

炎症性関節リウマチ滑膜細胞のシグナル伝達

森 宏樹, 中西 徹*

Signal Transduction of Inflammatory Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis

Hiroki MORI and Tohru NAKANISHI

*Molecular Biology and Molecular Diagnosis, Shujitsu University School of Pharmacy,
1-6-1 Nishigawara, Okayama City 703-8516, Japan*

(Received August 22, 2007)

Recent advances in post-genomic technology enable us to analyze gene expression and protein modification comprehensively in tissues and cells, resulting in new developments in the analysis of molecular events of diseases. We have been studying the pathogenic and progressive mechanisms of diseases from the aspect of signalling pathways of cells. Inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 produced from activated macrophages stimulate the overgrowth of synoviocytes and induce osteoclast differentiation in rheumatoid arthritis (RA). As a consequence, cartilage and bone destruction in joints is observed in RA patients. Recently, the pathogenic mechanisms are beginning to be discussed at the molecular level. For example, up-regulation of *synoviolin*, an ER-localizing E3 ubiquitin ligase, in synoviocytes is involved in RA because rheumatoid synoviocytes produce *synoviolin* and overexpression of human *synoviolin* in mice causes arthropathy. So far little is known about ligands inducing arthropathy and their receptors in the disease. We characterized rheumatoid synoviocytes by profiling gene expression with genome-wide DNA chips, and found that a cluster antigen is involved in the proteins up-regulated in rheumatoid synoviocytes. We have been analyzing the relationship between *synoviolin* expression and the activation of cluster antigen. The cluster antigen and its signal pathways could become a novel therapeutic target for RA. We discuss the possibility of direct induction of *synoviolin* expression via activation of signal pathways directed by the cluster antigen in RA synoviocytes.

Key words—rheumatoid arthritis; synoviocyte; *synoviolin*; DNA chip (DNA microarray); cluster antigen

1. はじめに

ゲノム情報を用いたポストゲノム技術の進展により、最近、組織・細胞内の遺伝子発現・タンパク質修飾などが網羅的に解析できるようになり、種々の病態の分子レベルでの解析に新しい展開がもたらされるようになった。さらにこれによって、疾病発症・進行機序を情報伝達系などを通じて議論できるようになった。その代表的な技術が DNA チップ (DNA マイクロアレイ) である。¹⁾ われわれは、これまでこの DNA チップを用いた滑膜線維芽細胞の遺伝子発現プロファイリング等より、関節リウマチの増殖滑膜線維芽細胞の特徴付けを行ってきた。関節リウマチでは TNF α や IL-1 などの炎症性サイト

カインの産生亢進により、滑膜線維芽細胞の活性化・異常増殖あるいは破骨細胞の分化誘導が起こる。またその結果、骨・関節破壊及び増殖滑膜の軟骨・骨への進入という主病態を生じる。こうした過程について分子レベルでの解析が進展しているが、まだ未解明の部分も多い。例えば、増殖滑膜では、小胞体に局在する E3 ユビキチンリガーゼであるシノビオリンの発現亢進が関節リウマチの発症に関係すると考えられているが、その病態における誘導性リガンドあるいはその受容体に関しての詳細は不明である。われわれは、DNA マイクロアレイを用いた滑膜細胞遺伝子発現プロファイリングにより見出した CCN ファミリー遺伝子群、特に Wnt-1 誘導分泌タンパク質 (Wnt-1-induced secreted protein: WISP) 1-3 が関節リウマチ滑膜細胞で組織化学的に多く発現していることを見出した。さらにスプライシング変異体の解析等も行った結果、これらの遺伝子あるいは遺伝子産物が、関節リウマチの発症

就実大学薬学部薬学科分子生物臨床診断学 (〒703-8516 岡山市西川原 1-6-1)

*e-mail: torhoshi@shujitsu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S41 で発表したものを中心に記述したものである。

Table 1. Highly Expressed Genes in RA Synovial Cells

RA-I		RA-II	
A01g	Transforming protein rhoA	A01b	CD81
A07K	CDK inhibitor 1	A02d	annexin V
A07l	40S ribosomal protein S19	A09h	forkhead-related transcription factor FREAC-9
A09h	fte-140S ribosomal protein S3A	C02h	elastin precursor
A10h	IGFR II	C04g	annexin II
A14E	PDGFRa	D04g	glutamate dehydrogenase 1 precursor
A14l	RCL growth-related c-mycresponsive gene	D09i	amyloid A4 protein precursor (proteasexin-II)
C02i	calpain	E01h	GABAR β 3
C12d	ems-1 oncogene	E05m	CTGF-L (WISP-2)
D14j	RNA polymerase II coactivator p15	E07h	osteoprotegerin (OPG)
E08e	Gs α	E06k	natriuretic peptide precursor β
E12n	glutathione S-transferase Pi		
F02m	MMP 1		
F04m	MMP 3		
F05b	HSP27		
F08f	FGF7		

