



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
Author(s)	太田, 光俊
Description	配架番号 : 2443
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13429号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13429
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77737
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsutoshi_Ota.pdf



学 位 論 文

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

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	8 頁
実験方法	11 頁
実験結果	20 頁
考察	51 頁
総括および結論	54 頁
謝辞	56 頁
利益相反	57 頁
引用文献	58 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に現在投稿中である.

Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Takuto Ohki, Ikuma Nakagawa, Jing-Jing Jiang, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, Tomohiro Onodera, Norimasa Iwasaki, Masaaki Murakami

TMEM147 in chondrocytes regulates NF- κ B-mediated inflammation in degenerative joint diseases including osteoarthritis and rheumatoid arthritis

Annals of the Rheumatic Diseases (2018 年 8 月 投稿済み)

本研究の一部は以下の書籍に発表した

Ota, M., D. Kamimura, I. Nakagawa, H. Higuchi, Y. Tanaka, M. Fujita, S. Hiratsuka, M. Okawara, K. Murakami, T. Atsumi, Y. Arima and M. Murakami. Control of chronic inflammation by the inflammation amplifier and gateway reflexes.
Advances in Medicine and Biology 104: Chapter 4, 65-86, 2016

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Mitsutoshi Ota, Jing-Jing Jiang, Ikuma Nakagawa, Haruka Higuchi, Munezumi Fujita, Shigeto Hiratsuka, Momoko Okawara, Yuki Tanaka, Yasunobu Arima, Toru Atsumi, Daisuke Kamimura, Tomohiro Onodera, Norimasa Iwasaki, Masaaki Murakami
NAI1 is important for NF- κ B activation in chondrocytes via the regulation of the inflammation amplifier
第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日 沖縄県宜野湾市
2. 太田光俊, 田中勇希, 蔣菁菁, 中川育磨, 樋口はるか, 藤田宗純, 有馬康伸, 熱海徹, 上村大輔, 小野寺智洋, 村上正晃, 岩崎倫政
軟骨細胞には NF- κ B Arthritis Inducer 1 を介する炎症回路活性化機構が存在する
第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年 10 月 26-27 日 沖縄県宜野湾市

3. Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, Tomohiro Onodera, Norimasa Iwasaki, Masaaki Murakami
NF- κ B Arthritis Inducer 1 (NAI1) in chondrocytes regulates joint inflammation via NF- κ B activation
第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年 12 月 12-14 日 宮城県仙台市
4. Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, Tomohiro Onodera, Masaaki Murakami, Norimasa Iwasaki
NAI1-dependent functional regulation of the inflammation amplifier in chondrocytes via NF- κ B activation
International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society 14th World Congress 2018
April 9-12, 2018 Macao, China
5. Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, Tomohiro Onodera, Masaaki Murakami, Norimasa Iwasaki
NF- κ B Arthritis Inducer 1-dependent functional regulation of the inflammation amplifier in chondrocytes via NF- κ B activation
Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018 May 10-13, 2018 New Orleans, USA

要旨

【背景と目的】 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最終的に関節の機能不全を起こす疾患である. 軟骨細胞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. 慢性炎症は, 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恒常性の破綻を引き起こすというものである. 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 以上が同定されており, 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. 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, マウス (OA モデル・RA モデル) 及びヒト (OA・RA) 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マウス (Col2a1-STAT3fl/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, マウス (OA モデル・RA モデル) 及びヒト (OA・RA)

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 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 及び IL-6 の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 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、TMEM147 ノックダウン細胞及び TMEM147 強制発現 HEK293T 細胞を用い、実験により 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 を行ったところ、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とから、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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ANOVA	Analysis of variance
BSA	Bovine serum albumin
BCR	breakpoint cluster region
CCL	C-C motif chemokine ligand
CLN	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8
Col2a1	Collagen type II alpha 1 chain
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immune-sorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
CK2 α	α subunit of casein kinase II
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLP1R	Glucagon-like peptide 1 receptor
GWAS	Genome-wide association study
HEPES	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
HBST	Hepes buffered Steinberg's solution
HE	Hematoxylin and eosin
HPRT	Hypoxanthine guanine phospho-ribosyl- transferase
I κ B	Inhibitor of kappa B
IKK	Inhibitor of kappa B kinase
IL	Interleukin
IB	Immunoblot
IP	Immunoprecipitation
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B kinase
N. S.	Not significant
OA	Osteoarthritis

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PEI	Polyethyleneimine
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RA	Rheumatoid arthritis
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
STAT3	Signal transducers and activator of transcription 3
TAE	Tris-acetate-EDTA
TMEM147	Transmembrane protein 147
TNF- α	Tumor necrosis factor α
WB	Western blotting

緒言

軟骨は健全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り、それ故一度軟骨の変性が生じると最終的には関節機能不全を引き起こす (Makris et al. 2015). 変形性関節症 (以下 OA) , 関節リウマチ (以下 RA) は、いずれも慢性的な関節軟骨の傷害によって関節機能不全を起こす疾患である. OA, RA に対するエピジェネティック研究により、いくつかの共通な遺伝子の活性化が示されており (Ospelt and Frank-Bertoncelj 2016), OA, RA 患者の関節内における炎症性サイトカインやケモカインも、一部共通していることが報告されている (Pap and Korb-Pap 2015). そして、その軟骨傷害を直接的に引き起こすものは、軟骨細胞より産生されたマトリックスメタロプロテイナーゼやアグリカナゼであることはよく知られている (Pap and Korb-Pap 2015). しかし、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.

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 (Hotamisligil 2006, Glass et al. 2010, Murakami et al. 2013). 我々は先に、慢性炎症を引き起こす鍵となる分子メカニズムとして、『炎症回路』を報告した (Ogura et al. 2008, Murakami et al. 2013, Atsumi et al. 2014). 本メカニズムは、非免疫系細胞において Nuclear factor-kappa B kinase (以下 NF- κ B) 経路と Signal transducers and activator of transcription 3 (以下 STAT3) 経路が同時に活性化することにより 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、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し、免疫細胞浸潤によって恒常性が破綻することにより慢性炎症が引き起こされるものであり、サイトカイン誘導性関節炎モデル、多発性硬化症モデル、移植片慢性拒絶モデル等を含む疾患モデルの発症に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている (図 1) (Ogura et al. 2008, Lee et al. 2012, Lee et al. 2013, Murakami et al. 2013, Atsumi et al. 2014, Harada et al. 2015, Meng et al. 2016, Atsumi et al. 2017, Ota et al. 2017).

また我々は、炎症回路標的分子が慢性炎症性疾患である RA や多発性硬化症の患者血清中で高値を示すことを発見しており (Lee et al. 2013, Murakami et al. 2013, Harada et al. 2015), 炎症回路を標的とした新規治療法の創出を目指している. RNAi を基盤としたゲノムワイドスクリーニングを行い、1000 を超える炎症回路関連遺伝子を同定した中から (Murakami et al. 2013), 炎症回路を制御する分子として breakpoint cluster region (以下 BCR) の機能を明らかとした (Meng et al. 2016). これまで BCR は慢性骨髄性白血病の原因としての BCR-ABL キメラタンパクがよく知られていた (Weisberg et al.

2007). 新たに発見したのは BCR が TNF- α の刺激によって活性化した α subunit of casein kinase II (以下 CK2 α) と結合し, BCR の 177 番目チロシンがリン酸化することにより NF- κ B p65 との結合部位が形成され, BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体となることによって NF- κ B p65 の 529 番目セリンがリン酸化され, 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 (Meng et al. 2016).

本研究では炎症回路関連遺伝子の中から transmembrane protein 147 (以下 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 (Dettmer et al. 2010) と言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 OA モデルマウス, RA モデルマウス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 Nicastrin-like protein-Nodal modulator の構成要素であること (Dettmer et al. 2010), M3 muscarinic acetylcholine receptor と結合して負に制御していること (Rosemond et al. 2011), 酵母において Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (以下 CLN8) 及び Glucagon-like peptide 1 receptor (以下 GLP1R) と結合していること (Huang et al. 2013, Passantino et al. 2013) 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, 本仮説を検証するために, 軟骨細胞における炎症回路の存在を示すこと, その分子制御機構を解明することを目的とした.

本研究において, 軟骨細胞の炎症回路が RA モデルのクリニカルスコアを増悪させることが明らかとなった. 続いて *in vitro* 研究では TMEM147 の抑制によって NF- κ B 標的遺伝子の発現が抑えられ, また *in vivo* 研究でも TMEM147 の抑制により RA モデルの臨床スコア増悪を抑制することが示された. 分子メカニズムとしては, TMEM147 は BCR/CK2 α 依存性 NF- κ B 活性化経路 (Meng et al. 2016) の足場タンパクとして働いていることが明らかとなった. これらの結果から軟骨細胞を起点とした炎症回路, 特に TMEM147 を介した炎症回路活性化機構は新たな治療標的となりうることを示されたのでここに報告する.

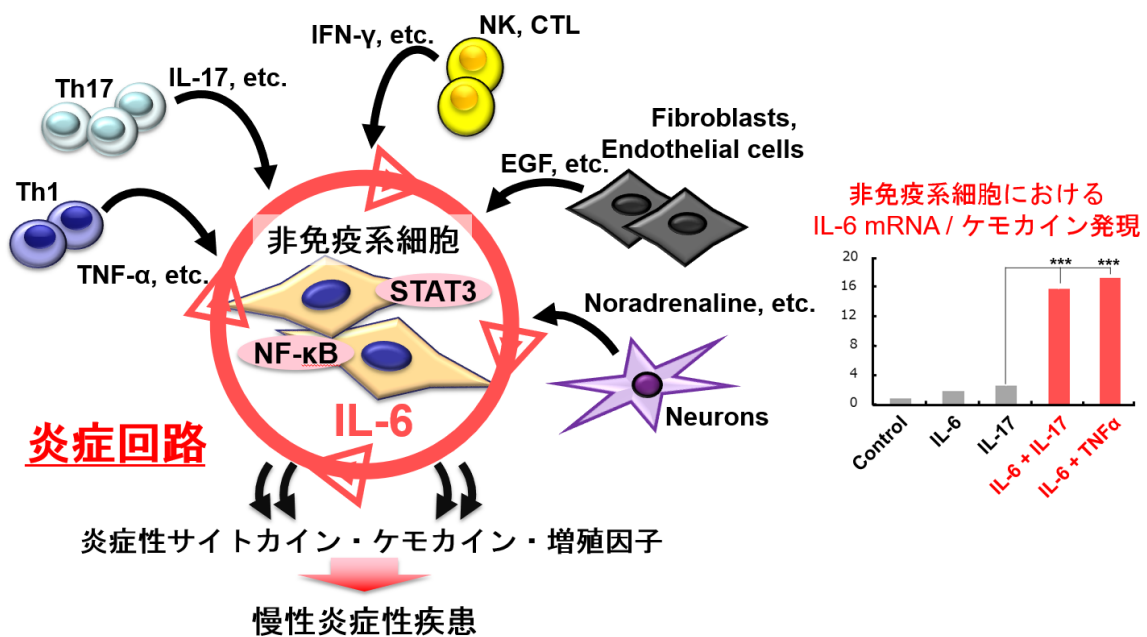


図 1. 炎症回路の模式図

非免疫系細胞において NF-κB と STAT3 の同時に活性化により NF-κB の過剰な活性化が引き起こされ、種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子が大量に発現することで恒常性が破綻し慢性炎症性疾患が引き起こされる。(Murakami et al. 2013), (Ogura et al. 2008), (Atsumi et al. 2014), (Lee et al. 2012), (Lee et al. 2013), (Harada et al. 2015), (Meng et al. 2016), (Atsumi et al. 2017), (Ota et al. 2017) より一部改変).

実験方法

1. マウス

野生型マウスは C57BL/6 マウスを Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。RA モデルマウスは、ヒト gp130 の 759 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 gp130 (F759) を全身で発現する F759 マウス (gp130^{F759/F759} ノックインマウス) を使用した (Atsumi et al. 2002)。軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した Col2a1-Cre マウスを、Akira Lab. (Osaka University, Japan) より供与された STAT3^{flx/flx} マウス (Takeda et al. 1998) を交配させることにより作出した Col2a1^{Cre}+STAT3^{fl/fl} を使用した。これらの実験動物は、北海道大学遺伝子病制御研究所において室温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。

2. 自然発症型 OA モデル, RA モデル

C57BL/6 マウスを 14 か月間飼育した age-associated OA モデル (Stoop et al. 1999) を自然発症型 OA モデルとした。F759 マウスを 5 か月間飼育した spontaneous RA model (Atsumi et al. 2002, Sawa et al. 2006) を自然発症型 RA モデルとした。これらのマウスより膝関節を摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定を行った。

3. サイトカイン誘導性関節炎モデル

6-8 週齢の F759 マウス足関節腔内にヒト IL-6 (100 ng, Toray Industries) とマウス IL-17A (100 ng, R&D Systems) を 3 日間連続投与したものをサイトカイン誘導性 RA モデルとし、コントロールとしては生理食塩水を投与した (Murakami et al. 2011)。またいくつかの実験では TMEM147 特異的 shRNA もしくはコントロールとしての scrambled sequence (Sigma-Aldrich) を搭載した shRNA レンチウイルス (3.6×10^5 TU) を Polybrene (40 μ g) と共に足関節腔内に 1 日間隔で 3 回投与した後、先のサイトカイン誘導性関節炎を惹起した (Murakami et al. 2011, Murakami et al. 2013, Harada et al. 2015, Meng et al. 2016, Atsumi et al. 2017)。またいくつかの実験では、先のサイトカイン誘導性関節炎におけるサイトカイン投与と同時に、抗 TMEM147 抗体 (2 μ g, Sigma-Aldrich) もしくはコントロールとしての irrelevant rabbit IgG 抗体 (2 μ g, Santa Cruz Biotechnology) を 3 日間連続投与した。

関節炎のスコアリングは足関節の可動域を指標として、0-3 点で評価した (0 点: 正常, 1 点: 軽度の可動域制限, 2 点: 中等度の可動域制限, 3 点: 重度の可動域制限) (Murakami et al. 2011)。

4. ヒト軟骨組織

臨床検体の採取，取扱いについて北海道大学医学部医の倫理委員会に申請し承認を得た（承認番号：自 15-0103）．同委員会の規定に沿って研究を実施した．OA 患者 5 例／RA 患者 6 例／コントロールとして多指症患者 5 例より手術時にそれぞれ関節軟骨を採取した．本研究に用いた検体の患者情報を示す（表 1）．

表 1. 患者情報

Control としての多指症が 5 例，OA が 5 例，RA が 6 例であった．

Information of patients.			
Diagnosis	Age	Sex	Affected side
コントロール (多指症)	2Y9M	F	Rt
	0Y11M	M	Rt
	0Y11M	M	Rt
	1Y5M	F	Lt
	1Y1M	M	Rt
OA	84Y	F	Lt
	75Y	F	Lt
	85Y	F	Rt
	53Y	F	Lt
	83Y	F	Rt
RA	78Y	F	Lt
	55Y	F	Rt
	63Y	M	Lt
	72Y	F	Rt
	82Y	F	Lt
	76Y	F	Lt

5. 組織染色

10%パラホルムアルデヒド固定を行った後 10%EDTA (pH7.5) で脱灰処理を施し，パラフィンに包埋したものを 5 μ m 厚で切り出してキシレンにより脱パラフィン処理を行い，アルコールにて脱水，水洗して HE 染色，Safranin O 染色を行った．免疫染色については，水洗後に抗原賦活化処理としてクエン酸ナトリウム (pH6.0) に浸して 10 分煮沸し，再度水洗して内在性酵素賦活化処理として 3%過酸化水素水に 5 分間浸した．ブロッッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector

Laboratories) を用いてプロトコール通りに行い、一次抗体 (抗リン酸化 p65 抗体, 抗リン酸化 STAT3 抗体, 抗 TMEM147 抗体), 二次抗体 (ビオチン標識抗 rabbit IgG モノクローナル抗体) を使用し, 発色基質として DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories) を用いた.

6. 細胞及び刺激条件

マウス前軟骨細胞株 ATDC5 は Riken Cell Bank (Ibaraki, Japan) より購入した.

初代培養マウス軟骨細胞は既報の通りに, 生後 5-6 日のマウスより分離培養した (Gosset et al. 2008).

初代培養ヒト軟骨細胞は Cell Applications Inc. (San Diego, CA, USA) より購入した.

