



Title	線維芽細胞様滑膜細胞におけるFarnesyltransferase inhibitorのRasGRP4-Ras蛋白質間相互作用の抑制効果の検討
Author(s)	嶋村, 抄苗
Description	配架番号 : 2534
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14069号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14069
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78288
Type	doctoral thesis
File Information	Sanae_Shimamura.pdf



学 位 論 文

線維芽細胞様滑膜細胞における

Farnesyltransferase inhibitor の

RasGRP4-Ras 蛋白質間相互作用の抑制効果の検討

(Farnesyltransferase inhibitor suppresses
the RasGRP4 and Ras interaction of fibroblast-like
synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

嶋 村 抄 苗

学 位 論 文

線維芽細胞様滑膜細胞における

Farnesyltransferase inhibitor の

RasGRP4-Ras 蛋白質間相互作用の抑制効果の検討

(Farnesyltransferase inhibitor suppresses

the RasGRP4 and Ras interaction of fibroblast-like
synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

嶋 村 抄 苗

目次

発表論文目録および学会発表目録.	1
1. 要旨	3
2. 略語表	5
3. 緒言	7
3.1 関節リウマチ	7
3.2 線維芽細胞様滑膜細胞	9
第一章	11
4. 緒言	11
4.1 HEK-293 細胞における RasGRP4 強制発現による MAPK シグナル伝達経路の 変化	14
4.1.1 方法.....	14
4.1.2 結果.....	15
4.1.3 考察.....	16
4.2 FLS における RasGRP4 強制発現による MAPK シグナル伝達経路の変化...	17
4.2.1 方法.....	17
4.2.1.1 FLS の分離	17
4.2.1.2 FLS を用いた RasGRP4 のトランスフェクション	19
4.2.1.3 RasGRP4 を強制発現した FLS のウェスタンブロッティング	22
4.2.1.4 結果.....	23
4.3 ヒト滑膜組織における MAPK 活性化の評価	24
4.3.1 方法.....	24
4.3.2 結果.....	25
4.3.3 考察.....	28
4.4 FLS における RasGRP4 強制発現と細胞増殖能.....	29
4.4.1 方法.....	30
4.4.2 結果.....	31
4.5 FLS における Duolink Proximity Ligation assay (PLA) 法を用いた RasGRP4 と Ras の蛋白質間相互作用の解析.....	32
4.5.1 方法.....	32
4.5.2 結果.....	33
4.6 考察	34

第二章	37
5. 緒言	37
5.1 Tipifarnib が FLS の増殖能に与える影響	41
5.1.1 方法	41
5.1.2 結果	42
5.2. Tipifarnib が RasGRP4-Ras の蛋白質間相互作用に与える影響	43
5.2.1 方法	43
5.2.2 結果	44
5.3. Tipifarnib が関節炎モデルマウスに与える影響	45
5.3.1 方法	45
5.3.2 結果	46
5.3.3 再実験	49
5.3.4 考察	51
5.4 考察	52
6. 総合考察	53
7. 結論	55
8. 謝辞	56
9. 利益相反	57
10. 引用文献	58

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文に発表した。

Nakamura H*, Shimamura S*, Yasuda S, Kono M, Kono M, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Shimizu T, Iwasaki N, Atsumi T. Ectopic RASGRP2 (CalDAG-GEFI) expression in rheumatoid synovium contributes to the development of destructive arthritis. Ann Rheum Dis. 2018;77:1765-1772.

* Contributed equally

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Shimamura S, Yasuda S, Shimizu Y, Kono M, Kato M, Bohgaki T, Horita T, Atsumi T. Ectopic expression of RasGRP4 plays a critical role in inflammatory arthritis via phosphorylation of Erk and p38-MAPK
第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月18-20日、札幌
2. Sanae Shimamura, Shinsuke Yasuda, Michihiro Kono, Hiroyuki Nakamura, Michihito Kono, Yuka Shimizu, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi
RasGRP4 induces proliferation of fibroblast-like synoviocytes via Ras-MAPK pathway
第61回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017年4月20-22日、東京
3. Sanae Shimamura, Shinsuke Yasuda, Michihito Kono, Yuka Shimizu, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tatsuya Atsumi, Inhibition of Ras translocation suppresses RasGRP4-induced proliferation of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis,
The 7th East Asian Group of Rheumatology. Tokyo, 7-8 July 2017

