

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26461478

研究課題名（和文）滑膜細胞調節因子シノビオリンによる関節リウマチ骨軟骨破壊機構の解明

研究課題名（英文）The study of bone destruction mechanism of rheumatoid arthritis by synoviolin

研究代表者

八木下 尚子（YAGISHITA, Naoko）

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：40367389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）はQOLを脅かす疾患であり、現在、骨破壊と線維化の進んだエンドステージの患者に対して有効な治療法はないため、医療・社会・経済の面からRAの病態形成の全貌を明らかにすることが求められている。我々がRA滑膜細胞から発見したシノビオリンは、RAの様々な病態形成に関与するが、骨・軟骨破壊との関与については明らかではなかった。そこで本研究では、シノビオリンの骨・軟骨における機能解明を試みたところ、軟骨において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The symptoms of rheumatoid arthritis (RA) are based on the many processes. We recently cloned Synoviolin as an overexpressing molecule in rheumatoid synovium, and has been verifying its critical roles in RA. In this study, we investigated the role of synoviolin in bone and cartilage using Synoviolin conditional knockout mice and showed that Synoviolin has a crucial role in cartilage.

研究分野：分子病態学

キーワード：遺伝子 タンパク質 動物 関節リウマチ 滑膜細胞 小胞体関連分解 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA)は、(1)免疫応答異常、(2)滑膜細胞の過剰増殖、(3)骨・軟骨破壊、(4)線維化の病的プロセスが複雑に相互作用して時空間的に多様な病態を呈しながら症状が進行する。これまでに我々は、小胞体膜状に局在する小胞体関連タンパク質分解 (Endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD) の E3 ユビキチン化酵素シノピオリンを発見し (Genes Dev 2003), RA ではシノピオリンの過剰発現による ERAD の活性化が、不良品タンパク質の蓄積による小胞体の破綻・細胞死を回避させ、(2)滑膜細胞の過剰増殖を引き起こすという新たな病態論を展開した (Nat Clin Prac Rheum 2008)。さらにシノピオリンは、可溶性もしくは分泌型小胞体基質 (ERAD-Ls) の分解で中心的役割を果たし (Bernasconi R et al. J Cell Biol 2010)、ERAD-Ls であるコラーゲンの品質管理を介して RA の終末像である(4)線維化を制御することを発見した (PLoS One 2010)。また他のグループからは、シノピオリンが抗 TNF 製剤の感受性決定因子であること (Toh ML et al. Arthritis Rheum 2006)、慢性炎症の分子標的となること (Gao B et al. Arthritis Rheum Ther 2006, Toh ML et al. PLoS ONE 2010, Klaasen R et al. Ann Rheum Dis 2012 など) が報告されていることから、シノピオリンは RA における(1)免疫応答異常にも深く関与しているといえる。

以上のことから、シノピオリンは(1)(2)(4)の各病的プロセスに関わりあいながら RA の症状を進行させるといえるが、(3)との関わりについては不明である。RA とシノピオリンの関係を明らかとし、RA を総合的に理解して克服するためには、この解明が必須な課題であるといえる。そのためにはシノピオリン遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、骨・軟骨組織におけるシノピオリンの生理学的意義を明確にすることが有効であるが、このマウスは胎生致死となる (J Biol Chem 2005)。そこで、Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いたタモキシフェン誘導型シノピオリンコンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、タモキシフェン投与によりシノピオリンを欠損させたところ、摂餌量はコントロールマウスと差がないにもかかわらず、体重の減少、白色脂肪組織の萎縮を認め、投与後 3 週目までに死亡した (EMBO J 2015)。さらに詳細な解析から、シノピオリンは酸化やミトコンドリアの機能に關与する遺伝子の発現を調節する PPAR の

転写コアクチベーター PGC-1 を基質として分解し、その発現量の調節を行っていることが明らかとなった。すなわち

cKO マウスでは PGC-1 の分解が抑制され、結果としてミトコンドリアの増大、エネルギー代謝の活性化が起こり、脂肪組織が縮小し、体重が減少することが証明されたのである (EMBO J 2015)。この cKO マウス関節では、滑膜細胞・軟骨細胞の薄層化、軟骨細胞の不正配列、骨芽細胞の萎縮が認められた。また、in Vitro では cKO マウス由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSC) から脂肪細胞への分化は促進されるのに対し、骨芽細胞への分化は抑制された (未発表データ)。

2. 研究の目的

骨・軟骨組織におけるシノピオリンの機能を解明し、RA の(3)骨・軟骨破壊とシノピオリンの関係を明らかとして RA の病態を総合的に理解し、その克服につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

