

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790947

研究課題名（和文） リウマチ滑膜細胞のユビキチン化，シトルリン化修飾による
二元的制御機構の解析研究課題名（英文） The functions of the post-translational modifications in rheumatoid
arthritis

研究代表者

荒谷 聡子（ARATANI SATOKO）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40387064

研究成果の概要（和文）：我々は E3 ユビキチン化酵素 Synoviolin を発見し関節リウマチ（RA）滑膜細胞過増殖という病態に関与するというモデルを提唱してきた。一方、シトルリン化酵素が RA 病因遺伝子として同定され RA におけるシトルリン化修飾が注目されている。本研究では転写後修飾という共通性に着目しユビキチン化とシトルリン化修飾の相互作用の検討を行った。「シノビオリンの強発現による不良タンパク質の分解を介して、最終的には小胞体ストレスが軽減し細胞増殖および分泌が活性化される」という仮説と合致することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease and characterized by synovial hyperplasia. We previously cloned E3 ubiquitin ligase, Synoviolin, as a regulatory factor of cell proliferation and suggested that endoplasmic reticulum (ER) associated degradation system via Synoviolin has important roles for overgrowth of synoviocytes. Meanwhile, Peptidyl-Arginine Deiminases 4 (PADI4) is identified as the RA-susceptible gene. However functions of citrullinated proteins with PADI are unclear. In this study, I hypothesize that the accumulation of citrullinated proteins in RA synoviocytes could associate for ER stress and explore the crosstalk of ubiquitination and citrullination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学・ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

RA は関節腔内で炎症、滑膜細胞の増殖およびこれらに伴う関節破壊といった病態を示

し、四肢の自由を奪い運動性の低下を招く運動器疾患である。RA は高齢化の進む現代において医療・社会経済の面からも非常に重要

な問題であると考えられる。RA における炎症という側面については炎症細胞やサイトカインなど広く解析されてきた。一方、病態の中心と考えられる滑膜細胞の増殖機構については詳しく解明されていなかった。そこで我々は滑膜細胞増殖の調節機序、さらには滑膜細胞自体の細胞生物学的性状に関して明らかにすることを目指して研究を進めてきた。まず滑膜細胞における遺伝子発現制御について解析を行い、転写統合因子 CBP を介した転写活性化およびアセチル化による滑膜細胞増殖の調節メカニズムを報告した。さらに、滑膜細胞に発現する分子群を網羅的にスクリーニングし滑膜細胞の増殖に関与する因子として Synoviolin を得た (HUGO GenBank ID: AB024690)。Synoviolin は小胞体ストレス (Endoplasmic reticulum associated degradation; ERAD) で機能する E3 ユビキチン化酵素であり、蓄積した不良タンパク質の分解およびユビキチン化修飾によりシグナル伝達を調節することが明らかになった。我々は Synoviolin について ① 遺伝子改変動物を用いた実験により Synoviolin の過剰発現は関節炎の発症率を上昇させ、逆に Synoviolin 遺伝子ヘテロ欠損マウスは関節炎モデルに対し抵抗性を示す ② ユビキチン化酵素活性依存的に、小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を示す ③ Synoviolin 欠損マウスのプロテオーム解析から、ガン抑制遺伝子 p53 を介した細胞増殖調節に関与する ④ コラーゲンタンパク質の発現制御と繊維化に関与するということを明らかにしてきた。一方、RA の滑膜組織においてシトルリン化修飾されたタンパク質が増加していることが知られていた。かつ、RA においてシトルリン化された因子が抗原として認識され抗シトルリン化タンパク質自己抗体が産生されていることから、すでに臨床の場で診断マーカーとして利用されている。近年、理研・東大の大規模な SNPs 解析にてシトルリン化酵素 PADI4 遺伝子に多型があり、RA に多く認められる PADI4 の遺伝子は mRNA の安定化により滑膜組織において発現量が増加していることが報告された。これらのことから PADI4 の増加によるシトルリン化タンパク質の増加が RA の発症に深く関与しているのではないかと推察されている。シトルリン化の分子レベルでの機能としてアルギニン残基の電荷がなくなるため結合因子、構造に変化をもたらすと考えられ、その例として PADI4 によるシトルリン化によりヒストンを脱メチル化し転写を抑制することが報告されている。しかし滑膜細胞におけるシトルリン化修飾された因子の作用機序や研究題症者はそれらの関連を検証し PADI4 の増加により細胞内タンパク質のユビキチン