4. Sanae Shimamura, Shinsuke Yasuda, Michihito Kono, Michihiro Kono , Shun Tanimura , Eri Sugawara , Ryo Hisada, Hiroyuki Nakamura, Kazumasa Ohmura, Yuka Shimizu, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tatsuya Atsumi, RasGRP4 expression in rheumatoid synovium plays a critical role via Ras- MAPK pathway
The 12th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus (LUPUS 2017) & the 7th Asian Congress on Autoimmunity (ACA)
- 5 Sanae Shimamura, Shinsuke Yasuda, Michihiro Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi , Farnesyltransferase inhibitor suppresses the RasGRP4 and Ras interaction of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis,
第47回日本免疫学会総会・学術集会、2018年12月12日、福岡
- 6 Sanae Shimamura, Shinsuke Yasuda, Michihiro Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi , Farnesyltransferase inhibitor suppresses the RasGRP4-Ras- MAP kinase pathway in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis,
第47回日本臨床免疫学会総会、2019年10月17日、札幌

1. 要旨

【背景と目的】

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性疾患である。関節滑膜に T 細胞、マクロファージ、B 細胞が浸潤し、滑膜の炎症をひきおこし、tumor necrosis factor alpha (TNF α)、interleukin-6 (IL-6)などの炎症性サイトカインが産生される。さらに炎症性サイトカインにより、滑膜でマクロファージ様滑膜細胞と線維芽細胞様滑膜細胞(fibroblast-like synoviocytes: FLS)が増殖しパニヌスを形成する。FLS が matrix metalloproteinase (MMP)などの化学物質を産生することで軟骨破壊を促進し、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)の発現を介して破骨細胞の分化を促進し、骨・軟骨破壊をきたすと考えられているが、未だその病態には不明な点も多い。

炎症性滑膜組織において、関節組織を侵食する腫瘍様のパニヌスと呼ばれる肉芽組織が RA のひとつの特徴であり、そのパニヌスを形成する主要な細胞は FLS とマクロファージである。FLS は MMP や RANKL、IL-6、vascular endothelial growth factor A (VEGF)など種々のサイトカインやケモカインを産生し、RANKL、MMP などの産生を増やし、骨・軟骨破壊に関わっている。

我々は RA の滑膜組織において RasGRP4 の発現が亢進しており、RasGRP4 の遺伝子発現量が FLS の増殖能と相関することを報告した。RA の滑膜組織では Ras の活性化および、pERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-Jun N-terminal kinase)、p38 のいずれの MAPK 経路も活性化していることが知られているが、RasGRP4 が FLS の増殖に関与するメカニズムは未だ不明である。我々は、RasGRP4 が FLS の増殖を促進する分子生物学的機構を解明することを、本研究の第一の目的とした。

RasGRP4 阻害薬は未だに存在しないため、Ras 阻害薬の FTI (farnesyl transferase inhibitors) の一種である Tipifarnib が RasGRP4-Ras 蛋白間相互作用に及ぼす影響、Tipifarnib が FLS の増殖能に与える影響について検討した。最後に Tipifarnib の関節炎モデルマウス対する治療効果を検討し、Tipifarnib の関節炎抑制効果について検討することとした。

【対象と方法】

最初に RasGRP4 を発現していない HEK293 細胞に RasGRP4 発現ベクター、空ベクターのトランスフェクションを行い、下流の Raf/MEK/ERK、p38、JNK のリン酸化蛋白の発現に関して比較検討した。次に、FLS に RasGRP4 発現ベクター、空ベクターのトランスフェクションを行い、下流の ERK、p38、JNK のリン酸化蛋白の

発現に関して比較検討した。ヒト滑膜組織の連続切片を用いて、抗 RasGRP4 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体を用いて、免疫組織化学染色をすることでこれらの蛋白の発現に関して解析をおこなった。継代を経て RasGRP4 の発現が低下した FLS を使用し、空ベクターあるいは RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした。Proximity Ligation assay（近接ライゲーションアッセイ（PLA））にて、RasGRP4 と Ras の蛋白質間相互作用を評価した。