となんらかのかかわりを持つ可能性が示唆されたので以下に紹介する。また同様に DNA チップ解析によって、関節リウマチ滑膜細胞において、クラスター分化抗原とシノビオリン遺伝子の発現に関連があるという結果を得たので、この点についても、特にシグナル伝達の観点から紹介したいと思う。

2. 関節リウマチ (RA) 滑膜細胞の遺伝子発現プロファイリング²⁾

われわれは、まず変形性関節症 (OA) 及び RA 患者の関節から滑膜細胞を分離して培養後、RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を比較した。その結果、RA で発現亢進している遺伝子として、Table 1 のような遺伝子を抽出した。ここには既に RA のマーカーとして知られている遺伝子も存在するが、この中でわれわれは結合組織成長因子 (CTGF) 関連遺伝子に着目した。

CTGF は CCN ファミリー³⁾に属する成長因子で、349 アミノ酸からなる分子量 38kDa の分泌タンパク質である。分子内には 39 個のシステイン残基が存在する特徴的な構造を持っている。この CTGF はもともと抗 PDGF 抗体との交差性から発見されたタンパク質であるが、筆者 (中西) らは、ディファレンシャルディスプレイ (differential display) 法によって軟骨特異的遺伝子としてこの CTGF をクローニングした。⁴⁾ CTGF は、*in vitro* で軟骨細胞の成長分化を促進する作用を有し、⁵⁾ 血管新生や骨芽

細胞の増殖分化をも促進すると思われたが、そのトランスジェニックマウスは、矮小化、骨密度低下の表現型を示し、⁶⁾ この CTGF の *in vivo* での作用が複雑なものであることを示唆した。実際、CTGF は多くの因子と結合してその作用を調節する、いわゆるモジュレーターとして作用することが明らかとなっており、その作用は病的なものも含めて単純ではない。

Figure 1 には、この CTGF が属する CCN ファミリーのメンバーとその共通構造を示した。CCN とは、メンバーの Cyr61, CTGF, Nov の頭文字を取って命名されたもので、このファミリーには Cyr61, CTGF, Nov 及び WISP-1-3 の 6 つの因子が属している (これらは正式には CCN1-6 の名称で呼ぶことになっている)。これらの因子は、インスリン様成長因子結合タンパク質と相同な領域 (Fig. 1 では IGFBP)、フォンウィレブランド因子と相同な領域 (Fig. 1 では VWC)、トロンボスポンジンと相同な領域 (Fig. 1 では TSP1)、そしてシステインノット



中西 徹

就実大学薬学部教授。愛知県生まれ。東京大学理学部卒業。大阪大学細胞工学センター、京都大学ウイルス研究所を経て 1992 年岡山大学歯学部助手、1998 年同助教授、2001 年同大学院医学総合研究科助教授、2004 年より現職。2000 年仏国パストゥール研究所客員研究員、日本パストゥール協会会員。

The CCN Family

Connective tissue growth factor (CTGF)
Cysteine rich protein (Cyr61)
Nephroblastoma overexpressed gene (Nov)
Wnt-1 induced secreted protein (WISP-1 -3)



CCN1 ----- Cyr61/CEF10
CCN2 ----- CTGF/Fisp12
CCN3 ----- Nov
CCN4 ----- WISP1/Elm1
CCN5 ----- WISP2/rCop1
CCN6 ----- WISP3

Fig. 1. Schematic Representation of the CCN Family

IGFBP: insulin-like growth factor binding protein-like domain, VWC: von Willbrand factor-like domain, TSP1: thrombospondin-like domain, CT: cysteine knot containing family of growth regulators-like domain.