TMEM147 shRAN ノックダウン ATDC5 は, Day0 で DMEM/F-12 (1:1, Wako) に 2 mM の L-Glutamine と 5% FBS を混ぜた培地に ATDC5 を懸濁したものを, 96 well plate に 1.0×10^3 個/well で播種し培養. Day 1 で培地を DMEM/F-12 (1:1, Wako) に 2 mM の L-Glutamine (Wako) と 5% FBS (Thermo Fisher) を混ぜた培地に目的遺伝子特異的 shRNA 含有レンチウイルス 1 μ L (TMEM147 shRNA: TRCN0000174842, nontarget shRNA: SHC002, Sigma-Aldrich) に Polybrene (8 μ L/mL) を加えたものに交換し培養. Day 2 で DMEM/F-12 (1:1, Wako) に 2 mM の L-Glutamine (Wako) と 5% FBS (Thermo Fisher) を混ぜた培地に puromycin (5 μ g/mL) を加えた培地 200 μ L に交換して培養した. puromycin による薬剤選択により生存した細胞を TMEM147 ノックダウン ATDC5 とし, qPCR にて TMEM147 のノックダウン効率を検証した.

TMEM147 siRNA ノックダウン初代培養ヒト軟骨細胞は, Day0 で初代培養ヒト軟骨細胞を 96 well plate に 7×10^3 個/well で播種し培養. Day 1 で Opti-MEM (18 μ L/well, Thermo Fisher) に siRNA (5 μ M) 0.5 μ L, Lipofectamine RNAiMAX (0.28 μ L/well, Thermo Fisher) を混ぜたものを, 先の初代培養ヒト軟骨細胞を培養している well に添加してトランスフェクションを行った. Day 2 で 180 μ L の DMEM (Wako) に 2 mM の L-Glutamine (Wako) と 10% FBS (Thermo Fisher) を混ぜた培地を追加して培養. Day 3 で細胞を回収し, qPCR に使用した. 使用した siRNA は human si-TMEM147 (s20403, Thermo Fisher), human si-nontarget (SIC-001, Sigma-Aldrich) である.

実験により, 以下のサイトカイン刺激を行った. 2 時間の血清飢餓処理の後, ヒト IL-6 (Toray Industries) 100 ng/mL 及び可溶性ヒト IL-6 受容体 (Toray Industries) 100 ng/mL, マウスもしくはヒト IL-17 (R&D Systems) 50 ng/mL, マウスもしくはヒト TNF- α (PeproTech) 50 ng/mL で刺激した.

7. プラスミド

Flag タグ融合 TMEM147 発現プラスミド DNA を、次の手順で作成した.

まず、96 well plate で培養した ATDC5 に対し SuperPrep Cell Lysis Kit for qPCR (TOYOBO) を用いることで total cellular RNA を回収した.

マウス TMEM147 をエンコードする cDNA を抽出増幅するため、先の total cellular RNA を用いて KOD FX (TOYOBO) の標準プロトコールで PCR を行った. その際使用したプライマーは表 2 のとおりである. TMEM147 エンコード cDNA を、2.5%アガロースゲルで電気泳動し抽出. これを制限酵素処理した (BamH I, Xho I, High buffer, TaKaRa). また pCMV-Tag2B ベクターも同様に制限酵素処理した. 処理した TMEM147 及び pCMV-Tag2B を Ligation high Ver 2 (TOYOBO) を用いて Ligation し、コンピテントセル (ECOS DH5 α , NIPPON GENE) に Transfection した後、カナマイシン含有 LB 培地に植え付け、37°Cで一晩培養した.

発生したコロニーを pick up して、カナマイシン含有 LB 培養液に懸濁し、再度 37°Cで一昼夜培養した.

GenEluteTM Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて、培養液から Flag タグ融合 TMEM147 発現プラスミド DNA を抽出した. なお、抽出した DNA は BigDye Direct Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた標準プロトコールで、シーケンスが正しいことを確認した.

表 2. コンストラクション用プライマー配列

Primer name	Primer sequence (5'–3')	
Mouse TMEM 147	Forward	TATGGATCCATGACCCTGTTCCACTTCGGGAACT
	Reverse	GGTCTCGAGCTAGGAGTGTACATTGACAACAGCAACAT

8. 抗体

以下の抗体は、Western Blotting, 免疫沈降法, qPCR, ELISA, 共焦点顕微鏡観察, 免疫組織化学染色, 関節腔内投与に使用した. 抗 TMEM147 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 TMEM147 抗体 (generated by immunizing rabbit with peptide containing amino acids 121-136 VGARGIEFDWKYIQMSC, Sigma-Aldrich), 抗 p65 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗リン酸化 p65 (S536) 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗リン酸化 p65 (S529) (Abcam), 抗リン酸化 p65 (S276) 抗体 (Sigma-Aldrich), 抗リン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗リン酸化 I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 BCR 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗リン酸化 BCR (Y177) 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 CK2 α 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗リン酸化 CK2 α 抗体

(Sigma-Aldrich), 抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich), 抗FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich), 抗 rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 mouse IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 goat IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), Alexa Fluor 488 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Life technologies), Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (Life technologies).

9. qPCR

各種細胞は, 96 well plate に 1×10^4 個/well で播種して一晩培養した. 翌日, 実験により先に記載した条件で細胞刺激を行った後, SuperPrep Cell Lysis Kit for qPCR (TOYOBO) を用いた標準プロトコールで mRNA を抽出し, M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いた標準プロトコールで cDNA を作成した.

標的 mRNA レベルは, ABI Prism 7300 fast real-time PCR system (Applied Biosystems) と SYBR Green FAST qPCR master mix (KAPA Biosystems) を用い, 初期熱変性 $94^{\circ}\text{C} \cdot 10$ 分, 熱変性 $94^{\circ}\text{C} 15$ 秒, アニーリング/伸長反応 $60^{\circ}\text{C} 60$ 秒 $\times 40$ サイクルのプロトコールで qPCR を行った. 内在性コントロールとして, マウス由来細胞では HPRT を, ヒト由来細胞では GAPDH を使用した. なお, 用いたプライマー配列は表 3 の通りである.

表 3. qPCR で用いたプライマー配列の一覧

Primer name	Primer sequence (5' - 3')	
mouse HPRT	Forward	GATTAGCGATGATGAACCAGGTT
	Reverse	CCTCCCATCTCCTTCATGACA
mouse IL-6	Forward	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	Reverse	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
mouse TMEM147	Forward	CGTTGCATCAGCTCAGGTCT
	Reverse	GTGGACGAAGGTCTCCATGA
mouse CCL20	Forward	CGACTGTTGCCTCTCGTACA
	Reverse	GAGGAGGTTACAGCCCTTT
mouse CXCL1	Forward	ACCCGCTCGCTTCTCTGT
	Reverse	AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG
mouse STAT3	Forward	CAATACCATTGACCTGCCGAT
	Reverse	GAGCGACTCAAAGTCCCT
human GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	Reverse	CGCTCCTGGAAGATGGTG
human IL-6	Forward	GGAGACTTGCCTGGTGAAAA
	Reverse	GTCAGGGGTGGTTATTGCAT
human TMEM147	Forward	ACACGCTATGATCTGTACCACA
	Reverse	CAGAGGTGGACGAAGGTCTC
human CCL2	Forward	CAGCCAGATGCAATCAATGCC
	Reverse	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
human CXCL1	Forward	AGGGAATTACCCCAAGAAC
	Reverse	ACTATGGGGGATGCAGGATT
human STAT3	Forward	ACCAGCAGTATAGCCGCTTC
	Reverse	GCCACAATCCGGGCAATCT

10. ELISA

各種細胞は Day 0 で、96 well plate に 1×10^4 個/well で播種し、37°Cで一晩培養した。Day 1 で、先に記載した条件で 24 時間の細胞刺激を行った。Day 2 で、その培養上清を回収し、Mouse IL-6 ELISA Set (BD Biosciences) を用いて標準プロトコールで ELISA を行った。吸光度の測定には Model 680 Microplate Reader (BIO RAD) を用い、450/550 nm で計測した。

11. MTT assay

ELISA で用いた、96 well plate から培養上清を除いた細胞に対して、MTT 溶液を DMEM 培養液で希釈し作成した MTT 含有 DMEM 培地 (500 $\mu\text{g/mL}$) を 100 $\mu\text{L/well}$ 添加し、37°Cで 2 時間培養して呈色反応を行った。その後培養上清を除去し、DMSO を 100 $\mu\text{L/well}$ 添加して MTT を溶解し、Model 680 Microplate Reader (BIO RAD) を用いて 550 nm における吸光度を測定した。

12. Western blotting (WB)

各種細胞は 10 cm dish に播種し培養した。培養細胞は dish を on ice とし、培地を吸引して氷冷した PBS 10 mL で 3 回洗浄後、セルスクレーパー (住友ベークライト) で細胞を回収した。4°C 1500 rpm で 3 分遠心して上清を除き、セルペレットを得た。細胞溶解には HBST (0.5) バッファー (0.5% TritonX-100, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES [pH7.4]) に 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich), phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma Aldrich), phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich) を添加したものをを用い、4°Cで 2 時間緩徐に転倒混和して攪拌し、4°C 15000 rpm で 30 分遠心して得られた上清を細胞溶解液として回収した。得られたサンプルは Bradford Protein Assay (BIO RAD) を用いた標準プロトコールでタンパク濃度を測定し、サンプル間で同じ濃度となるよう調整した。

得られた各サンプルは 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample バッファーで 60°C 10 分温め、5-20%濃度勾配のゲル (SuperSep Ace, Wako) とマルチゲル II 泳動槽 (コスモ・バイオ) を用いてポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。続いてゲルタンパク質を、ミニトランスブロットセル (BIO RAD) を用いて polyvinylidene fluoride membrane (Pall Corporation) に転写した。

タンパク質を転写した membrane は、5%スキムミルクもしくは 2% BSA でブロッキングした後、先に記載した各種抗体を Can Get Signal (TOYOBO) に混入した反応液と反応させた。

membrane は、Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher) もしくは Chemi-Lumi One L (nacalai tesque) によって化学発光させたものを、富士メディカ

ルフィルムプロセサーFPM100 (FUJIFILM) を用いて現像した。

なお、実験により 2 時間の血清飢餓処理の後、先に示した条件にて細胞刺激を行った。

13. 免疫沈降 (IP)

各種細胞は 10 cm dish に播種し培養した。培養細胞は dish を on ice とし、培地を吸引して氷冷した PBS 10 mL で 3 回洗浄後、セルスクレーパー (住友ベークライト) で細胞を回収した。4°C 1500 rpm で 3 分遠心して上清を除き、セルペレットを得た。細胞溶解には IP バッファー (1M Tris-HCL [pH7.5], 1M MgCl₂, 500 mM EDTA, 5 M NaCl, 1% NP40) に 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich) , phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma Aldrich), phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich) を添加したものをを用い、4°C で 30 分間緩徐に転倒混和して攪拌した後、超音波処理 (30 秒間隔で 5 分間 2 セット) を行って、4°C 15000 rpm で 30 分遠心して得られた上清を細胞溶解液として回収した。得られたサンプルは Bradford Protein Assay (BIO RAD) を用いた標準プロトコールでタンパク濃度を測定し、サンプル間で同じ濃度となるよう調整した。

プロテイン G セファロースビーズ (Pharmacia) を、サンプル 1 mg タンパク質相当量に対して 10 µg を添加して、4°C で 1 時間緩徐に転倒混和して攪拌することによりプレクリアを行い、4°C 9000 rpm で 1 分遠心して上清を回収した。

Flag ビーズ (Sigma Aldrich) あるいは、抗 p65 抗体 (Santa Cruz) とプロテイン G セファロースビーズ (Pharmacia) を加えて 4°C で 2 時間緩徐に転倒混和して攪拌することで、免疫沈降した。Flag 融合タンパクは 3 x Flag ペプチド (Sigma Aldrich) で溶出し、抗 p65 抗体とプロテイン G セファロースビーズ次の煮沸処理により溶出した。

サンプルは 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample バッファーで 95°C 5 分煮沸し、WB に使用した。

14. Luciferase Reporter Assay

Day 0 で、96 well plate に 2×10^4 個/well で HEK293T 細胞を播種し 37°C で一晩培養。Day 1 で、リン酸カルシウム法を用いてコントロールとしての empty vector (pCMV-Tag2B) と先に記載した方法で作成した TMEM147 発現 vector を 100 ng/well で導入した。また pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega) もしくは pGL4.20[luc2P/IL-6-RE/Puro] を 4.5 ng/well (Promega) で、pGL4.74[hRluc/TK] を 0.5 ng/well (Promega) で導入し、37°C で 24 時間培養した。Day 2 で培養液を除去し、先に記載した条件で細胞を 37°C で 6 時間刺激した。

PBS で細胞を洗浄し、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) の標準プロトコールでレポーター活性の測定を行った。具体的には、Passive Lysis buffer を 50 μ L/well 加えて室温下で 20 分間緩やかに振盪させ細胞を融解し、その細胞溶解液 5 μ L と発色基質 25 μ L を混合することにより、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。測定には Glomax-Multi Detection System (Promega) を使用し、細胞間の導入効率補正は、遺伝子導入時に同時に添加した pGL4.32 由来のウミシイタケルシフェラーゼを内部標準として用いることで行った。

15. 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内タンパク局在の観察

Mock 細胞 (non-target control) 及び TMEM147 ノックダウン細胞を、 μ -Slides (Ibidi) に 1×10^5 個/chamber で播種し、37°Cで一晩培養。翌日、2 時間の細胞飢餓処理の後に、TNF- α 50 ng/mL で 0 分、15 分、30 分刺激し、PBS 100 μ L で 3 回洗浄。Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) の標準プロトコールで固定及び膜透過処理を施した。一次抗体は抗 p65 抗体 (SantaCruz) を 4°Cで 1 時間反応させ、PBS 100 μ L で 3 回洗浄した後、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Life technologies), さらに核染色用として Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (Life technologies) を 4°Cで 1 時間反応させ、PBS 100 μ L で 3 回洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡は LSM5 Pascal system (Zeiss) を使用した。

16. 統計学的解析

実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (Mean $\pm$ SD)で示した。

本研究では、2 群間の有意差検定には Student's *t* 検定 (two-tailed) を、3 群間の有意差検定に One-way ANOVA with Dunnett's post hoc 解析を、関節炎モデルのクリニカルスコアの有意差検定には Wilcoxon rank-sum test を用いた。*p* 値は 0.05 未満のものを有意とし、**p* < 0.05, ***p* < 0.01, 及び****p* < 0.001 で示した。

実験結果

1. 軟骨細胞における炎症回路は、OA モデルマウス及び RA モデルマウスの病態に関与する.

軟骨細胞に炎症回路が存在するか否かを明らかにするため、以下の実験を行った.

まずは、マウス前軟骨細胞株である ATDC5 を用いて検討を行った. ATDC5 に対して IL-6, IL-17, TNF- α のサイトカイン刺激により, IL-6 の mRNA 発現量を qPCR で, IL-6 のタンパクレベルを ELISA で測定したところ, IL-6 (STAT3 経路) 及び IL-17 もしくは TNF- α (NF- κ B 経路) の同時活性化により IL-6 が相乗的に産生され, 炎症回路の存在が示唆された (図 2A, 2B).

さらに, 初代培養マウス軟骨細胞を用いて同様の検討を行ったところ, ATDC5 と同様に IL-6 (STAT3 経路) 及び IL-17 もしくは TNF- α (NF- κ B 経路) の同時活性化により IL-6 が相乗的に産生されたことから, マウス軟骨細胞における炎症回路の存在が示唆された (図 3A, 3B).

続いて, 実際に関節炎モデルマウスにおいて炎症回路が活性化していることを検討するために, 自然発症型 OA モデルマウス及び自然発症型 RA モデルマウスを準備し, それぞれから膝関節を摘出して組織切片を作成した. Safranin O 染色にて OA モデルおよび RA モデルいずれにおいても軟骨表面は不整となり, 関節炎が引き起こされていることが分かる (図 4A). 免疫組織化学染色によってリン酸化 NF- κ B p65 及びリン酸化 STAT3 の発現を確認したところ, 軟骨細胞において, リン酸化 NF- κ B p65 及びリン酸化 STAT3 の発現が有意に増加していることが示された (図 4A, 4B). OA 及び RA のいずれのモデルマウスにおいても, 軟骨細胞での炎症回路の活性化が示された.