化が抑制されることを発見したが、その意義はまだ不明であった。

2. 研究の目的

本研究計画で RA 滑膜細胞で RA の発症に深く寄与するとされさらにタンパク質修飾に関与する 2 因子、Synoviolin による ERAD の活性化と PADI4 のタンパク質の増加によるシトルリン化タンパク質の蓄積のクロストークについて解析を行う。PADI4 によるユビキチン化の抑制とそれぞれのシグナル経路に共通に含まれる p53 に注目して、滑膜細胞増殖における Synoviolin、PADI4 の機能を分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PADI 発現によるユビキチン化への影響

PADI4 タンパク質の増加、シトルリン化タンパク質の蓄積がユビキチン化につながるか、小胞体ストレスに応答するプロモーターをつなげたレポーター遺伝子 (ERSE-Luc) を用いてレポーターアッセイを行う。また酵素活性の欠損した変異体を用いて、重要性を確認する。

(2) PADI4 の Synoviolin 発現調節への関与の検討

PADI4 によるユビキチン化の抑制が Synoviolin の量によるものかどうかを検討する。PADI4 を強発現し発現量の変化を確認する。

(3) p53 標的遺伝子の転写活性化への PADI4 の関与

PADI4 はヒストンのシトルリン化により p21 や WAF1 などアポトーシスにかかわる p53 の標的遺伝子の転写活性化を抑制する。そこで p21 を用いて滑膜細胞においても PADI4 が p53 標的遺伝子の転写を調節しているかどうか検討する。PADI4 とともに p21 プロモーターをつないだレポーター遺伝子を滑膜細胞に導入し転写活性化に対する効果を調べる。

4. 研究成果

PADI4 によるユビキチン化への影響を検討した結果、PADI4 によりユビキチン化は抑制された。そこに酵素活性が低下した変異体を導入したところ野生型に比べユビキチン化の抑制されない傾向が認められた。細胞内においてシトルリン化酵素活性依存的にユビキチン化を抑制することを明らかにした。細胞内における PADI4 強発現の Synoviolin の発現量への影響を検討したところ変化は認められなかった。また p53 および ERAD 関連プロモーター (ERSE) を用いて転写への影響を検討したところ、PADI4

によるシトルリン化が転写調節に関与し ERSE の転写を抑制することが示唆された。以上の結果から、シトルリン化が細胞内タンパク質のユビキチン化を抑制し、これはあたかも小胞体ストレスが軽減した状態であるのではないかと考えられた。これらのことは、RA においてシノビオリンの強発現により不良タンパク質の分解が促進することにより最終的には小胞体ストレスが軽減し細胞増殖および分泌が活性化されるという我々の提唱したモデルと一致することが示唆された。

さらに我々は Synoviolin によるユビキチン化に関して組織の線維化に同分子が重要であることを発見した。線維化の病態の解析のため肝硬変モデルを用い、線維化の中心である線維芽細胞にシノビオリンが強発現し、Synoviolin 遺伝子ヘテロマウスは肝線維化に抵抗性を示すことを明らかにした。さらに詳細な機能解析により Synoviolin が線維化の直接的な原因因子である細胞外マトリックスの 1 つ、コラーゲンタンパク質の発現・成熟に重要であり、その制御には Synoviolin のユビキチン化酵素活性が必要であることを報告した (図)。RA は滑膜増殖、免疫応答、組織破壊、組織線維化といった多段階の症状を示す。これらの結果から Synoviolin によるユビキチン化制御は滑膜増殖だけでなく RA の最終像である線維化においても重要であり、Synoviolin は RA の多様な病態へと関与していることが示唆された。

