

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08896

研究課題名(和文) Layilinを中心とした関節リウマチの滑膜細胞増殖・活性化の機構解明

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Layilinがcyclin-dependent kinase 1とdynamin-related protein1の活性化を介して、ミトコンドリア形態をチューブ状のfusion型から粒状のfission型に変えることを見出した。このミトコンドリアの変化は癌細胞の浸潤能増強に関連するとされることから、LayilinがEMT様変化を介して細胞の浸潤能を増強させている傍証であると言える。また、複数の細胞株でLayilin発現抑制により細胞増殖が抑制されることを見出した。以上の結果は、LayilinがEMT様変化およびその結果起こる細胞の増殖能・浸潤能の獲得に深く関わることを強く示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりLayilinがEMTおよびその結果起こる細胞の増殖能・浸潤能の獲得に深く関わることを強く示唆された。より長期的な目標は、滑膜細胞のEMT様変化の抑制、それによる異常増殖抑制・骨浸潤抑制により、RAを治療する方法を実現することである。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やJAK阻害薬とは全く機序の異なる治療法を可能とすることであり、実用上の極めて大きな意義である。

研究成果の概要(英文)：We here demonstrated that layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 and dynamin-related protein 1 activation in HEK293T cells. As the shift from tubular to fragmented mitochondria has been reported to correlate with the enhancement of tumor cell migration and invasion, this data gives supporting evidence that layilin enhances invasive abilities through EMT-like changes. In addition, we found that cell proliferation slowed down in layilin-knockdown (KD) cells. These data suggest that layilin is deeply involved in enhancement of cell invasion and proliferation resulting from EMT-like changes.

研究分野：自己免疫疾患及びプロテオミクス

キーワード：Layilin 滑膜細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) RA 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するなど、炎症性サイトカイン(特に TNF- α) が RA における炎症を主導していることが知られている。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ニ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 TNF- α や TGF- β 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 の標識タンパク質を発現していること (Steenvoorden, 2006)、低酸素状態の滑膜細胞で 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」と表現される) を起こし、異常な増殖能と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) Layilin は C 型レクチン様の膜貫通型タンパク質である。ヒアルロン酸の受容体とされているが、細胞骨格関連タンパク質と結合すること、CD8+T 細胞の疲弊と関連することなども報告されており、本来機能は不明である。我々は当初「ヒアルロン酸受容体」という観点から Layilin を研究しており、ヒアルロン酸が Layilin を介して、軟骨細胞および滑膜細胞における MMP-1/-13 産生を抑制していること、軟骨細胞で TNF- α が Layilin の発現を増強することを報告している (Murata, 2013, Asano, 2014)。その時点では我々は Layilin の役割について「ヒアルロン酸受容体」以上のことは考えていなかった。ところが、次に行った腎癌細胞を用いた研究で、TNF- α によって Layilin の発現は増強し、かつ、EMT 様形態変化 (紡錘形化) と EMT マーカー変化を起こすこと、さらに重要なことには、TNF- α 誘導性 EMT が Layilin の発現抑制により起こらなくなることを見出した (Adachi, 2016)。これは TNF- α 誘導性 EMT に Layilin が必須であることを示している。この時点で、我々は Layilin 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。形態学的にも、Layilin は細胞膜表面よりもむしろ核近傍に斑状に局在していることもわかり (研究開始当初未発表データ; Tsubota, 2021)、受容体としての機能以外の機能も有することを支持するものであった。そして、滑膜線維芽細胞株を用いたプロテオミクス解析では、Layilin のノックダウンにより変動するタンパク質で同定できたもの 23 個のうち 16 個 (70%) が EMT との関連が報告されているタンパク質であったことを報告し (Shimazaki, 2017) Layilin は MTA3 を負に制御することで、EMT のマスター分子である Snail を増強させていることを見出している (Kaji, 2019)。

2. 研究の目的

我々は「Layilin を介した TNF- α 誘導性上皮間葉移行 (EMT) 様変化が RA 滑膜細胞の異常増殖の本態である」との仮説を立てた。本研究では Layilin 遺伝子欠損マウスおよびヒト滑膜細胞等を用いて本仮説を実証することを目指し、Layilin を標的とした RA 滑膜増殖抑制治療法の開発

につなげたい。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 研究

Layilin を標的として滑膜細胞の増殖能・浸潤能を抑制することが可能であるか否かを明らかにする。ヒト MG 細胞株 (A172) を用いて、2 種類のライリン siRNA (siL-1 および siL-2) の導入によりライリンの発現を抑制し、siRNA 導入から 24、48、72、96 時間後に細胞数を測定する。

