

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08380

研究課題名(和文) 全身性自己免疫疾患におけるRasGRPシグナル異常の解明とその是正

研究課題名(英文) Amendment of abnormal RasGRP signaling in patients with systemic autoimmunity

研究代表者

保田 晋助 (Yasuda, Shinsuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00374231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)患者では、関節を覆う滑膜が異常増殖し、これが骨・軟骨破壊の原因となっている。RAの治療は飛躍的に進歩したが、それでも寛解に至る症例は半数に過ぎず、免疫抑制による感染症も問題となる。この問題を解決するために、本研究課題ではRAにおける滑膜細胞そのものを標的とした治療開発を目指している。限られた血球に発現するシグナル分子であるRasGRP2, RasGRP4が一部のRA患者滑膜に高発現し、滑膜線維芽細胞の増殖・遊走・炎症性物質の産生を共同して促進していることが明らかになった。さらに動物モデルを用いてRasGRP2, RasGRP4を阻害することで関節炎と骨破壊を抑制できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RasGRPは1-4のファミリー分子からなるシグナル分子で、それぞれ血球の系統に比較的限局して発現する。関節リウマチの治療は飛躍的に進歩したが、寛解に至る患者は半数に過ぎず、免疫抑制に伴う感染症も避けがたい。本研究課題では、関節リウマチの本態とも言える増殖した滑膜においてRasGRP2, 4が異所性発現すること、これらが共同して滑膜の病的な働きを促進すること、また関節炎動物モデルを用いてこれらが治療標的になり得ることを示した。これらは、RasGRP標的薬をリウマチの本態である滑膜にデリバリーする治療の開発に繋がる知見であるといえる。

研究成果の概要(英文)：In the joints of patients with rheumatoid arthritis (RA), abnormal growth of synovial fibroblasts and secretion of cytokines as well as proteases contribute to cartilage and bone destruction. Although treatment strategy in RA has been dramatically improved, still half of the patients achieve remission and unwanted infections are induced by immunosuppression. In the current research program, we aimed to search for novel treatment strategy targeting RA-synovial fibroblasts. We found abnormally high expression of RasGRP2 and RasGRP4 in synovial fibroblasts derived from some of RA patients, which are signal molecules restrictively expressed in platelets and bone-marrow derived cells in normal state, respectively. RasGRP2 and 4 coordinately induce cell migration, proliferation and cytokine/protease production. Moreover, inhibition of RasGRP2/4 ameliorated arthritis and joint destruction in animal arthritis model.

研究分野：膠原病・リウマチ

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 RasGRP

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節における滑膜炎と異常増殖、さらには骨・軟骨破壊をきたす自己免疫性疾患である。近年、RA 治療は長足の進歩を遂げたが、依然として寛解を得られない症例が半数を占める。RasGRP4 は当初マスト細胞でクローニングされたが、その後我々が単球での発現を (Hashimoto and Yasuda et al, *Arthritis Res Ther* 2011)、他のグループが好中球での発現を報告した。さらに、RA 患者の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) に RasGRP4 が高発現し、その増殖を促進することを明らかにした (Kono and Yasuda et al, *Arthritis Rheumatol* 2015)。また、破骨細胞を分化・活性化する RANKL は RA で鍵となる分子のひとつであるが、RANKL は NF- κ B 経路の活性化を促すことが知られている。NF- κ B は様々な炎症に関与し、RA においても治療ターゲットとみなされてきた。

一方、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) は妊娠可能年齢の女性に好発し、糸球体腎炎・中枢神経障害など重篤な臓器障害をきたす症例が少なくないが、治療に関してはステロイドや非特異的な免疫抑制をかけてしまう薬剤が主体となっている。SLE 患者由来の T 細胞では、カルシニューリン経路の異常活性化を促す一方で MAP キナーゼ経路の活性化が不十分となる結果、IL-2 産生が低下することが知られている。また、MAP キナーゼ下流の DNMT1 の発現が低下することで DNA の低メチル化が起きることが報告されている。我々は、T 細胞において MAP キナーゼ経路の上流で Ras を活性化する RasGRP1 が SLE 患者においてスプライシング異常・蛋白レベルの低下を来す事を示した。

2. 研究の目的

本来は骨髄球に発現する RasGRP4 が RA-FLS で異所性に高発現することから、RasGRP4 は新たな RA の治療ターゲットになる可能性がある。一方で、SLE 患者 T 細胞において RasGRP1 のスプライシング異常を是正することができれば下流のシグナル異常および IL-2 産生、DNMT1 発現を正常化できると考えた。本研究では、RA、SLE において RasGRP シグナルがどのような異常を来しているのかを詳細に解明し、その是正によって RA では滑膜増殖を抑制、SLE では T 細胞機能を正常化させることを目指した。

また、NF- κ B を制御する micro RNA として miR-9 が報告されており、RA-FLS においても miR-9 が同様の抑制作用を示すかどうかを検討した。

3. 研究の方法

RA 患者由来の FLS における RasGRP ファミリー分子の発現を、メッセージレベル・蛋白レベルで検討した。新たに RasGRP2 の高発現が一部 RA 患者において認められたため、以降は RasGRP2 の下流シグナルおよび FLS の動態への影響・サイトカイン産生能に及ぼす影響について検討した。

