

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16303

研究課題名(和文) 関節リウマチの病態におけるユビキチン修飾を介したT細胞内シグナル制御の役割

研究課題名(英文) T cell signalling regulation via ubiquitination in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

勝山 隆行 (Katsuyama, Takayuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80570093

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)：本研究ではT細胞選択的に特定のE3ユビキチンリガーゼをノックアウト(KO)したマウスを作製した。体重変化や生存期間についてはKOマウスと野生型マウスで有意な差はなく、関節炎の自然発症などは認めなかった。一方で、T細胞からの炎症性サイトカイン産生は両者で差を認め、基質として知られている複数のタンパク質の発現がKO T細胞で亢進していた。さらに、今回着目したE3ユビキチンリガーゼがWntシグナル活性化制御に関与することを明らかにした。これらがエフェクターT細胞の分化に果たす役割についても検討した。さらに関節炎モデルでも検討を行い、関節リウマチの病態における役割についても解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの治療は生物学的製剤やJAK阻害薬の登場で飛躍的な進歩を遂げた。一方で、それらの薬剤を用いても依然として寛解導入が困難な症例は一定数存在し、新規治療標的の開発が期待されている。本研究では関節リウマチの病態に関与する新たな分子としてE3ユビキチンリガーゼの1つに着目した。本研究で当該分子やその下流シグナルがT細胞機能や関節リウマチの病態に果たす役割を明らかにすることにより、関節リウマチの病態解明や新たな作用機序をもつ治療薬の開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, T cell conditional knockout (cKO) mice of an E3 ubiquitin ligase were generated. No significant differences in body weight changes or survival were observed between KO and wild-type mice. Also, spontaneous onset of arthritis was not observed. On the other hand, there were differences in the production of inflammatory cytokines from T cells between WT and KO mice, and the expression levels of several proteins known as substrates of the E3 ligase were increased in T cells from KO mice. Furthermore, the E3 ubiquitin ligase was shown to regulate Wnt signalling. Their role in effector T cell differentiation was also investigated. We analyzed the role of this E3 ligase in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by analyzing model mice of arthritis.

研究分野：膠原病内科

キーワード：関節リウマチ T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)は多関節の滑膜炎を主体とする全身性自己免疫疾患である。その治療の進歩はめざましく、TNF α や IL-6 を標的とした抗体製剤(生物学的製剤)やヤヌスキナーゼ(JAK: Janus kinase)を標的とした JAK 阻害薬の登場により関節破壊を抑制し臨床的・構造的・機能的な寛解の導入・維持が実現可能な目標となった。しかし、未だにその病因は明らかになっておらず、生物学的製剤を用いても一定数の患者で寛解導入に至らず関節破壊の進行を許してしまうという現実がある。そのため、RA の病態に関わる細胞内シグナルの解明は新規治療の開発に繋がることが期待されている。

ユビキチン修飾系はユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の 3 種類の酵素群によりユビキチンを標的タンパク質に結合させる翻訳後修飾系である。酵素群の中で最も下流にある E3 はユビキチン修飾系の中核を担う。免疫担当細胞内のシグナル伝達のあらゆるレベルでユビキチン化が関与しており、近年自己免疫疾患・炎症性疾患におけるユビキチン修飾系の重要性が注目されている。今回着目したユビキチン E3 リガーゼの 1 つは、破骨細胞や癌細胞株で様々な標的タンパクをユビキチン化し細胞内シグナルを制御することが知られている。破骨細胞では標的タンパクを介して、RA でも重要な役割を果たす TNF α 産生を制御する。また、癌細胞株では T 細胞機能にとって重要な LKB1-AMPK シグナルを制御することが明らかになっているが、免疫担当細胞における役割や自己免疫疾患の病態生理への関与についてはこれまで検討されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、着目するユビキチン E3 リガーゼが T 細胞機能にどのような役割を果たしているか、そして関節リウマチの病態生理にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、T 細胞選択的にユビキチン E3 リガーゼをノックアウト(KO)したマウスを作成し、このマウスを用いて T 細胞機能における役割を解析した。

In vivo の解析は、KO マウスと対照マウスで生存期間・体重変化・関節炎所見の有無を比較し全身性炎症をきたすかどうかについて検討した。さらに、尿蛋白の有無についても ELISA で検討し、腎臓などの組織学的検討も行なった。

続いて KO マウスと対照マウスから T 細胞を分離し、フローサイトメトリーで T 細胞活性化マーカーや刺激後のサイトカイン産生などを解析した。さらに、着目するユビキチン E3 リガーゼの基質の発現の変化についてウエスタンブロットで確認し、wnt シグナルなどの下流シグナルについても解析を行なった。

続いて、K/BxN 血清移入関節炎モデルを用いて関節リウマチ病態における T 細胞での役割について検討した。

4. 研究成果

(1). T 細胞選択的ノックアウトマウスの解析

Loxp-Cre システムを用いて今回着目したユビキチン E3 リガーゼを T 細胞選択的にノックアウト(KO)したマウスを作成した。KO マウスの脾臓から T 細胞を分離し、標的とするユビキチン E3 リガーゼの発現が低下していることを確認した。表現型について対照マウスとの比較を行なったが、体重の変化や生存期間については両者で有意差を認めなかった。また、関節炎や皮膚炎など、明らかな疾患の自然発症もみられなかった。組織学的な評価についても明確な差は確認できなかった。

続いてフローサイトメトリーで脾臓細胞を解析したところ、KO マウス由来の脾臓細胞では CD4-CD8-の DN T 細胞が有意に増加していた。また CD69 などの T 細胞活性化マーカーについても上昇していた。さらに PMA/Ionomycin で刺激した後の炎症性サイトカイン産生についても、KO マウス由来 T 細胞で増加していることが確認された。制御性 T 細胞などの分画については両者で明らかな差はみられなかった。

以上の結果から、今回着目したユビキチン E3 リガーゼは T 細胞活性化や炎症性サイトカイン産生に関与していることが示唆された。

(2). T 細胞シグナルにおける役割と関節炎モデルでの検討

続いて、KO マウスと対照マウスの脾臓から分離した T 細胞での蛋白発現についてウエスタンブロットで解析を行なった。基質とされているいくつかの蛋白のうち複数の標的基質の発現が KO マウス由来の T 細胞で増加していることを明らかにした。そのうち 1 つの蛋白は wnt シグナルの制御に関わることが知られているため、wnt- β カテニン経路についても確認したところ、KO マウス由来 T 細胞と対照マウス由来 T 細胞では wnt- β カテニン経路の活性化に差があることが確認された。

さらに、K/BxN 血清移入関節炎モデルを用いて関節リウマチ病態における T 細胞での役割について検討を行なった。関節炎発症時期や関節炎スコアの差、組織学的評価などについて引き続き解析を進めている。また、発現が増加している基質の阻害剤やダブルノックアウトマウスでの解析も検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------