さらに, 軟骨細胞に存在する炎症回路が関節炎において重要であることを確認するため, 軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウスを作成することとした. 具体的には, 本研究で用いている RA モデルマウスである F759 マウスをベースとして, 軟骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作成するため, F759 マウスに加えて Col2a1-Cre マウス及び STAT3 flox/flox マウスを準備した. これらを交配することにより, 軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウス (Col2a1-STAT3^{fl/fl} F759 mice) を作出することに成功した. 軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウスの足関節腔内に, IL-6 及び IL-17 を投与してサイトカイン誘導性関節炎を引き起こしたところ, その臨床スコアは有意に抑制された (図 5).

以上の結果から, 軟骨細胞には炎症回路が存在し, それは OA モデルマウス及び RA モデルマウスいずれの病態にも関与していることが示唆された.

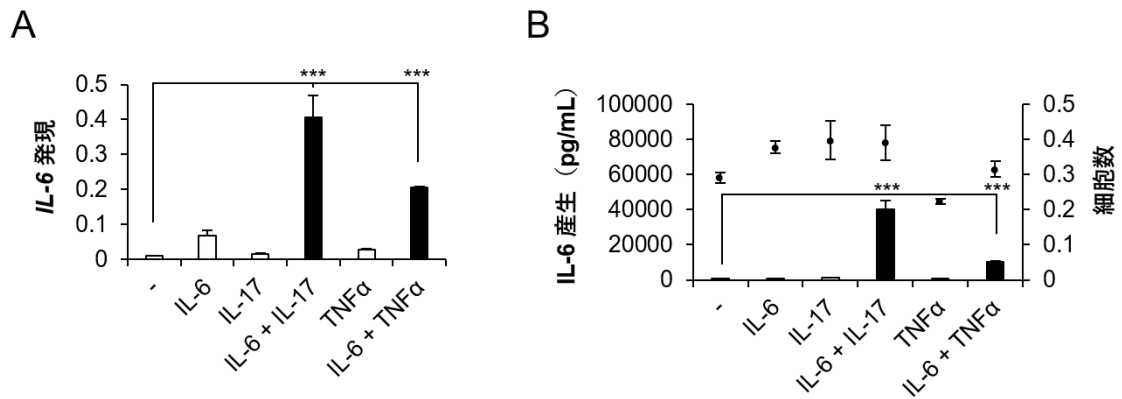


図 2. ATDC5 における炎症回路

ATDC5 はヒト IL-6 及び IL-6R, IL-17, TNF- α で刺激し, (A) IL-6 mRNA 発現量, (B) IL-6 タンパクレベルを示す. IL-6 タンパクレベルはマウス IL-6 特異的な ELISA を用いており, ヒト IL-6 との交差反応はない. (B) のドットプロットは, MTT assay で計測された相対細胞数である. データは 3 回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, ***は, $p < 0.001$ を示す.

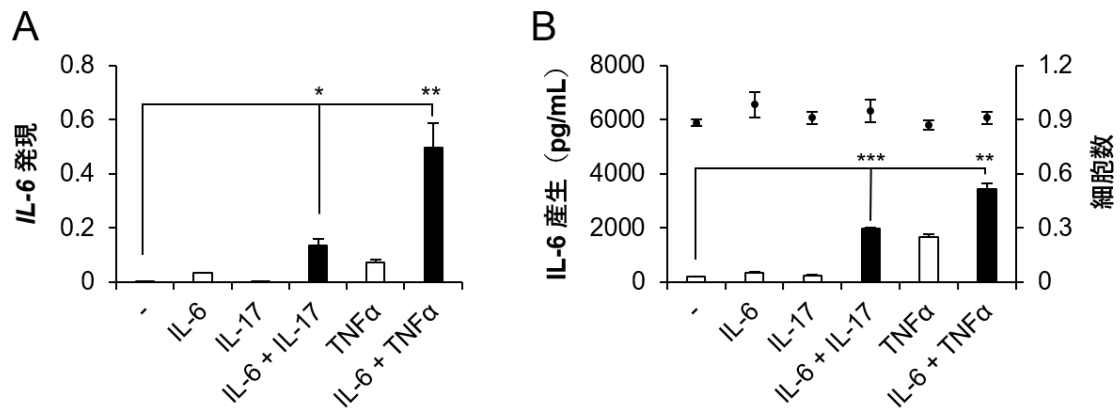


図3. 初代培養マウス軟骨細胞における炎症回路

初代培養マウス軟骨細胞はヒト IL-6 及び IL-6R, IL-17, TNF- α で刺激した. (A) IL-6 mRNA 発現量, (B) IL-6 タンパクレベルを示す. IL-6 タンパクレベルはマウス IL-6 特異的な ELISA を用いており, ヒト IL-6 との交差反応はない. (B) のドットプロットは, MTT assay で計測された相対細胞数である. データは3回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, *は $p < 0.05$ を, **は $p < 0.01$ を, ***は $p < 0.001$ を示す.

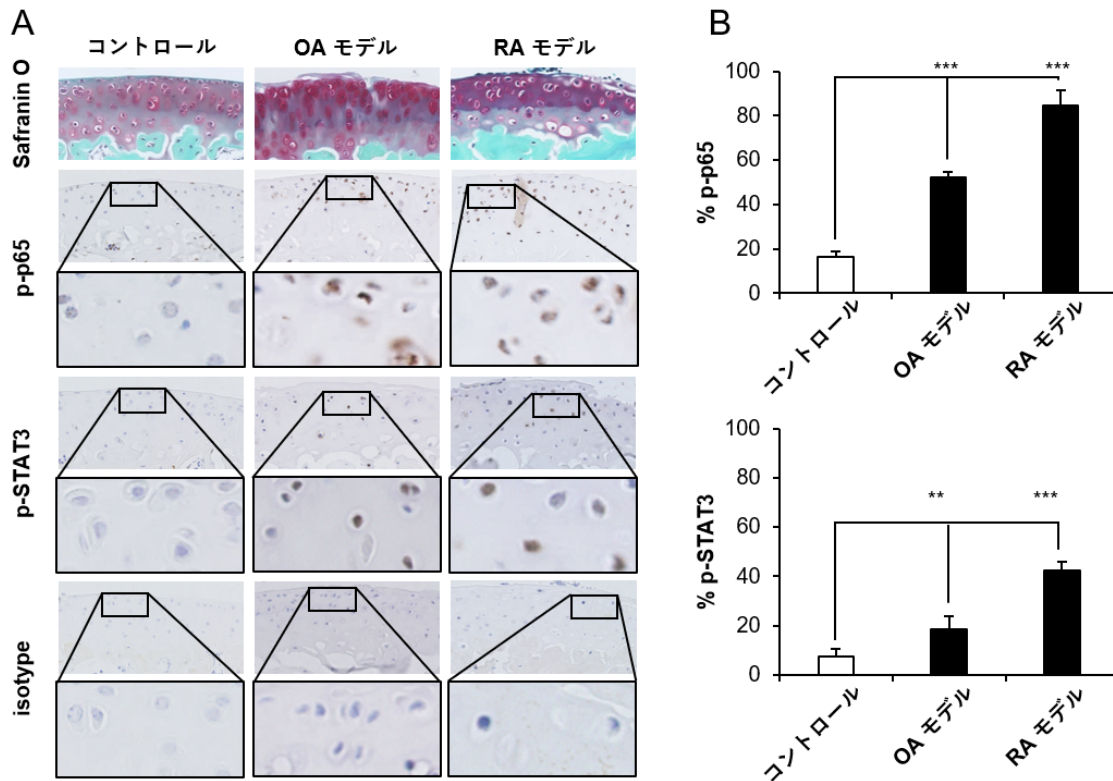


図 4. 自然発症型 OA モデルマウス及び自然発症型 RA モデルマウスにおける炎症回路の活性化

コントロール、自然発症型 OA モデルマウス及び自然発症型 RA モデルマウスより摘出した膝関節に対し、Safranin O 染色，リン酸化 NF- κ B p65 (p-p65) 及びリン酸化 STAT3 (p-STAT3) の免疫組織化学染色を行った。(A) OA モデルおよび RA モデルいずれにおいても Safranin O 染色での軟骨表面は不整で，p-p65，p-STAT3 は軟骨細胞で染色された。(B) 軟骨細胞のうち，p-p65 陽性細胞，p-STAT3 陽性細胞の割合をパーセントで示す。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示され，**は $p < 0.01$ を，***は $p < 0.001$ を示す。

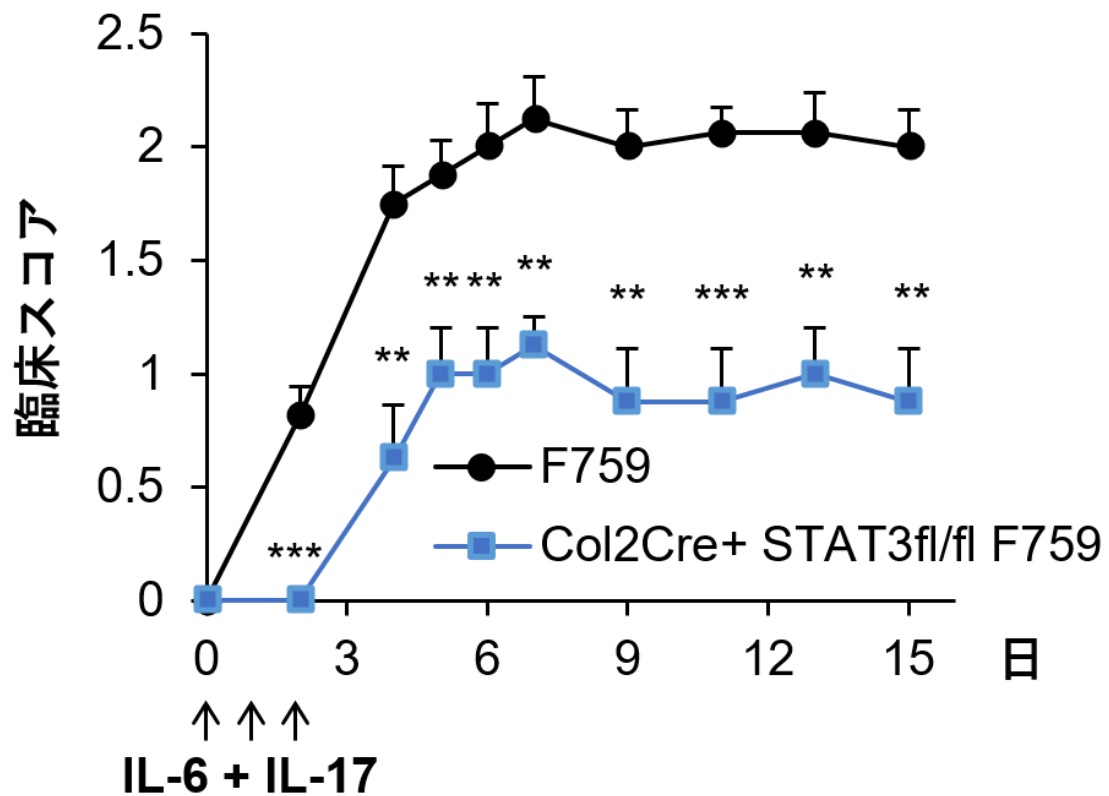


図5. 軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウスにおけるサイトカイン誘導性関節炎の抑制
コントロール及び軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウスの足関節腔内に、IL-6 及び IL-17 を3日間連続投与し、各個体の臨床スコアを評価した。データは平均値 ± 標準偏差で示され、**は $p < 0.01$ を、***は $p < 0.001$ を示す。

2. 軟骨細胞における炎症回路活性化は、OA 患者及び RA 患者にも存在する.

マウスでの研究結果を踏まえ、ヒト軟骨細胞にも炎症回路が存在するかを検討することとし、以下の実験を行った.

初代培養ヒト軟骨細胞に対して IL-6, IL-17, TNF- α のサイトカイン刺激を加え、IL-6 の mRNA 発現量を qPCR で測定したところ、IL-6 (STAT3 経路) 及び IL-17 もしくは TNF- α (NF- κ B 経路) の同時活性化により、IL-6 が相乗的に産生され炎症回路の存在が示唆された (図 6).

さらに、実際の OA 患者及び RA 患者において炎症回路が活性化していることを検討するため、手術時に摘出された膝軟骨を用いて組織切片を作成した. Safranin O 染色にて OA 患者および RA 患者いずれにおいても、軟骨基質は変性し赤く染色されていないことから、関節炎が引き起こされていることが分かる (図 7A). 免疫組織化学染色によってリン酸化 NF- κ B p65 及びリン酸化 STAT3 の発現を確認したところ、軟骨細胞において、リン酸化 NF- κ B p65 及びリン酸化 STAT3 の発現が有意に増加していることが示された (図 7A, 7B). OA 患者及び RA 患者のいずれにおいても、軟骨細胞での炎症回路の活性化が示された.

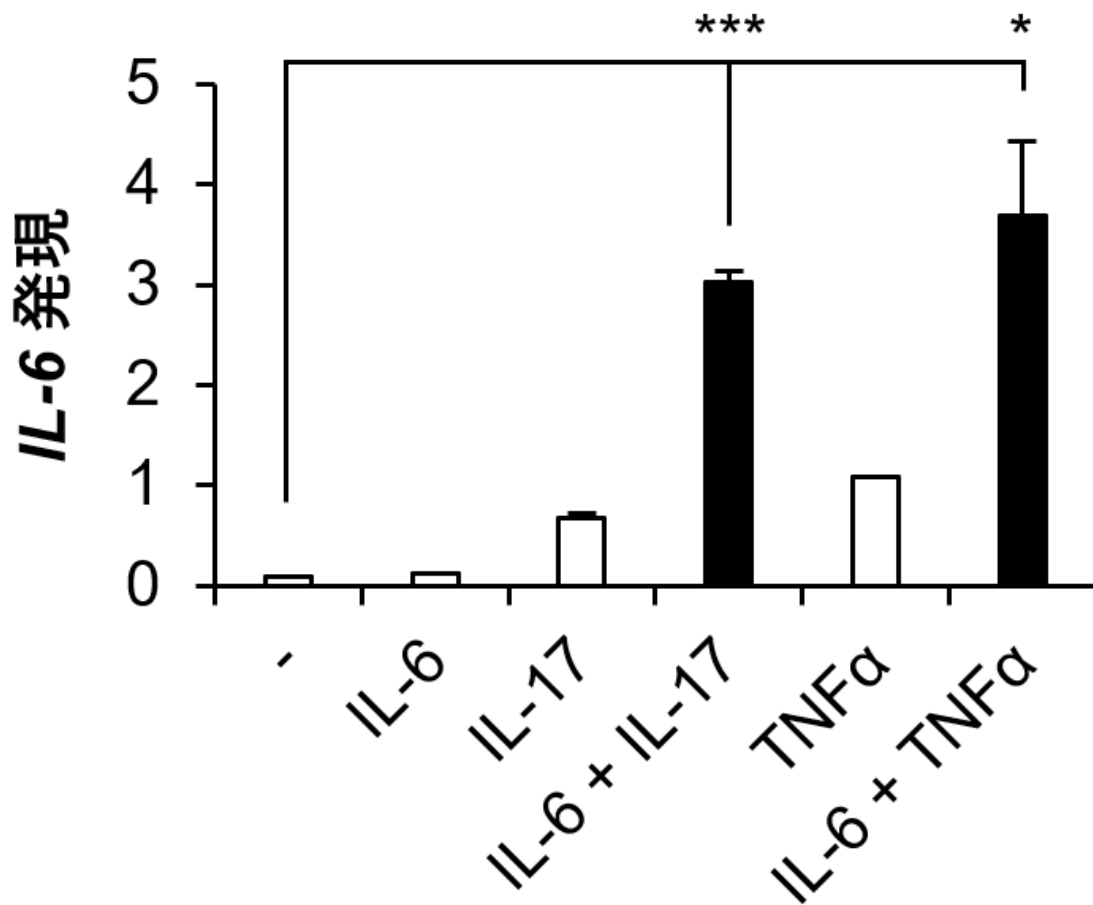


図 6. 初代培養ヒト軟骨細胞における炎症回路

初代培養ヒト軟骨細胞はヒト IL-6 及び IL-6R, IL-17, TNF- α で刺激した. IL-6 mRNA 発現量を示す. データは3回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, *は $p < 0.05$ を, ***は $p < 0.001$ を示す.