NF- κ B の RANKL プロモータへの結合が予測されたため、ChiP アッセイを用いた両者の結合を検討、ルシフェラーゼを用いたリポーターアッセイにより NF- κ B の RANKL 遺伝子発現への影響を検討した。さらに、RA-FLS に miR-9 を作用させることで NF- κ B 活性を抑制できるか、RANKL 発現を抑制できるかを検討した。

SLE 患者由来 T 細胞における正常 RasGRP1 および RasGRP1 スプライシングアイソフォームについて発現を検討した。さらに、代表的スプライシング因子である SRSF1 の SLE 患者 T 細胞における発現および RasGRP1 との相互作用について検討した。

4. 研究成果

一部の RA 患者由来の FLS において RasGRP2/4 が強発現する事が明らかになった。RasGRP2 は Rap1 を活性化することで FLS の細胞骨格を変化させ、遊走・接着を促す一方、RasGRP4 は Ras-MAPK 経路を介して増殖を促し、両経路は協働して関節炎病態に関与する事を示した。さらに、ラット関節炎モデルにおいて RasGRP2、RasGRP4 を標的とする siRNA を関節内投与することで骨破壊を抑制できた (Nakamura H, Shimamura S, Yasuda S, et al. *Ann Rheum Dis* 2018)。さらに、farnesyltransferase inhibitor が in vitro で FLS における RasGRP4 と Ras の会合を阻害し、下流の MAPK 経路を抑制する事でその増殖能を低下させることを示した。

また、NF- κ B が RANKL のプロモータ領域に結合してその発現を亢進するポジティブフィードバック機構が存在することを見出した。さらに、NF- κ B を抑制する micro RNA である miR-9 によって関節炎が抑制されることが、ラット関節炎モデルにて明らかになった (Lee WS, Yasuda S, et al. *Clin Immunol* 2020)

SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 のスプライシング異常に代表的な SR 蛋白である SRSF1 の発現低下が関与し、下流の MAPK 経路の活性低下、IL-2 産生障害、DNA 低メチル化などの SLE 患者 T 細胞に特徴的な性質に関与することを示した。さらに、SLE 患者由来 T 細胞に SRSF1 を発現させることで RasGRP1 の発現が回復し、RasGRP1 を発現させることで IL-2 および DNMT1 の発現が回復した (Kono M, Kurita T, Yasuda S, et al. *Arthritis Rheumatol* 2018)。

これらより、代表的な 2 つの全身性自己免疫疾患において、RasGRP ファミリー分子の発現を是正することで病態を改善できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lee WS, Yasuda S, Kono M, Kudo Y, Shimamura S, Kono M, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Shimizu T, Onodera T, Iwasaki N, Atsumi T	4. 巻 212
2. 論文標題 MicroRNA-9 ameliorates destructive arthritis through down-regulation of NF- B1-RANKL pathway in fibroblast-like synoviocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-020-01089-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 保田晋助, 中村浩之, 嶋村抄苗	4. 巻 62
2. 論文標題 RA滑膜における異所性RasGRP2の発現が破壊性関節炎に寄与する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 375-380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kono M, Kurita T, Yasuda S, Kono M, Fujieda Y, Bohgaki T, Katsuyama T, Tsokos GC, Moulton VR, Atsumi T.	4. 巻 70
2. 論文標題 Decreased expression of Serine/arginine-rich splicing factor 1 in T cells from patients with active systemic lupus erythematosus accounts for reduced expression of RasGRP1 and DNA methyltransferase 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol	6. 最初と最後の頁 2046-2056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.40585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura H, Shimamura S, Yasuda S, Kono M, Kono M, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Shimizu T, Iwasaki N, Atsumi T	4. 巻 77
2. 論文標題 Ectopic RASGRP2 (CaLDAG-GEF1) Expression in Rheumatoid Synovium Contributes to the Development of Destructive Arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis	6. 最初と最後の頁 1765-1772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-018-1647-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shimamura S, Yasuda S, Kono Michihito, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, and Atsumi T
2. 発表標題 Farnesyltransferase inhibitor suppresses the RasGRP4 and Ras interaction of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村浩之、保田晋助、河野通大、嶋村抄苗、藤枝雄一郎、加藤将、奥健志、坊垣暁之、オルガアメンゲアル、渥美達也
2. 発表標題 関節リウマチ患者に高発現したRasGRP2は線維芽細胞様滑膜細胞の接着および遊走に關与する
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kono M, Kurita T, Yasuda S, Fujieda Y, Bohgaki T, Katsuyama T, Kono Michihito, Tsokos GC, Moulton VR, Atsumi T
2. 発表標題 Decreased expression of Serine/arginine-rich splicing factor 1 in T cells from patients with active systemic lupus erythematosus contributes to reduced expression of RasGRP1
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kono M, Kurita T, Yasuda S, Fujieda Y, Bohgaki T, Katsuyama T, Kono Michihito, Tsokos GC, Moulton VR, Atsumi T
2. 発表標題 Decreased expression of Serine/arginine-rich splicing factor 1 in T cells from patients with active systemic lupus erythematosus contributes to reduced expression of RasGRP1
3. 学会等名 11th International Congress on Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 14Kono M, Yasuda S, Kono Michihito, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Atsumi T
2. 発表標題 RASGRP1 polymorphism can contribute to clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 20th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 医薬用組成物	発明者 保田晋助	権利者 国立大学法人北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2020-15678	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	李文詩 (Lee WenShi) (30883590)	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・膠原病・リウマチ内科学分野 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Harvard Medical School	Beth Israel Deaconess Medical Center	