次に、FLS に Tipifarnib を添加し FLS の細胞増殖能の変化、RasGRP4 と Ras の蛋白質間相互作用を評価した。最後に、関節炎モデルマウスにおいて、Tipifarnib の持続皮下投与を 28 日間継続し関節炎スコア、足関節径を測定し関節炎に対する効果を検討した。

【結果】HEK-293 細胞に RasGRP4 を強制発現することにより Raf/MEK/ERK、p38、JNK のリン酸化蛋白の発現が亢進された。FLS に RasGRP4 を強制発現することにより ERK、p38、JNK のリン酸化が亢進され、特に ERK と p38 においてリン酸化が亢進された。RA のヒト滑膜組織において、RasGRP4 陽性部分と一致して、特に phospho-p38 および phospho-JNK の陽性像が得られたが、phospho-ERK は淡く染色された。PLA 法において RasGRP4 を強制発現した群では、空ベクターを強制発現した群と比較して有意に PLA シグナルが増強しており、RasGRP4 強制発現により Ras - RasGRP4 の蛋白質相互作用が確認された。また Tipifarnib は Ras - RasGRP4 の蛋白質相互作用を抑制し、FLS の細胞増殖能を抑制した。関節炎モデルマウスにおいて、Tipifarnib の持続皮下投与を行い、関節炎の発症早期において、Tipifarnib 投与群は、コントロール群と比較し足関節径は有意に低く、関節炎スコアも低い傾向が認められた。

【考察】RasGRP4 の強制発現により、ERK/p38/JNK の主要な MAP キナーゼ・カスケードがいずれもリン酸化・活性化し、特に ERK と p38 のリン酸化亢進し活性化することを示した。RasGRP4 における FLS の増殖には、Ras を介した ERK の活性化が関与していると考えられた。RA のヒト滑膜組織の免疫組織染色では Phosphor-ERK の発現が淡く染色され、治療薬による修飾の影響が考えられた。Tipifarnib は RasGRP4 強制発現による RasGRP4-Ras 間の蛋白質間相互作用を抑制し、Tipifarnib により Ras を介した FLS の増殖を抑制した。Tipifarnib は関節炎発症早期において、関節炎モデルマウスの関節炎を抑制し、その病因より近い新たな治療薬となりうる。

【結論】FLS において RasGRP4 は Ras を活性化し、ERK 経路や p38 経路の活性化し、細胞増殖能を上昇させる。Tipifarnib は Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用を抑制し、FLS の細胞増殖を抑制する。Ras 阻害薬は免疫をほとんど抑制することなく、RA の疾患を制御する画期的な治療薬となり得る。

2. 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。

ACPA	anti-citrullinated peptide antibody
BUC	bucillamine
CRP	C reactive protein
CIA	collagen induced arthritis
DAS28	disease activity score 28
DMARDs	disease-modifying anti-rheumatic drugs
ETN	etanercept
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESR	erythrocyte sedimentation rate
FBS	fetal bovine serum
FLS	fibroblast-like synoviocyte
FTI	farnesyl transferase inhibitors
FTase	farnesyl transferase
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GGPP	geranylgeranyl pyrophosphate
GGTase-I	Geranylgeranyltransferase type I
GGTI	Geranylgeranyltransferase I Inhibitor
GLM	golimumab
HAQ-DI	health assessment questionnaire disability index
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HE	hematoxylin-eosin
HSP-47	heat shock protein 47
IFX	infliximab
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IMDM	iscove' s modified Dulbecco' s medium
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	matrix metalloproteinase
MTX	methotrexate

NA	not available
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate buffered saline
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PLA	proximity Ligation assay
R	correlation coefficient
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RasGRP	Ras guanine nucleotide-releasing protein
Ras-GEF	Ras guanine nucleotide exchange factor
RF	rheumatoid factor
RQ	relative quantification
TCZ	tocilizumab
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