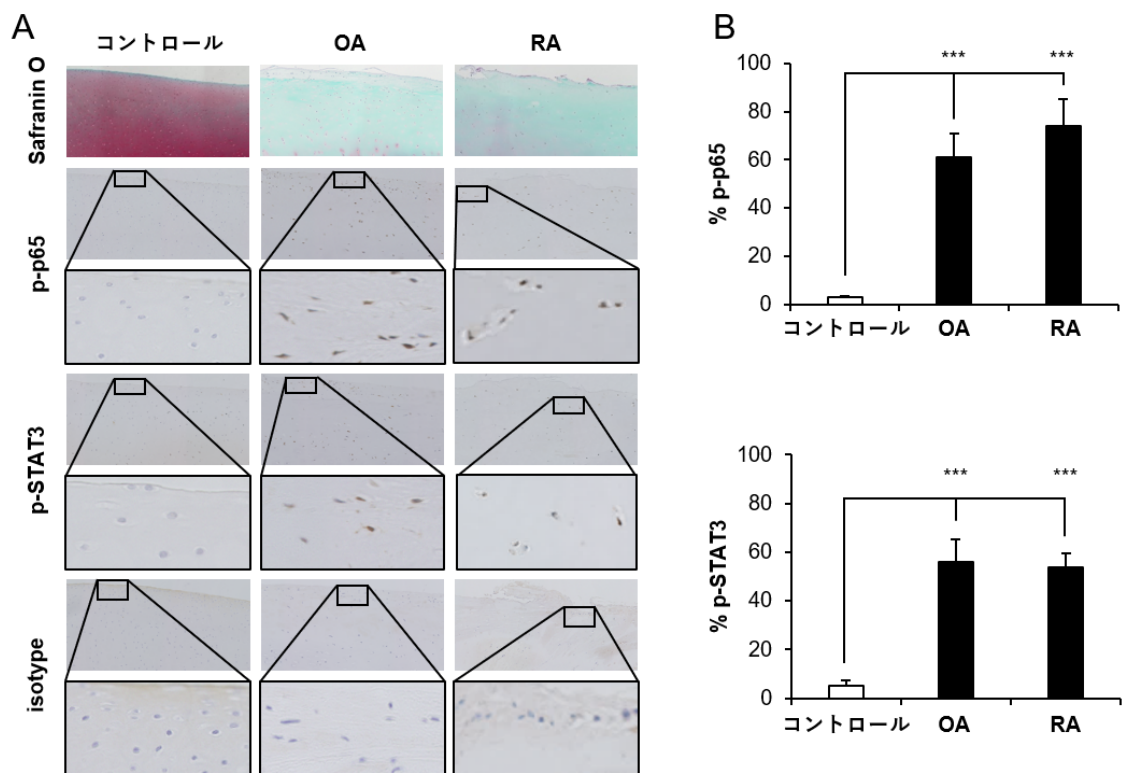


図 7. OA 患者及び RA 患者における炎症回路の活性化

コントロール、OA 患者及び RA 患者より摘出した膝関節に対し、Safranin O 染色、リン酸化 NF- κ B p65 (p-p65) 及びリン酸化 STAT3 (p-STAT3) の免疫組織化学染色を行った。(A) OA 患者および RA 患者いずれにおいても Safranin O 染色での軟骨表面は不整で、変性により赤く染色されず、p-p65、p-STAT3 は軟骨細胞で染色された。(B) 軟骨細胞のうち、p-p65 陽性細胞、p-STAT3 陽性細胞の割合をパーセントで示す。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示され、***は $p < 0.001$ を示す。

3. 軟骨細胞に存在する TMEM147 は、炎症回路の活性化に重要な役割を果たす。

我々は先の研究にて、shRNA を用いたゲノムワイドスクリーニングを行い、1000 を超える炎症回路関連遺伝子を同定した (Murakami et al. 2013). 本研究ではその中から、TMEM147 に着目して解析を進めた. その理由として、TMEM147 が膜タンパクであり (Dettmer et al. 2010), 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点、TMEM147 が自然発症型 OA モデルマウス及び自然発症型 RA モデルマウスのみならず、OA 患者及び RA 患者の膝関節軟骨細胞に強発現しているのを発見した点が挙げられる (図 8A, 8B).

まず、軟骨細胞における TMEM147 が炎症回路に対してどのような役割を持つのかを精査する目的で、前軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いた TMEM147 ノックダウン細胞を作出した. 具体的には、ATDC5 細胞に TMEM147 shRNA あるいは nontarget shRNA を含むレンチウイルスを感染させ、puromycin による薬剤選択を行うことにより TMEM147 ノックダウン細胞 (sh) 及びコントロール細胞 (Mock) を作出した. これらの細胞は、qPCR により TMEM147 の mRNA レベルを測定してノックダウン効率を測定し、さらに WB により TMEM147 の発現がタンパク質レベルでも抑えられていることを確認した (図 9A, 9B). また TMEM147 の発現は、IL-6 と IL-17 のサイトカイン刺激では変化しなかった (図 9A, 9B).

次に、炎症回路への関与を解析するため、TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞 (sh) 及びコントロール細胞 (Mock) に対して IL-6 と IL-17 のサイトカイン刺激を行い、IL-6 の発現及び産生を mRNA レベル (qPCR による) 及びタンパクレベル (ELISA による) で測定したところ、IL-6 の発現及び産生は抑制されることが示された (図 10A, 10B). また ELISA と同時に MTT assay を行って細胞数を評価しており、IL-6 の産生低下が細胞数に影響されるものでないことを確認している (図 10B).

続けて、TMEM147 の強制発現下における NF- κ B p65 及び IL-6 のプロモーター活性を、Luciferase Reporter Assay により評価したところ、いずれのプロモーター活性も TMEM147 の遺伝子導入により有意に増強することが示された (図 11A, 11B).

さらに、TMEM147 が炎症回路の NF- κ B 経路と STAT3 経路のいずれに強く関与するかを検討するため、qPCR を行った. 具体的には、先に作成した TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞 (sh) 及びコントロール細胞 (Mock) に対して IL-6 と IL-17 のサイトカイン刺激を行い、NF- κ B 経路の標的遺伝子である CCL20 及び CXCL1 と、STAT3 経路の標的遺伝子である STAT3 (Narimatsu et al. 2001) の mRNA レベルを qPCR にて測定している. 結果、TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞 (sh) ではコントロール細胞 (Mock) に比して NF- κ B 経路の標的遺伝子の発現が有意に抑制されたのに対し、STAT3 経路の標的遺伝子の発現には変化が見られな

かった (図 12).

これまでに示された TMEM147 の機能が, ATDC5 細胞のみならずヒト軟骨細胞でも同様であるかを確認するため, 初代培養ヒト軟骨細胞を用いた TMEM147 ノックダウン細胞を作出した. 具体的には, 初代培養ヒト軟骨細胞に si-TMEM147 あるいは si-nontarget をトランスフェクションさせることにより TMEM147 ノックダウン細胞 (si) 及びコントロール細胞 (si-Control) を作出した. これらの細胞は, qPCR により TMEM147 の mRNA レベルを測定してノックダウン効率を測定した (図 13). また TMEM147 の発現は, IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激では変化しなかった (図 13).

次に, 炎症回路への関与を解析するため, TMEM147 ノックダウン初代培養ヒト軟骨細胞 (si) 及びコントロール細胞 (si-Control) に対して IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激を行い, IL-6 の発現を mRNA レベル (qPCR による) で測定したところ, IL-6 の発現は抑制されることが示された (図 14).

さらに, TMEM147 が炎症回路の NF- κ B 経路と STAT3 経路のいずれに強く関与するかを検討するため, qPCR を行った. 具体的には, 先に作成した TMEM147 ノックダウン初代培養ヒト軟骨細胞 (si) 及びコントロール細胞 (si-Control) に対して IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激を行い, NF- κ B 経路の標的遺伝子である CCL2 及び CXCL1 と, STAT3 経路の標的遺伝子である STAT3 (Narimatsu et al. 2001) の mRNA レベルを qPCR にて測定している. 結果, TMEM147 ノックダウン初代培養ヒト軟骨細胞 (si) ではコントロール細胞 (si-Control) に比して NF- κ B 経路の標的遺伝子の発現が有意に抑制されたのに対し, STAT3 経路の標的遺伝子の発現には変化が見られなかった (図 15).

最後に, *in vivo* での検討として, サイトカイン誘導性関節炎モデルを用いた実験を行った. 具体的には F759 マウスの足関節腔内に TMEM147 shRNA, NF- κ B p65 shRNA (ポジティブコントロールとして) もしくは nontarget shRNA を含むレンチウイルスを投与した後, 炎症回路を活性化させる IL-6 及び IL-17 を同様に投与して, サイトカイン誘導性関節炎を発症させた. 結果, TMEM147 抑制マウスにおいて有意に臨床スコアの増悪が抑制された (図 16).

以上の結果から, 軟骨細胞に存在する 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.

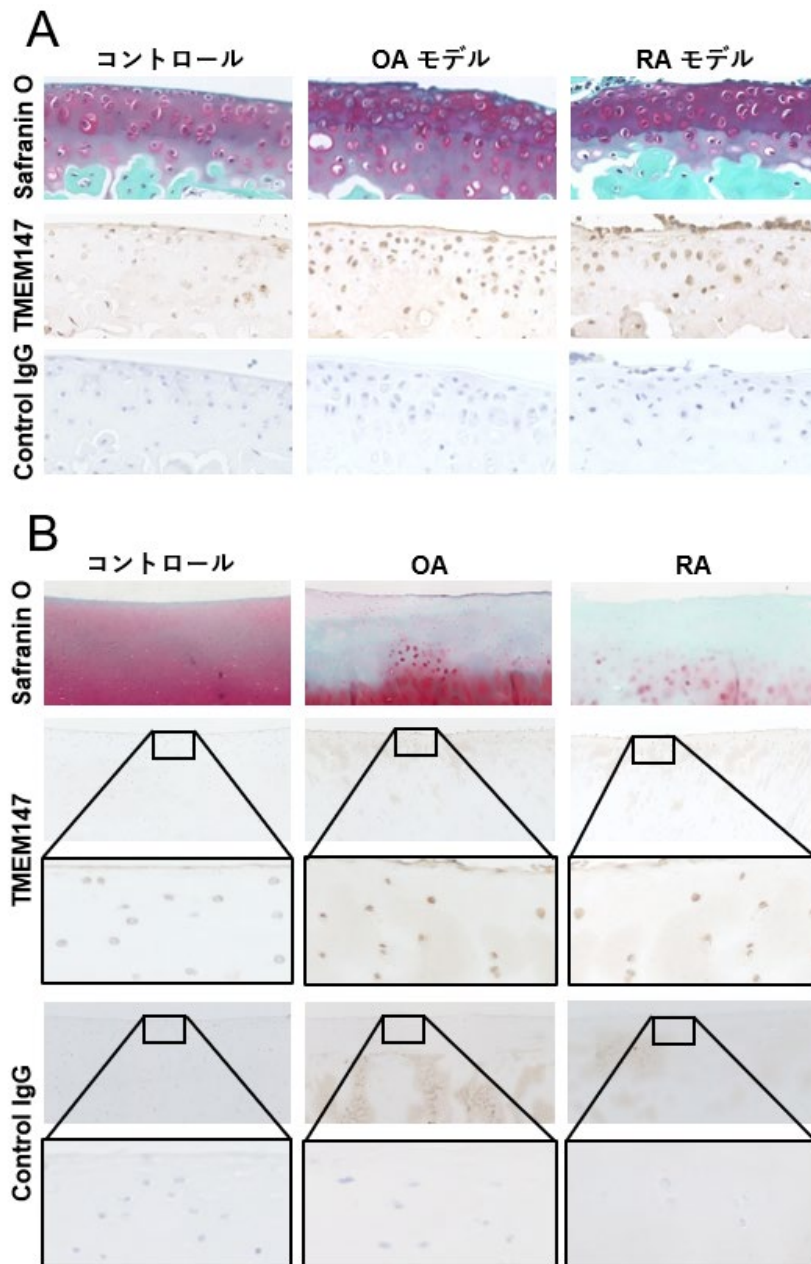


図 8. OA モデルマウス及び RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者における軟骨細胞での TMEM147 の発現

コントロール, OA モデルマウス及び RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者より摘出した膝関節に対し, Safranin O 染色, TMEM147 の免疫組織化学染色を行った. (A) OA モデルおよび RA モデルいずれにおいても Safranin O 染色での軟骨表面は不整で, TMEM147 はコントロールと比して軟骨細胞で強染色された. (B) OA 患者および RA 患者いずれにおいても Safranin O 染色での軟骨表面は不整で, 変性により赤く染色されず, TMEM147 はコントロールと比して軟骨細胞で強染色された.

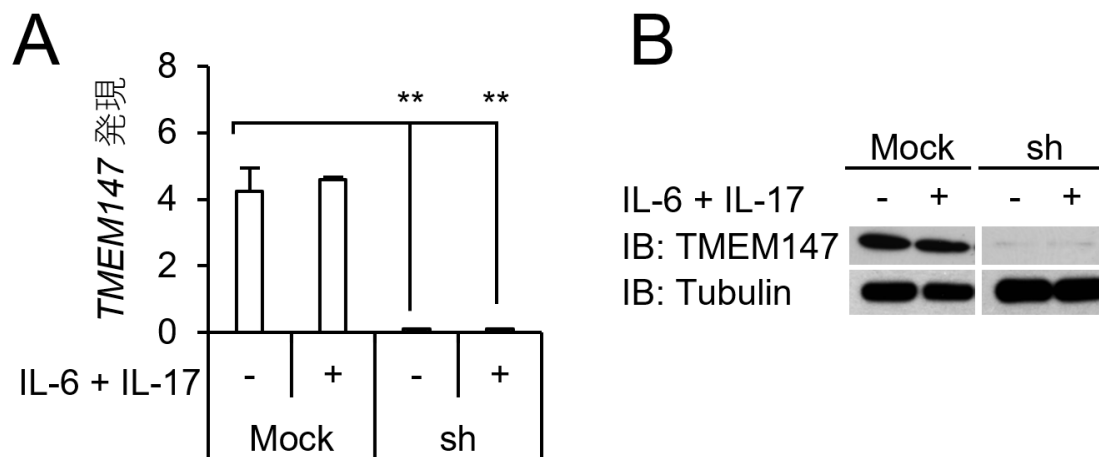


図9. ATDC5細胞を用いたTMEM147ノックダウン細胞の作出

ATDC5細胞にTMEM147 shRNAあるいはnontarget shRNA含有レンチウイルスを感染させ、TMEM147ノックダウン細胞(sh)及びコントロール細胞(Mock)を作出し、ヒトIL-6及びIL-17で刺激した。(A)TMEM147のmRNA発現量を、(B)TMEM147のタンパクレベルを示す。(A)データは3回の実験結果の平均値と標準偏差を内在性コントロールとしてのHPRTに対する相対値で示され、(B)3回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。**は $p < 0.01$ を示す。

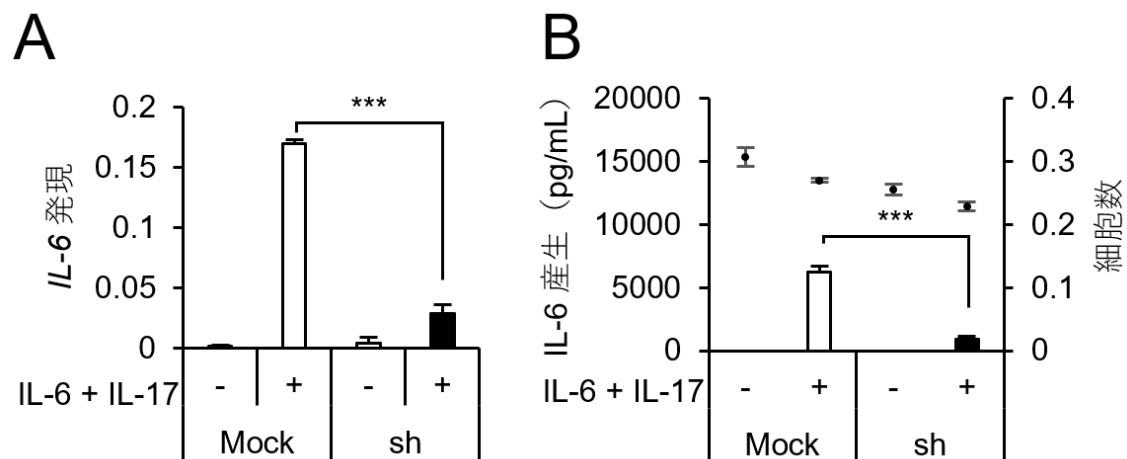


図 10. TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞における炎症回路の抑制

ATDC5 より作出した TMEM147 ノックダウン細胞 (sh) 及びコントロール細胞 (Mock) をヒト IL-6 及び IL-17 で刺激した. (A) IL-6 mRNA 発現量, (B) IL-6 タンパク質レベルを示す. IL-6 タンパク質レベルはマウス IL-6 特異的な ELISA を用いており, ヒト IL-6 との交差反応はない. (B) のドットプロットは, MTT assay で計測された相対細胞数である. データは 3 回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, ***は $p < 0.001$ を示す.

