方し治療反応性が良好であった患者の群に分類し、PBMCからRNAを抽出しRT-PCRを行なったところ、Smad3、Smad4、STAT3と負の制御因子の発現様式と生物学的製剤治療抵抗性と感受性に有為な相関が見られた。

研究分担者が所属する筑波大学医学倫理委員会にて審査承認を受け、患者様とインフォームドコンセントの上で文書を交わして得たPBMCを用いて、個人情報保護法に則り個人情報が同定できないように研究を遂行した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Ji Hyeon Ju, In-Kyu Lee, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Mizuko Mamura, 第47回日本免疫学会学術集会、Canonical TGF- $\beta$  signaling via Smad3/4 suppresses Th17 differentiation、2018/12/10

Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Ji Hyeon Ju, Masahiro Yokozawa, Yuya Kondo, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Mizuko Mamura, 第5回 日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス、Canonical TGF- $\beta$  signaling via SMAD3 and SMAD4 suppresses STAT3-induced arthritogenic Th17

differentiation、2018/11/1

Mizuko Mamura, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Ji Hyeon Ju, In-Kyu Lee, Eunjin Bae, Jeong-Hwan Yoon、第62回日本リウマチ学会総会・学術集会International Concurrent Workshop-3: Immunology、Canonical TGF- signaling via C-terminally phosphorylated Smad3 and Smad4 suppresses Th17 differentiation、2018/4/26

真村瑞子、2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ: Smadシグナルのcanonical経路とnon-canonical経路、Canonical SMADシグナルとnon-canonical SMADシグナルによる免疫細胞分化制御、2017/12/8

真村瑞子、第38回日本炎症・再生医学会シンポジウム13骨・軟骨の炎症と再生 (骨免疫学会合同)、関節炎でのTh17分化、2017/7/19

Mizuko Mamura, Jeong-Hwan Yoon, Ji Hyeon Ju, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida、第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、International Concurrent Workshop-B9: Cytokine and cell biology、Canonical TGF- signaling via Smad3/4 regulates expression and function of SOCS3 to suppress Th17 differentiation、2016/4/23

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：住田 孝之

ローマ字氏名：SUMIDA Takayuki

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号 (8桁)：00183054

研究分担者氏名：尹 晶煥

ローマ字氏名：YOON Jeong-Hwan

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：兼任助教

研究者番号（8桁）：30748885

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 光保

ローマ字氏名：KATO Mitsuyasu

研究協力者氏名：須藤 カツ子

ローマ字氏名：SUDO Katsuko

研究協力者氏名：宮澤 恵二

ローマ字氏名：MIYAZAWA Keiji

研究協力者氏名：黒田 雅彦

ローマ字氏名：KURODA Masahiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。