

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16288

研究課題名(和文) 時計遺伝子を介した滑膜細胞の炎症性メディエーター産生とオートクライン機構の研究

研究課題名(英文) The production of inflammatory mediators and autocrine via clock genes in RA-FLS

研究代表者

金城 健太 (Kaneshiro, Kenta)

神戸大学・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：60897586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  刺激下において、RA-FLSのBmal1が各種炎症性メディエーター(MMP-3/9, IL-6, CCL2)産生を制御していることがリアルタイムPCR、蛍光免疫染色によって明らかとなった。この研究成果は、骨軟骨破壊、細胞遊走に関わる炎症性メディエーター発現、関節破壊がBmal1によって広範囲に制御されることを示唆するものである。  
以上を踏まえて、Bmal1が制御する炎症性メディエーター発現機構をNF- $\kappa$ B転写活性の観点から明らかにする発展的な研究課題を新たに立案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかではなかったRAにおける時計遺伝子Bmal1の役割の一端が本研究により明らかとなった。本研究はBmal1による炎症性メディエーター産生機構の関連に留まらず、リウマチ関節内環境の総合的な理解につながる可能性を有するものである。さらにBmal1の新規治療標的としての可能性や症状が概日リズムを持つ関節リウマチの治療効果を最適化するための指標となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The expressions of inflammatory mediators (MMP-3/9, IL-6, CCL2) were increased by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but siRNA/Bmal1 attenuated the expressions in RA-FLS. This result indicated that inflammatory mediators related to bone destruction and cell migration were broadly controlled by Bmal1.

Based on these results, we could hypothesize that Bmal1 regulated the expressions of inflammatory mediators by transcriptional activity of NF- $\kappa$ B.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：関節リウマチ 炎症性サイトカイン 時計遺伝子 Bmal1

## 1. 研究開始当初の背景

地球上に生息するほぼすべての生物は、時計遺伝子群の相互作用により睡眠・覚醒やホルモン分泌、免疫機構、細胞分裂などの生命現象を約 24 時間周期で制御する。時計遺伝子群には Per (Period)1/2/3、Bmal1 (brain and muscle Arnt-like protein-1)、Cry (cryptochrome)1/2、Clock (circadian locomotor output cycles kaput)、Dbp (D site of the albumin promoter binding protein)、Hlf (hepatic leukaemia factor)、Tef (Thyrotroph embryonic factor)、E4bp4 (E4-binding protein 4)、Ror (RAR-related orphan receptor) a/c、Rev-erba などがあり、それぞれがフィードバックループを形成して、互いの発現を調節する。

RA は「朝のこわばり」や「炎症性サイトカイン IL (Interleukin)-6 / TNF (Tumor necrosis factor)- の分泌が夜間に亢進する」病状の日内変動を示す疾患であり (Curr Opin Rheumatol.2012;24:312)、RA-FLS は(1)炎症性メディエーター産生、(2)腫瘍様増殖、(3)細胞遊走によってパンヌス形成と骨軟骨破壊を導く。増殖した滑膜組織から産生される炎症性メディエーターには MMP (matrix metalloprotease)-3 や TIMP (tissue inhibitor of metalloprotease)-3、CCL2 (C-C motif chemokine 2)、IL-6、IL-7、IL-15 などが知られており、MMP-3 は関節内基質を分解し、TIMP-3 は MMP-3 を阻害する。

更に CCL2 はマクロファージや RA-FLS の遊走を促進すること、IL-7 は胸腺細胞の、IL-15 は T 細胞のアポトーシスを抑制することも報告されているが、時計遺伝子が RA-FLS の炎症性メディエーター産生を介して RA 関節破壊に与える影響の詳細は未だ明らかでない。また、昨今 RA 治療に広く用いられる生物学的製剤や JAK (Janus kinase) 阻害剤、RA 治療基準薬メソトレキサートなどは免疫抑制作用により感染症を誘引するなど、無視できない副次作用を伴うことも重要な課題として残っている。

## 2. 研究の目的

(1)「RA の夜間に亢進する炎症性サイトカイン分泌は RA-FLS の時計遺伝子に制御されているのか？」、(2)「副次作用を最小限に抑え、治療効果を最大化するため、Bmal1 遺伝子を標的とした RA 治療法を開発することが出来るか？」。を検証するため、RA-FLS の Bmal1 遺伝子発現を操作することで、Bmal1 遺伝子が RA-FLS の炎症性メディエーター産生に与える影響、更にそのオートクライン機構を明らかにし、本研究が Bmal1 遺伝子を標的とした RA 治療法開発の端緒となることを目的とする。