3. 緒言

3.1 関節リウマチ

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性疾患である (McInnes and Schett, 2011) (Aletaha and Smolen, 2018)。RA の罹患頻度は 0.5%、男女比は 1 : 3 程度で 60 歳代に最も多い (Myasoedova et al., 2010)。RA の発症は、何らかの滑膜炎に関連したペプチドが樹状細胞などの抗原提示細胞に提示されることで免疫反応が開始されると考えられている (Lebre et al., 2008)。関節滑膜に T 細胞、マクロファージ、B 細胞が浸潤し、滑膜の炎症をひきおこし、tumor necrosis factor alpha (TNF α)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが産生される。さらに炎症性サイトカインにより、滑膜でマクロファージ様滑膜細胞と線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLS) が増殖しパンヌスを形成する (Aletaha and Smolen, 2018)。FLS が matrix metalloproteinase (MMP) などを産生することで軟骨破壊を促進し、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の発現を介して破骨細胞の分化を促進し、骨・軟骨破壊をきたす。また、Th17 細胞から産生される IL-17 が IL-6 と協調して FLS に作用して、さらに、多くの IL-6 を産生するという “IL-17 誘導性の炎症アンブ” が報告されており (Ogura et al., 2008)、FLS は RA の病態の中核を担うと考えられるが、未だその病態には不明な点も多い (Figure1) (Aletaha and Smolen, 2018; Redlich and Smolen, 2012)。

近年、メトトレキサートなどの疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease-modifying anti-rheumatic drugs: DMARDs) や TNF α 阻害薬や IL-6 阻害薬などの生物学的製剤、細胞内シグナル伝達を阻害する JAK 阻害薬の開発により、RA の治療は劇的に進歩したが (Rein and Mueller, 2017)、現行の治療によっても骨破壊、関節破壊による関節の変形を完全には食い止めることができない患者が存在する。また、関節破壊により activities of daily living (ADL) が低下する患者もみられ、薬剤の副作用として易感染性による日和見感染や、コストの高さなど、未だ問題点も多い (Smolen and Aletaha, 2015) (Nakayamada et al., 2016)。RA の病因により近い治療ターゲットとその薬剤開発が求められている。

