

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20755

研究課題名(和文) 滑膜線維芽細胞におけるGLI3の機能解析

研究課題名(英文) GLI3 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

研究代表者

小宮 陽仁 (Komiya, Yoji)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：00907818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)で用いられる免疫抑制薬は、不応例の存在や易感染性の問題などの限界がある。滑膜炎の病態形成に関わる関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞(RASF)の病的な機能の抑制は、新規治療戦略になると考えられる。RASFのサブセットの中で細胞浸潤、増殖能の高いサブセットで高発現しているGLI3は、RASFを標的とした新規治療戦略の開発に繋がると考えた。siRNAを用いた結果からも、RASFにおいてGLI3と炎症、migration、proliferation関連の遺伝子との関連が示唆された。GLI3は滑膜線維芽細胞からのサイトカイン産生と増殖、遊走能を担う転写因子と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチに対する新規治療標的として、関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞の中で細胞浸潤、増殖能の高いサブセットの抑制は、RASFを標的とした新規治療戦略の開発に繋がると考えた。siRNAを用いた結果GLI3は滑膜線維芽細胞からの種々のサイトカイン産生と増殖、遊走能を担った。GLI3は滑膜線維芽細胞からの種々のサイトカイン産生と増殖、遊走能を担う転写因子と考えられる。

研究成果の概要(英文)：DMARDs are used for the treatment of rheumatoid arthritis(RA). Some patients do not respond to any of these drugs, and infections associated with immunosuppression are also a problem. In RA, synovial fibroblasts (RASF) maintain chronic inflammation which leads to joint destruction. There are no therapeutic agents that target RASF. CD34-THY1+ subset is expanded in RASF and has characteristic features of invasive cells and dominant producer of inflammatory cytokines, suggesting that this subset is pathogenic. GLI3 was highly expressed in the CD34-THY1+. Silencing of GLI3 by siRNA in RASF decreased the proliferation, migration, and production of inflammatory mediators. GLI3 would be a key transcription factor to regulate the pathogenic functions of the CD34-THY1+ fibroblast subset in RA.

研究分野：膠原病・リウマチ内科学分野

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は関節を主座とした慢性炎症性疾患で、不可逆的な関節破壊をもたらす患者の生活の質を大きく損なう。近年の治療戦略の進歩によってその治療成績は大きく向上したが、その中心的役割を担う生物学的製剤は、一部の患者に高い有効性を示すものの、副作用として易感染性をもたらす、高コストな治療であるため医療経済的に大きな負担となるなど、多くの問題を抱えている。関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞(RASF)は、RAの病態形成に重要な役割を担っているが、RASFを治療ターゲットとした薬剤は現時点においてない。今までは単一と考えられていたRASFが3種類の異なる機能を持つサブセット(CD34-THY1-サブセット、CD34-THY1+サブセット、CD34+サブセット)に分けられることが報告されている。これら3つのサブセットの中で、CD34-THY1+サブセットは変形性関節症の患者との比較によってRA患者の滑膜で割合が増えていること、また他のサブセットと比較し、増殖・浸潤能が亢進していることから、RAの病態形成に寄与しているサブセットと考えられる。そのため、CD34-THY1+サブセットはRAの新たな治療標的候補細胞となりうる。このサブセットにおいて発現が亢進している転写因子の中にサブセットを規定するマスターレギュレーターが潜んでいる可能性が考えられる。このマスターレギュレーターに介入することで病的形質を正常化させる、あるいは病的サブセットの選択的除去ができる可能性があり、既存の治療を補完する治療戦略になりうると考えた。CD34-THY1+サブセットにおいて高発現している転写因子としてGLI3を含む4つの遺伝子を同定した。CD34-THY1+サブセットで高発現しているGLI3はこのサブセットを特徴付けるマスターレギュレーターの一つの可能性があり、GLI3は、悪性腫瘍領域において既に腫瘍の浸潤や転移に関わる転写因子と考えられているが、RASFにおいては、十分な検討はされていない。GLI3はRASFにおいても増殖の亢進や浸潤に寄与することで、RAの滑膜におけるサイトカイン産生、滑膜肥厚と肉芽組織の形成において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。GLI3によるRASFの制御機構を明らかにすることにより、RASFを標的とした新規治療戦略の開発に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

GLI3の滑膜線維芽細胞における機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

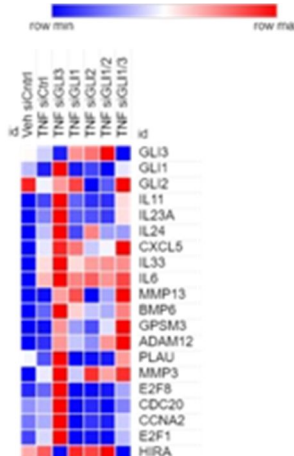
RA患者由来の滑膜滑膜線維芽細胞を用いた。GLI3のプラスミドを用いてChip-Seqを行い、GLI3の下流を明らかにする。また、siRNAにてGLIファミリーの機能評価を行った。

## 4. 研究成果

当初の予定では、作成したGLI3のプラスミドを用いて、Chip-Seqを行う予定であったが、予備検討に行った患者検体由来の滑膜線維芽細胞株からは、Chip-Seqに用いるに十分なサンプル量を回収できなかった。

GLIファミリーの追加検討を行なったところ、患者由来の滑膜検体間でGLI1、GLI2、GLI3の発現が異なる可能性が、Western Blotの結果から考えられた。そのため、siRNAでのノックダウンやプラスミドを用いた過剰発現系以外に、定常状態でのGLIファミリーの発現量がTNF刺激後のサイトカイン産生に影響を与えていた可能性を考え、GLIファミリーの発現量とサイトカイン刺激への反応性の関連性についてもあわせて評価を行なった。siRNAを用いて、GLI1、GLI2、GLI3各々の単独の抑制、およびGLI3とGLI1の同時抑制を行ない、その相互作用などの評価を行った。滑膜線維芽細胞にsiRNAをトランスフェクションした後、TNF- $\alpha$ で刺激を行ったサンプルのRNAシーケンスを行い、各々の条件での遺伝子発現を評価した(右図)。GLI3に対するsiRNAではGLI1、GLI2の発現が上昇し、加えてIL6、IL23A、MMP3、CDC20などの発現上昇を認めた。この結果からもGLI3と炎症、migration、proliferation関連の遺伝子との関連が示唆された。またGLI3抑制で発現の上昇したRNAの一部は、GLI3に加えてGLI1を同時に抑制することによって、その上昇が抑制された。このことから、おそらくGLI3はrepressorとして作用し、GLI1がactivatorとして働いていると考えられた。

CD34-THY1+サブセットで高発現しているGLI3はRASFを標的とし



た新規治療戦略の開発に繋がると考えられる。

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