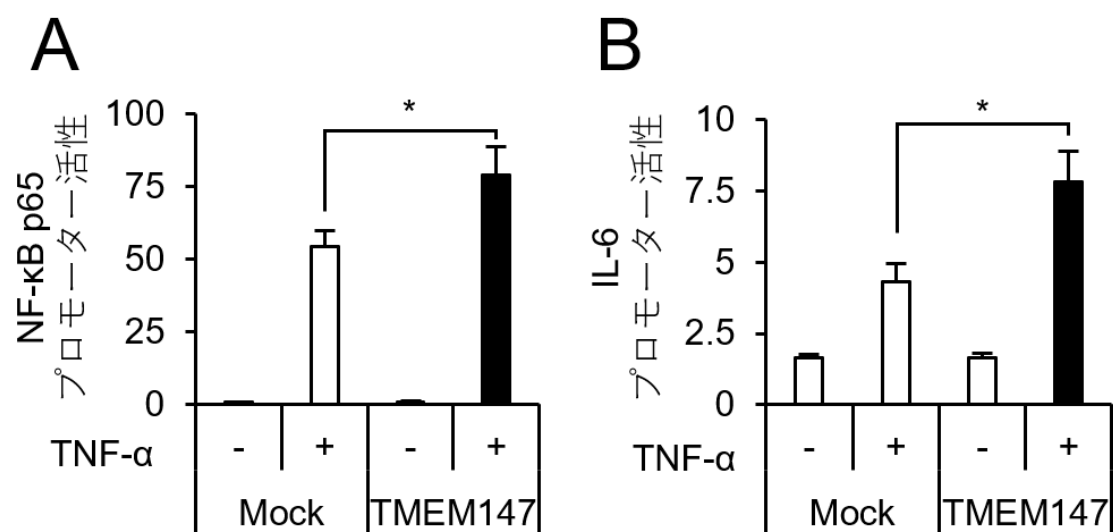


図 11. TMEM147 強制発現下における NF-κB p65 及び IL-6 のプロモーター活性

HEK293T 細胞に TMEM147 をトランスフェクションし, TNF-α で刺激した. (A) NF-κB p65 のプロモーター活性, (B) IL-6 のプロモーター活性を示す. データは 3 回繰り返した実験結果の平均値 ± 標準偏差で示され, *は $p < 0.05$ を示す.

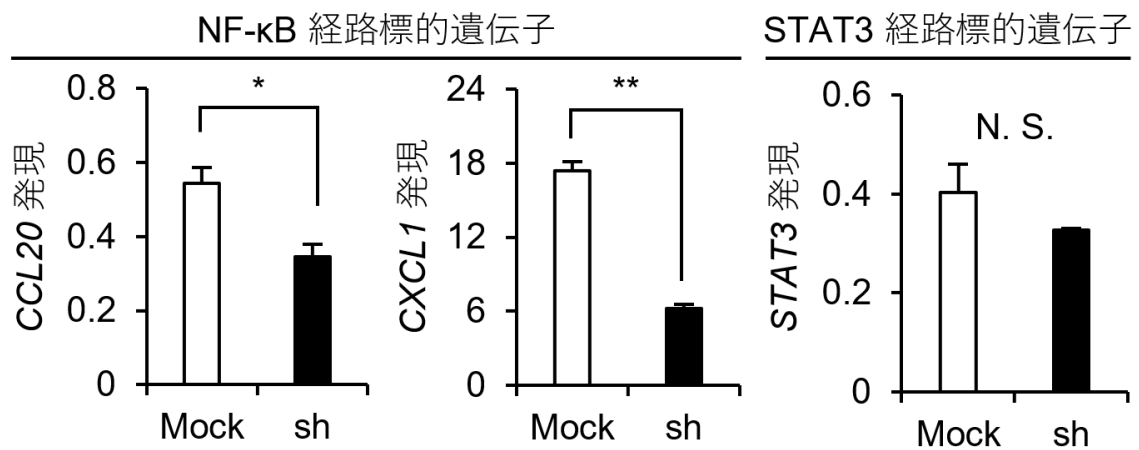


図 12. TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞における NF-κB 経路標的遺伝子及び STAT3 経路標的遺伝子の発現

ATDC5 より作出した TMEM147 ノックダウン細胞 (sh) 及びコントロール細胞 (Mock) を IL-6 及び IL-17 で刺激し, CCL20 及び CXCL1 (NF-κB 経路標的遺伝子), STAT3 (STAT3 経路標的遺伝子) の発現量を測定した. データは 3 回の実験結果の平均値と標準偏差を, 内在性コントロールとしての HPRT に対する相対値で示され, * は $p < 0.05$ を, ** は $p < 0.01$ を示す.

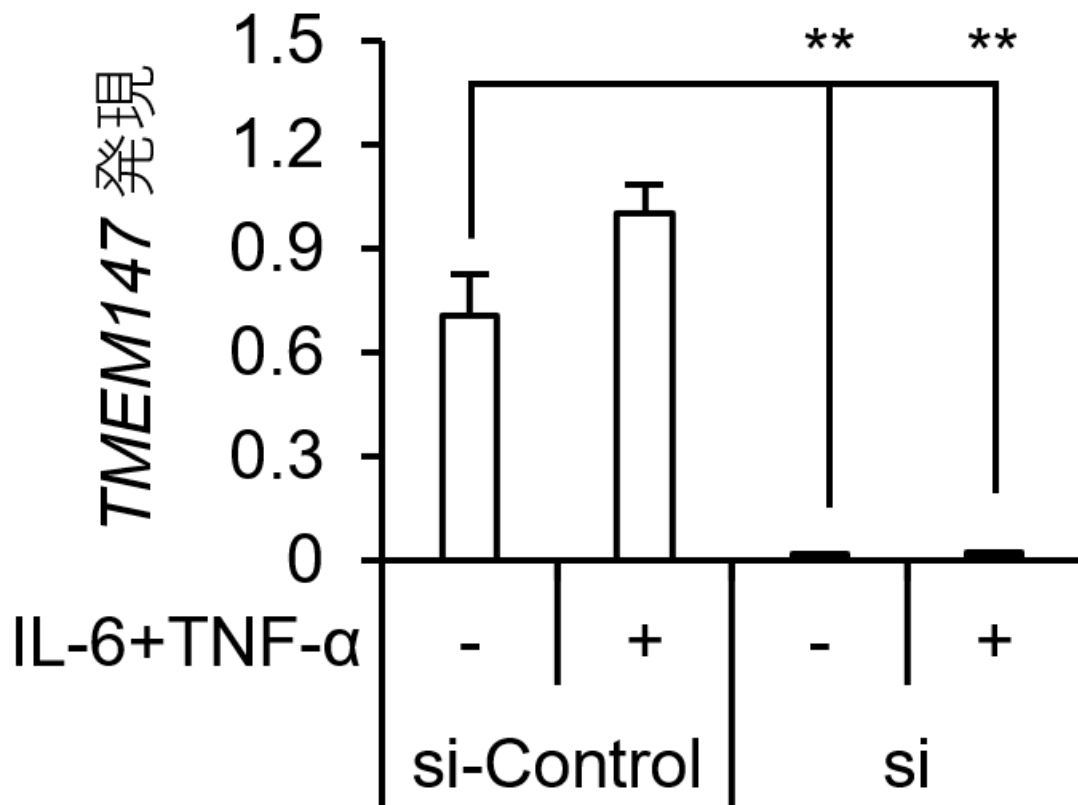


図 13. 初代培養ヒト軟骨細胞を用いた TMEM147 ノックダウン細胞の作出

初代培養ヒト軟骨細胞に si-TMEM147 あるいは si-nontarget をトランスフェクションさせることにより TMEM147 ノックダウン細胞 (si) 及びコントロール細胞 (si-Control) を作出し、IL-6 及び TNF- α で刺激した。TMEM147 の mRNA 発現量を示す。データは3回の実験結果の平均値と標準偏差を、内在性コントロールとしての GAPDH に対する相対値で示され、**は $p < 0.01$ を示す。

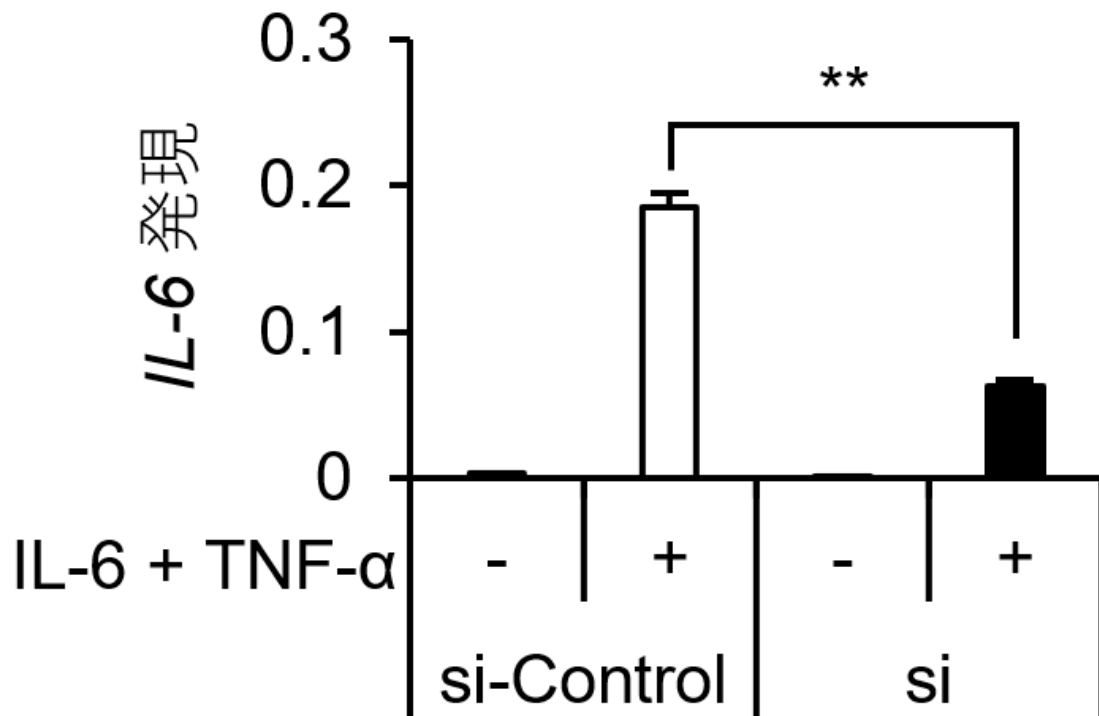


図 14. TMEM147 ノックダウン初代培養ヒト軟骨細胞における炎症回路の抑制

初代培養ヒト軟骨細胞より作出した TMEM147 ノックダウン細胞 (si) 及びコントロール細胞 (si-Control) を IL-6 及び TNF- α で刺激した. IL-6 mRNA 発現量を示す. データは 3 回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, **は $p < 0.01$ を示す.

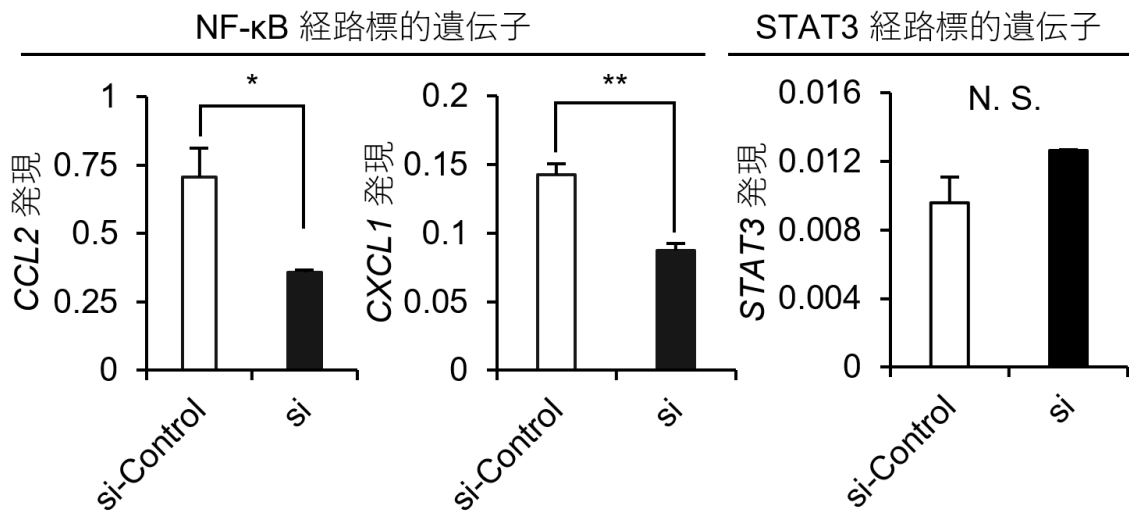


図 15. TMEM147 ノックダウン初代培養ヒト軟骨細胞における NF-κB 経路標的遺伝子及び STAT3 経路標的遺伝子の発現

初代培養ヒト軟骨細胞より作出した TMEM147 ノックダウン細胞 (si) 及びコントロール細胞 (si-Control) を IL-6 及び TNF-α で刺激し, CCL2 及び CXCL1 (NF-κB 経路標的遺伝子), STAT3 (STAT3 経路標的遺伝子) の発現量を測定した. データは 3 回の実験結果の平均値と標準偏差を, 内在性コントロールとしての GAPDH に対する相対値で示され, *は $p < 0.05$ を, **は $p < 0.01$ を示す.