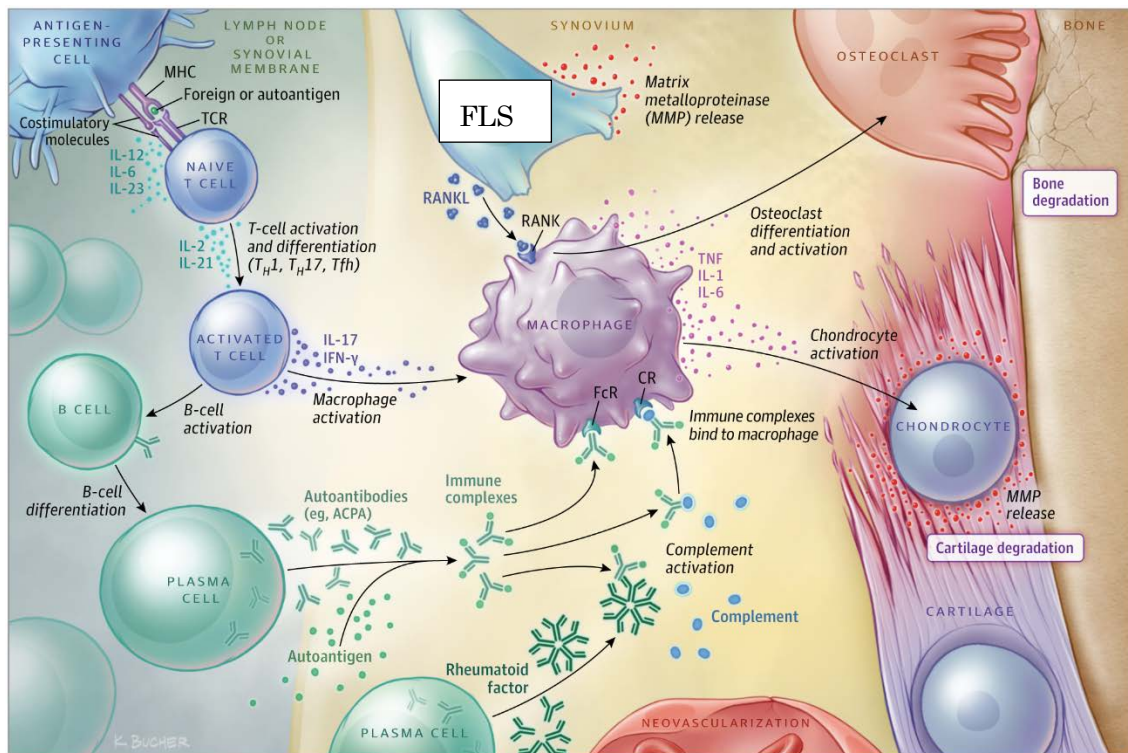


Figure1. 関節リウマチの病態 (Aletaha and Smolen, 2018 より一部改変)
 FLS が MMP などを持生することで軟骨破壊を促進し、RANKL の発現を介して破骨細胞の分化を促進し、骨・軟骨破壊をきたす。

FLS : fibroblast-like synoviocyte

MMP: matrix metalloproteinase

RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

3.2 線維芽細胞様滑膜細胞

滑膜細胞はマクロファージ様滑膜細胞 (type A) と線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS: fibroblast-like synoviocyte (typeB)) に分類される。FLS は健常人の滑膜組織において、滑膜細胞の 75-80% を占め (Smith, 2011)、滑膜組織の三次元的な構造および、滑液の産生において中心的な役割を果たしている (Kiener et al., 2010)。

炎症性滑膜組織において、関節組織を侵食する腫瘍様のパンヌスと呼ばれる肉芽組織が RA のひとつの特徴であり、そのパンヌスを形成する主要な細胞は FLS とマクロファージである (Muller-Ladner et al., 1996; Tolboom et al., 2005)。パンヌスは関節組織を侵食し関節軟骨の変性を引き起こす。炎症性滑膜ではリンパ球、形質細胞やマクロファージの浸潤や血管増生が認められるが、これらの免疫担当細胞をターゲットとした治療は必ずしも有効ではない。マクロファージの浸潤を抑制するケモカインやケモカイン受容体をターゲットとした治療は動物実験では有効性が認められ、ヒトへの臨床応用を期待されたが、ヒトを対象とした臨床試験では期待されていた治療効果は認められなかった (Szekanecz and Koch, 2016)。

heat shock protein-47 (HSP-47) が滑膜において FLS に特異的に存在し、滑膜表層の FLS の面積が関節リウマチの活動性と相関すると報告されている (Izquierdo et al., 2011)。Cadherin-11 は滑膜組織の形成に必須であり、Cadherin-11 ノックアウトマウスでは滑膜組織が低形成で、滑膜炎が起きにくい。さらに関節炎モデルマウスにおいて、Cadherin-11 抗体により滑膜炎は軽減された (Lee et al., 2007)。また、RA の軟骨とパンヌスの接合部位には Cadherin-11 の発現が亢進しており、さらに Cadherin-11 を強制発現させると FLS の侵食能は増大したことから、Cadherin-11 は FLS の侵食に関与していると考えられた (Kiener et al., 2009)。また、FLS は MMP (Kumkumian et al., 1989; Lotz and Guerne, 1991) や RANKL (Hashizume et al., 2008; Shigeyama et al., 2000)、IL-6 (Guene et al., 1989)、vascular endothelial growth factor A (VEGF) (Hashizume et al., 2009) など種々のサイトカインやケモカインを産生し、RANKL、MMP などの産生を増やし、骨・軟骨破壊に関わっている。 (Bottini and Firestein, 2013; Lee et al., 2013) (Figure 2)。

