



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	菅原, 恵理
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：2461 他
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/2115/74613
Type	doctoral thesis
File Information	Eri_Sugawara_summary.pdf



学位論文 (要約)

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)**

2019 年 3 月

北海道大学

菅原 恵理

Eri Sugawara

学位論文 (要約)

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)**

2019 年 3 月

北海道大学

菅原 恵理

Eri Sugawara

【背景】関節リウマチ(rheumatoid arthritis : RA) は関節滑膜の炎症に始まり、滑膜の肥厚、絨毛組織の増殖により骨軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫疾患である。RA の発症には遺伝学的素因に加え、喫煙、歯周病、腸内細菌叢の異常などの環境要因、ヒストンのアセチル化、DNA のメチル化などのエピジェネティック修飾、タンパクのシトルリン化などの翻訳後修飾などが複雑に関与している。RA の炎症性に増殖した滑膜では滑膜の主要な構成細胞である滑膜線維芽細胞 (Synovial fibroblasts: SFs)の腫瘍様の増殖が見られる。炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinase (MMP)、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)を産生し軟骨破壊や、破骨細胞の分化および骨破壊を促進し、RA の病態形成において中心的役割を担っている。RA の治療はメトトレキサートなどの disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)に加え、上述の RA に関連するサイトカインや分子を治療標的とした TNF- α 阻害薬、IL-6 阻害薬、T 細胞選択的共刺激調節剤などの生物学的製剤が次々と開発され、劇的に進歩したが、依然として治療抵抗群が存在し、また、易感染性などの薬剤の副作用や費用などの観点からドラッグフリー寛解のニーズは高く、関節リウマチの病態の究明、さらに新たなアプローチによる治療が求められている。

抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA)は 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。遺伝学的にも ACPA 陽性 RA のみが human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitope alleles や PTPN22 遺伝子の一塩基多型と関連していることから、これらを異なる疾患概念とする考え方もある。マウスにおいてシトルリン化フィブリノゲンに対する自己抗体が関節炎を誘発するほか、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスではコラーゲンのシトルリン化により関節炎が増強されるなど、シトルリン化抗原に対する自己免疫が RA の発症と関連していることが示唆されている。シトルリン化は peptidylarginine deiminase (PAD)により媒介される翻訳後修飾であり陽性荷電を有するアルギニンが非荷電のシトルリンに変化し、水素結合や電荷が変化し、タンパク間の相互作用が変化する。ACPA の陽性率と喫煙、歯周病や HLA-DRB1 shared epitope の存在が ACPA と関連することが知られているが、その詳細な産生機序や関節炎発症の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。オートファジーは飢餓、小胞体ストレス、成長、病原体の感染や異常タンパクの蓄積への適応に必要な機能であり、細胞や臓器の多彩な機能の維持に必要な機能である。古典的に抗原提示細胞は Major histocompatibility complex class I (MHC class I) を介して細胞内の抗原を提示し、MHC class II を介して細胞外の抗原を提示すると考えられてきたが、近年、オートファジーを介して細胞内タンパクからペプチドが生成され MHC class II により抗原提示する経路があることが報告されている。また、オートファゴソームは PAD の活性が高くオートファジーはシトルリン化および抗原提示を介して ACPA 産生に

寄与している可能性がある。RA の滑膜線維芽細胞は変形性関節症 (osteoarthritis: OA) のそれと比較して高いオートファジー活性を有し、抗アポトーシス作用を有していることが報告されている。RA の関節内では発症早期から活性化した CD4 陽性 T 細胞がみられ病態形成に関与していると考えられている。CD4 陽性 T 細胞は MHC class II により提示された抗原を認識し活性化する。T 細胞の活性化および免疫寛容には T 細胞受容体と抗原の相互作用に加え、共刺激分子である B7 スーパーファミリーと B7 リガンドの相互作用が必要である(Sharpe and Freeman, 2002)。MHC class II 分子は樹状細胞、マクロファージ、B 細胞などの古典的抗原提示細胞に存在することが知られているが、炎症などにより活性化した状態ではすべての細胞においてその発現がみられる。SFs においても IFN- γ 刺激により活性化した状態では MHC class II 分子の発現がみられ、CD4 陽性 T 細胞を活性化することが報告されている。ACPA の主な対応抗原としてシトルリン化ビメンチンが知られているが、ビメンチンは SFs などの間葉系細胞に特異的に発現している

【目的】本研究では、RA における ACPA の産生機序を解明することを目的とし、RA の SFs における高いオートファジー活性、オートファジーによるシトルリン化および抗原提示に注目した。活性化した SFs が抗原提示細胞として機能し、オートファジーを介してシトルリン化ペプチドを抗原提示している可能性を考えた。

【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 刺激を併せて行うと、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】これまでに、IFN- γ 刺激により SFs において MHC class II の発現が誘導されることが報告されている。また、T 細胞の共刺激分子である B7 スーパーファミリー分子の B7-H3、B7-H1 や B7-DC は SFs に発現していることが報告されている。B7-H3 は 2002 年に B7 スーパーファミリー分子の一つとして同定され、T 細胞の増殖や細胞毒性、IFN- γ 産生に関与している一方で、抑制性の効果も報告されている。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し、サイトカイン未刺激 T 細胞に対しては抑制性に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 の滑膜炎の病態に関与していることが示唆されている。B7-H1 と B7-DC は programmed death-1 (PD-1) のリガンドとして同定された B7 スーパーファミリー分子である。滑膜由来の B7-H1 は活性化した T 細胞に対して抑制的に作用すると報告されている。RA の滑膜において B7-DC の発現がみられ、RA の病態形成に何らかの関与をしていることが示唆されているが、その詳細な機序についてはまだ明らかになっておらず、今後の検討が必要である。これらの複数の共刺激分子が作用し、T 細胞との相互作用を制御しているものと考えられた。本研究により、SFs が IFN- γ 刺激下で抗原提示細胞として機能し T 細胞と相互作用する可能性が示唆された。