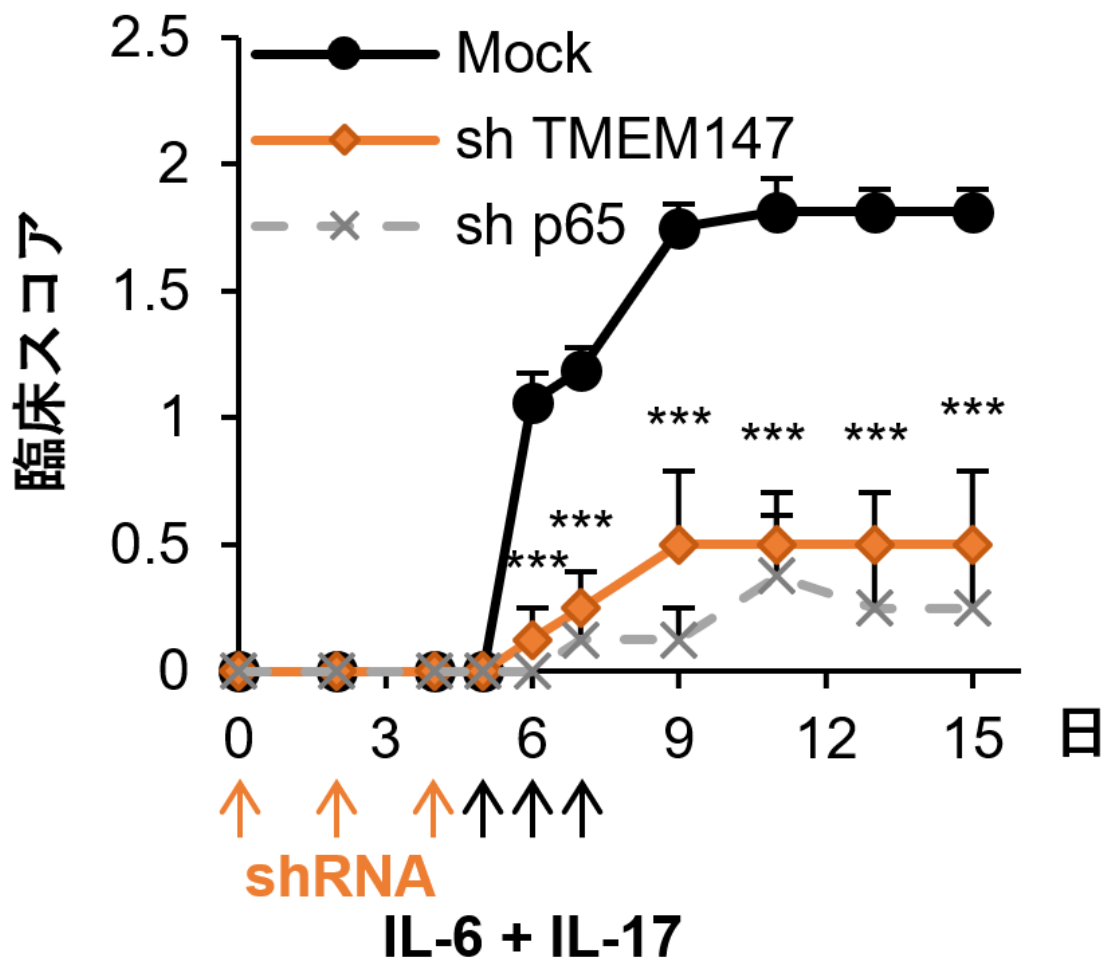


図 16. TMEM147 shRNA の関節腔内投与によるサイトカイン誘導性関節炎の抑制

F759 マウスの足関節腔内に nontarget shRNA, TMEM147 shRNA, NF- κ B p65 shRNA (ポジティブコントロール) を投与した後, IL-6 及び IL-17 を同様に投与してサイトカイン誘導性関節炎を発症させ, 各個体について臨床スコアを評価した. データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, ***は $p < 0.001$ を示す.

4. TMEM147 は BCR-CK2 α 複合体の足場タンパクとして機能する

NF- κ B 経路は IL-1, IL-17, TNF- α , LPS 等, 種々の炎症性サイトカインや細胞ストレスによって活性化することが知られているが, NF- κ B 経路において転写活性を有する分子として重要なものの一つに NF- κ B p65 がある. NF- κ B p65 は細胞質では I κ B α と結合した非活性化状態で存在するが, 先に述べたような刺激により, IKK 複合体のリン酸化を経て I κ B α がリン酸化され, プロテアソーム系によって I κ B α が分解される. I κ B α が分解された NF- κ B p65 は 536 番目のセリン (S536) のリン酸化によって活性化し, 核局在シグナルの露出により核内へ移行して転写活性を示すようになることが知られている (Ghosh and Hayden 2008). そこで, TMEM147 が NF- κ B 経路に対してどのような機能を持つのかを精査することとした.

まず, 先に作出した TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞に対して TNF- α で刺激を与え, I κ B α 及び NF- κ B p65 S536 のリン酸化とその分解について, 抗 I κ B α 抗体, 抗リン酸化 I κ B α 抗体, 抗 NF- κ B p65 抗体, 抗 NF- κ B p65 S536 抗体を用いて, WB で経時的に評価した. 結果, TMEM147 のノックダウンは, I κ B α 及び NF- κ B p65 S536 のリン酸化とその分解に影響を及ぼさないことが示された (図 17). さらに, TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞を TNF- α で刺激し, NF- κ B p65 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡によって経時的に観察し評価したが, NF- κ B p65 の細胞内局在は変化しなかった (図 18A, 18B).

そこで, 近年我々が発見した炎症回路を制御分子である BCR に着目し研究を進めることとした. BCR のメカニズムは, BCR は TNF- α 刺激によって活性化した CK2 α と結合し, BCR の 177 番目のチロシン (Y177) がリン酸化することにより NF- κ B p65 との結合部位が形成され, BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体となることによって NF- κ B p65 の 529 番目のセリン (S529) がリン酸化され, NF- κ B 経路の標的遺伝子が発現するというものである(Meng et al. 2016). TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞に対して TNF- α で刺激を与え, BCR Y177, CK2 α Y360 及び NF- κ B p65 S529 のリン酸化とその分解について WB で経時的に評価したところ, TMEM147 のノックダウンによって BCR Y177, CK2 α Y360 及び NF- κ B p65 S529 のリン酸化は減弱した (図 19A, 19B, 19C). この結果から, TMEM147 は BCR-CK2 α -NF- κ B p65 経路に関与していることが示唆された.

続けて, 免疫沈降法 (IP) と WB により, TMEM147 と BCR, CK2 α , NF- κ B p65 との関係を解析することとした. HEK293T 細胞に Flag タグ融合 TMEM147 を強制発現させ, その細胞融解液に対して Flag ビーズを用いた IP を行い, 抗 BCR 抗体, 抗 CK2 α 抗体, 抗 NF- κ B p65 抗体で WB を行った. 結果, TMEM147 は BCR 及び NF- κ B p65 と結合する一方, CK2 α とは結合しないことが明らかとなった (図

20).

最後に、TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞における BCR-NF- κ B p65 複合体のあり方を、IP と WB により解析した。先に作出した TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞の細胞融解液に対して抗 NF- κ B p65 抗体を用いて IP を行い、抗 NF- κ B p65 抗体、抗 BCR 抗体で WB を行った。結果、TMEM147 のノックダウンにより、BCR と NF- κ B p65 の結合が減弱することが示された (図 21)。以上の結果から、TMEM147 は BCR-NF- κ B p65 複合体形成の足場タンパクとして働き、炎症回路のうち NF- κ B 経路を制御していることが示唆された。

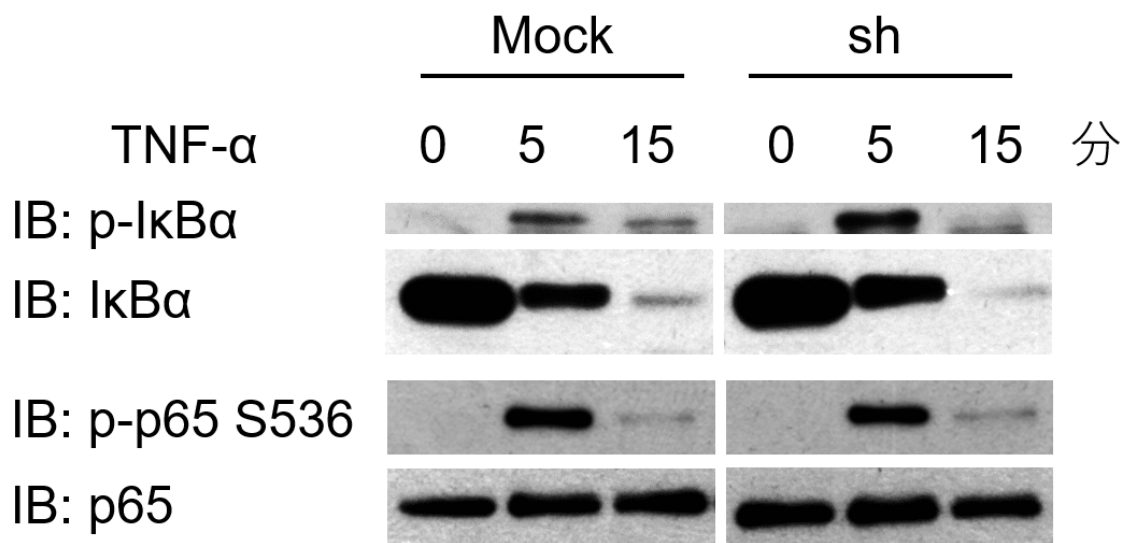
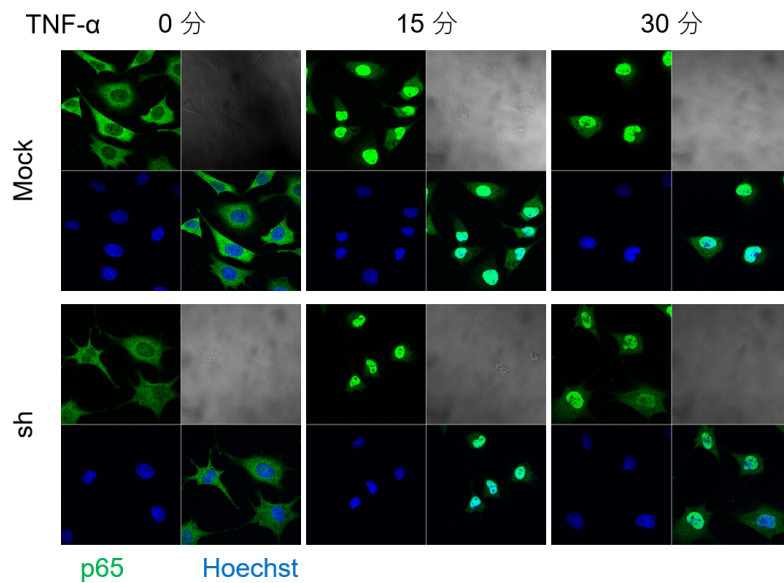


図 17. TMEM147 ノックダウンによる, I κ B α 及び NF- κ B p65 S536 リン酸化の経時的変化

TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞に対して, TNF- α で刺激を与えた. 刺激後 0 分, 5 分, 15 分で細胞を融解してサンプルを回収し, WB によりリン酸化 I κ B α , NF- κ B p65 S536 を評価した. 3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

A



B

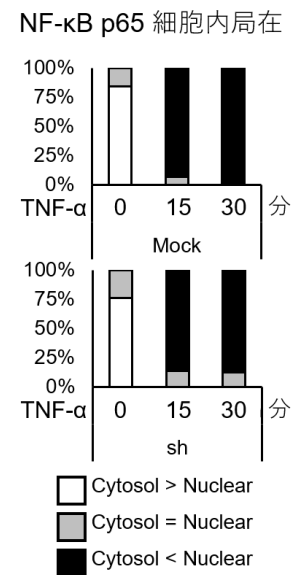


図 18. TMEM147 ノックダウンによる, NF-κB p65 細胞内局在の経時的変化

TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞を TNF-α で刺激し, 刺激後 0 分, 15 分, 30 分における NF-κB p65 の細胞内局在を, 共焦点レーザー顕微鏡によって観察し評価した. (A) 代表像, (B) 各サンプルにおいて細胞 100 個以上を計測し, NF-κB p65 の細胞内局在を定量化した.

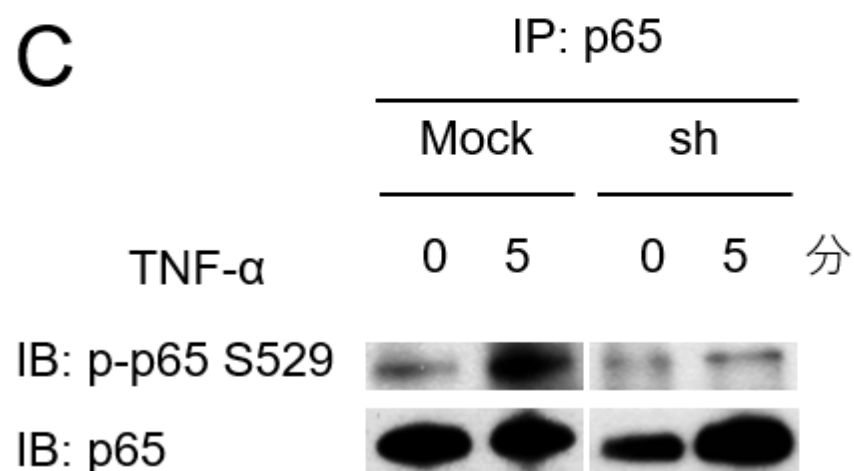
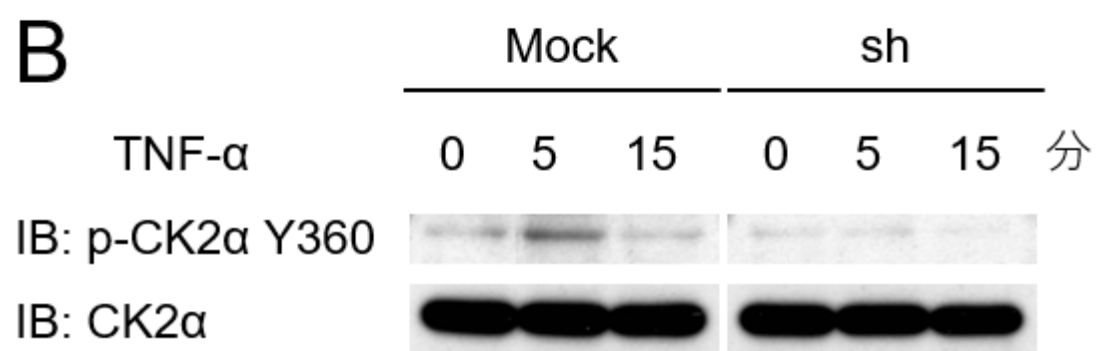
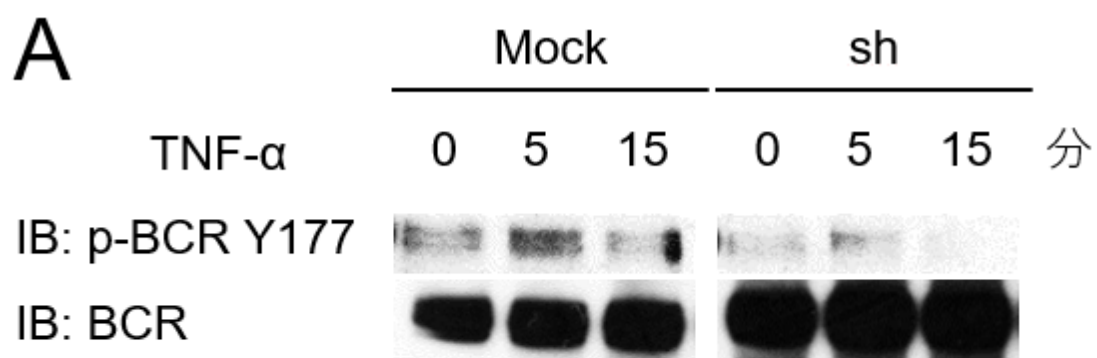


図 19. TMEM147 ノックダウンによる, BCR Y177, CK2 α Y360 及び NF- κ B p65 S529 リン酸化の経時的変化

TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞に対して TNF- α で刺激を与えた. 刺激後に細胞を融解してサンプルを回収し, WB により BCR Y177, CK2 α Y360 及び NF- κ B p65 S529 を評価した. 3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