## 3. 研究の方法

IL-1、IL-6、IL-17、TNF-、IFN (interferon)- で経時的に刺激した RA-FLS 由来の RNA を用いて、Bmal1、MMP-3/9、TIMP-3、CCL2、IL-6、IL-7、IL-15 遺伝子の RNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量解析する。同じ実験系で BMAL1 と MMP-3、TIMP-3、CCL2、IL-6、IL-7、IL-15 を蛍光二重免疫染色し、シングルセルレベルでの BMAL1 と各種炎症性メディエーターのタンパク発現パターンを明らかにする。同時に培養上清中の MMP-3/9、TIMP-1/2/3、CCL2、IL-6、IL-7、IL-15 濃度を ELISA で定量する。これにより、RA-FLS の Bmal1 発現、炎症性メディエーター産生を変動させる炎症性サイトカインを絞り込み、以下の実験に用いる炎症性サイトカインを選択する。

RNA 干渉を用いて Bmal1 発現を抑制し、上述の実験(a)において、Bmal1 発現促進効果を認めた炎症性サイトカインを用いて RA-FLS を経時的に刺激する (siRNA/control+ 無刺激群、siRNA/control+ 刺激群、siRNA/Bmal1+ 無刺激群、siRNA/Bmal1+ 刺激群)。RNA を抽出し、逆転写後、リアルタイム PCR 法にて Bmal1、MMP-3/9、TIMP-1/2/3、CCL2、IL-6、IL-7、IL-15 遺伝子を定量解析する。同時に培養上清中の MMP-3、TIMP-3、CCL2、IL-6、IL-7、IL-15 濃度を ELISA で定量する。同じ実験系で RA-FLS 遊走の程度をスクラッチアッセイ、細胞増殖活性を WST-8 アッセイにて検証する。これにより、Bmal1 遺伝子によって発現が制御される炎症性メディエーターと個々の産生量、RA-FLS の遊走と増殖に与える影響が明らかとなる。

## 4. 研究成果

本研究を通じて、TNF-、IL-1、IFN- 刺激によって RA-FLS の Bmal1 および、MMP-3/9、CCL2、IL-6/15 発現が上昇することがリアルタイム PCR によって明らかとなった。siRNA/Bmal1 による Bmal1 発現抑制下においては、これらの炎症性メディエーター発現上昇が抑制されることが免疫染色、ELISA、リアルタイム PCR (図 1) によって明らかとなった。以上より、Bmal1 が RA-FLS の炎症性メディエーター発現を制御していることが明らかとなった。本申請課題の研究成果は、第 30 回日本リウマチ学会

近畿支部学術集会(申請者が本研究課題を通して指導した修士課程学生が筆頭演者として発表、若手優秀演題賞を受賞)、第66回日本リウマチ学会学術総会で発表された。また、本研究課題の研究成果を土台として、新たな研究計画を立案するに至った。少数の予備実験により、Bmal1抑制がTNF- $\alpha$ によって促進されるRA-FLSのNF- $\kappa$ Bのリン酸化を抑制することが明らかとなった(図2)。