を含む C 末端領域 (Fig. 1 では CT) の 4 つのモジュールから構成されている。

CTGF と Cyr61 の間ではアミノ酸配列に約 50% の相同性がみられ、システイン残基の位置もよく保存されている。今回の DNA マイクロアレイ解析の結果では、このメンバーの中の WISP-2⁷⁾ が、RA 滑膜細胞で多く発現していた。実際、定量 PCR 法で調べた結果、WISP-1-3 は RA 滑膜細胞において、他の CCN ファミリーのメンバーよりも多く発現していることが分かった (Fig. 2)。また、免疫組織化学的手法で、RA 滑膜組織におけるこれらのタンパク質の分布を調べたところ、OA 滑膜組織と比較して、より多くのタンパク質の分布が見い出された。

WISP 遺伝子から転写される mRNA には様々な変異体が知られているが、このような遺伝子変異のあるものはリウマチ様の症状を引き起こすことが知られている。⁸⁾ 今回、RA と OA の滑膜細胞について、TSP と CT 領域を欠く変異体の発現を比較したところ、RA 滑膜細胞においてこの変異体の発現が増加していることが認められた (通常の RT-PCR による解析, data not shown)。これらの結果は WISP あるいはその変異体が RA の発症となんらかの関連を有することを示唆していると思われる。

最近 Notch シグナルが RA 滑膜細胞の活性化に

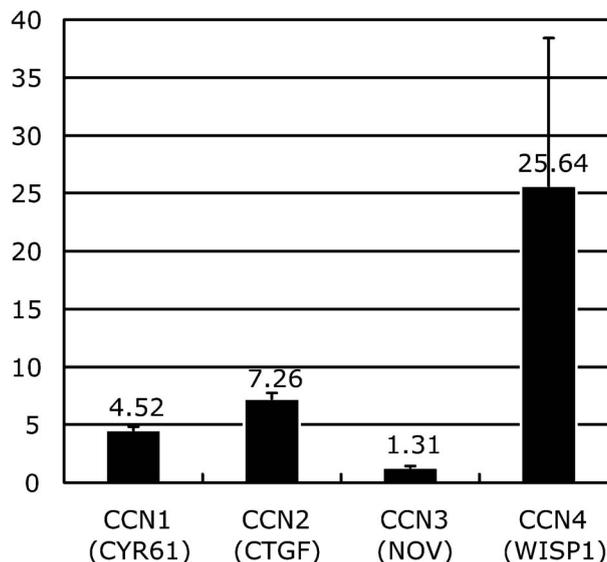


Fig. 2. Quantitative RT-PCR Analysis of the Expression of Four CCN Genes in OA and RA Synovial Cells

The ordinate shows relative expression level of each gene in RA synovocytes relative to the expression level in OA synovocytes.

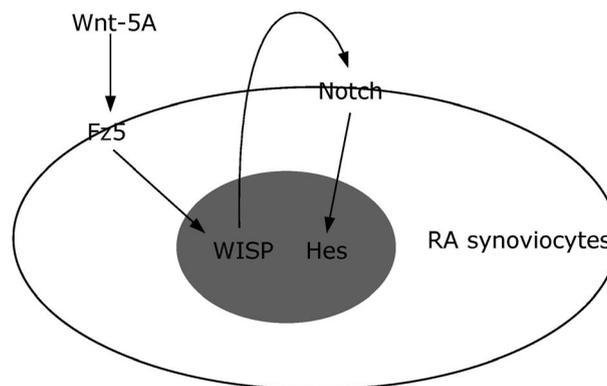


Fig. 3. Schematic Representation of Wnt-Notch Signaling Hypothesis Mediated by WISP-3 in Relation to the Abnormal Proliferation of RA Synovocytes

関係することが明らかになり、さらに CCN ファミリーのうち CTGF や Nov が Notch と結合することが示唆されたため、もし WISP タンパク質が Notch を認識できると仮定すれば、Fig. 3 のように、WISP が仲介役となって、この RA 滑膜細胞の活性化を進行させるという可能性を説明できることになる。この CCN ファミリーの細胞膜上受容体については明らかになっていないものもあり、滑膜細胞上の WISP 受容体の探索も含めて、現在、作用機序の詳細を検討中である。

3. 滑膜細胞上クラスター分化抗原の機能解析

上記の遺伝子発現プロファイリングの過程で、わ

れわれは Table 1 にあるように RA で活性化される遺伝子を多く見出したが、その中で最近、WISP とともに着目しているのがクラスター分化抗原である。

この分化抗原は 22-26 kDa の III 型膜貫通タンパク質であり、広く造血系、神経外胚葉系、間葉系に発現している。この分子は細胞増殖やシグナル伝達に関係すると考えられているが、B 細胞においては CD37 及び CD53 と複合体を形成し、あるいは CD19 の発現を制御するとともに CD19、CD21 などと会合し B 細胞表面に存在するといわれている。この分子の機能として最も病的に想定されてきたのは、慢性 C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus: HCV) が細胞に侵入する際の標的分子としての役割である。HCV エンベロープタンパクである E2 がこの分子の主要細胞外ループと結合することや、*in vivo* で HCV 感染を中和する抗体が *in vitro* でウイルスとこの分子との結合を阻害することなどが知られているが、*in vivo* でこの分子が実際に上記のような役割を果たしているかについては疑問の声もある。このほかにも、この分子が精子と卵の細胞膜融合に関与し得ることなども最近明らかになっている。