以上より、FLS は RA の病因により近い新規の治療ターゲットとなりうると思われる。

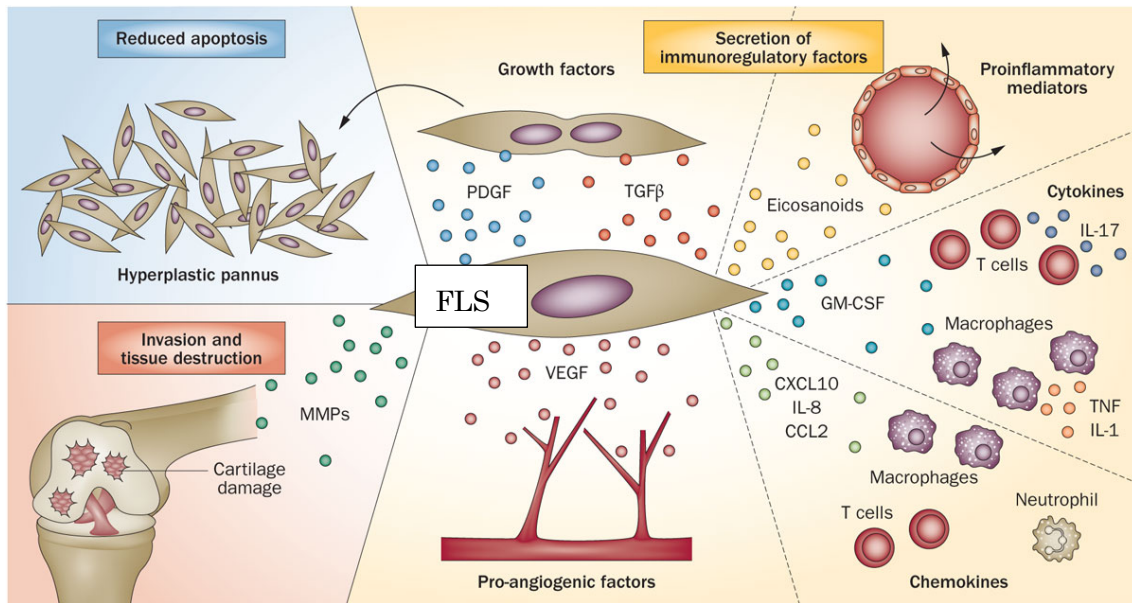


Figure 2. FLS による骨・軟骨破壊の機序 (Bottini and Firestein, 2013 より一部改変)

FLS は種々のサイトカインやケモカインを産生し、RANKL、MMP などの産生を増やし、骨・軟骨破壊に関わっている。

FLS: Fibroblast-like synoviocytes,

MMP: Matrix Metalloproteinase

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

第一章

4. 緒言

Ras guanine nucleotide-releasing protein (RasGRP) family は RasGRP1 から 4 が発見されており Ras exchange motif (REM) –cdc25 unit を持つ Ras guanine nucleotide exchange factor の一種で Ras を活性化する (Figure 3、4)。

RasGRP4 は当初マスト細胞から同定され、マスト細胞の分化・機能において重要な役割が担っていることが示された (Li et al., 2002; Li et al., 2003; Yang et al., 2002)。その後我々は末梢血 CD14 陽性細胞にも発現していることを示し (Hashimoto et al., 2011)、好中球にも発現していることが示された。 (Suire et al., 2012)。