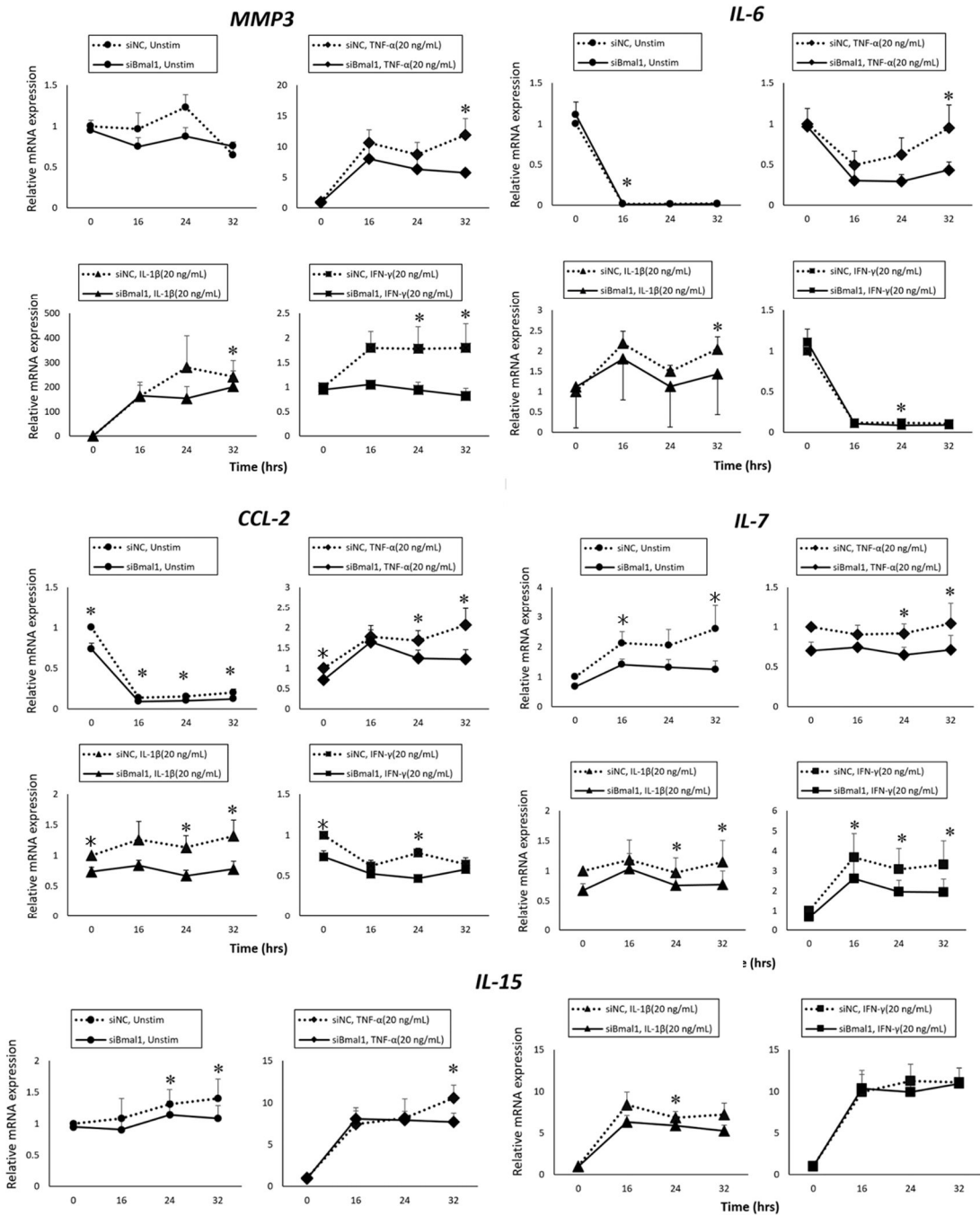


図1：TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  刺激を受けた RA-FLS の各種炎症性メディエーター発現変化は siRNA/Bmal1 により抑制された。

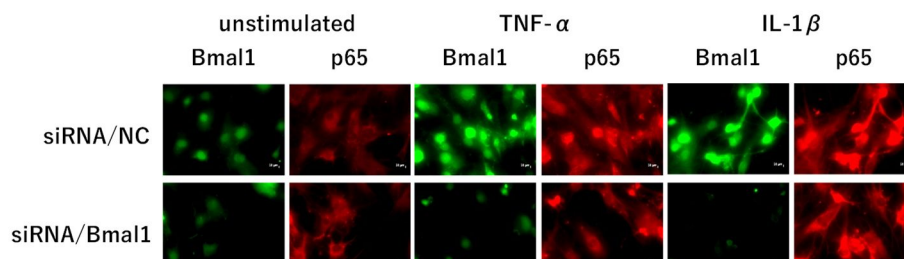


図2：TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  刺激を受けた RA-FLS の NF- $\kappa$ B の核内移行は siRNA/Bmal1 により抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 中川加奈子、金城健太、吉田幸祐、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1はRA滑膜細胞の炎症性メディエーター産生を制御する
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川加奈子、金城健太、吉田幸祐、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜細胞における時計遺伝子を介した炎症性メディエーター産生
3. 学会等名 第30回日本リウマチ学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------