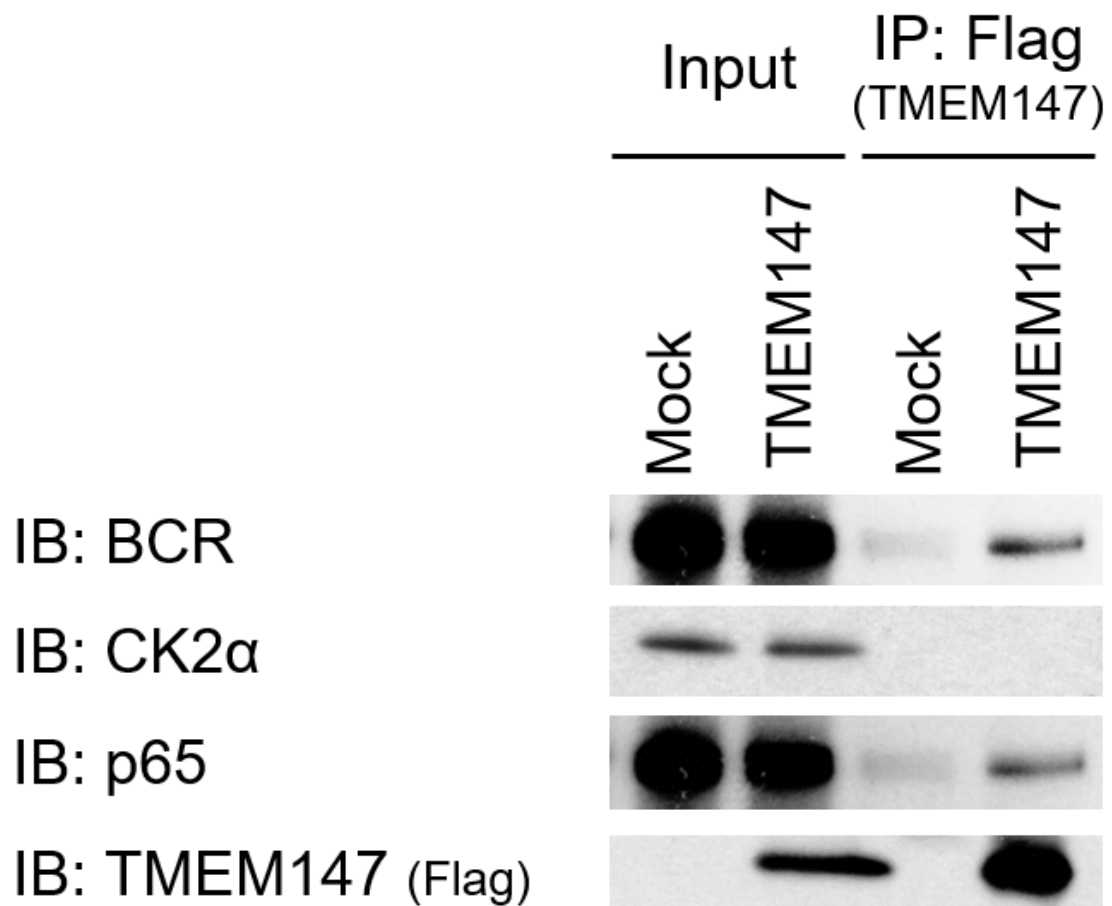


図 20. TMEM147 と BCR, CK2 α 及び NF- κ B p65 との結合

HEK293T 細胞に Flag タグ融合 TMEM147 を強制発現させ、その細胞融解液に対して Flag ビーズを用いた IP を行い、サンプルを回収した. 抗 BCR 抗体, 抗 CK2 α 抗体, 抗 NF- κ B p65 抗体で WB を行うことにより, TMEM147 との結合を評価した. 3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

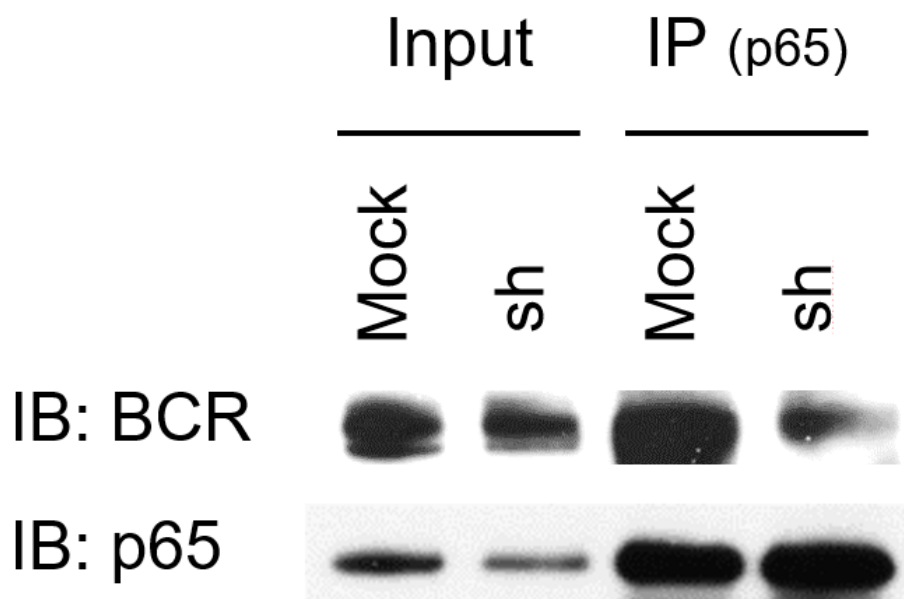


図 21. TMEM147 ノックダウンによる BCR と NF- κ B p65 との結合

TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞の細胞融解液に対して，抗 NF- κ B p65 抗体を用いて IP を行い，サンプルを回収した．抗 BCR 抗体及び抗 NF- κ B p65 抗体で WB を行うことにより，BCR と NF- κ B p65 との結合を評価した．3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す．

5. 抗 TMEM147 抗体投与は、炎症回路を抑制する

これまでの実験により、軟骨細胞における TMEM147 が BCR-NF- κ B 複合体の足場タンパクとなって NF- κ B 経路を制御し、炎症回路を活性化していることが示された。よって、TMEM147 が本当に治療標的となりうるのかどうかを検討するため、抗 TMEM147 抗体を用いた治療効果実験を行うこととした。

TMEM147 の構造については Dettmer らにより 7 回膜貫通型タンパクであると報告されている (Dettmer et al. 2010)。そこで我々は、Dettmer らの報告をもとに、TMEM147 の膜外成分のうちで 4, 5 回目の膜貫通部に挟まれた部分 (amino acids 121-136 VGARGIEFDWKYIQMSC) に対する抗 TMEM147 抗体を作成した (図 22)。

作成した抗 TMEM147 抗体が、治療効果を示すか精査するため、マウス前軟骨細胞株 ATDC5 細胞に対して IL-6 と IL-17 のサイトカイン刺激を行うと同時に、抗 TMEM147 抗体を添加して、IL-6 及び NF- κ B 経路の標的遺伝子である CXCL1 の発現を mRNA レベル (qPCR による) で測定した。結果、IL-6 及び CXCL1 の発現は、抗 TMEM147 抗体投与により有意に抑制されることが示された (図 23A, 23B)。さらに、IL-6 の産生についてはタンパクレベル (ELISA による) でも測定し、qPCR の結果と同様に抗 TMEM147 抗体投与によって有意に抑制されることを確認した (図 24)。ELISA と同時に MTT assay を行って細胞数を評価しており、IL-6 の産生低下が細胞数に影響されるものでないことを確認している (図 24)。

最後に、in vivo での検討として、サイトカイン誘導性関節炎モデルを用いた実験を行った。具体的には、F759 マウスの足関節腔内に作成した抗 TMEM147 抗体もしくは生理食塩水 (コントロール) を投与すると同時に、炎症回路を活性化させる IL-6 及び IL-17 を投与して、サイトカイン誘導性関節炎を発症させた。結果、抗 TMEM147 抗体投与マウスにおいて、有意にクリニカルスコアの増悪が抑制された (図 25)。

以上の結果から、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。

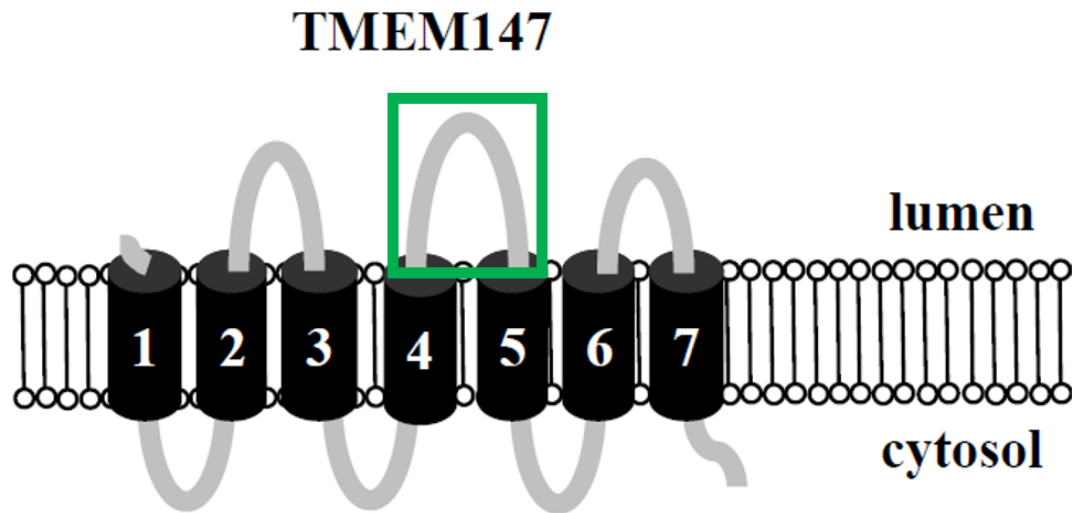


図 22. TMEM147 の構造

TMEM147 は 7 回膜貫通型タンパクと報告されている (Dettmer et al. 2010). 図の緑線で囲まれた部位に対する抗体を作成し, 治療効果実験に用いた (Dettmer et al. 2010) より一部改変).

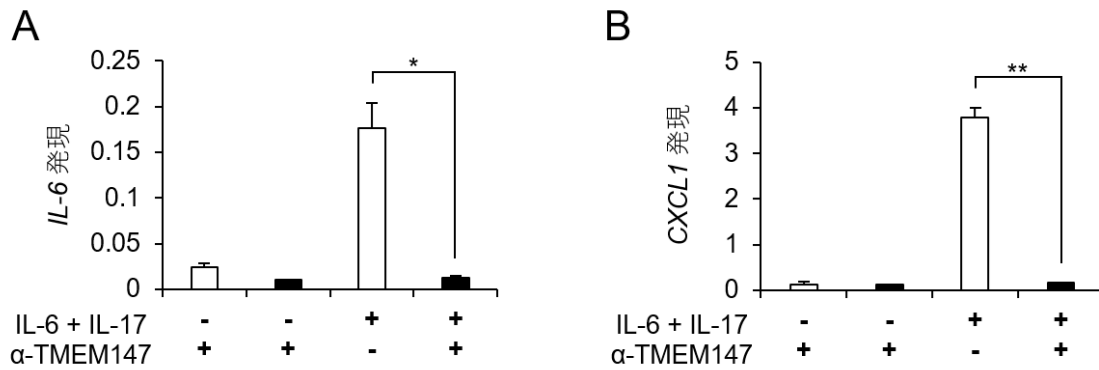


図 23. 抗 TMEM147 抗体による炎症回路標的の抑制 (mRNA レベル)

ATDC5 細胞に対して IL-6 及び IL-17 で刺激すると同時に、抗 TMEM147 抗体を添加した. (A) IL-6 mRNA 発現量, (B) CXCL1 mRNA 発現量を示す. データは 3 回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, *は $p < 0.05$ を, **は $p < 0.01$ を示す.

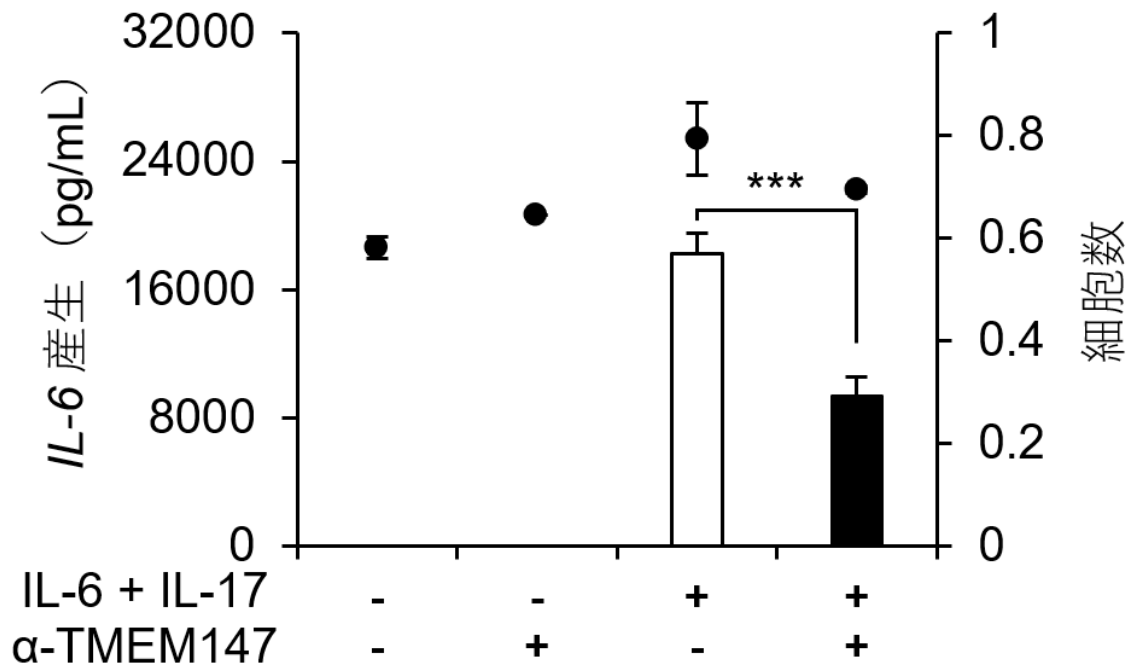


図 24. 抗 TMEM147 抗体による炎症回路の抑制 (タンパクレベル)

ATDC5 細胞に対してヒト IL-6 及び IL-17 で刺激すると同時に、抗 TMEM147 抗体を添加した. IL-6 産生量を示す. IL-6 タンパク質レベルはマウス IL-6 特異的な ELISA を用いており、ヒト IL-6 との交差反応はない. ドットプロットは、MTT assay で計測された相対細胞数である. データは 3 回繰り返した実験結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示され、***は $p < 0.001$ を示す.

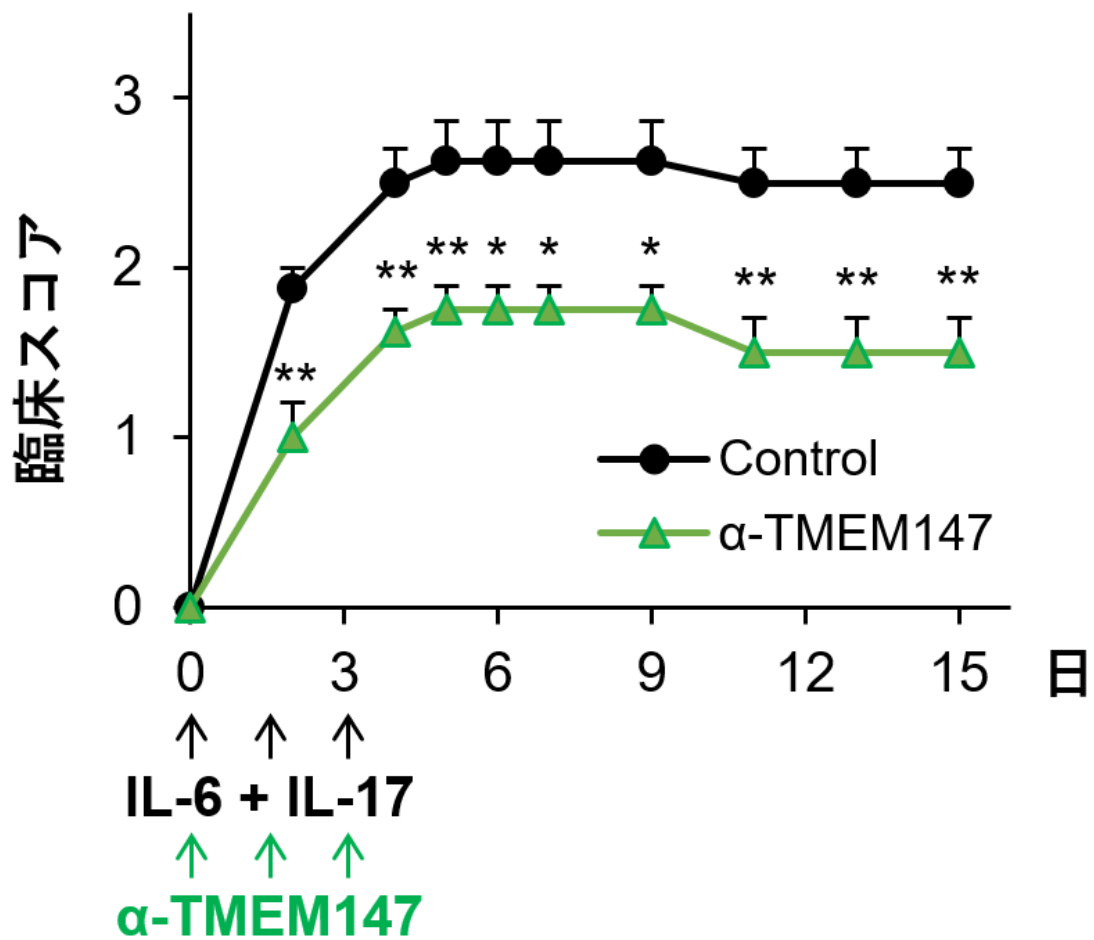


図 25. 抗 TMEM147 抗体の関節腔内投与によるサイトカイン誘導性関節炎の抑制

F759 マウスの足関節腔内に抗 TMEM147 抗体もしくは生理食塩水 (コントロール) を投与すると同時に, IL-6 及び IL-17 を投与してサイトカイン誘導性関節炎を発症させ, 各個体について臨床スコアを評価した. データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示され, * は $p < 0.05$ を, ** は $p < 0.01$ を示す.

