

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462390

研究課題名(和文) NF- $\kappa$ B抑制分子を介した関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞のTNF応答増幅機構研究課題名(英文) NF- $\kappa$ B inhibitory molecule mediated TNF responsiveness of rheumatoid arthritis delivered fibroblast-like synoviocyte

研究代表者

五十嵐 英哉 (IGARASHI, HIDEYA)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40291538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NF- $\kappa$ B抑制因子であるABIN-3の炎症性サイトカイン誘導機構を明らかにする目的で、ABIN-3を恒常的に発現するヒト滑膜線維芽細胞株を樹立した。この細胞株では特徴的な形態変化や増殖能の低下、およびマトリックスメタロプロテアーゼやアルデヒド分化酵素の発現低下、Erk、Aktの活性低下などが認められた。さらに質量分析法を用いABIN-3会合分子としてE3ユビキチンリガーゼNEDD4Lを同定し、NEDD4Lとの結合能を失ったABIN-3変異体は、滑膜線維芽細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms for the pro-inflammatory effect of ABIN-3, an inhibitor for NF- $\kappa$ B activation, we established the stable transfectant constitutively expressing ABIN-3 by enforced expression in fibroblast-like synoviocyte cell line MH7A derived from rheumatoid arthritis patient designated as A3G. A3G showed the phenotypic changes as spindle-like appearance, growth retardation, decreased expression of MMPs and ALDH1A1, and down-regulated activity of Erk and Akt. We identified E3 ubiquitin ligase NEDD4L as a binding partner of ABIN-3 by mass-spectrometry and enforced expression.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 NF- $\kappa$ B ABIN-3 NEDD4L ユビキチンリガーゼ アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis、以下 RA) は遺伝的因子、生活習慣、感染症の既往など、複合的な素因によって発症する多因子疾患であるが、主たる病変は関節滑膜の炎症であり、治療の主眼はいかにこの炎症を抑えるかということに置かれている。近年その寛解率の高さから脚光を浴びている抗サイトカイン療法などの生物学的製剤は、確かに炎症を抑えるのに優れた効果を発揮するが、本来のサイトカインの働きや免疫システムの抑制による易感染性などの副作用がしばしば問題となる。理想的には病態の主体をなす関節滑膜線維芽細胞 (fibroblast-like synoviocyte、以下 FLS) の増殖を局所的に是正する治療法の開発が望まれるが、現状では生物学的製剤に取って代わるような治療法の確立には至っていない。

### 2. 研究の目的

TNF $\alpha$ は全身性自己免疫疾患である RA の発症、進展に關与する重要なサイトカインであり、その受容体である TNFR に結合して転写因子である NF- $\kappa$ B を活性化し、TNF $\alpha$ 自身、および IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの転写とともに、A20 とその会合分子である ABIN (A20-binding NF- $\kappa$ B inhibitor) ファミリー分子の転写を促進する。A20/ABINs は TNFR シグナル分子をユビキチン化することにより分解・不活性化して NF- $\kappa$ B を抑制する、いわゆる negative feed-back loop を形成し、炎症の遷延化による生体への障害を回避している。しかし一方で、我々は A20/ABINs がヒト RA 由来 FLS (RA-FLS) において炎症性サイトカインを誘導する可能性があることを見出した。ABIN ファミリーの中でも、1) カウンターパートと考えられるマウス ABIN-3 は NF- $\kappa$ B 抑制ドメインを持たず、種の違いによる機能変換があること、2) 他のファミリーメンバーと比較して機能解析が進んでいない、という観点から ABIN-3 に注目し、RA-FLS における ABIN-3 の機能を明らかにし、ABIN-3 が RA 治療の標的分子となり得るか検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ABIN-3 を恒常的に発現するヒト RA-FLS 形質安定細胞株の樹立  
ABIN-3 と GFP が融合タンパクとして発現するように設計したエピゾーマル型発現ベクターをヒト RA-FLS 形質転換細胞株である MH7A に遺伝子導入し、GFP の蛍光を指標としたセルソーティングによる濃縮と薬剤耐性選択により、ABIN-3/GFP 恒常発現 MH7A 形質安定細胞株を樹立し、A3G と呼ぶこととした。同時に GFP のみを恒常的に発現するコントロール細胞株も樹立し、以下この 2 者を比較することで ABIN-3 の過剰発現による RA-FLS の細胞特性の変化を解析した。

