



Title	オートファジーは滑膜線維芽細胞においてピメンチンのシトルリン化およびMHC class IIとの相互作用を促進する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	菅原, 恵理
Description	配架番号 : 2461
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13447号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74603
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Eri_Sugawara_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 菅 原 恵 理

学 位 論 文 題 名

オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチンのシトルリン化および
MHC class II との相互作用を促進する
(Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin and Its Interaction with Major Histocompatibility
Complex class II in Synovial Fibroblasts)

【背景と目的】 抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA)は関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)において特異的に検出される自己抗体である。ACPAはRAの発症に先立って検出され、ACPA陽性患者の関節予後は不良であることから、病原性を有する自己抗体として注目されている。ACPAの陽性率と喫煙、歯周病や human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitopeの存在がACPAと関連することが知られているが、その産生機序は明らかになっていない。マクロオートファジー（以下、オートファジー）はリソソームを分解の場とする細胞内の主要な分解システムである。オートファジーは細胞内浄化や飢餓適応を主な役割としているが、細胞内タンパクから MHC class II 分子と結合するペプチドを生成し抗原提示にも関与する。近年、オートファジーが細胞内タンパク質のシトルリン化を促進することが報告されており、オートファジーはシトルリン化、抗原提示と2つの機序を介し ACPAの産生に関与している可能性がある。滑膜線維芽細胞 (Synovial fibroblasts: SFs)は関節リウマチの病態において中心的役割を担っている。活性化し異常に増殖した SFs は炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinaseなどを分泌し、関節の炎症、破壊に寄与している。

本研究は ACPAの産生機序を解明することを目的とし、RAにおける SFsの抗原提示能とオートファジーの役割を検証した。

【対象と方法】 北海道大学病院で人工膝関節置換術を施行された RA患者の滑膜から SFsを分離・培養し4-8継代の細胞を用いた。SFsを interferon- γ (IFN- γ)で刺激し細胞表面における MHC class IIの主要なサブタイプである HLA-DR および T細胞の活性化に必要な共刺激分子である B7分子の発現をフローサイトメトリ法で確認した。ACPA陽性の患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体を一次抗体として SFsのライセートのウエスタンブロットを行い、SF内の ACPAの対応抗原の存在を確認した。この ACPAの対応抗原がシトルリン化ビメンチンであることを確認するために、抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降を行った。オートファジーが SFs細胞内のビメンチンのシトルリン化に及ぼす影響を確認す

るために、SFs を無血清培地による飢餓状態およびプロテアソーム阻害薬の MG132 で刺激しオートファジーを誘導し、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体、抗 LC3 抗体および抗 β -actin 抗体を用いたウエスタンブロットを行い densitometry でタンパク量を定量した。また、オートファジー阻害の影響を評価するため、3-methyladenine (3-MA) を添加した。SFs を IFN- γ 刺激下で飢餓刺激あるいは MG132 で刺激し、細胞内の HLA-DR、シトルリン、ビメンチンの発現を免疫細胞染色法で評価した。また、SFs のライセートで抗 HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降を行い、HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合を確認した。Proximity ligation assay を行い HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの相互作用を評価した。

【結果】 HLA-DR、B7-H1 および B7-DC は IFN- γ 刺激により SFs 表面に誘導され、B7-H3 は IFN- γ 刺激の有無に関わらず発現していた。SFs が抗原提示細胞としての機能を有していることが示唆された。ACPA 陽性患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体は 54kDa のタンパクを認識したが、ACPA 陰性患者血清はこれを認識しなかった。抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降法でこれがシトルリン化ビメンチンであることを確認した。飢餓刺激および MG132 による刺激により LC3-II/ β -actin 比が増加しており、オートファジーが亢進していることを確認した。また、それに伴いシトルリン/ビメンチン比が増加しビメンチンのシトルリン化が亢進した。3-MA によりオートファジー阻害を行うとこの効果は抑制された。免疫細胞染色で、IFN- γ と飢餓刺激あるいは MG132 刺激を併せて行くと、細胞内の HLA-DR およびシトルリンが増加し、これらの局在は一致していた。SFs ライセートでの抗 HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降により細胞内で HLA-DR とシトルリン化ビメンチンが結合していることを確認した。Proximity ligation assay でオートファジーが HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの相互作用を増強することを確認した。

【考察】 IFN- γ 刺激により SFs 細胞表面に MHC class II が誘導された。SFs における B7-H3 シグナルは、炎症性サイトカイン存在下で活性化した T 細胞に対しては共刺激シグナルとして作用することが報告されており、SFs が B7-H3 と活性化 T 細胞の相互作用を介して RA の病態に関与している可能性がある。B7-H1 と B7-DC は抑制性の作用を持つとの報告もあり、その詳細な機序についてはさらなる検討が必要である。オートファジー誘導により SFs 細胞内のビメンチンのシトルリン化が亢進することが示された。オートファゴソームはアルギニンをシトルリン化する酵素である peptidylarginine deiminase (PAD) の高い活性を有していることが報告されており、オートファジー誘導により、PAD 活性が亢進し、オートファゴソーム内でのビメンチンのシトルリン化が亢進したものと考えられた。HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの相互作用は IFN- γ 刺激下でオートファジーを誘導した際に増強され、RA の SFs で MHC class II によりシトルリン化ビメンチンが抗原提示されているという仮説を支持する結果であった。

【結論】 SFs は抗原提示細胞としての機能を有し、オートファジーが SFs の細胞内におけるビメンチンのシトルリン化を促進し、細胞内における MHC class II とシトルリン化ビメンチンの結合を促進する。