Layilin の下流に位置する分子や Layilin 経路を遮断できる分子を明らかにするために、Layilin により影響を受ける遺伝子群および miRNA を網羅的に解析する。ヒト MG 細胞株 (A172) を用いて、siL-1 および siL-2 の導入によりライリンの発現を抑制し、siRNA 導入から 48 時間後に細胞を回収し、total RNA を抽出した。対照としてコントロール siRNA (siC) を導入した細胞を準備した。抽出 RNA からライブラリを調製し、次世代シーケンサー (mRNA-seq 及び miRNA-seq) に供した。TPM 換算で siC と比較して siL-1 でも siL-2 でも ± 1.5 倍以上有意に増加もしくは減少している遺伝子 (リードカウントの Base Mean ≥ 5 , FDR (false discovery rate) ≤ 0.001) を対象に、Ingenuity® Pathway Analysis を用いてオントロジー解析に供した。

(2) *In vivo* 研究

我々はこれまでに CRISP/Cas9 法 (Zheng, 2015) を用いてホモ型 Layilin 欠損 (LAYN (-/-)) マウスを作製している。本マウスを系統化後、繁殖して下記実験に用いた。

LAYN (-/-) マウスの形態学的特徴・生化学的特徴を検討する。

LAYN (-/-) 欠損マウスを用いたコラーゲン誘導性関節炎モデルの解析により、関節炎における Layilin の役割を明らかにする。

LAYN (-/-) 欠損マウスの抗体等の産生能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 研究

以前、浸潤性の高い神経膠腫由来細胞株 A172 細胞で、Layilin が SNA11 を介して、EMT 様変化を促進し、浸潤能を高めることを報告した (Kaji T, 2019)。加えて Layilin が cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) と dynamin-related protein1 (DRP1) の活性化を介して、ミトコンドリア形態を長いチューブ状の fusion 型から短い粒状の fission 型に変えることを見出した (Tsutiya A, 2021)。fusion 型から fission 型へのミトコンドリアの変化は癌細胞の浸潤能増強に関連するとされることから (Zhao, 2013)、Layilin が EMT を介して細胞の浸潤能を増強させている傍証であると言える。また、複数の細胞株で Layilin の発現抑制により細胞増殖が抑制されることを見出した。これらの結果は、Layilin が EMT およびその結果起こる細胞の増殖能・浸潤能の獲得に深く関わることを強く示唆するものであった。滑膜細胞株について同様の機序があると考えられ、現在検討している。

mRNA-seq の結果、siC と比較して、siL-1 及び siL-2 で 1.5 倍以上有意に増加した遺伝子が 263 個、1/1.5 倍以下に有意に減少した遺伝子が 103 個あった (FDR ≤ 0.001)。これらの遺伝子をオントロジー解析した結果、腫瘍のカテゴリーで「細胞死」関連遺伝子が 117 個、「細胞増殖」関連遺伝子が 41 個、「薬剤耐性」関連遺伝子が 11 個であった。また、miRNA-seq の結果、siC と比較して、siL-1 及び siL-2 で 1.5 倍以上有意に増加した miRNA が 49 個、1/1.5 倍以下に有意に減少した miRNA が 11 個あった (FDR ≤ 0.001)。ライリンによって変動した「細胞死」、「細胞増

殖」,「薬剤耐性」関連遺伝子は、一部 EMT と関連するものも含まれていた。これら遺伝子のほとんどは本研究で初めてライリンとの関係性が見出された遺伝子であり、個別に解析を進める予定である。また、ライリンによって変動した miRNA の中には、ライリンにより変動した遺伝子を調節するとの報告があるものも含まれていた。一方、大半の miRNA はその機能が知られていないものであった。今後、これら miRNA の機能を含め、個別に解析する予定である。

(2) *In vivo* 研究

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モデルの解析を行った。関節炎スコアは Layilin 欠損マウスの野生型と比較して有意な差は認められなかった。

また、抗 Type II コラーゲン抗体価も有意な差は認められなかった。今後、他の関節炎モデルあるいは Layilin 過剰発現マウスを用いて Layilin の関節炎における役割を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ushimaru S, Arito M, Tsutiya A, Sato T, Omoteyama K, Sato M, Suematsu N, Kurokawa M S, Kamijo-Ikemori A, Shibagaki Y, Kato T	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of Layilin in Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in Malignant Glioma Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of St. Marianna University	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17264/stmarieng.11.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsutiya A, Arito M, Tagashira T, Sato M, Omoteyama K, Sato T, Suematsu N, Kurokawa MS, Kato T.	4. 巻 549
2. 論文標題 Layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 and dynamin-related protein 1 activation in HEK293T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 143-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.091.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaji T, Arito M, Tsutiya A, Sase T, Onodera H, Sato T, Omoteyama K, Sato M, Suematsu N, Kurokawa MS, Tanaka Y, Kato T.	4. 巻 1719
2. 論文標題 Layilin enhances the invasive ability of malignant glioma cells via SNAI1 signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 140-147.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.05.034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口拓哉、有戸光美、土屋貴大、加藤智啓、北川博昭
2. 発表標題 神経芽腫及び神経膠腫細胞におけるがん幹細胞性へのライリンの影響
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有戸光美、佐藤利行、表山和樹、佐藤政秋、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 滑膜繊維芽細胞におけるライリンの役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------