軟骨細胞特異的 KO マウスには 型コラーゲンプロモーター (Col2a1-Cre(+))、骨芽細胞特異的 KO マウスには SP7 プロモーター制御下で Cre を発現するマウス (Sp7-Cre(+)) を、それぞれシノピオリン floxed マウス (Syno^{fl/fl}) と掛け合わせ作製した (Col2a1-Cre(+)/Syno^{fl/fl} および Sp7-Cre(+)/Syno^{fl/fl})。得られた仔マウスの遺伝子型は尾組織を用いた PCR 法により同定し、目的とする KO マウスの表現型を次の項目について解析した。特に骨・軟骨組織、脂肪組織に重点を置き解析した。

4. 研究成果

軟骨細胞・骨芽細胞特異的シノピオリン KO マウスを、型コラーゲン、SP7 プロモーター制御下で Cre を発現するマウスを、それぞれシノピオリン floxed マウスと掛け合わせ作製したところ、軟骨細胞・骨芽細胞特異的シノピオリン遺伝子欠損マウスはいずれも体格が小さく、しかもメンデルの法則に則って出生しないことが明らかとなった。そこで、胎生期より遺伝子型の解析を行い、各ステージでの KO マウスの存在率を検証したところ、型コラーゲンプロモーター制御下で Cre を発現するマウスの出生は予測の 50% 程度であり、しかも出生後 3 週間程度しか生存しないことが明らかとなった。以上の結果からシノピオリンは軟骨において重要な役割を示すこと

が明らかとなり、RAの病態を形成する免疫応答異常、滑膜細胞の過剰増殖、骨・軟骨破壊、線維化のすべての病的プロセスに参与することが示された。そのため、シノビオリンを抑制することがRAの治療につながるものと大いに期待される。

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 9 件)

八木下尚子、中島利博、関節リウマチ発症因子シノビオリン、アレルギーの臨床、査読無、37 巻、2017,94-100

八木下尚子、中島利博、関節リウマチ発症因子シノビオリン、BIO Clinica 慢性炎症と疾患、査読無、5 巻、2016,137-143

八木下尚子、中島利博、関節リウマチ発症因子シノビオリン、アレルギーの臨床、査読無、36 巻、2016,84-90

Aratani S,Fujita H,Yagishita N,Yamano Y,Okubo Y,Nishioka K,Nakajima T. Inhibitory effects of ubiquitination of synoviolin by PADI4, Mol. Med. Rep. in.press, 査読有、-、2016、-

Nakajima F,Aratani S,Fujita H,Nakatani K,Makita K,Nakajima T. A case of fibromyalgia involving pain throughout the body treated with sitespecific targeted pain control, Springerplus, 査読有、5 巻、2016,1027 DOI:10.1186/s40064-016-2572-z

Fujita H,Aratani S,Fujii R,Yamano Y,Yagishita N,Araya N,Izumi T,Azakami K,Hasegawa D,Nishioka K,Nakajima T. Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF- κ B regulates NF- κ B signaling in cells subjected to ER stress, Int J Mol Med, 査読有、37 巻 2016,1611-1618 DOI:10.3892/ijmm.2016.2566.

Maeda T,Tanabe-Fujimura C,Fujita Y,Abe C,Nanakida Y,Kun Zou,Liu S,Nakajima T,Komano H. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 inhibits the proteasomal degradation of homocysteine-inducible endoplasmic reticulum protein, Biochem Biophys Res Commun, 査読有、473 巻、2016,1276-1280 DOI:10.1016/j.bbrc.2016.04.057

Fujita H,Yagishita N,Aratani S,Saito-Fujita T,Morota S,Yamano Y,Hansson MJ,Inazu M,Kubota H,Sudo K,Kawahara KI,Nakajima F,Hasegawa D,Higuchi I,Sato T,Araya N,Usui C,Nshioka K,Nakatani Y,Maruyama I,Usui M,Hara N,Uchino H,Elmer E,Nshioka K,Nakajima T. The E3 Ligase synoviolin control body weight and mitochondrial biogenesis through negative regulation of PGC-1 EMBO J,34(8):1042-1055,2015

Wu T,Zhao F,Gao B,Tan C,Yagishita N,Nakajima T,Wong PK,Chapman E,Fang D,Zhang DD. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis Genes Dev,28(7):708-22,2014

[学会発表](計 17 件)

荒谷聡子、藤田英俊、八木下尚子、山野嘉久、西岡久寿樹、中島利博、関節リウマチにおける転写後修飾による多重化シグナル調節機構の解析。第3回JCRベーシックリサーチカンファレンス 2016年10月14日~15日、アキバホール(東京都千代田区)

