

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：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462309

研究課題名(和文) グリオスタチンは関節リウマチの新規治療ターゲットとなりうる

研究課題名(英文) Gliostatin as a novel therapeutic target for rheumatoid arthritis

研究代表者

永谷 祐子 (NAGAYA, Yuko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90291583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の治療はこの10年で劇的に進歩し強力かつ積極的な治療介入により、寛解をめざすことが可能になってきた。しかしいずれの薬物治療にも反応しない薬剤耐性難治性患者が存在する。我々は、RAの病態形成にグリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。本研究ではこのグリオスタチンが治療標的たりうることを明らかにした。RA由来滑膜細胞を用いて分子生物学的手法によりグリオスタチンによる関節破壊機序とその抑制機構を解析した。

研究成果の概要(英文)：Treatment of rheumatoid arthritis (RA) has advanced dramatically in the last decade, and it has become possible to aim for remission through strong treatment intervention such as biological and targeted anti-rheumatic drugs. However, there are drug-resistant patients who do not respond to any drug treatment. We have reported for the first time that gliostatin is closely involved in the pathogenesis of RA. In this study, we clarified that this gliostatin can be therapeutically targeted. The mechanism of joint destruction by gliostatin and its suppression mechanism were analyzed by molecular biological method using fibroblast-like synoviocytes derived from patients with RA

研究分野：整形外科

キーワード：関節リウマチ 滑膜細胞 グリオスタチン チミジンホスホリラーゼ マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

グリオスタチンは thymidine phosphorylase (TP) 活性をもち、*in vivo*、*in vitro* において血管新生作用を有している。またラット大脳皮質のグリア細胞に対しては増殖阻害作用を、皮質ニューロンに対しては神経突起伸長および生存維持活性をもっている。TP は thymidine を thymine と deoxyribose-1-phosphate へと代謝するがこの酵素活性のみからグリオスタチンのもつ多彩な生物学的作用を説明することはできない。申請者は、関節リウマチ (RA) の発症に、グリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。すなわち、RA 患者の関節液中には高濃度にグリオスタチンが存在し、血清グリオスタチン濃度は RA の病勢も反映している。ウサギを用いた *in vivo* の実験系にて、グリオスタチンの関節内投与により RA 様の慢性滑膜炎と関節軟骨破壊が惹起されることを確かめた。RA 由来の培養滑膜細胞をグリオスタチンにて刺激すると血管新生作用をもつ蛋白質の遺伝子群の発現が誘導され、血管新生抑制作用をもつ蛋白質の遺伝子群の発現が抑制された。また炎症性サイトカインネットワークの上流のサイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β によりグリオスタチンが誘導されることを明らかにした。さらにグリオスタチンは滑膜細胞に作用し、軟骨基質を破壊する matrix metalloproteinases (MMP)-3 の発現を増強することを報告した。以上のようにグリオスタチンは RA の関節破壊に強い影響を及ぼすことが示唆される。

2. 研究の目的

関節リウマチ (RA) の治療はこの 10 年で劇的に進歩した。早期診断し、発症早期からの強力かつ積極的な治療介入により、寛解をめざすことが可能になってきた。しかしいずれの薬物治療にも反応しない薬剤耐性難治性患

者や炎症が鎮静化されたにもかかわらず骨びらの進行がみられる患者が存在する。我々は、RA の病態形成にグリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。本研究ではこのグリオスタチンを標的とした RA の新規治療を開発し、関節破壊を防止する治療を確立することを最終目標としている。

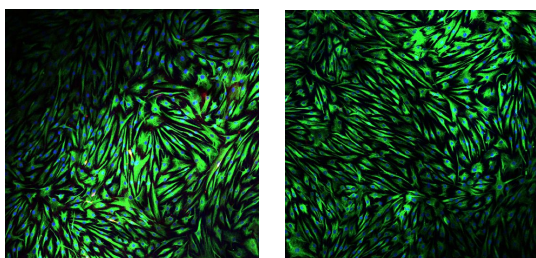
3. 研究の方法

RA 患者由来の滑膜培養細胞を用いて、グリオスタチン刺激応答と、グリオスタチン産生を指標とした TNF- α など炎症性サイトカインの誘導能を検討した。グリオスタチンには autocrine 作用があり、これにより RA 病態の慢性化、炎症の持続性が生じると考えられる。予備実験にて、この誘導は calcineurin inhibitor である FK506 によって抑制されることを確認している。グリオスタチンの promoter には Sp-1 結合部位が 7 つあり、Sp-1 阻害によるグリオスタチン産生阻害も試みた。グリオスタチンの promoter を組み込んだ luciferase assay vector を構築し、そこでグリオスタチン産生がいかなるシグナル伝達を介しているのかをさらに解析した。効率のよいグリオスタチン抑制因子を探索する。グリオスタチン RNA 干渉を用いた実験によりグリオスタチン産生抑制の波及効果を明らかにする。

4. 研究成果

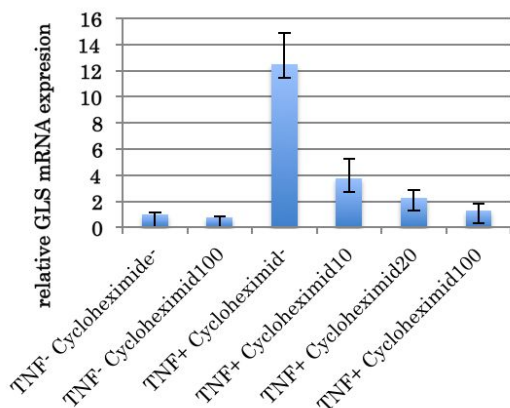
平成 26 年度には (1) 組換え型グリオスタチンの精製 (2) 滑膜培養細胞の継代培養 (3) 滑膜細胞でのグリオスタチン産生における NF- κ B シグナル伝達経路の検討の 3 点を目標とした。グリオスタチン cDNA を組み込んだ発現ベクター (pET-His) を *E. Coli* にトランスフェクトし、グリオスタチン組換え体を調製した。精製した組換え体は Affi-Prep Polymyxin B にて lipopolysaccharide を除去した。本研究に必要な充分量のグリオスタチンを精製することができた。人工膝関節置換術のさいに患者の承

諾を得て採取した滑膜を培養し、3代から6代継代した。この滑膜培養細胞を安定的に維持し、in vitroの実験系に供することができた。本細胞は抗vimentin抗体、抗CD14抗体、抗von Willbrand factor抗体による免疫細胞染色により99% 線維芽細胞であることを確認した(図1 a. 抗vimentin抗体、抗CD14抗体による二重免疫細胞染色、b. 抗vimentin抗体、抗von Willbrand factor抗体による二重免疫細胞染色)。



(図1. a) (図1. b)

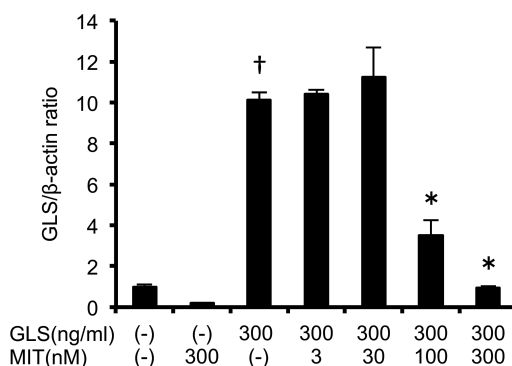
滑膜培養細胞におけるグリオスタチン産生はTNF- α によって誘導されることからNF- κ Bシグナル伝達経路の関与が示唆された。そこでNF- κ B阻害剤(dexamethasone、aspirinなど)を用いた実験系を構築した。グリオスタチン産生は抑制されたが、さらに詳細に検討するためNF- κ B阻害剤の選択を再考すべきと考えた。Cycloheximide前処理をした後TNF- α 刺激することによりグリオスタチン mRNAの誘導が完全に押さえられたことから、TNF- α によるグリオスタチン蛋白の誘導には何らかのタンパク質を介していると考えられた(図2)。



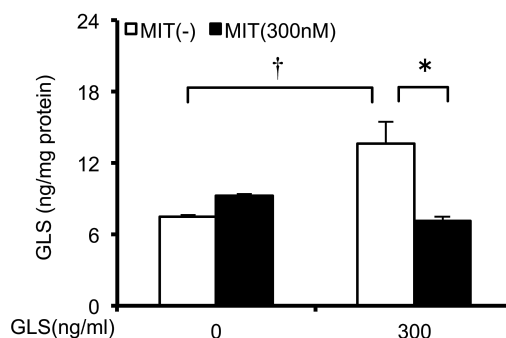
(図2)

平成27年度にはグリオスタチンのプロモーターを組み込んだluciferase assay vectorを作製し、炎症性サイトカイン刺激によるグリオスタチン発現の転写調節活性部位を特定した。予備実験ではSp-1結合部位が重要であることが示唆されている。Sp-1阻害剤の一つであるmithramycinによりluciferase活性が高度に減弱することが確認できた。

平成28年度には滑膜培養細胞ではグリオスタチンはautocrine作用を有しているが、mithramycinによってこのautocrine作用が著明に抑制された(図3a. mRNAレベル、図3b. タンパク質レベル)。

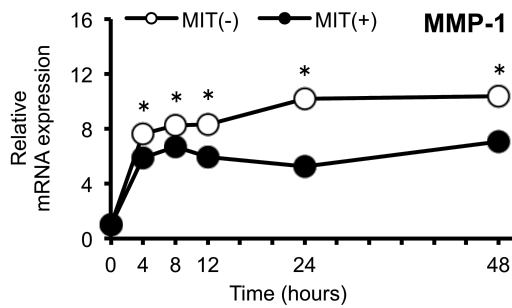


(図3a)

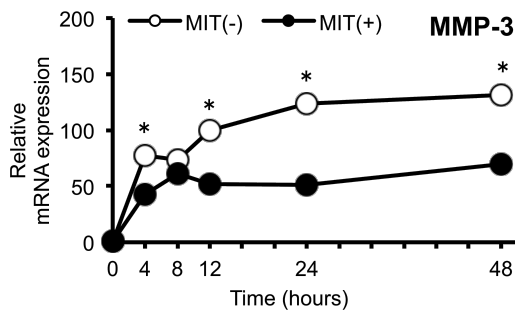


(図3b)

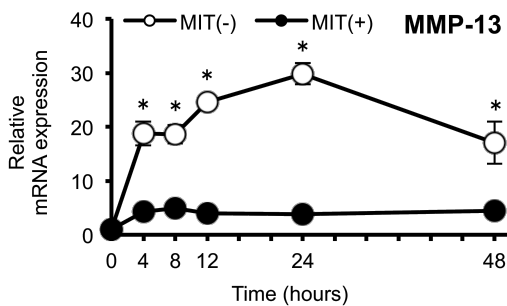
さらに興味深いことにグリオスタチンはMMP-3のみならず、MMP-1, 13の発現も誘導し、それらの誘導が全てmithramycinによって抑制されることが明らかとなった(図4a, b, c)。



(図4a)



(図4b)



(図4c)

グリオスタチンautocrine作用の連鎖を断ち切る因子の一つが明らかとなり、その因子によって、骨軟骨破壊に深い関連のあるMMP群が抑制された。生物学的製剤不応RA症例の病態抑制に迫れる可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Goto Y, Aoyama M, Sekiya T, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K, Asai K, Goto S. CXCR4⁺CD45⁻ cells are niche forming for osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 signaling pathways in bone marrow.

Stem Cells. 2016;34:2733-2743. (査読あり)
doi: 10.1002/stem.2440

2. Yoshida M, Goto H, Nozaki M, Nishimori Y, Takenaga T, Murase A, Nagaya Y, Iguchi H, Kobayashi M, Sugimoto K, Nishiyama T, Otsuka T. Quantitative analysis of attachment of the labrum to the glenoid fossa: a cadaveric study. J Orthop Sci. 2015;20:823-9. (査読あり) doi: 10.1007/s00776-015-0742-4.

3. Yoshida M, Goto H, Nozaki M, Nishimori Y, Takenaga T, Murase A, Nagaya Y, Iguchi H, Kobayashi M, Sugimoto K, Otsuka T. Postoperative evaluation of drill holes for arthroscopic Bankart repair with suture anchors by the use of computed tomography. J Orthop Sci. 2015 ;20:481-7. (査読あり) doi: 10.1007/s00776-015-0703-y

4. Nomura T, Aoyama M, Waguri-Nagaya Y, Goto Y, Suzuki M, Miyazawa K, Asai K, Goto S. Tumor necrosis factor stimulates osteoclastogenesis from human bone marrow cells under hypoxic conditions. Exp Cell Res 2014; 321: 167-177. (査読あり) doi: 10.1016/j.yexcr.2013.11.020.

5. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Nozaki M, Mizutani J, Goto H, Kobayashi M, Otsuka T. Progression of hip joint deformity during the management of pelvic insufficiency fracture in a patient with rheumatoid arthritis: a case report. J Spine 2014, 3:6. (査読あり)

<https://www.omicsgroup.org/journals/progression-of-hip-joint-deformity-during-the-management-of-pelvic-insufficiency-fracture-in-a-patient-with-rheumatoid-arthritis-a-case-report-2165-7939-3-188.php?aid=33355>

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 立松 尚衛, 永谷祐子, 川口洋平, 生田憲史, 小栗雄介, 小林正明, 野崎正浩, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. 関節リウマチ線維芽細

胞様滑膜細胞に置いてグリオスタチンによって誘導された MMPs は Sp 1 阻害剤によって抑制される. 第 31 回日本整形外科基礎学術集会 2016.10.13-14. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

2. 川口洋平, 永谷祐子, 立松 尚衛, 小林正明, 後藤英之, 野崎正浩, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. グリオスタチン発現抑制はリウマチ滑膜細胞に対する JAK 阻害剤の新規作用機序である. 第 31 回日本整形外科基礎学術集会. 2016.10.13-14. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

3. 川口洋平, 永谷祐子, 小林正明, 後藤英之, 野崎正浩, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. 関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞において TNF- α によるグリオスタチンの発現は JAK 阻害剤により抑制される. 第 160 回名古屋市立大学医学会例会. 2016.6.20. 名古屋市立大学大学院医学研究科研究棟 (愛知県・名古屋市)

4. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Ikuta K, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Sp1 inhibitor modulates the autocrine action of gliostatin/thymidine phosphorylase (GLS/TYMP) in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016). 2016.6.8-11. ExCel London. London (United Kingdom)

5. Ikuta K, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Sp1 interference prevents joint destruction of RA through inhibitory effects of gliostatin and matrix metalloproteinase-3. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016). 2016.6.8-11. ExCel London. London (United Kingdom)

6. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The JAK inhibitor

(Tofacitinib) inhibits TNF-induced gliostatin/thymidine phosphorylase expression in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016). 2016.6.8-11. ExCel London. London (United Kingdom)

7. 立松 尚衛, 永谷祐子, 川口 洋平, 井之上 浩一, 浅井清文, 大塚隆信. 関節リウマチ患者の血清

N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline(AcSDKP)濃度は治療の有効性を反映している. 第 89 回日本整形外科学会学術集会. 2016. 5.12-15. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

8. 川口洋平, 永谷祐子, 立松尚衛, 小林正明, 後藤英之, 野崎正浩, 小栗雄介, 浅井清文, 大塚隆信. トファシチニブ投与 RA 患者の臨床像と血清グリオスタチンへの影響の検討. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2016.4.21~2016.4.23. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

9. 川口洋平, 永谷祐子, 立松尚衛, 小林正明, 後藤英之, 野崎正浩, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. 関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞において TNF- α によるグリオスタチン発現は JAK 阻害剤により抑制される. 第 30 回日本整形外科基礎学術集会. 2015.10.22-23. 富山国際会議場 (富山県・富山市)

10. Ikuta K, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. A Role For P38 Mitogen-activated protein kinase (Mapk) in gliostatin production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2015). 2015.6.10-13. Fiera Roma. Roma (Italy)

11. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The inhibitory effect of synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs and steroids on

gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor production in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2015). 2015.6.10-13.

Fiera Roma. Roma (Italy)

12. 立松尚衛, 永谷祐子, 川口洋平, 菊池可絵, 青山峰芳, 井之上浩一, 浅井清文, 大塚隆信. 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法による関節リウマチ患者の血清中AcSDKPの検討. 第29回日本整形外科基礎学術集会. 2014.10.9-10. 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)

13. 永谷祐子, 小林正明, 後藤英之, 野崎正浩, 井口普敬, 大塚隆信. 生物学的製剤導入前後にリウマチ関節手術を考慮した症例の検討. 第123回中部日本整形外科災害外科学会. 2014.10-3,4. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

14. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Gliostatin regulates vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2014). 2014.6.11-14. Le Palais des Congres de Paris. Paris (France)

15. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kawaguchi Y, Kobayashi M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The importance of gliostatin as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2014). 2014.6.11-14. Le Palais des Congres de Paris. Paris (France)

6. 研究組織

(1)研究代表者

永谷 祐子 (NAGAYA, Yuko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90291583

(2)研究分担者

大塚 隆信 (OTSUKA, Takanobu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10185316

浅井 清文 (ASAI, Kiyofumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70212462

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

川口 洋平 (KAWAGUCHI, Yohei)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医
研究者番号：90766734

小栗 雄介 (OGURI, Yusuke)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医
研究者番号：80528969

立松 尚衛 (TATEMATSU, Naoe)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・大学院生