

令和元年6月6日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09910

研究課題名(和文) Layilin依存性上皮間葉移行を中心とした関節リウマチ滑膜細胞の制御

研究課題名(英文) Regulation of rheumatoid synovial fibroblasts focusing on layilin-dependent epithelial-mesenchymal transition-like changes

研究代表者

加藤 智啓 (KATO, TOMOHIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80233807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜線維芽細胞株を用いたプロテオミクス解析で、ライリン発現抑制により変動する蛋白質を24個同定した。そのうち15個(62.5%)がepithelial-mesenchymal transition (EMT)との関連が報告されている蛋白質であり、ライリンはEMT及びEMT様変化に深く関与している可能性が示された。また、ライリンはMTA3を負に制御することで、EMTのマスター分子であるSNAIL1を増強させ、細胞の浸潤能に寄与することを見出した。さらに、ライリンの機能解析に有用なツールとして、CRISPR/Cas9法を用いてホモ型ライリン欠損マウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜細胞のEMT様変化自体を研究している論文は数が少なく、これからの分野である。また、ライリンの機能に關しても明らかにされていない点が多い。その中で、RAで高値となるTNF- $\alpha$ がライリンを介してEMTを起こすという独創的な仮説を提唱し、本研究でその実験的根拠を一部見出した点に学術的意義がある。本研究の長期的目標は、滑膜細胞のEMT様変化抑制、それによる異常増殖抑制・骨浸潤抑制によりRAの治療を行うということである。著効はするが高価でかつ易感染性などの副作用のある現在の生物学的製剤とは全く機序の異なる治療が可能となるところが実用上の極めて大きな意義である。

研究成果の概要(英文)：Firstly, in proteomic analysis, we successfully identified 24 protein spots affected by layilin-silencing in human synovial fibroblasts. As a result, 15 (62.5%) out of the 24 protein spots were assigned to epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins. These data suggest that layilin is deeply involved in EMT and EMT-like changes. Secondly, we found that layilin up-regulated the expression of snail family transcriptional repressor 1 (SNAIL1) via down-regulation of metastasis-associated protein 3 (MTA3) and that enhanced the cellular invasive ability. Thirdly, using the CRISPR-Cas9 method, we successfully established the first layilin-deficient (homo, LAYN-/-) mice to clarify the physiological and pathogenic roles of layilin. This is expected to be a useful tool for the clarification.

研究分野：リウマチ学・生化学

キーワード：滑膜線維芽細胞 関節リウマチ 上皮間葉移行様変化 ライリン

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

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多関節破壊をもたらす関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) の病態の二大特徴は、炎症と滑膜表層細胞の増殖である。前者については炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤が著効を示すなど、炎症性サイトカイン (特に TNF- $\alpha$ ) が RA における炎症を主導している。一方、健常では単層の滑膜表層細胞は、RA ではあたかも腫瘍のように増殖し、一部は細胞塊いわゆるパンヌスを形成し骨に浸潤していく。現在まで滑膜細胞を標的とした RA 治療法はない。

(2) 上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) とは、上皮細胞が細胞極性を失うなど間葉系細胞様に変化する現象である。実験的には様々な細胞で TGF- $\beta$  や TNF- $\alpha$  などのサイトカインによって EMT が誘導される。EMT を起こした細胞は遊走能や組織浸潤能を獲得し、細胞外基質の産生を増大させる。そのため、EMT は癌細胞の浸潤や転移、あるいは臓器の線維化に関わっているとされる。RA においては、滑膜細胞が EMT のマーカータンパク質を発現していること (Steenvoorden, 2006) や低酸素状態で PI3kinase/Akt/HIF-1 を介した EMT が起こること (Li, 2013) などが報告されている。すなわち RA では滑膜表層細胞が EMT 様変化 (滑膜表層細胞は上皮細胞ではないので「EMT 様」とする) を起こし、異常増殖し浸潤能を獲得するという経路が考えられるが、その詳細は不明である。