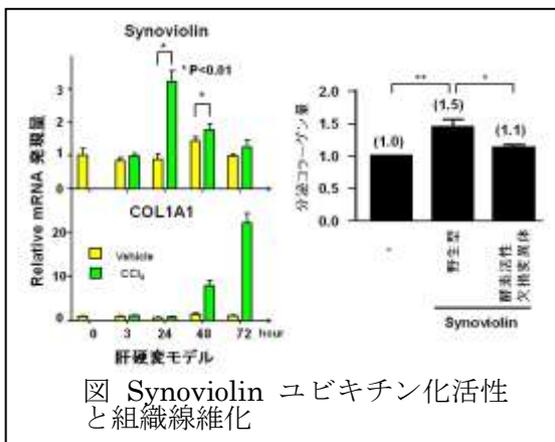


図 Synoviolin ユビキチン化活性と組織線維化

以上のように Synoviolin のユビキチン化酵素活性が RA の病因・病態に深く関与していることを明らかにした。さらに我々は Synoviolin が RA 治療法の標的となり得ると考え、Synoviolin ユビキチン化酵素活性阻害剤を探索し Synoviolin 選択的、非選択的に作用する低分子化合物を得た。実際に同化合物が RA 発症の制御が可能かを検討した。同化合物は μM の濃度で滑膜細胞の増殖を抑制することが明らかになった。また、これらの化合物が関節炎の発症に対し

て抑制的な効果を示すかを検討するため、野生型マウスに II 型コラーゲンを注射しコラーゲン関節炎モデルマウスを作製し、そこに同化合物を連日投与した。その結果、Synoviolin 酵素阻害剤を投与した個体では関節炎の重症度が抑制されることが明らかになった。現在化合物は米国の企業との共同研究によりさらなる最適化を進めている。以上のことから Synoviolin ユビキチン化阻害剤は RA の治療法の開発に対して異議があるもの期待される。またシトルリン化酵素は RA だけでなくガンや神経変性疾患に関与することが報告されていることから、RA だけでなく PADI およびシトルリン化に関連する様々疾患に対する治療に結びつく可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yagishita N, Aratani S, Leach C, Amano T, Yamano Y, Nakatani K, Nishioka K, Nakajima T, RING finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis, *Int J Mol Med*, in press (2012) 査読有
- ② Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Kanazawa T, Ito K, Yamano Y, Nakamura H, Nakajima T, Nishioka K, The Japanese version of the 2010 American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity, *Mod Rheumatol*, 20: 40-44, (2012) 査読有
- ③ Sato T, Fujii R, Konomi K, Yagishita N, Aratani S, Araya N, Aono H, Yudoh K, Suzuki N, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, Overexpression of SPAC1A1/SAAL1, a new gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans, *Arthritis Rheum*, 63: 3833-3842 (2011) 査読有
- ④ Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, Araya N, Yudoh K, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes, *Ann Rheum Dis*, 70: 221-226 (2011) 査読有
- ⑤ Araya N, Takahashi K, Sato T, Nakamura

T, Sawa C, Hasegawa D, Ando H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Oka H, Nishioka K, Nakajima T, Mori N, Yamano Y, Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type1-associated neurological disease, Antivir Ther, 16: 89-98 (2011) 査読有

- ⑥ Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, Matsumoto N, Aratani S, Izumi T, Azakami K, Nakazawa M, Fujita H, Sato T, Araya N, Koike J, Tadokoro M, Suzuki N, Nagata K, Senoo H, Friedman SL, Nishioka K, Yamano Y, Itoh F, Nakajima T, E3 Ubiquitin Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrogenesis, PLoS One, 5(10): e13590, (2010) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Aratani S Yagishita N, Kanazawa T, Nakajima F, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, The functions of the post-translational modifications in rheumatoid arthritis, Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo: The 8th GARN Meeting, 15 November 2011, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- ② Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T. Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis, The 2011 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, 8 November 2011, Chicago, U. S. A.
- ③ Aratani S Yagishita N, Hasegawa D, Nishioka K, Nakajima T, E3 Ubiquitin

Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrogenesis, Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics, 12 July 2011, Philadelphia, U. S. A.

- ④ Aratani S Yagishita N, Hasegawa D, Nishioka K, Nakajima T, Synoviolin ; a novel regulator for fibrosis, Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics, 12 July 2011, Philadelphia, U. S. A.
- ⑤ 荒谷聡子、八木下尚子、山野嘉久、西岡久寿樹、中島利博、翻訳後タンパク質修飾からみた関節リウマチの病態研究、第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011 年 7 月 18 日 神戸(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場 神戸国際展示場)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/rrc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒谷 聡子 (ARATANI SATOKO)
東京医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40387064

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし