

20/229044A

厚生労働科学研究費補助金
難知性疾患克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

関節リウマチ発症因子シノビオリン
からみた慢性炎症機構の解析
に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 知雄

平成 25 年 (2013 年) 3 月

目 次

I.	総括研究報告書	1
	関節リウマチ発症因子シノビオリンからみた 慢性炎症機構の解析	
	研究代表者 佐藤 知雄 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 病因・病態解析部門	
II.	分担研究報告書	
	1. シノビオリン コンディショナルマウスの作成と その解析	7
	佐藤 知雄 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 講師	
	2. E3 ユビキチンリガーゼ シノビオリンの 基質の同定とその意義 ...	9
	中島 利博 東京医科大学医科学総合研究所 教授	
	3. 新たに同定されたシノビオリン阻害剤の コラーゲン関節炎における効果の検討	13
	荒谷 聡子 東京医科大学医科学総合研究所 助教	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV.	研究成果の刊行物・別刷	19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
総括研究報告書

関節リウマチ発症因子シノビオリンからみた慢性炎症機構の解析に関する研究

研究代表者 佐藤知雄
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 講師

研究要旨：関節リウマチ (RA) は Quality of life を脅かす代表的な疾患である。現在、抗 TNF α 抗体など生物学的製剤を用いた方法が最も有効とされているが、約 25 %はこの治療法に不応である。病因に基づいた科学的、かつ根治的な治療法確立のためにもRA の病因・病態形成の全貌を明らかにすることが求められている。これまでに我々は、滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、RAに関わる E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見した。シノビオリンが RA 滑膜細胞に過剰発現することにより、小胞体関連分解(ERAD) を活性化し、正確な折りたたみに失敗した不良タンパク質の再生機能を増加させる。そして、この hyper-ERAD という状態が不良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、結果として滑膜細胞を増殖させるという新たな病態論を展開した。近年、研究分担者の中島とスイスの研究グループとの共同研究により膜結合型基質 (ERAD-LM) と可溶性基質 (ERAD-LS) に大別される小胞体内基質の分解のうち、シノビオリンがERAD-LSで中心的役割を果たすことを明らかとした。すなわち、サイトカインとその受容体の関係でいえば、サイトカインの質の制御を司る E3 ユビキチン化酵素であることを証明した。これらの結果より、RA 滑膜細胞ではシノビオリンによって分泌タンパク質の産生が増加したサイトカインストームという状態が作り出され、自身が作り出したサイトカインストームによりさらに増殖の方向へ進むという仮説を立てた。本研究では、シノビオリンの有する ERAD-LS 機能により誘導される炎症の慢性化機構という仮説の検証を目的とした。その結果、①シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウス (syno cKO mice) のサイトカイン、小胞体関連因子の発現解析を行ったところ、末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節におけるサイトカインの発現については共通して炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。また、小胞体関連遺伝子については臓器ごとに動態が異なっていた。②約 200 万個の化合物ライブラリーよりシノビオリンの自己ユビキチン化活性を指標としたスクリーニングにより 2 種類の阻害活性を有する化合物が得られた。これらの化合物は HeLa 細胞に比べ、RA 滑膜細胞の増殖をより強力に抑えることが明らかとなった。さらに、コラーゲン関節炎に対しても関節炎スコアの制御が可能であった。これまでのヘテロ欠損体を用いた研究成果 (J. Biol. Chem. 2005) に加え、新規選択的 E3 ユビキチン化阻害剤を用いることでシノビオリンが RA の病態・治療に重要な標的分子であることのPOCができた。今年度は、cKO マウスの作出も完遂し、その完全欠失体を用いた検討においても RA の慢性炎症に深く関わることが証明された。これらの発見は単に科学的な重要性を示すのみならず、今後の創薬開発に大きな役割をなすことが期待される。今後、上記のシステムを用いた候補化合物の至適化を進め、RA のみならず希少性間質性肺炎の治療にも一日も早く展開したい。

研究分担者

中島 利博
東京医科大学医科学総合研究所 教授

荒谷 聡子
東京医科大学医科学総合研究所 助教

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は Quality of life を脅かす代表的な疾患である。現在、抗 TNF α 抗体など生物学的製剤を用いた方法が最も有効とされているが、約 25 % はこの治療法に不応である。病因に基づいた科学的、かつ根治的な治療法確立のためにも RA の病因・病態形成の全貌を明らかにすることが求められている。その病態に関しては、免疫応答異常、滑膜細胞の過剰増殖、骨・軟骨破壊、線維化などの病的なプロセスが相互作用し時空間的に多様な病態を呈しながら症状が進行することが知られている。これまでに我々は、このうち滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、RA に関わる E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見した (Gene & Deve 2003)。シノビオリンが RA 滑膜細胞に過剰発現することにより、小胞体関連分解(ERAD) を活性化し、正確な折りたたみに失敗した不良品タンパク質の再生機能を増加させる。そして、この hyper-ERAD という状態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、結果として滑膜細胞を増殖させるという新たな病態論を展開した (Nature Rev. Rheum 2008)。近年、研究分担者の中島とスイスの研究グループとの共同研究により膜結合型基質 (ERA D-LM) と可溶型基質 (ERAD-LS) に大別される小胞体内基質の分解のうち、シノビオリンが ERAD-LS で中心的役割を果たすことを明らかとした (J. Cell. Biol 2010)。すなわち、サイトカインとその受容体の関係でいえば、サイトカインの質の制御を司る E3 ユビキチン化酵素であることを証明した。これらの結果より、RA 滑膜細胞ではシノビオリンによって分泌タンパク質の産生が増加したサイトカインストームという状態が作り出され、自身が作り出したサイトカインストームによりさらに増殖の方向へ進むという仮説を立てた。本研究では、シノビオリンの有する ERAD-LS 機能により誘導される炎症の慢性化機構という仮説の検証を目的とする。

B. 研究方法

①シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウス (syno cKO mice) のサイトカイン、小胞体関連因子の発現解析
遺伝子改変動物を用いた解析により、すでに、シノビオリンの古典的ノックアウトマウスが ERAD の E3 ユビキチンリガーゼとしては稀有 (唯一) な胎生致死を呈し、その表現型が ERAD シグナルの全般的調節因子である XBP-1 の KO マウスと酷似していることは報告していた (J. Biol Chem. 2005)。そこで、コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作出し成獣でのシノビオリンの生体機能解析を行った (論文投稿中)。本研究では、サイトカインの主要な標的、ないしは産生臓器である末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節におけるサイトカイン、小胞体関連遺伝子の網羅的解析を行った。

②シノビオリン阻害剤による本研究の基本概念の proof of concept (POC)
次に、シノビオリンと RA との関連性、さらにシノビオリンが創薬標的であるかを検証するために、high through put screening により得られた構造の異なる二種類のシノビオリン阻害剤 (LS-101、LS-102) を用い、以下の実験を行った。

- 1) in vitro シノビオリン阻害活性の定量:我々が開発したシノビオリンの E3 ユビキチン化活性定量法に基づき 50%抑制濃度 (IC50 %) を定量した。
- 2) RA 滑膜細胞の増殖活性:患者より得られた RA 滑膜細胞にそれぞれの薬剤を添加し、24 時間後の IC50 % を測定した。
- 3) RA 滑膜細胞のサイトカイン分泌能:ELISA 法により定量した。
- 4) コラーゲン関節炎の抑制効果:常法に従い II 型コラーゲンを免疫し、同時に 1.3mg/kg、ならびに 4.0mg/kg の薬剤を連日、腹腔投与し二度目の免疫後、21 日目まで関節炎スコアを計測した。

③変異型 surfactant protein C (SP-C) による小胞体ストレスとシノビオリンの関連性の検討

SP-C 遺伝子のエクソン 4 を中心とした領域は変異のホットスポットの一つであり、かつ先天的SP-C の遺伝子変異により出生直後からの重篤な間質性肺炎が生じることが知られている。これまでの研究により SP-C 変異タンパク質が小胞体ストレスを介して線維化・慢性炎症を引き起こしていることが示唆されていた。一方、我々はシノビオリンが線維化の病態に深くかかわることを証明していた(PLoS One 2010)。そこで、われわれはSP-C変異タンパク質がシノビオリンを介してその病態を形成しているのでは仮定した。その検証には

- 1) シノビオリンプロモータを用いたルシフェラーゼアッセイ、real time PCR
- 2) SP-C 変異タンパク質によるコラーゲン分泌亢進へのシノビオリン siRNA の効果判定
- 3) 2) に対する LS-102 の効果判定を用いた。

患者より採取した検体の使用は、聖マリアンナ医科大学・生命倫理委員会（承認番号：443）、東京医科大学・医学倫理委員会（承認番号1497）によってすでに承認を受けているものであり、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り人間の尊厳を尊重して研究を実施した。検体は同委員会に承認を受けた書面によるインフォームドコンセントを得たうえで被験者の安全性を配慮して採取し、連結不可能匿名化した後に使用した。

C. 研究結果

①シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウス (syno cKO mice) のサイトカイン、小胞体関連因子の発現解析
末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節におけるサイトカインの発現については共通して炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。また、小胞体関連遺伝子に

ついては臓器ごとに動態が異なっていた。

②シノビオリン阻害剤による本研究の基本概念の proof of concept (POC)

約 200 万個の化合物ライブラリーよりシノビオリンの自己ユビキチン化活性を指標としたスクリーニングにより 2 種類の阻害活性を有する化合物が得られた (図 1)。これらの、化合物は HeLa 細胞に比べ、RA 滑膜細胞の増殖をより強力に抑えることが明らかとなった(図 2)。さらに、コラーゲン関節炎に対しても関節炎スコアの制御が可能であった (図3)。これらの結果は、学術論文 (Int. J. Mol. Med. 2012) として報告されたのみならず、知的財産権としてとして成立している。

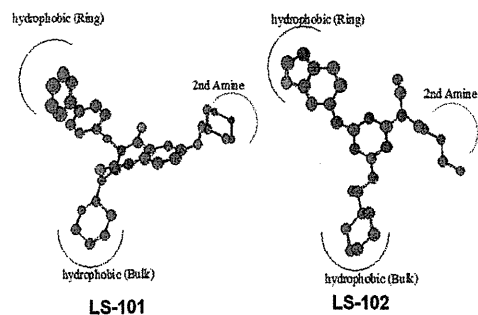


図 1 阻害剤の構造

シノビオリン抑制剤によるRA滑膜細胞増殖の選択的抑制効果

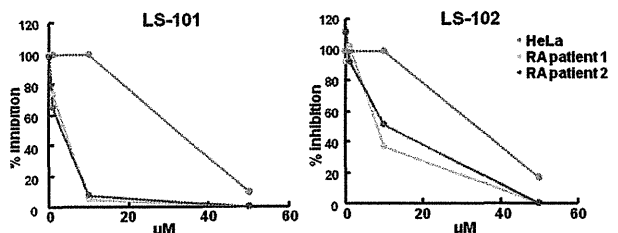


図 2 滑膜細胞増殖への影響

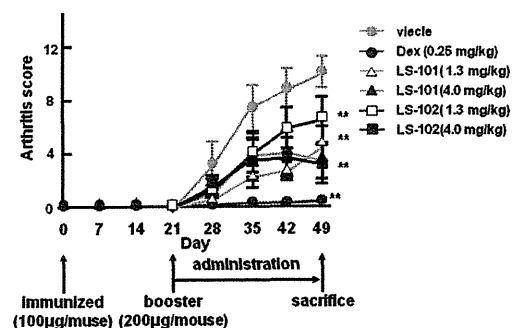


図 3 関節炎への効果

③変異型surfactant protein C(SP-C)による小胞体ストレスとシノビオリンの関連性の検討

変異型 SP-C の強発現によりシノビオリン プロモーター並びにその mRNA の発現が活性化された。さらに、コラーゲン分泌亢進はシノビオリン siRNA で制御され、LS-102 にて完全に抑制が可能であった (論文準備中。知財申請中)。

D. 考察

これまでのヘテロ欠損体を用いた研究成果 (J. Biol. Chem. 2005) に加え、新規選択的 E3 ユビキチン化阻害剤を用いることでシノビオリンが RA の病態・治療に重要な標的分子であることのPOCができた。今年度は、cKO マウスの作出も完遂し、その完全欠失体を用いた検討においても RA の慢性炎症に深く関わるということが証明された。これらの発見は単に科学的な重要性を示すのみならず、今後の創薬開発に大きな役割をなすことが期待される。すなわち、cKO マウス由来の細胞はタモキシフェンにより人為的にシノビオリン遺伝子を欠失させることができる。したがって、創薬開発の過程で問題となる off-target に関して容易に検証することが可能となった。

また、シノビオリンの制御は RA のみならず慢性炎症・線維化の関与する様々な病態に重要であることが予想されていたが、今年度、SP-C 変異遺伝子による重篤な間質性肺炎の治療に適用可能である可能性が示された。

今後、上記のシステムを用いた候補化合物の至適化を進め、RA のみならず希少性間質性肺炎の治療にも一日も早く展開したい。

E. 結論

RING 型 E3 ユビキチン化阻害剤を世界で初めて報告し、シノビオリンが RA 治療の創薬標的であることの POC に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T., Yamano Y., Tomaru U., Shimizu Y., Ando H., Okazaki T., Nagafuchi H., Shimizu J., Ozaki S., Miyazawa T., Yudoh K., Oka H., Suzuki N.

Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis.

Modern Rheumatology, in press, 2013.

- 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 modified ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity.

Modern Rheumatology, in press, 2012.

- 3) Yagishita N., Aratani S., Leach C., Amano T., Yamano Y., Nakatani K., Nishioka K. and Nakajima T.

RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis.

Int. J. Mol. Med, 30:1281-1286, 2012.

- 4) Tanabe C, Maeda T, Zou K, Liu J, Liu S, Nakajima T, Komano H.

The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid β production by targeting a negative regulator of γ -secretase, Rer1, for degradation.

J Biol Chem, 28: 287:44203-11, 2012.

2. 学会発表

- 1) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の進行度に関連するバイオマーカーの同定, 第17回日本神経感染症学会, 2012年10月20日, 京都.

- 2) 中島利博、荒谷聡子、臼井千恵、八木下尚子、西岡健弥、山野嘉久、藤田英俊、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、西岡久寿樹. 線維筋痛症研究プラットフォームの確立と疼痛シグナル解析モデルの構築, 日本線維筋痛症学会第4回学術集会, 2012年9月16日, 長崎.
- 3) 山野嘉久、渡邊修、荒谷聡子、八木下尚子、藤田英俊、臼井千恵、西岡健弥、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、中島利博、西岡久寿樹. 線維筋痛症患者における抗VGKC複合体抗体の測定, 日本線維筋痛症学会第4回学術集会, 2012年9月16日, 長崎.
- 4) 荒谷聡子、臼井千恵、八木下尚子、西岡健弥、山野嘉久、藤田英俊、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、西岡久寿樹、中島利博. 線維筋痛症における疼痛シグナル解析モデルの構築, 日本線維筋痛症学会第4回学術集会, 2012年9月15日, 長崎.
- 5) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久.

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の進行度に関連する新規バイオマーカーとしての髄液 CXCL10 の重要性, 第5回 HTLV-1 研究会・第1回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012年8月26日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 中島利博、荒谷聡子

発明者: 中島利博、瀬戸口靖弘、中島若巳、荒谷聡子、藤田英俊

発明の名称: 1, 3, 5-トリアジン誘導体を有する線維化予防又は治療剤

出願人: 東京医科大学

出願日: 2012年12月26日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチ発症因子シノビオリンからみた慢性炎症機構の解析
【シノビオリン コンディショナルマウスの作成とその解析】

研究代表者 佐藤 知雄
聖マリアンナ医科大学 難病医療研究センター

研究要旨：関節リウマチ (RA) は、種々の病的なプロセスが相互作用し時空間的に多様な病態を呈しながら症状が進行することが知られている。これまでに我々は、このうち滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見した (Gene&Deve 2003)。シノビオリンが RA 滑膜細胞に過剰発現することにより、小胞体関連分解 (ERAD) を活性化し、正確な折りたたみに失敗した不良品タンパク質の再生機能を増加させる。遺伝子改変動物を用いた解析を行ったところ、シノビオリン KO マウスは胎生致死であった (J. Biol. Chem 2005)。そこで本研究では成体で遺伝子欠損を引き起こすことが可能な Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いて、時期または組織特異的に遺伝子を欠損させるシノビオリンコンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、このマウスの解析により成獣でのシノビオリンの生体機能を明らかにすることを目的とした。その結果、末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節における炎症性サイトカインの発現については共通して抑制されていた。また、小胞体関連遺伝子については臓器ごとに動態が異なっていた。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は、免疫応答異常、滑膜細胞の過剰増殖、骨・軟骨破壊、線維化などの病的なプロセスが相互作用し時空間的に多様な病態を呈しながら症状が進行することが知られている。これまでに我々は、このうち滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、E3 ユビキチン化酵素シノビオリンを発見した (Gene&Deve 2003)。シノビオリンが RA 滑膜細胞に過剰発現することにより、小胞体関連分解 (ERAD) を活性化し、正確な折りたたみに失敗した不良品タンパク質の再生機能を増加させる。遺伝子改変動物を用いた解析を行ったところ、シノビオリン KO マウスは胎生致死であった (J. Biol. Chem 2005)。そこで本研究では成体で遺伝子欠損を引き起こすことが可能な Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いて、時期または組織特異的に遺伝子を欠損させるシノビオリンコンディ

ショナル KO (cKO) マウスを作製し、このマウスの解析により成獣でのシノビオリンの生体機能を明らかにすることを目的とする

B. 研究方法

①シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウス (syno cKO mice) の作出

CAGプロモーター制御下でCreとエストロゲン受容体 (ER) を発現するトランスジェニックマウス (CAG-CreER (+)) を用いて全身で時期特異的にシノビオリンを欠損させる。CAG-CreER (+) マウスでは、ERの合成リガンドであるタモキシフェンとERが結合するとCreERタンパク質の核移行が誘導される。核に移行したCreERは2つのloxP配列を認識し、その間にあるシノビオリン遺伝子を切り出すことによりシノビオリンを欠損させることができる。

具体的には、シノビオリンfloxedヘテロマウス (Synofl/+) とCAG-CreER (+) を交配させ、得られた産仔の尾組織を用いてPCR法により遺伝子型を同定し、CAG-CreER (+) /Synofl/+を得る。次に、CAG-CreER (+) /Synofl/+とシノビオリンfloxedホモマウス (Synofl/fl) を交配させ、得られた産仔の尾組織を用いてPCR法により遺伝子型を同定し、CAG-CreER (+) /Synofl/flを得る。このマウスが8週齢になった時点で、コーン油で20 mg/mLに調製したタモキシフェンを5 mg/40 g body weight腹腔内投与し、シノビオリンcKOマウスを作製する。なお比較対象としては、シノビオリンを欠損させないCAG-CreER (-) /Synofl/flを用いる。

②syno cKO miceのサイトカイン、小胞体関連因子の発現解析

サイトカインの主要な標的、ないしは産生臓器である末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節におけるサイトカイン、小胞体関連遺伝子の網羅的解析を行った。

なお、患者より採取した検体の使用は、聖マリアンナ医科大学・生命倫理委員会（承認番号：443）によってすでに承認を受けているものである。組換えDNA実験は、聖マリアンナ医科大学遺伝子組換え実験安全委員会（承認番号：0312、01008、08004、1004）によってすでに承認を受けているものである。

C. 研究結果

末梢血有核細胞、脾臓、肝臓、胸腺、関節における炎症性サイトカインの発現については共通して抑制されていた。また、小胞体関連遺伝子については臓器ごとに動態が異なっていた（論文投稿中）。

D. 考察

これまでのヘテロ欠損体を用いた研究成果 (J. Biol. Chem. 2005) に加え、今年度は、cKOマウスの作出も完遂し、その完全欠失体を用いた検討においてもRAの慢性炎症に深く関わることを証明された。これらの発見は単に科学的な重要性を示すのみならず、今後の創薬開発に大きな役割をなすことが期待される。すなわち、cKOマウス由来の細胞は

タモキシフェンにより人為的にシノビオリン遺伝子を欠失させることができる。したがって、創薬開発の過程で問題となる off-targetに関して容易に検証することが可能となった。

E. 結論

シノビオリンのcKO miceの作出に成功した。今後、成獣後の全身性のノックアウトだけではなく臓器特異的ノックアウトの作出と解析を行い、より詳細なシノビオリンの生体機能を明らかとしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T., Yamano Y., Tomaru U., Shimizu Y., Ando H., Okazaki T., Nagafuchi H., Shimizu J., Ozaki S., Miyazawa T., Yudoh K., Oka H., Suzuki N.

Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis.

Modern Rheumatology, in press, 2013.

2. 学会発表

- 1) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の進行度に関連するバイオマーカーの同定, 第17回日本神経感染症学会, 2012年10月20日, 京都.
- 2) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の進行度に関連する新規バイオマーカーとしての髄液 CXCL10 の重要性, 第5回 HTLV-1 研究会・第1回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012年8月26日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチ発症因子シノビオリンからみた慢性炎症機構の解析
【E3ユビキチンリガーゼ シノビオリンの基質の同定とその意義】

研究分担者 中島 利博
東京医科大学 医学総合研究所

研究要旨：我々は、滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、RAの発症分子となるE3ユビキチン化酵素シノビオリンを発見・命名した (Gene&Deve 2003)。私たちは、シノビオリンは小胞体関連分解 (ERAD) の中心的な E3 リガーゼとして、また、p53 などのユニークな基質の機能を介して細胞死の回避とサイトカイン・コラーゲンなどの分泌タンパク質を増加させることにより RA の病態に深く関わっていると考えている(Nature Rev. Rheum. 2008, EMBO. J. 2008, J. Cell. Biol 2010)。今後、シノビオリンの有する生理活性を明らかにし、かつその阻害剤の開発に必要な不可欠なポイントの一つが基質の同定であることは明白である。本研究ではシノビオリンの基質の同定とその生物学的意義を明らかにすることを目的とした。その結果、変異型 surfactant protein C (SP-C) がシノビオリンを介して線維化を起こしていた。

A. 研究目的

我々は、滑膜細胞の過剰増殖に着目して研究を進め、RAの発症分子となるE3ユビキチン化酵素シノビオリンを発見・命名した (Gene&Deve 2003)。私たちは、シノビオリンは小胞体関連分解 (ERAD) の中心的な E3 リガーゼとして、また、p53 などのユニークな基質の機能を介して細胞死の回避とサイトカイン・コラーゲンなどの分泌タンパク質を増加させることにより RA の病態に深く関わっていると考えている(Nature Rev. Rheum. 2008, EMBO. J. 2008, J. Cell. Biol 2010)。今後、シノビオリンの有する生理活性を明らかにし、かつその阻害剤の開発に必要な不可欠なポイントの一つが基質の同定であることは明白である。本研究ではシノビオリンの基質の同定とその生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

①変異型surfactant protein C (SP-C) による小胞体ストレスとシノビオリンの関連

性の検討

SP-C 遺伝子のエクソン 4 を中心とした領域は変異のホットスポットの一つであり、かつ先天的SP-C の遺伝子変異により出生直後からの重篤な間質性肺炎が生じることが知られている。これまでの研究により SP-C 変異タンパク質が小胞体ストレスを介して線維化・慢性炎症を引き起こしていることが示唆されていた。一方、我々はシノビオリンが線維化の病態に深くかかわることを証明していた(P LoS One 2010)。そこで、われわれはSP-C変異タンパク質がシノビオリンを介してその病態を形成しているのでは仮定した。その検証には

- 1) シノビオリンプロモータを用いたルシフェラーゼアッセイ、real time PCR
- 2) SP-C 変異タンパク質によるコラーゲン分泌亢進へのシノビオリン siRNA の効果判定
- 3) 2) に対する LS-102 の効果判定を用いた。

なお、患者より採取した検体の使用は、

東京医科大学・医学倫理委員会（承認番号1497）によってすでに承認を受けているものであり、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り人間の尊厳を尊重して研究を実施した。検体は同委員会に承認を受けた書面によるインフォームドコンセントを得たうえで被験者の安全性を配慮して採取し、連結不可能匿名化した後に使用した。また、実際の研究の実施にあたっては同委員会実施の「臨床研究に関する講習会」を受講し、臨床研究に関する倫理・その他臨床研究の実施に必要な知識についての講習・その他必要な教育を受けている（受講者番号：20081225015）。

組換えDNA実験は、東京医科大学（既作出11-10、12-2～18）によってすでに承認を受けているものであり、その実施にあたっては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」および大学の規定に則り、実験の安全かつ適切な実施を図った。

C. 研究結果

①変異型 surfactant protein C (SP-C) による小胞体ストレスとシノビオリンの関連性の検討

変異型 SP-C の強発現によりシノビオリン プロモーター並びにその mRNA の発現が活性化された。さらに、コラーゲン分泌亢進はシノビオリン siRNA で制御され、LS-102にて完全に抑制が可能であった（論文準備中。知財申請中）。

D. 考察

シノビオリンの制御は RA のみならず慢性炎症・線維化の関与する様々な病態に重要であることが予想されていたが、今年度、SP-C 変異遺伝子による重篤な間質性肺炎の治療に適用可能である可能性が示された。

今後、候補化合物の至適化を進め、RA のみならず希少性間質性肺炎の治療法の開発を急ぎたい。

E. 結論

変異型 SP-C による線維化にシノビオリンが関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.* 30: 1281-6, 2012.
- 2) Tanabe C, Maeda T, Zou K, Liu J, Liu S, Nakajima T, Komano H : The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid β production by targeting a negative regulator of γ -secretase, Rer1, for degradation. *J Biol Chem.* 28: 287(53):44203-11, 2012.
- 3) 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 modified ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity *Mod. Rheumatol.* 2012. in press. (オンラインではすでに閲覧可能)

2. 学会発表

- 1) Daisuke Hasegawa, Nobuyuki Matsumoto, Naoko Yagishita, Satoko Aratani, Yoshihisa Yamano, Kusuki Nishioka, Scott L. Friedman Toshihiro Nakajima, Fumio Itoh : E3 Ubiquitin Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrosis, The 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei, Taiwan, February 16-19, 2012.
- 2) Toshihiro Nakajima : Kyrgyz-Japanese collaboration in medicine, prospects of development., the jubilee international scientific-practical conference "Mirrakhimov's lectures", Kyrgyz Republic, March 27, 2012.
- 3) 中島利博 : 私たちの考える慢性疼痛

- への包括的医療の理想郷とは、市民公開講座「現代の痛み・難病に対する最新の治療 ～変形性関節症、関節リウマチ、線維筋痛症について～」(2012年4月22日、高知)
- 4) Toshihiro Nakajima : ER stress signaling as a chronicity of inflammation, The 32nd Korean College of Rheumatology (KCR)Korean College of Rheumatology annual scientific meeting and 6th International symposium, the Sejong University Convention Center, Seoul, South Korea, May18-19, 2012.
 - 5) 島津央, 澁谷美雪, 上村致信, 中谷孝, 中島利博 : チーム治療における鑑別診断について, 第46回高知リウマチ研究会 (2012年6月15日、高知)
 - 6) 西森美佐子, 澁谷美雪, 上村致信, 中谷孝, 中島利博 : 線維筋痛症における関節超音波検査の有用性, 第46回高知リウマチ研究会 (2012年6月15日、高知)
 - 7) Toshihiro Nakajima, Naoko Yagishita, SatokoAratani, Hidetoshi Fujita, Kusuki Nishioka : What tells us from Post-neonatal knock out of synoviolin, Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics 2012, University Convention Center in Seoul, South Korea, July27, 2012.
 - 8) 中島利博 : リウマチ性疾患の現在—過去—未来への挑戦—基盤研究—起業・創薬—国際貢献—, 鹿児島大学講演会 (2012年8月27日、鹿児島)
 - 9) 中島利博, 荒谷聡子, 臼井千恵, 八木下尚子, 西岡健弥, 山野嘉久, 藤田英俊, 伊藤健司, 長田賢一, 中村郁朗, 岡寛, 西岡久寿樹 : 線維筋痛症研究プラットフォームの確率と疼痛シグナル解析モデルの構築, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月16日、長崎)
 - 10) 山野嘉久, 渡邊修, 荒谷聡子, 八木下尚子, 藤田英俊, 臼井千恵, 西岡健司, 伊藤健司, 長田賢一, 中村郁朗, 岡寛, 中島利博, 西岡久寿樹 : 線維筋痛症における抗 VGKC 複合抗体の測定, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月16日、長崎)
 - 11) 岡寛, 臼井千恵, 西岡健弥, 山野嘉久, 中村郁朗, 荒谷聡子, 中島利博, 西岡久寿樹 : 線維筋痛症におけるプレガバリンと CPK の上昇について - 臨床例からの解析, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月16日、長崎)
 - 12) 西森美佐子, 澁谷美雪, 上村到信, 中谷孝, 中島利博 : 線維筋痛症における関節超音波検査の有用性, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月16日、長崎)
 - 13) 薦田昭宏, 窪内郁恵, 澁谷美雪, 中谷孝, 中島利博 : 線維筋痛症の運動機能障害に対する理学療法について, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月15日、長崎)
 - 14) 荒谷聡子, 臼井千恵, 八木下尚子, 西岡健弥, 山野嘉久, 藤田英俊, 伊藤健司, 長田賢一, 中村郁朗, 岡寛, 西岡久寿樹, 中島利博 : 線維筋痛症における疼痛シグナル解析モデルの構築, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月15日 - 16日、長崎)
 - 15) 島津央, 澁谷美雪, 上村到信, 中谷孝, 中島利博 : チーム医療における線維筋痛所の鑑別診断, 日本線維筋痛症学会 第4回学術集会 (2012年9月15日 - 16日、長崎)
 - 16) Chiaki Tanabe, Tomoji Maeda, Kun Zou, Junjun Liu, Shuyu Liu, Toshihiro Nakajima, and Hiroto Komano : Synoviolin is involved in the ubiquitination of Rer1 and regulates the generation of amyloid beta, XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portoroz, Slovenia, September 22-26, 2012.
 - 17) 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の機能解析, 第170回東京医科大学医学会総会 (2012年11月17日、東京)
 - 18) 藤田英俊, 荒谷聡子, 中島利博 : Combination therapy of carbon-ion irradiation and dendritic cell immunotherapy in mouse lung metastatic model, 第170回東京医科大学医学会総会 (2012年11月17日、東京)
 - 19) 中島利博 : E3ユビキチン化酵素シノビオリンの機能解析, 第170回東京医科大学医学会総会 (2012年11月17日、東京)

20) 藤田英俊、荒谷聡子、中島利博 :
Combination therapy of carbon-ion
irradiation and dendritic cell
immunotherapy in mouse lung metastatic
model, 第170回東京医科大学医学会総
会 (2012年11月17日、東京)

発明の名称: 1, 3, 5-トリアジン誘導体
を有する線維化予防又は治療剤
出願人: 東京医科大学
出願日: 2012年12月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 中島利博

発明者: 中島利博、瀬戸口靖弘、中島若巳、
荒谷聡子、藤田英俊

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチ発症因子シノビオリンからみた慢性炎症機構の解析
【新たに同定されたシノビオリン阻害剤のコラーゲン関節炎における効果の検討】

研究分担者 荒谷 聡子
東京医科大学 医学総合研究所

研究要旨：関節リウマチをはじめとする種々の難治性疾患に対して複数の戦略的なアプローチを試みてきた。その過程で、E3 ユビキチンリガーゼであるシノビオリンを発見し報告した (Genes & Deve 2003)。同分子は関節リウマチ滑膜細胞に過剰発現し、同細胞の活性化と過増殖を引き起こし関節リウマチの病因となりうる可能性がある。さらに代表的な関節リウマチの先進医療である抗 TNF α 製剤の感受性をも左右することが報告された。そこで、シノビオリンの酵素活性阻害剤を探索し、得られた化合物の効果を検証した。その結果、約 200 万個の化合物ライブラリーよりシノビオリンの自己ユビキチン化活性を指標としたスクリーニングにより2種類の阻害活性を有する化合物が得られた。これらの、化合物は HeLa 細胞に比べ、RA 滑膜細胞の増殖をより強力に抑えることが明らかとなった。さらに、コラーゲン関節炎に対しても関節炎スコアの制御が可能であった。したがって、これまでのヘテロ欠損体を用いた研究成果 (J. Biol. Chem. 2005) に加え、新規選択的E3ユビキチン化阻害剤を用いることでシノビオリンがRAの病態・治療に重要な標的分子であることの、いわば proof of concept ができた。今後、これらの類縁化合物をスクリーニングし、より活性が強く、かつ安全性の高い化合物を同定することが必要となろう。

A. 研究目的

我々は関節リウマチをはじめとする種々の難治性疾患に対して複数の戦略的なアプローチを試みてきた。その過程で、E3 ユビキチンリガーゼであるシノビオリンを発見し報告した (Genes & Deve 2003)。同分子は関節リウマチ滑膜細胞に過剰発現し、同細胞の活性化と過増殖を引き起こし関節リウマチの病因となりうる可能性がある。さらに代表的な関節リウマチの先進医療である抗 TNF α 製剤の感受性をも左右することが報告された。そこで、シノビオリンの酵素活性阻害剤を探索し、得られた化合物の効果を検証する。

B. 研究方法

①シノビオリン阻害剤の同定とその薬理作用の検討

次に、シノビオリンとRAとの関連性、さらにシノビオリンが創薬標的であるかを検証するために、high through put screeningにより得られた構造の異なる二種類のシノビオリン阻害剤 (LS101、LS102) を用い、以下の実験を行った。

- 1) in vitro シノビオリン阻害活性の定量：我々が開発したシノビオリンの E3 ユビキチン化活性定量法に基づき50%抑制濃度 (IC₅₀ %)を定量した。
- 2) RA 滑膜細胞の増殖活性：患者より得られたRA滑膜細胞にそれぞれの薬剤を添加し、24 時間後の IC 50 % を測定した。
- 3) RA 滑膜細胞のサイトカイン分泌能：ELISA 法により定量した。
- 4) コラーゲン関節炎の抑制効果：常法に従い II 型コラーゲンを免疫し、同時に1.3 mg/kg、ならびに4.0 mg/k

gの薬剤を連日、腹腔投与し二度目の免疫後、21日目まで関節炎スコアを計測した。

なお、患者より採取した検体の使用は、東京医科大学・医学倫理委員会（承認番号1497）によってすでに承認を受けているものであり、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り人間の尊厳を尊重して研究を実施する。検体は同委員会に承認を受けた書面によるインフォームドコンセントを得たうえで被験者の安全性を配慮して採取し、連結不可能匿名化した後に使用した。また、組換えDNA実験は、東京医科大学（既作出11-10、12-2～18）によってすでに承認を受けているものである。動物実験の実施にあたっては、東京医科大学に動物実験計画を申請し、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」および大学の規定に則り、できる限り利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するとともに、できる限り動物に苦痛を与えない方法によって実施した。

C. 研究結果

①シノビオリン阻害剤の同定とその薬理作用の検討

約 200 万個の化合物ライブラリーよりシノビオリンの自己ユビキチン化活性を指標としたスクリーニングにより2種類の阻害活性を有する化合物が得られた。これらの、化合物は HeLa 細胞に比べ、RA 滑膜細胞の増殖をより強力に抑えることが明らかとなった。さらに、コラーゲン関節炎に対しても関節炎スコアの制御が可能であった。これらの結果は、学術論文 (Int. J. Mol. Med. 2012) として報告されたのみならず、知的財産権として成立している。

D. 考察

これまでのヘテロ欠損体を用いた研究成果 (J. Biol. Chem. 2005) に加え、新規選択的E3ユビキチン化阻害剤を用いるこ

とでシノビオリンがRAの病態・治療に重要な標的分子であることの、いわば proof of concept (POC) ができた。今後、これらの類縁化合物をスクリーニングし、より活性が強く、かつ安全性の高い化合物を同定することが必要となろう。

E. 結論

RING 型 E3 ユビキチン化阻害剤を世界で初めて報告し、シノビオリンが RA 治療の創薬標的であることの POC に成功した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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. 30: 1281-6, 2012.
- 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 modified ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity Mod. Rheumatol. 2012. in press. (オンラインではすでに閲覧可能)

2. 学会発表

- 1) Daisuke Hasegawa, Nobuyuki Matsumoto, Naoko Yagishita, Satoko Aratani, Yoshihisa Yamano, Kusuki Nishioka, Scott L. Friedman Toshihiro Nakajima, Fumio Itoh : E3 Ubiquitin Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrosis, The 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei, Taiwan, February 16-19, 2012.
- 2) Toshihiro Nakajima, Naoko Yagishita, Satoko Aratani, Hidetoshi Fujita, Kusuki Nishioka : What tells us from

Post-neonatal knock out of synoviolin, Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics 2012, University Convention Center in Seoul, South Korea, July27, 2012.

- 3) 中島利博、荒谷聡子、臼井千恵、八木下尚子、西岡健弥、山野嘉久、藤田英俊、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、西岡久寿樹：線維筋痛症研究プラットフォームの確率と疼痛シグナル解析モデルの構築，日本線維筋痛症学会 第 4 回学術集会（2012年9月16日、長崎）
- 4) 山野嘉久、渡邊修、荒谷聡子、八木下尚子、藤田英俊、臼井千恵、西岡健司、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、中島利博、西岡久寿樹：線維筋痛症における抗 VGKC 複合抗体の測定，日本線維筋痛症学会 第 4 回学術集会（2012年9月16日、長崎）
- 5) 岡寛、臼井千恵、西岡健弥、山野嘉久、中村郁朗、荒谷聡子、中島利博、西岡久寿樹：線維筋痛症におけるプレガバリンと CPK の上昇について - 臨床例からの解析，日本線維筋痛症学会 第 4 回学術集会（2012年9月16日、長崎）
- 6) 荒谷聡子、臼井千恵、八木下尚子、西岡健弥、山野嘉久、藤田英俊、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、岡寛、西岡久寿樹、中島利博：線維筋痛症における疼痛シグナル解析モデルの構築，日本線維筋痛症学会 第 4 回学術集会（2012年9月15日 - 16日、長崎）
- 7) 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の機能解析，第170回東京医科大学医学会総会（2012年11月17日、東京）
- 8) 藤田英俊、荒谷聡子、中島利博：Combination therapy of carbon-ion irradiation and dendritic cell immunotherapy in mouse lung metastatic model, 第170回東京医科大学医学会総会（2012年11月17日、東京）
- 9) 藤田英俊、荒谷聡子、中島利博：Combination therapy of carbon-ion irradiation and dendritic cell immunotherapy in mouse lung metastatic model, 第170回東京医科大学医学会総会（2012年11月17日、東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 荒谷聡子

発明者：中島利博、瀬戸口靖弘、中島若巳、荒谷聡子、藤田英俊

発明の名称：1, 3, 5-トリアジン誘導体を有する線維化予防又は治療剤

出願人：東京医科大学

出願日：2012年12月26日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato T., Yamano Y., Tomaru U., Shimizu Y., Ando H., Okazaki T., Nagafuchi H., Shimizu J., Ozaki S., Miyazawa T., Yudoh K., Oka H., Suzuki N.	Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis.	Modern Rheumatology		in press	2013 Epub ahead of print
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 modified ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity.	Modern Rheumatology		in press	2013 Epub ahead of print
Yagishita N., Aratani S., Leach C., Amano T., Yamano Y., Nakatani K., Nishioka K. and Nakajima T.	RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis.	Int. J. Mol. Med.	30	1281-1286	2012
Tanabe C., Maeda T., Zou K., Liu J., Liu S., Nakajima T., Komano H.	The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid β production by targeting a negative regulator of γ -secretase, Rer1, for degradation.	J Biol Chem	28: 287(53)	44203-44211	2012