(2) マイクロアレイによる差次的遺伝子発現解析

A3G、コントロール細胞から RNA を抽出し、DNA チップによるアレイ解析を行った。

(3) 分子生物学・生化学的解析

アレイ解析で得られた遺伝子の発現、あるいは以降の解析における分子の発現、リン酸化レベルは、リアルタイム PCR による定量的転写量測定、およびウエスタンブロットによるタンパク量測定で解析した。

(4) 質量分析による ABIN-3 結合分子の同定  
A3G、コントロール細胞からタンパク可溶化物を調製し、抗 GFP 抗体によって免疫沈降された沈降物をタンパク電気泳動したのち銀染色でタンパクを可視化、A3G サンプルに特異的に見られるタンパクのバンドを ABIN-3 複合体と考えて切り出し、質量分析法により得られたアミノ酸配列から分子を同定した。

(5) ABIN-3 変異体の作製

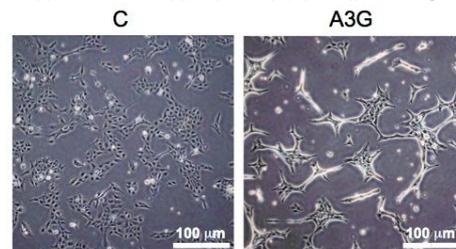
Inversed-PCR 法によりコドンの塩基置換を行い、ABIN-3 の PY モチーフ内にあるプロリンがアラニン変換された ABIN-3 の cDNA を作製し、(1) と同じ手法によって ABIN-3 変異体/GFP 恒常発現 MH7A 形質安定細胞株を樹立し AYm と呼ぶことにした。

(5) 死細胞の検出

早期にアポトーシスを起こした細胞はアネキシン V 染色によって、またそれ以降の段階の死細胞は Propidium iodide (PI) 染色によって FACS 解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) A3G はコントロールに較べて胞体が紡錘状になる形態変化が認められた (図 1)。FACS 解析でも細胞サイズの増大が確認されると同時に、通常の培養条件下で PI 陽性の死細胞の増加および増殖能の低下を認めた。

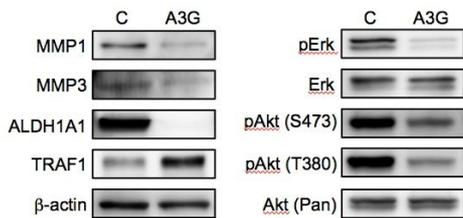


[図 1] 顕微鏡下での細胞の形態

C: コントロール細胞株

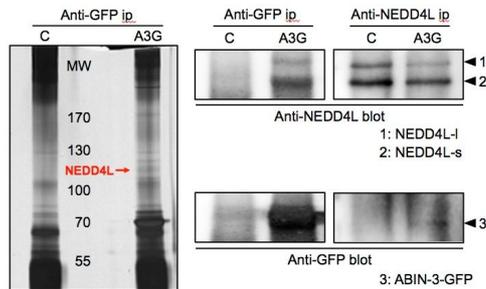
(2) このような形質変化の原因を探る目的で A3G とコントロール細胞間で DNA アレイ解析を行い、マトリックスメタロプロテアーゼをはじめ、発現量の変動する遺伝子が捉えられた。これらの遺伝子発現制御を探索する過程で、代謝関連分子、種々のキナーゼ活性のレベル、あるいは TNFR シグナル伝達分子の発現等の変化が ABIN-3 の単独恒常発現によってもたらされることを見出した (図 2)。

(3) ABIN-3 には酵素活性はないが、ユビキチン化したタンパク分子と結合するドメインがあり、ABIN-3 の恒常発現による細胞形質



[図2] ウェスタンブロットによるタンパクの発現とリン酸化レベル

の変化や種々の分子の発現、活性化に及ぼす影響は ABIN-3 会合分子の機能によることが考えられたため、免疫沈降によって共沈される分子を質量分析によって同定したところ、その中のひとつに E3 ユビキチンリガーゼ(ユビキチン転移酵素)である NEDD4L の会合が示唆され、特異的抗体によるウェスタンブロットによってこの会合を確認した(図3)。抗 GFP 抗体による ABIN-3 複合体免疫沈降物を使った invitro ユビキチン反応により、NEDD4L と共役する E2 ユビキチン結合酵素の UbcH5b 存在下で新規のユビキチン鎖連結反応が起こること、その基質が ABIN-3 複合体に存在することが明らかとなった。