考察

OA 及び RA において、軟骨細胞から産生された MMPs, ADAMTS が軟骨基質を分解変性させることは広く知られている (Pap and Korb-Pap 2015). しかしながら, MMPs に対するインヒビター治療の臨床試験は, 残念ながらほぼ失敗に終わっているのが現状である (Krzieski et al. 2007). 滑膜細胞をはじめとする 1 型コラーゲン陽性細胞や, 種々の免疫細胞は OA や RA といった関節炎に関与していることが知られている (Pap and Korb-Pap 2015, Orr et al. 2017). 一方で軟骨細胞自体が, MMPs や ADAMTS を介さずに OA や RA の発症や増悪に関わるかどうかについてはよくわかっていない.

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にした.

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 モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者の全てにおいて確認され, 加えて, 軟骨細胞特異的に STAT3 をノックアウトすることにより NF- κ B 経路と STAT3 経路の同時活性化が妨げられた軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウス (Col2a1-STAT3^{fl/fl} F759 mice) において, その関節炎が有意に抑制された (図 5). これらの結果は, 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.

加えて, 先行研究において施行された RNAi を基盤としたゲノムワイドスクリーニングにより同定された炎症回路関連遺伝子 (Murakami et al. 2013) の中から TMEM147 を見出し, 炎症回路を制御する分子としてその治療可能性を検討した実験として行い, RA モデルマウス (F759) に対する TMEM147 ノックダウン実験 (TMEM147 shRNA 関節腔内投与による) 及び TMEM147 抑制実験 (抗 TMEM147 抗体関節腔内投与による) のいずれにおいても, 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の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 (図 16, 25). もちろん, TMEM147 ノックダウン実験, TMEM147 抑制実験, そのいずれにおいても関節腔内に投与していることから, 軟骨細胞以外の細胞に存在する TMEM147 が関与している可能性も否定はできない. しかし, OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者の全てにおいて TMEM147 が軟骨細胞に存在していることは示しており (図 8A, 8B), またマウス前軟骨細胞株 ATDC5 及び初代培養ヒト軟骨を用いた実験により TMEM147 は NF- κ B 経路に関与していることも示されたことから (図 9-15, 17-21), 軟骨細胞に存在する TMEM147 も関与していることが示唆されたと考える.

興味深い点は, OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者の全てにおいて軟骨細胞の TMEM147 の発現が増強している点だが (図 8A, 8B), マウス前

軟骨細胞株 ATDC5 細胞及び初代培養ヒト軟骨細胞に対する IL-6 と IL-17 もしくは TNF- α の刺激では, TMEM147 の mRNA 発現に変化が見られなかった点である (図 9, 13). OA 及び RA において, 何が TMEM147 の発現を高め, 炎症回路を活性化しているのかについては, さらなる研究が必要である.

既報によれば, TMEM147 は種々の膜タンパクと結合することが報告されている. 具体的には, Rosemond らは TMEM147 が M3 muscarinic acetylcholine receptor と結合してこれを負に制御していることを報告しており (Rosemond et al. 2011), Dettmer らは TMEM147 が Nicastrin-like protein-Nodal modulator の構成要素であることを報告している (Dettmer et al. 2010). また, 酵母において TMEM147 が CLN8 及び GLP1R と結合していること (Huang et al. 2013, Passantino et al. 2013) が報告されている. 本研究において我々は, 新たに TMEM147 が BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体 (Meng et al. 2016) と結合することを明らかとし (図 20), さらに BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体形成を増強することを示した (図 21). さらに, TMEM147 の膜外成分に対する抗 TMEM147 抗体を作成し (図 22) それが *in vitro* において炎症回路を抑制し (図 23, 24), *in vivo* において RA モデルマウスのクリニカルスコア増悪を抑制すること (図 25) が示された. これらの結果から我々は, TMEM147 の膜外成分に対する抗 TMEM147 抗体の結合が BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体形成を妨げることにより, NF- κ B 経路の活性化を抑制しているのではないかと考えている. その精緻なメカニズムについてはさらなる研究が必要であるが, TMEM147 に対する抗体療法は十分な創薬可能性を秘めていると考える.

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, BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体による炎症メカニズム (Meng et al. 2016) についてさらに深化させ, TMEM147 の新たな機能について明らかとしたものである (図 26). 本研究の結果から導き出されるのは, 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, 新たな治療戦略の提案である.

関節炎 (OA / RA)

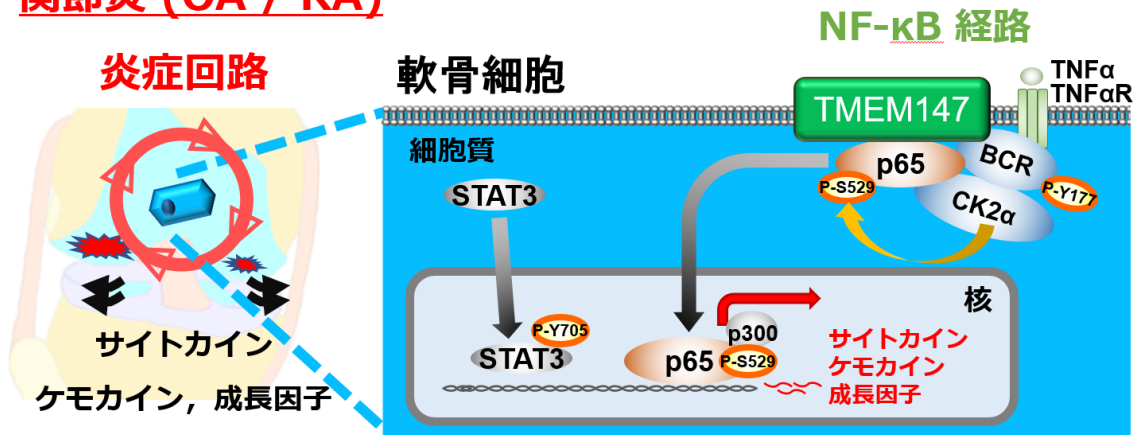


図 26. 関節炎における炎症回路と，TMEM147 によるその制御

関節炎 (OA 及び RA) における炎症回路と，TMEM147 によるその制御につき，模式図を示す．関節炎 (OA 及び RA) の軟骨細胞には炎症回路が存在しており，膜タンパクである TMEM147 は BCR-CK2α-NF-κB p65 複合体形成の足場として働くことにより，炎症回路の NF-κB 経路を活性化する．その結果，IL-6 をはじめとした種々の炎症性サイトカインやケモカイン等の産生が亢進することとなり，恒常性の破たんから関節炎 (OA 及び RA) を引き起こす．

総括および結論

- 軟骨細胞には炎症回路活性化能が存在する.
- OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者の軟骨細胞では, 炎症回路が活性化している.
- 軟骨細胞の炎症回路をノックアウトすることで, RA モデルマウスの臨床スコア増悪は抑制される.
- OR モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者及び RA 患者の軟骨細胞では, TMEM147 の発現が増強している.
- RA モデルマウスに対する足関節特異的 TMEM147 ノックダウンは, 臨床スコア増悪を抑制する.
- 軟骨細胞の TMEM147 は, BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体形成の足場として働くことにより, 炎症回路の NF- κ B 経路を活性化する.
- RA モデルマウスに対する抗 TMEM147 抗体の関節腔内投与は, 臨床スコアの増悪を抑制する.

現在、OA や RA をはじめとした関節炎の病態については依然として不明な点が多く、十分な治療法が確立しているとはいえない。これまでに、関節の重要な構成要素である軟骨細胞と炎症回路の関係を報告したものはなく、また TMEM147 と慢性炎症との関係を報告したものもない。

本研究では、初代培養ヒト及びマウスの軟骨細胞に加えてマウス前軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いた *in vitro* 研究と、OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者, RA 患者の軟骨組織を用いた *ex vivo* 研究によって、軟骨細胞自体に炎症回路が存在することを明らかとした。さらに、軟骨細胞特異的炎症回路抑制マウスを作出することにより、軟骨細胞の炎症回路が関節炎増悪に関与することを *in vivo* 研究で示した。また、OA モデルマウス, RA モデルマウス, OA 患者, RA 患者の軟骨組織を用いた *ex vivo* 研究によって、軟骨細胞の TMEM147 発現が増強していることを発見し、TMEM147 ノックダウン ATDC5 細胞を用いた *in vitro* 研究によって、TMEM147 が BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体形成の足場として働くことにより、炎症回路の NF- κ B 経路を活性化することを明らかにした。さらに、RA モデルマウスに対する足関節特異的 TMEM147 ノックダウンと、抗 TMEM147 抗体の関節腔内投与による *in vivo* 研究により、TMEM147 に対する抗体療法の臨床応用の可能性を示した。

本研究の問題点は、抗 TMEM147 抗体が具体的にどのような分子メカニズムをもって炎症回路を抑制しているのかが不明な点、OA 及び RA において TMEM147 の発現がいかんして増強するのかについては明らかとなっていない点である。今後はまず、

ATDC5 細胞に対して IL-6 及び IL-17 刺激を与えると同時に抗 TMEM147 抗体を添加した後, IP 及び WB を行うことで BCR-CK2 α -NF- κ B p65 複合体の形成が阻害されるかどうかを検討していく予定である. また, TMEM147 の発現が増強している OA 患者及び RA 患者の軟骨組織に対して RNA シーケンスを行うことによって, TMEM147 の発現増強に関わる分子の同定を進めていきたいと考えている.

謝辞

稿を終えるにあたり，研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に深い謝意を表します．

本研究全般にわたりご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野・村上正晃教授に深い謝意を表します．また，直接のご指導を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野・上村大輔講師，同・田中勇希助教，元北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野・有馬康伸助教に心より感謝いたします．さらに，各種研究材料を提供していただきました北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・近藤英司特任教授，同・小野寺智洋講師，同・河村太介助教に深く感謝いたします．

最後に本研究を遂行するにあたり，数々のご助言，ご協力，ご支援頂きました，北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室及び，北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野のすべてのみなさまに，心より御礼申し上げます．

利益相反

日本語： 開示すべき利益相反状態はない。

英 語： The author declares no conflict of interest.

引用文献

Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S. J., Saeki, Y., Kitamura, Y. et al. (2002). "A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis." *J Exp Med* 196(7): 979-990.

Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., Yamada, M., Harada, M., Jiang, J. J., Kamimura, D. et al. (2014). "Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology." *Cancer Res* 74(1): 8-14.

Atsumi, T., Suzuki, H., Jiang, J. J., Okuyama, Y., Nakagawa, I., Ota, M., Tanaka, Y., Ohki, T., Katsunuma, K., Nakajima, K. et al. (2017). "Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b." *Int Immunol* 29(12): 581-591.

Dettmer, U., Kuhn, P. H., Abou-Ajram, C., Lichtenthaler, S. F., Kruger, M., Kremmer, E., Haass, C. and Haffner, C. (2010). "Transmembrane protein 147 (TMEM147) is a novel component of the Nicalin-NOMO protein complex." *J Biol Chem* 285(34): 26174-26181.

Ghosh, S. and Hayden, M. S. (2008). "New regulators of NF-kappaB in inflammation." *Nat Rev Immunol* 8(11): 837-848.

Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. and Gage, F. H. (2010). "Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration." *Cell* 140(6): 918-934.

Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S. and Jacques, C. (2008). "Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes." *Nat Protoc* 3(8): 1253-1260.

Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R. et al. (2015). "Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development." *J Immunol* 194(3): 1039-1046.

Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444(7121): 860-867.

Huang, X., Dai, F. F., Gaisano, G., Giglou, K., Han, J., Zhang, M., Kittanakom, S., Wong, V., Wei, L., Showalter, A. D. et al. (2013). "The identification of novel proteins that interact with the GLP-

1 receptor and restrain its activity." *Mol Endocrinol* 27(9): 1550-1563.

Krzeski, P., Buckland-Wright, C., Balint, G., Cline, G. A., Stoner, K., Lyon, R., Beary, J., Aronstein, W. S. and Spector, T. D. (2007). "Development of musculoskeletal toxicity without clear benefit after administration of PG-116800, a matrix metalloproteinase inhibitor, to patients with knee osteoarthritis: a randomized, 12-month, double-blind, placebo-controlled study." *Arthritis Res Ther* 9(5): R109.

Lee, J., Nakagiri, T., Kamimura, D., Harada, M., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, Y., Inoue, M., Miyoshi, S., Morii, E. et al. (2013). "IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation." *Int Immunol* 25(5): 319-332.

Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S., Okumura, M. et al. (2012). "IL-6 amplifier, NF-kappaB-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses." *J Immunol* 189(4): 1928-1936.

Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C. and Athanasiou, K. A. (2015). "Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage." *Nat Rev Rheumatol* 11(1): 21-34.

Meng, J., Jiang, J. J., Atsumi, T., Bando, H., Okuyama, Y., Sabharwal, L., Nakagawa, I., Higuchi, H., Ota, M., Okawara, M. et al. (2016). "Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II." *J Immunol* 197(8): 3111-3119.

Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J. J., Atsumi, T. et al. (2013). "Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop." *Cell Rep* 3(3): 946-959.

Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y. et al. (2011). "Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells." *J Exp Med* 208(1): 103-114.

Narimatsu, M., Maeda, H., Itoh, S., Atsumi, T., Ohtani, T., Nishida, K., Itoh, M., Kamimura, D., Park, S.-J., Mizuno, K. et al. (2001). "Tissue-Specific Autoregulation of the stat3 Gene and Its Role in Interleukin-6-Induced Survival Signals in T Cells." *Molecular and Cellular Biology*

21(19): 6615-6625.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y. and Hirano, T. (2008). "Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction." *Immunity* 29(4): 628-636.

Orr, C., Vieira-Sousa, E., Boyle, D. L., Buch, M. H., Buckley, C. D., Canete, J. D., Catrina, A. I., Choy, E. H. S., Emery, P., Fearon, U. et al. (2017). "Synovial tissue research: a state-of-the-art review." *Nat Rev Rheumatol* 13(10): 630.

Ospelt, C. and Frank-Bertoncelj, M. (2016). "Epigenetics: New insights into site-specific variations in RA and OA." *Nat Rev Rheumatol* 12(9): 506-507.

Ota, M., Kamimura, D., Nakagawa, I., Higuchi, H., Tanaka, Y., Fujita, M., Hiratsuka, S., Okawara, M., Murakami, K., Atsumi, T. et al. (2017). Control of chronic inflammation by the inflammation amplifier and gateway reflexes. *Advances in Medicine and Biology*. V. L. Berhardt, Nova Science Pub Inc. 104: 65-86.

Pap, T. and Korb-Pap, A. (2015). "Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis--two unequal siblings." *Nat Rev Rheumatol* 11(10): 606-615.

Passantino, R., Cascio, C., Deidda, I., Galizzi, G., Russo, D., Spedale, G. and Guarneri, P. (2013). "Identifying protein partners of CLN8, an ER-resident protein involved in neuronal ceroid lipofuscinosis." *Biochim Biophys Acta* 1833(3): 529-540.

Rosemond, E., Rossi, M., McMillin, S. M., Scarselli, M., Donaldson, J. G. and Wess, J. (2011). "Regulation of M(3) muscarinic receptor expression and function by transmembrane protein 147." *Mol Pharmacol* 79(2): 251-261.

Sawa, S., Kamimura, D., Jin, G. H., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Ishihara, K., Murakami, M. and Hirano, T. (2006). "Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4⁺ T cells." *J Exp Med* 203(6): 1459-1470.

Stoop, R., van der Kraan, P. M., Buma, P., Hollander, A. P., Billinghamurst, R. C., Poole, A. R. and

van den Berg, W. B. (1999). "Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice." *Arthritis Rheum* 42(11): 2381-2389.

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T. and Akira, S. (1998). "Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice." *The Journal of Immunology* 161(9): 4652-4660.

Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A. and Griffin, J. D. (2007). "Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia." *Nat Rev Cancer* 7(5): 345-356.