(3) ライリンは C 型レクチン様の膜貫通型タンパク質で、ヒアルロン酸の受容体とされている (Bono, 2001) が、タリン等の細胞骨格関連タンパク質と結合し (Borowsky, 1998) 細胞接着や癌細胞の浸潤・転移に関与することが報告されており (Zhuo, 2006) 本来機能は未確定である。我々はライリンについて当初「ヒアルロン酸受容体」という観点から研究しており、軟骨細胞および滑膜細胞でライリンが発現しており、ライリンの発現抑制によりヒアルロン酸の MMP-1/-13 産生に対する抑制効果が低下することを報告した (Murata, 2013)。さらに研究を進めて、軟骨細胞で TNF- $\alpha$  がライリンの発現を大幅に増強することを見出した (Asano, 2014)。この時点では我々はまだ、RA におけるライリンの役割について「ヒアルロン酸の受容体」以上のことは考えていなかった。ところが、次に行った腎明細胞癌細胞を使った研究で、TNF- $\alpha$  によってライリンの発現は増強し、かつ、EMT 様形態変化と EMT マーカー変化を起こすこと、そしてさらに重要なことには、TNF- $\alpha$  誘導性 EMT がライリンのノックダウンにより起こらなくなることを見出した (Adachi, 2015)。これは TNF- $\alpha$  誘導性 EMT にライリンが必須であることを示している。この時点で、我々はライリンの本来機能が EMT の制御にあるのではないかと考えるようになった。その観点から RA の滑膜増殖を考えた時、RA における高 TNF- $\alpha$  状態がライリンを介して、本来単層の滑膜表層細胞に EMT 様変化を起こさせ、滑膜表層細胞が EMT 様変化により増殖能・浸潤能を獲得してパンヌス形成へと進むという仮説が十分に成り立つと結論した。これを実証するために本研究を申請することとした。

## 2. 研究の目的

本研究ではライリンを介した TNF- $\alpha$  誘導性の上皮間葉移行が RA 滑膜細胞の異常増殖の本態であるとの仮説を立て、これを実証する。またライリンを標的とした滑膜増殖抑制治療の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

関節滑膜細胞におけるライリン依存性 EMT 様変化とその影響を *in vitro*, *in vivo* の両面から検討する。

(1) *in vitro* 研究として、TNF- $\alpha$  により関節滑膜細胞が EMT のマーカー変化と形態的变化を示すか否か、そして、これらがライリンを介するか否かを検討する。加えて、増殖能・浸潤能の亢進の有無を検討する。また、ライリンの下流に位置する分子を同定する。

ヒト滑膜線維芽細胞株 (Immortalized human synovial membrane fibroblasts-SV40, HSF) および関節リウマチ及び変形性関節症患者の手術検体から分離培養した初代滑膜細胞を TNF- $\alpha$  で刺激し、EMT 様変化の指標となる snail family transcriptional repressor 1 (SNAI1)等のマーカー変化 (Voulgari, 2009) が起こるか否かをウエスタンブロット等で検討する。

上記 で培養滑膜細胞はすでに紡錘形をしているがさらなる形態的变化が起こるか否か観察する。また、増殖・浸潤能を促進するか否かスクラッチアッセイを用いて検討する。

上記 の実験において、siRNA でライリン発現を抑制することで、滑膜細胞での TNF- $\alpha$  誘導性 EMT 様変化がライリン依存性であるか否かを決定する。加えて、ライリンが高発現している、かつ増殖能・浸潤能の高い細胞株を用いて、ライリンが EMT 様変化に寄与するか否かについて検討する。

ライリンの下流経路の探索として、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システムを用いてプロテオミクス (Yoshioka, 2014) を行って、ライリンの影響を受けるタンパク質の網羅的検出・同定を行う。

(2) *in vivo* 研究として、ホモ型のライリン欠損マウスを作製し、コラーゲン誘導性関節炎に対する感受性の検討を行う。作製には作製期間の短い最新手法である CRISP/Cas9 法 (Zheng, 2015) を用い、この手法に実績のある動物実験会社に委託する。

ライリン遺伝子中の標的 DNA 配列の決定と、ベクターの作製、マウスへの導入を行う。ホモ型のライリン欠損マウスを作製・系統化し、そのフェノタイプの解析を行う。

コラーゲン誘導性関節炎における発症率と重症度を、野生型マウスとライリン欠損マウスと比較し、ライリンの関節炎発症における役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

関節滑膜細胞におけるライリン依存性 EMT 様変化とその影響を *in vitro* 及び *in vivo* の両面から検討した。

(1) *in vitro* 研究では、ヒト滑膜線維芽細胞株 (HSF) 及び初代滑膜細胞を用いて各実験を施行した。HSF でも初代滑膜細胞でも TNF- $\alpha$  刺激によりライリンの発現は増加した。今回用いた滑膜細胞では TNF- $\alpha$  刺激の有無に関わらず、EMT 様変化の指標となる SNAI1 の検出が乏しく、滑膜細胞における SNAI1 検出系の改善が必要とされる。また、今回用いた滑膜細胞では TNF- $\alpha$  刺激による形態的变化は認められなかった。そこで、HSF を用いて、無刺激及び TNF- $\alpha$  刺激でライリンの発現抑制が細胞の蛋白質プロファイルにどのように影響するかについて蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システムを用いて網羅的に調べた。無刺激及び TNF- $\alpha$  刺激時にライリン発現抑制によりスポット強度が  $\pm 1.3$  倍以上変

化した蛋白質スポットがそれぞれ 53 個及び 34 個あった。そのうち同定された 24 個の蛋白質中、15 個 (62.5%) が、EMT 関連蛋白質であった (Shimazaki K et al., 2018)。このことからライリンは HSF で EMT 関連蛋白質の調節に深く関与していることが示唆された。加えて、浸潤性の高い悪性神経膠腫細胞では、ライリンの発現抑制により EMT 促進に働く転写因子 SNAI1 の発現が減少し、それに伴い SNAI1 下流遺伝子で浸潤能に寄与する matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*), *MMP9*, and collagen type I alpha 1 chain (*COL1A1*) の発現も減少することを見出した(図 1)。また、ライリンによる SNAI1 の転写調節には MTA3 が関与していることも見出した。加えて、スクラッチアッセイによりライリン発現を抑制することで細胞の浸潤能も抑制されることを見出した(図 2)。以上より、ライリンは MTA3-SNAI1 を介して細胞の浸潤能に寄与することを明らかにした (Kaji et al., 2019, in press)。これらのことから関節リウマチ滑膜細胞の EMT 様変化、さらにはその浸潤能にもライリンが寄与する可能性が十分に考えられる。今後、滑膜細胞株種および滑膜細胞初代培養用の検体数を増やして同様の検討を進める予定である。

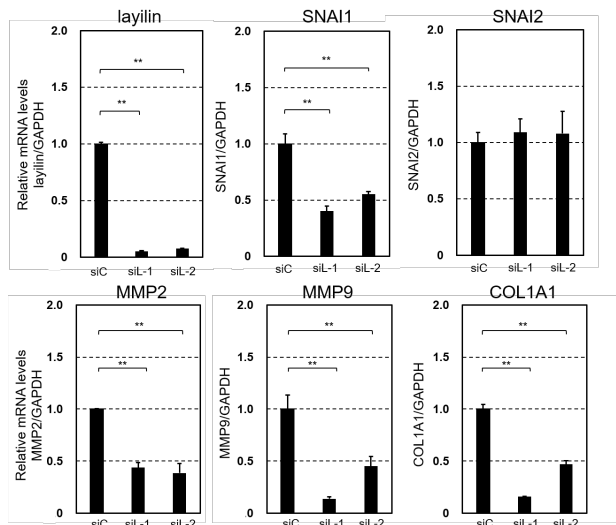


図1 ライリン発現抑制によるSNAI1及びSNAI1標的遺伝子発現に対する影響 (申請者ら論文より和訳して引用)

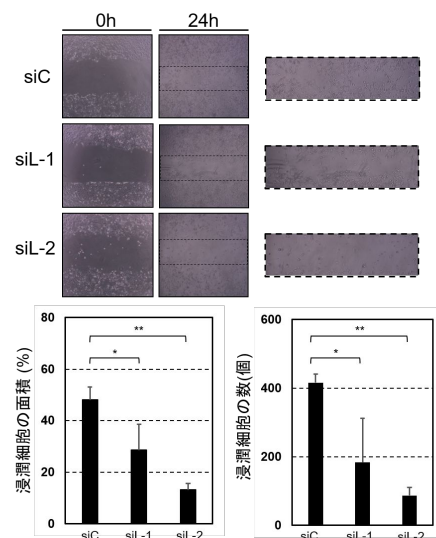


図2 ライリン発現抑制による細胞浸潤能に対する影響 (申請者ら論文より和訳して引用)

