



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	軟骨細胞におけるTMEM147依存的炎症回路制御機構についての解析 [全文の要約]
Author(s)	太田, 光俊
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2443 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13429号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74334
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsutoshi_Ota_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

軟骨細胞における TMEM147 依存的炎症回路制御機構についての解析

(Studies on the mechanism for regulating the inflammation amplifier via
TMEM147 in chondrocytes)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

太 田 光 俊

学 位 論 文 (要約)

軟骨細胞における TMEM147 依存的炎症回路制御機構についての解析

(Studies on the mechanism for regulating the inflammation amplifier via
TMEM147 in chondrocytes)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

太 田 光 俊

【背景と目的】

軟骨は健常状態では極めて高い耐久性を持つが、自然治癒力については非常に乏しい組織である。そのため、一度軟骨の変性が生じると最終的には関節の機能不全を引き起こすことから、治療の難しい組織といえる。変形性関節症（OA）、関節リウマチ（RA）、そのいずれも慢性的な関節軟骨の傷害により関節機能不全を起こす疾患で未だ多くの患者の ADL を損なっているにも関わらず、十分な治療方法が確立しているとはいえない。軟骨組織の傷害は関節炎の発症と密接に関わるが、軟骨細胞自体が直接炎症を媒介するかどうかについては、十分に明らかとされていない。急性炎症は生体防御において重要であるが、慢性炎症となると代謝性疾患、神経変性疾患、関節炎を含めた自己免疫疾患など多くの問題を引き起こす。慢性炎症を引き起こす鍵となる分子メカニズムとして、我々は先に「炎症回路」を報告した。これは非免疫系細胞に存在し、NF- κ B 経路と STAT3 経路の同時活性化によって NF- κ B 経路が過剰に活性化され、種々の炎症性サイトカインや、ケモカイン、増殖因子を含む炎症回路標的遺伝子群が大量に発現することによって免疫細胞の浸潤が引き起こされ、恒常性の破綻から慢性炎症が引き起こされるというものである。炎症回路関連遺伝子についてはゲノムワイドスクリーニングによって 1000 以上を同定しており、その中で炎症回路を制御する分子として breakpoint cluster region (BCR) の新たな機能を明らかとしている。それは、TNF- α の刺激によって BCR が α subunit of casein kinase II (CK2 α) 及び、NF- κ B p65 と結合し、BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体が NF- κ B p65 の 529 番目セリンをリン酸化して、NF- κ B 経路の標的遺伝子が発現するというメカニズムである。本研究では炎症回路関連遺伝子の中から transmembrane protein 147 (TMEM147) に着目した。その理由として、TMEM147 が 7 回貫通型膜タンパクであるといわれていることから、将来の治療応用に際して関節内への中和抗体投与が有効である可能性があったため、また予備実験として行ったモデルマウス（OA 及び RA）の軟骨組織に対する免疫染色によって、TMEM147 が軟骨細胞で高発現していたためである。TMEM147 は Nicotinic-like protein-Nodal modulator の構成要素であること、M3 muscarinic acetylcholine receptor と結合して負に制御していること、酵母において Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 及び Glucagon-like peptide 1 receptor と結合していることが報告されているが、慢性炎症と TMEM147 との関係については知られていない。そこで我々は、炎症回路が軟骨細胞にも存在し、軟骨細胞自体が関節炎の発症及び増悪に重要な役割を果たしているとの仮説を立てた。本研究の目的は、軟骨細胞における炎症回路の存在を示すとともに、炎症回路における TMEM147 の機能を解明することである。