われわれは、全ゲノム型 DNA チップによる OA 滑膜細胞と RA 滑膜細胞の遺伝子発現比較において、RA で発現亢進する遺伝子の中にこの分子を見出したが、これまでの研究でも、腸管などの炎症部位でこの分子が発現亢進することや、抗体の投与がこのような炎症の病態を改善するなどのデータが得られており、リウマチ性疾患、特に RA において、この分子がその発症や病態に関与しているのではないかと現在仮定して研究を行っている。

ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 は軟組織の線維組織から分離された細胞株で、炎症性サイトカインや MMP を発現し、デキサメサゾン等に応答性を示すことから、炎症の応答解析のモデル系として用いられ、また正常滑膜細胞の代替としても利用される。今回、この SW982 細胞で目的の分子が発現していることを、まず RT-PCR やフローサイトメーターにて確認した上で、この細胞を応答解析のモデル系として用いることとした。すなわち、この細胞を抗体にて刺激して細胞内の応答を解析することで、この分子とリウマチ性疾患の関連を見出すことがで

きるかどうか調べたのである。

まず、この細胞を効果的に刺激できる条件について調べたのであるが、その指標として、細胞内の IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインの発現変動を調べた。まず、細胞培養系に直接、抗体を添加した場合と、培養器に抗体を固定化してから細胞を添加してクロスリンク刺激を行った場合々々について、刺激後、細胞から RNA を抽出し定量 PCR (RT-PCR) を実施して、IL-1 β および TNF α の発現量の変化を各条件で比較した。その結果、最も高い濃度の抗体でクロスリンク刺激した条件下で、IL-1 β 及び TNF α の発現が再現性を持って最も変化することが分かったため、この刺激条件を次の DNA チップ実験で用いることとした。

次に、上記で決定した刺激条件で SW982 細胞を抗体で刺激し、刺激後の細胞あるいは無刺激の細胞から RNA を抽出して、両細胞の間での遺伝子発現の変化をアジレント社ヒト全ゲノム型チップ (44000 遺伝子搭載) を用いて解析した。各種補正を行ったのち、発現を比較して 5 倍以上の発現変動を認めた遺伝子についてまとめたところ、抗体刺激で遺伝子発現が 5 倍以上上昇したものが 30 遺伝子、5 倍以上低下したものが 3 遺伝子であった。これらの結果から、SW982 細胞にこの分子を介した刺激が入ると多くのリウマチ関連タンパクや骨破壊関連の遺伝子が上昇することが分かった。このことから、リウマチ性疾患の発症あるいは関節リウマチにおける滑膜細胞の異常な増殖にこの分子を介したシグナルが係わっていることが示唆された。実際、Fig. 4 と Fig. 5 に示すように、滑膜細胞では多くの Notch シグナル関連分子、あるいは G タンパクシグナル関連分子 (いずれも赤印) が相互に関連して動くことが明らかになっており、現在、これらのシグナル経路とクラスター分化抗原のかかわりについて詳細な解析を行っているところである (赤印の分子はクラスター分化抗原と関連あるいは相互作用があると思われる分子)。また、RA 滑膜細胞の増殖を促進し、関節炎や RA 症状の発症の原因遺伝子として知られているシノビオリンとこの分子の関連についても現在研究を進めているところである。

謝辞 本研究を進めるに当たり、以下の先生方のほか、多くの方にお世話になりました。この場を

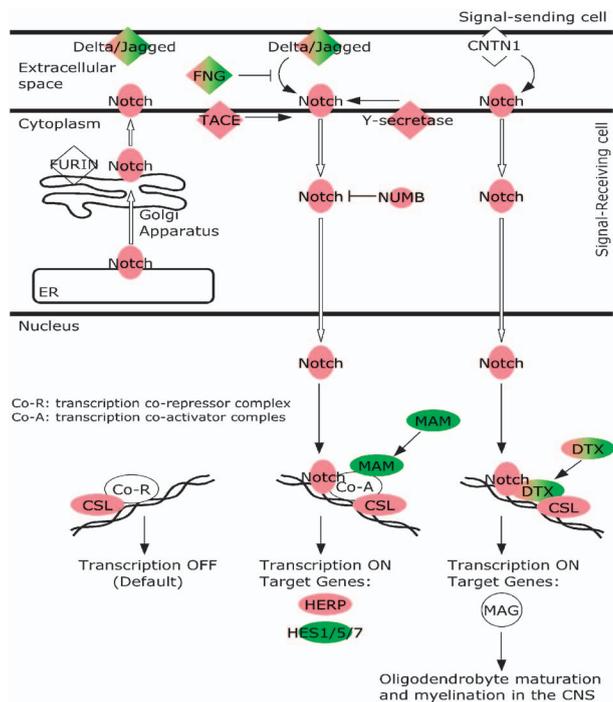


Fig. 4. Notch Signaling Pathways in Cytoplasm and Nucleus of Synovial Cells

Red/green colored molecules indicate cluster antigen-associated molecules. Ingenuity Pathways Analysis (Tomy Digital Biology Co., Ltd.) was used for this analysis.