藤田英俊、荒谷聡子、八木下尚子、山野嘉久、須藤カツ子、内野博之、西岡久寿樹、中島利博、リウマチ発症因子シノビオリンによる新規エネルギー代謝機構の解明。第3回JCRベーシックリサーチカンファレンス 2016年10月14日~15日、アキバホール(東京都千代田区)

中島利博、シノビオリンが拓く慢性炎症・関節リウマチの病態メカニズムと新規治療法の開発。第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13日~14日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

藤田英俊、荒谷聡子、西岡久寿樹、中島利博、マウスモデルを用いたシノビオリン阻害活性を有する天然物の効果の検証。日本線維筋痛症学会第8回学術集会 2016年09月17日~18日、KFC Hall&Rooms(東京都墨田区)

藤田英俊、荒谷聡子、西岡久寿樹、中島利博、ヒトにおけるシノビオリン阻害剤の効果の検証。日本線維筋痛症学会第8回学術集会 2016年09月17日~18日、KFC

Hall&Rooms (東京都墨田区)

藤田英俊、荒谷聡子、西岡久寿樹、中島利博、シノビオリン阻害剤の探索。
日本線維筋痛症学会第8回学術集会
2016年09月17日~18日、KFC Hall&Rooms (東京都墨田区)

荒谷聡子、シノビオリン阻害剤の実用化に向けて。
第17回運動器科学研究会 2016年09月02日~03日、大阪大学中之島センター (大阪府大阪市)

藤田英俊、リウマチ発症因子シノビオリンによるエネルギー代謝調節の解明。
第17回運動器科学研究会 2016年09月02日~03日、大阪大学中之島センター (大阪府大阪市)

中島利博、新規自己炎症症候群モデルマウスの樹立とシノビオリン阻害剤の効果。
第17回運動器科学研究会 2016年09月02日~03日、大阪大学中之島センター (大阪府大阪市)

Aratani S, Fujita H, Yagishita N, Yokota M, Nishioka K, Nakajima T. E3 Ubiquitin ligase Synoviolin inhibitors has effects on obesity ,
International Conference on Obesity and Chronic Diseases (ICOCD-2016),
2016.07.25-27, Las Vegas(USA)

Aratani S, Nakajima T. Synoviolin, as a novel factor for understanding obesity and metabolic disorders based on chronic inflammation,
International Conference on Obesity and Chronic Diseases(ICOCD-2016),
2016.07.25-27, Las Vegas(USA)

藤田英俊、荒谷聡子、須藤カツ子、稲津正人、原直美、内野博之、西岡久寿樹、中島利博、Synoviolin is a key regulator in chronic inflammation
第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム 2016年06月18日、東京医科大学病院 (東京都新宿区)

荒谷聡子、藤田英俊、八木下尚子、中島若巳、西岡久寿樹、中島利博、シノビオリン阻害剤の実用化に向けて。
第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム 2016年06月18日、東京医科大学病院 (東京都新宿区)

Nazgul Omurzakova, Nakajima T. Study on Clinical-Functional Peculiarities Assessment of Rheumatic Fheumatic

Fever in the Kyrgyz Republic,
The World Congress of Cardiology and Cardiovascular Health (WCC 2016),
2016.06.04-07, Mexico City(Mexico)

荒谷聡子、藤田英俊、西岡久寿樹、中島利博、E3 ユビキチン化酵素シノビオリン阻害剤の臨床応用への可能性。
第177回東京医科大学医学会総会2016年06月04日、東京医科大学病院 (東京都新宿区)

Nakajima T. Synoviolin, as a new stellar factor for understanding chronic inflammation,
MOSCOW INTERNATIONAL FORUM OF BONES AND JOINTS DISORDERS / THE INTERNATIONAL SCHOOL CONFERENCE (ISC) ,
2016.04.18-21, MOSCOW(russia)

Yagishita N, Aratani S, Fujita H, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T.
The role of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in bone destruction of rheumatoid arthritis
第58回日本リウマチ学会総会・学術集会
2014年4月 (東京)

〔図書〕(計1件)
八木下尚子 他、INTECH、
New Developments in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis、2017、162

〔その他〕
ホームページ等
<http://nanchiken.jp/byouin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木下 尚子 (YAGISHITA, Naoko)
聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：40367389

(2) 研究分担者

中島 利博 (NAKAJIMA, Toshihiro)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：90260752

荒谷 聡子 (ARATANI, Satoko)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：40387064

藤田 英俊 (HUJITA, Hidetoshi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：90571802