【方法と結果】

軟骨細胞に炎症回路が存在することを示すため、以下の実験を行った。まず、マウス前軟骨細胞株 (ATDC5), ヒト及びマウスの初代培養軟骨細胞に対して IL-6 (STAT3 経路) 及び IL-17 もしくは TNF- α (NF- κ B 経路) で刺激を与え, IL-6 の発現及び産生を qPCR 及び ELISA で測定したところ, IL-6 の相乗的な産生が示された。また, OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者, RA 患者の関節組織に対して免疫組織染色 (p-NF- κ B p65 及び p-STAT3) を行ったところ, 軟骨細胞にて NF- κ B 及び STAT3 の活性化が見られた。さらに, 軟骨細胞特異的炎症回路抑制 RA モデルマウス (Col2a1-STAT3^{fl/fl} F759 マウス) にて関節炎の臨床スコアが有意に抑制されたことから, 軟骨細胞に炎症回路が存在し, それは関節炎の病態に関与していることが示唆された。次に TMEM147 と関節炎との関連, 及び炎症回路における機能を解析するため, 以下の実験を行った。まず, OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者, RA 患者の関節組織に対して免疫組織染色 (TMEM147) を行ったところ, 軟骨細胞にて TMEM147 の発現増強が見られた。続けて, ATDC5 及び初代培養ヒト軟骨細胞に対して, shRNA レンチウイルスもしくは siRNA を用いて TMEM147 ノックダウン細胞を作出したところ, qPCR 及び ELISA にて炎症回路の抑制が示され, 特に NF- κ B 標的遺伝子の発現が抑えられることが明らかとなった。一方で, TMEM147 を HEK293T で強制発現させたところ, Luciferase Reporter Assay にて NF- κ B プロモーター活性及び IL-6 プロモーター活性の増強が示された。さらに, RA モデルマウスに対して TMEM147 shRNA レンチウイルスを関節内投与すると, その臨床スコアが有意に抑えられることが示された。続けて行った TMEM147 ノックダウン細胞及び TMEM147 強制発現 HEK293T 細胞を用いた実験では, TNF- α での刺激を与えつつ, 免疫組織染色, 免疫沈降法及び Western Blotting を行い, TMEM147 は NF- κ B p65 の核移行には関与せず, BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体形成の足場タンパクとして働いていることが示された。これらの結果から, TMEM147 は NF- κ B 経路を介して炎症回路を正に制御していることが示唆された。最後に TMEM147 が治療標的となりうるかを精査するため, TMEM147 の膜外成分に対する抗 TMEM147 抗体を作成して, 以下の実験を行った。ATDC5 に対して抗 TMEM147 抗体を添加したところ, qPCR 及び ELISA にて炎症回路の抑制が示された。さらに, RA モデルマウスに対して抗 TMEM147 抗体を関節内投与したところ, その臨床スコアが有意に抑制されたことから, 抗 TMEM147 抗体の関節腔内投与が, 関節炎に対する治療方法としての可能性を持つことが示された。

【考察】

今回我々は, 軟骨細胞に炎症回路が存在することを初めて示し, またその炎症回路が OA 及び RA の病態において重要な役割を果たしていることを明らかとした。軟骨細胞における炎症回路の活性化については, NF- κ B 及び STAT3 のリン酸化が OA 及

び RA のいずれにおいても確認され、軟骨細胞特異的炎症回路抑制 RA モデルマウスにおいて、その関節炎が有意に抑制されたことから、軟骨細胞が OA 及び RA における病態形成に新たな役割をもって関与していることを示すものである。さらに OA 及び RA において軟骨細胞で、炎症回路制御遺伝子の一つである TMEM147 の発現が増強し、RA モデルマウスに対する TMEM147 shRNA 関節内投与による TMEM147 ノックダウン実験及び抗 TMEM147 抗体関節内投与による TMEM147 抑制実験によってその臨床スコアが有意に抑制されたことから、軟骨細胞に存在する炎症回路分子制御機構において TMEM147 が大きな役割を持っていることを発見した。加えて TMEM147 の炎症回路における機能としては、BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体形成の足場タンパクとして働いていることが示され、TMEM147 は NF- κ B 経路を介して炎症回路を正に制御していることを明らかとした。

【結論】

本研究は、OA 及び RA の軟骨組織変性に関わる軟骨細胞の炎症回路に着目したものであると同時に、炎症回路の分子メカニズムについて深化させ TMEM147 の新たな機能を明らかとしたものである。本研究結果から、軟骨細胞に存在する TMEM147 を治療標的として炎症回路を制御することにより、OA 及び RA のいずれに対しても治療効果を得るという、新たな治療戦略を提案できる可能性がある。