オートファジーは飢餓状態での細胞の生存に関与し、プログラムされた細胞死であるアポトーシスと対照的な機能である。オートファジーはミトコンドリアの傷害に際し活性酸素や損傷した DNA を除去し、アポトーシスを抑制する。生体内ではこの両者がバランスをとり恒常性が維持されている。両者を制御する分子は相互に関連しており、アポトーシス制御分子の Bcl-2 は Beclin-1 を制御することでオートファジーを抑制している。また、caspase 依存性に Beclin-1 が分解され、オートファジーが抑制されプロアポトーシス因子の発現が誘導される。免疫細胞の生存と細胞死のバランスが、RA の病態形成に強く関与しており、RA においてアポトーシスは免疫細胞の活性化やサイトカイン産生を抑制し、抗炎症作用を持つ。RA の滑膜線維芽細胞は TNF- α などの炎症性サイトカインによりオートファジーとアポトーシス抵抗性が誘導され、高い増殖活性を有している。活動性の RA の滑膜ではアポトーシス活性が低下していることが報告されている。RA の滑膜線維芽細胞は OA と比較して小胞体ストレスによりオートファジーが強く誘導され、高いアポトーシス抵抗性を有し

ている。RA の滑膜においてはオートファジー活性とアポトーシス活性は負の相関を示しており、オートファジーがアポトーシス抵抗性に作用することが示唆されている。免疫組織学的および分子学的アプローチにより RA の滑膜において Beclin-1 や Atg5、LC3-II などのオートファジー関連分子の発現が OA の滑膜と比較して亢進していることが報告されている。また、コラーゲン誘発性関節炎マウスにおいてオートファジー阻害により関節炎が抑制され、PI3K/AKT 経路を介し滑膜線維芽細胞でアポトーシスが促進されることが報告され、オートファジーをターゲットにした治療の可能性も示唆されている。

申請者は RA の SFs には ACPA の対応抗原が存在し、それがシトルリン化ビメンチンであることを確認した。また、飢餓刺激やプロテアソーム阻害によるオートファジーの誘導に伴い SFs の細胞内のビメンチンのシトルリン化が亢進し、オートファジー阻害によりこの効果は抑制された。

シトルリン化はシトルリン化酵素である PAD により媒介される翻訳後修飾である。PAD のアイソタイプである PAD4 をコードする遺伝子の *PADI4* は RA の疾患感受性遺伝子の一つとして同定されており、過剰なシトルリン化が RA の病態形成に関与していることが示唆されている。また、PAD4 はシトルリン化抗原に対する自己抗体産生に関与しており、炎症性関節炎を誘発する。オートファゴソームは高い PAD 活性を有していることが報告されているが、その詳細な機序については未だ明らかになっていない。本研究におけるオートファジー誘導に伴うビメンチンのシトルリン化にも PAD の活性化が関与した可能性が高いと考えられ、今後 PAD 活性に関する検討も併せて行う必要がある。

ACPA はビメンチンを含むフィブリンやエノラーゼなど様々なタンパクのシトルリン化されたエピトープを認識するが、ACPA の中でも抗シトルリン化ビメンチン抗体は関節破壊と強い相関があることが知られている。シトルリン化ビメンチンは RA 感受性の HLA-DRB alleles である Shared Epitope を有する患者の T cell のエピトープとなり得ることが報告されており、シトルリン化ビメンチンが RA の主要な自己抗原であることが示唆されている。

また、本研究において RA の SFs の細胞内において、MHC class II とシトルリン化ビメンチンが結合していることが明らかにされた。また、MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用は IFN- γ 刺激下でオートファジー誘導を行うことにより増強された。

オートファジーは MHC class II を介した細胞内抗原提示に関与することが報告されており、近年オートファジー依存性の MHC class II を介した細胞内抗原提示を定義した “Type 2 cross-presentation” という概念が提唱されており、オートファジーの活性化と抗原提示の関連が注目されている。本研究ではオートファジー誘導により MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用が増強され、オートファジー誘導により細胞内抗原提示が促進されるという仮説を支持する結果であった。本研究では MHC class II の誘導に IFN- γ を用いたが、単一のサイトカイン刺激では生体内の炎症環境を十分に再現できていない可能性も考えられる。前述のごとく、RA の発症には複雑なサイトカインネットワークが関与して

いることを考慮し、複数のサイトカイン刺激を行い MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用におよぼす影響を今後評価すべきであると考え。また、本研究ではシトルリン化ビメンチンが MHC class II に load され実際に抗原提示されているかは確認できていない。今後はシトルリン化ビメンチン、MHC class II の強制発現系を作成し、シトルリン化ビメンチンが MHC class II に load され抗原提示されていることを示し、T 細胞と相互作用していることを確認することが研究課題である。

【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。