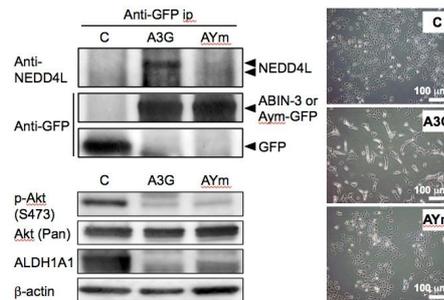


[図3] 質量分析に用いた免疫沈降物とウェスタンブロットによる結合の確認

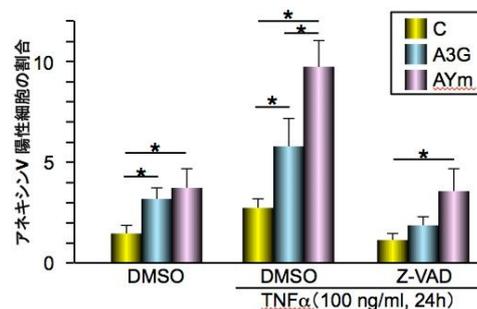
(4) ABIN-3 の C 末には NEDD4L との結合配列である PY モチーフ (PPXY) が存在している。PY モチーフ内のプロリンをアラニンに置換した機能喪失型 ABIN-3 変異体を作製し、このモチーフを介して ABIN-3 と NEDD4L が会合していることを確認した。大変興味深いことに、AY 変異体は A3G で見られた形態変化が消失するにもかかわらず、A3G での種々の分子の発現、活性化に及ぼす影響には変化がなく、細胞増殖能に関しては A3G よりもさらに低下していたことから、少なくとも特徴的な形態変化には ABIN-3 と NEDD4L の会合が必要であることがわかった(図4)。

(5) AY 変異体の形質安定細胞株 (AYm) は通常の培養条件下で A3G よりも PI 陽性の死細胞の増加を認めた。親株である MH7A は TNF $\alpha$  刺激によりアポトーシスが誘導される。コントロール、A3G、AYm を TNF $\alpha$  で刺激すると A3G はコントロールの 2 倍、AYm では 3 倍アネキ

シン V 陽性のアポトーシス細胞が増加していた。汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD はこの増加を抑制するので、A3G、AYm はカスパーゼ依存性アポトーシスに高い感受性を示すことがわかった(図5)。



[図4] AYm のフェノタイプ

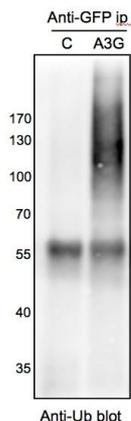


[図5] AYm のアポトーシスに対する感受性の亢進

#### (6) 考察および今後の展望

NEDD4L の基質は多数報告されている。中でも smad2 をユビキチン化して分解し、TGF- $\beta$  シグナルを抑制する機能や、上皮系ナトリウムチャンネル ENaC の細胞室内部分にある PY モチーフに結合し、これをユビキチン化して分解することによって尿細管における ENaC の数を調整して体液の塩濃度を調節する機能は重要である。先天性に ENaC の PY モチーフに変異があり、NEDD4L による ENaC の数の調節が出来なくなると、ナトリウムの細胞外への排泄が亢進し、高血圧などの症状を呈する、いわゆる Liddle 症候群となる。本研究において ABIN-3 を NEDD4L の新規の結合分子として同定し得たが、ABIN-3 自身が NEDD4L の基質となっている結果は得られず、NEDD4L の足場となっている可能性が示唆された。NEDD4L は K48 型ポリユビキチン鎖生成を触媒する E3 ユビキチンリガーゼである。他方の ABIN-3 結合分子である A20 は、TNFR を介する NF- $\kappa$ B 活性化経路抑制作用のひとつとして、シグナル伝達分子である RIP1 を K48 型ポリユビキチン化してこれを分解する。NF- $\kappa$ B 活性は TNF $\alpha$  で誘導されるアポトーシスに対して拮抗的に働くと考えられるので、もし NEDD4L が ABIN-3 を介して A20 と共に RIP1 にリクルートし、RIP1 の K48 型ポリユビキチン化を促進すれば、かなり早期の段階で NF- $\kappa$ B 活性の抑制が起こり、アポトーシスが増強することが説明できるのではないかと考えたが、TNF $\alpha$