(2) *in vivo* 研究としては、CRISP/Cas9 法を用いて、ホモ型のライリン欠損マウスの作製を進めた。ライリン遺伝子中の標的 DNA 配列を決定後、ベクターを作製し、ライリンを標的としたガイド RNA を合成した。DBA/1J マウスの受精卵にガイド RNA 及び Cas9 mRNA を導入し、細胞期胚を仮親マウスの卵管に移植した。妊娠した仮親より仔マウス F0 (計 40 匹、19 匹・21 匹) を得た。19 匹を遺伝子判定に供した結果、6 匹にライリン欠損が認められた。6 匹を対象に次世代シーケンスに供した結果、どのマウスも複数の DM を保有するモザイク状態であった。その中で、ライリン遺伝子 70bpDM (L70DM) を含むマウスと野生型を交配した。誕生した 22 匹の F1 マウスの遺伝子型判定の結果、L70DM のみをヘテロに有する (LAYN+/-) マウスは 12 匹であった。次にその LAYN+/- マウス同士を交配した。誕生した 30 匹の F2 マウスの遺伝子型判定の結果、L70DM のみをホモに有する (LAYN-/-) マウスを 7 匹得、系統化した。繁殖後、体重・臓器重量・血液検査 (赤血球数、血小板数、血糖、コレステロール、クレアチニンなど) などのフェノタイプは野生型と変わらなかった。コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) 実験では、ライリン欠損マウスで CIA 発症時期に関節炎スコアが有意に高く、CIA 発症が早まっている可能性が考えられた。また、それ以降も野生型と比較してその重

症度が高い傾向が認められた。今後、マウスの匹数を増やし、発症時期前後は細かく関節炎スコアをとることで、ライリンが関節炎発症に関与しているかどうか見極め、ライリンの関節炎発症における役割を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Omoteyama Kazuki, Sato Toshiyuki, Arito Mitsumi, Sato Masaaki, Suematsu Naoya, Kurokawa S. Manae, Kato Tomohiro. Effects of salazosulfapyridine on the profile of cell surface proteins, revealed by biotinylation of cell surface proteins and 2-dimensional electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2019, Vol.1867, No. 1, 47-56, doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.05.007. 査読有

Tsuno Hiroataka, Arito Mitsumi, Suematsu Naoya, Sato Toshiyuki, Hashimoto Atushi, Matsui Toshihiro, Omoteyama Kazuki, Sato Masaaki, Okamoto Kazuki, Tohma Shigeto, Kurokawa S. Manae, Kato Tomohiro. A proteomic analysis of serum-derived exosomes in rheumatoid arthritis. *BMC Rheumatology*, 2018, Vol.2, doi.org/10.1186/s41927-018-0041-8. 査読有

Shimazaki Kosuke, Arito Mitsumi, Sato Toshiyuki, Omoteyama Kazuki, Sato Masaaki, Kurokawa S. Manae, Suematsu Naoya, Niki Hisateru, Kato Tomohiro. Roles of layilin in human synovial fibroblasts revealed by proteomic analysis. *Integrative Molecular Medicine*, 2017, Vol.4, No.6, 1-7, 10.15761/IMM.1000316. 査読有

### 〔学会発表〕(計4件)

有戸光美、梶友紘、土屋貴大、佐藤政秋、佐藤利行、表山和樹、黒川真奈絵、末松直也、田中雄一郎、加藤智啓、悪性神経膠腫細胞におけるライリンの役割、第91回日本生化学会大会、2018年

嶋崎孝輔、有戸光美、佐藤利行、表山和樹、佐藤政秋、黒川真奈絵、末松直也、仁木久照、加藤智啓、プロテオミクス法を用いた、ヒト滑膜繊維芽細胞株におけるライリンの機能解析、日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018年合同大会、2018年

有戸光美、嶋崎孝輔、黒川真奈絵、佐藤利行、表山和樹、加藤智啓、滑膜細胞における Layilin の機能探索、第61回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017年

有戸光美、安達崇之、末松直也、池森敦子、表山和樹、佐藤利行、黒川真奈絵、岡本一起、木村健二郎、柴垣有吾、加藤智啓、腎尿細管上皮細胞の TNF- $\alpha$  誘導性上皮間葉移行に対する layilin の役割、第89回日本生化学会大会、2016年

### 〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。