借りて感謝いたします。聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター・中島利博教授，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・永井教之教授，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・尾崎敏文教授。

REFERENCES

- 1) Nakanishi T., Oka T., Akagi T., *Acta Med. Okayama*, **55**, 319–328 (2001).
- 2) Mori H., Nishida K., Ozaki T., Inoue H., Setsu K., Tsujigiwa H., Nagatsuka H., Gunduz M., Nakanishi T., *J. Hard Tissue Biol.*, **15**, 89–95 (2006).
- 3) Bork P., *FEBS Lett.*, **327**, 125–130 (1993).
- 4) Nakanishi T., Kimura Y., Tamura T., Ichikawa H., Yamaai Y., Sugimoto T., Takigawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 206–210 (1997).
- 5) Nakanishi T., Nishida T., Shimo T., Kobayashi K., Kubo T., Tamatani T., Tezuka K., Takigawa M., *Endocrinology.*, **141**, 264–273 (2000).

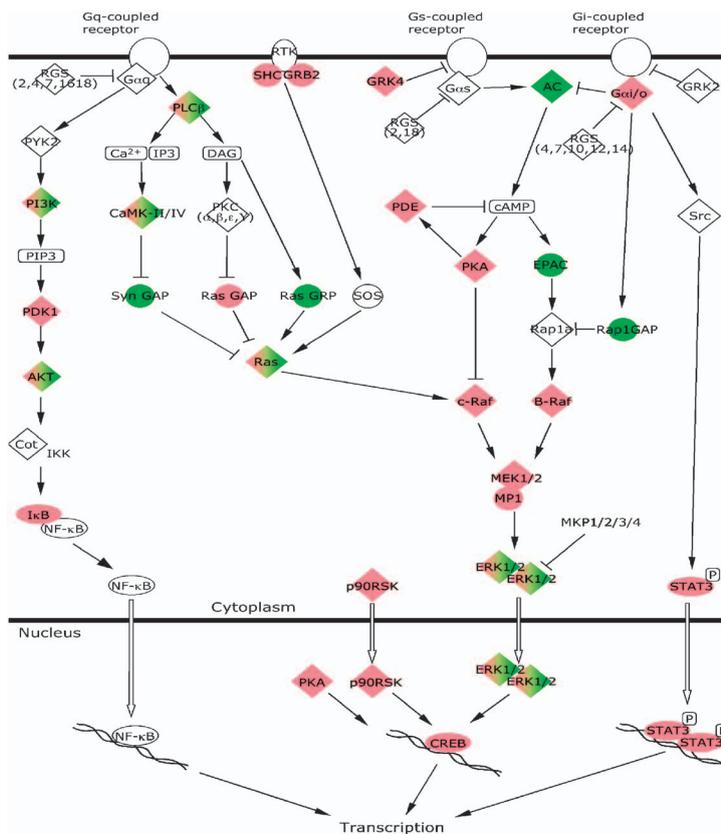


Fig. 5. Signaling Pathways of G-protein Coupled Receptor in Cytoplasm and Nucleus of Synovial Cells

Red/green colored molecules indicate cluster antigen-associated molecules. Ingenuity Pathways Analysis (Tomy Digital Biology Co., Ltd.) was used for this analysis.

- 6) Nakanishi T., Yamaai T., Asano M., Nawachi K., Suzuki M., Sugimoto T., Takigawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 678–681 (2001).
- 7) Zhang R., Averboukh L., Zhu W., Zhang H., Jo H., Dempsey P. J., Coffey R. J., Pardee A. B., Liang P., *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6131–6141 (1996).
- 8) Hurvitz J. R., Suwairi W. M., Van Hul W., El-Shanti H., Superti-Furga A., Roudier J., Holderbaum D., Pauli R. M., Herd J. K., Van Hul E. V., Rezai-Delui H., Legius E., Le Merrer M., Al-Alami J., Bahabri S. A., Warman M. L., *Nat. Genet.*, **23**, 94–98 (1999).