存在下においても A3G における RIP1 のユビキチン化促進は認められず、RIP1 が NEDD4L の基質である可能性は低いと考えられる。また NEDD4L と結合できない AYm が A3G よりもアポトーシスに対する感受性が高くなる現象をこの仮説では説明できない。驚いたことに、NF- $\kappa$ B 抑制と、ユビキチン化タンパクとの結合の両機能の発揮に重要な AHD2 ドメインを欠いた ABIN-3 の変異体を恒常的に発現させた MH7A でもアポトーシス感受性が亢進していたことは、NF- $\kappa$ B 活性と ABIN-3 複合体中の



ユビキチン化タンパク (図 6) の機能では説明できないかもしれない。AHD2 と PY の両ドメインを欠失した変異体を解析することが必要と思われるが、これはまさにマウスの ABIN-3 カウンターパートである。すなわちマウス ABIN-3 はアポトーシス促進作用を有する可能性があるが、ロックアウトマウスではなんらフェノタイプが出ないなど、少なくともマウスの生体内ではそのような機能はないのかもしれない。ヒトに進化する段階

[図 6] ABIN-3 複合体中のユビキチン化タンパク

で新たな機能を獲得した可能性が考えられる。ABIN-3 は他の ABIN ファミリーメンバーに比べると、発現している組織が限局しており、ABIN-3 を治療の標的と捉えた場合に、生体への影響は最小限で済むと考えられる。これまで報告されている ABIN-3 の誘導刺激は LPS や TNF $\alpha$  など炎症作用を有するものである。非炎症系の誘導剤、例えば特異的に ABIN-3 の転写活性を上げる天然、あるいは合成化合物を手にする如果能够できればこれを用いて異常増殖している FLS に ABIN-3 の発現を誘導することができるであろう。さらに誘導された ABIN-3 が NEDD4L と結合できないように、PY モチーフを含む相同配列の阻害ペプチドを併用すれば、AYm が過剰に存在するのと同じ状況を作り出すことができるので、異常増殖している FLS に細胞死を効率的に誘導して、全身的な副作用の少ない、RA の罹患関節で起こる骨・軟骨の破壊を防ぐ局所療法につながるのではないかと期待している。

## 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 1 件)]

Hirano H, Igarashi H, Morita Y, Ishihara K. TNF receptor type 2 transmits caspase-dependent apoptotic signals in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid

arthritis. *Kawasaki Med. J.* 41(2): 29-40, 2015. doi:10.11482/KMJ-E41(2) 29. 査読有り

[学会発表](計 6 件)

五十嵐英哉: NF- $\kappa$ B 抑制因子 ABIN-3 は RA 治療の標的分子となりうるか、第 26 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会シンポジウム リウマチ性疾患の基礎研究(平成 27 年 12 月 5 日 岡山コンベンションセンター(岡山市・岡山))

五十嵐英哉, 石原克彦: ABIN(A20-Binding Inhibitors of NF- $\kappa$ B) -3 は関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞(RA-FLS)株で Akt のユビキチン化を制御する、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会(平成 27 年 4 月 23 日 名古屋国際会議場(名古屋市・愛知))

平野紘康, 五十嵐英哉, 矢作綾野, 守田吉孝, 石原克彦: 関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞において 2 型 TNF 受容体(TNFR2)はカスパーゼを介するアポトーシスシグナルを伝達する、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会(平成 27 年 4 月 23 日 名古屋国際会議場(名古屋市・愛知))

平野紘康, 五十嵐英哉, 石原克彦: 2 型 TNF レセプターは滑膜線維芽細胞株においてカスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導する、岡山免疫懇話会(平成 27 年 3 月 4 日 岡山大学(岡山市・岡山))

Hideya Igarashi, Katsuhiko Ishihara: Over-expression of ABIN-3 negatively regulates Erk and Akt activity leading to apoptosis of rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocyte cell line. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (December 11<sup>th</sup>, 2014, Kyoto International Conference Center (Kyoto City・Kyoto))

Hiroyasu Hirano, Hideya Igarashi, Ayano Yahagi, Katsuhiko Ishihara: High density of TNFR2 on fibroblast-like synoviocyte derived from rheumatoid arthritis provides the sensitivity to cell death. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (December 11<sup>th</sup>, 2014, Kyoto International Conference Center (Kyoto City・Kyoto))

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 英哉 (IGARASHI HIDEYA)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40291538