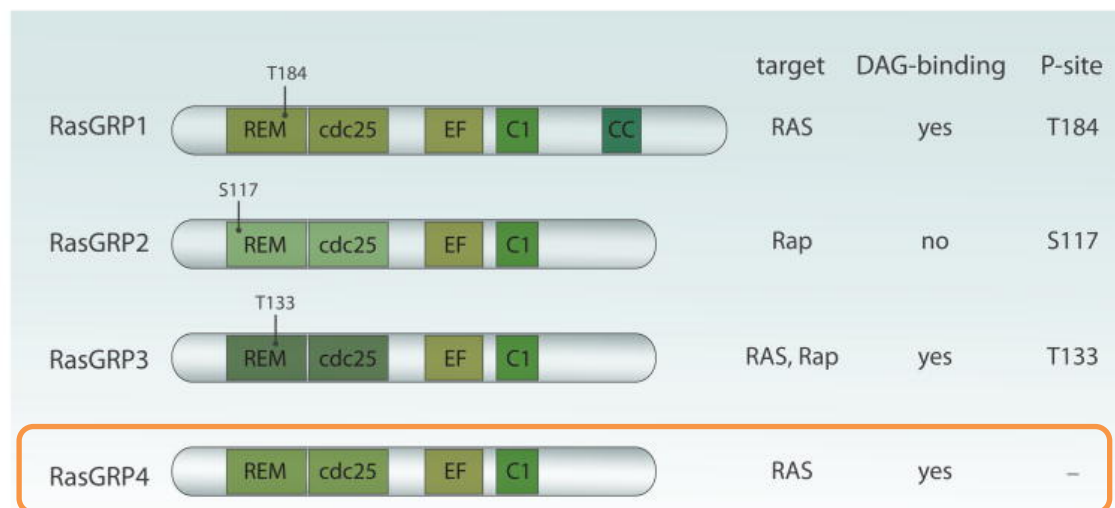


Figure3. RasGRP の構造 (Olga Ksionda et al. Front Biol. 2013 より一部改変)
RasGRP family は REM–cdc25 unit を持つ。

REM: Ras exchange motif

RasGRP : Ras guanine nucleotide-releasing protein

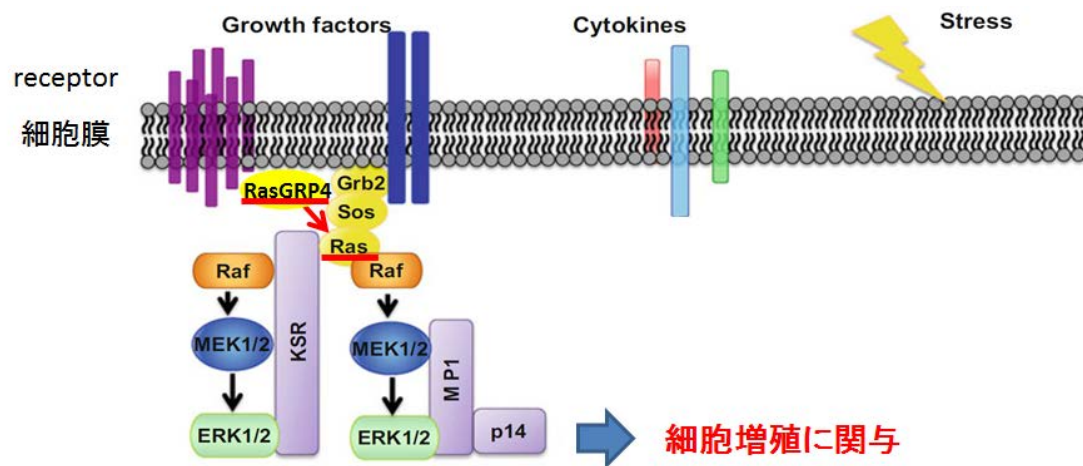


Figure 4. RasGRP4 とその下流のシグナル伝達(Paunovic et al. Drugs. 2013 より一部改変)

RasGRP4 は Ras guanine nucleotide exchange factor の一種であり Ras を活性化する。

RasGRP : Ras guanine nucleotide-releasing protein

RasGRP4 の cDNA が急性骨髄性白血病患者の白血球から分離され(Reuther et al., 2002)、急性骨髄性白血病に対するファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬による治療の予後不良因子として、RasGRP1 の高発現による同阻害薬への抵抗性が報告されている(Raponi et al., 2008)。またびまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫のリンパ節において RasGRP4 は高発現している(Zhu et al., 2019)。RasGRP4 の発現の抑制により、分裂の減少、アポトーシスの促進、酸化ストレスの亢進により、細胞増殖の抑制がおきること、ERK の発現の低下、JNK の発現の亢進が報告されている(Zhu et al., 2019)。これらのことから RasGRP は腫瘍化や増殖と密接な関連があると考えられている。

我々は関節リウマチ患者の末梢血 CD14 陽性単球において、RasGRP4 のスプライシング変異が健常者と比較し有意に多いことを報告した(Hashimoto et al., 2011)。また、Adachi ら(Adachi et al., 2012)は RasGRP4 をノックアウトした B6 マウスを作製した。K/BxN マウスの血清を用いて関節炎を誘導したところ、RasGRP4 ノックアウトマウスで関節炎スコア、骨びらんは著明に減少していた。マスト細胞の数やマスト細胞の組織学的評価では異常を認めなかったが、RasGRP4 ノックアウトマウスにおいて、PMA 刺激を行った骨髄由来マスト細胞の TNF- α 、IL-1 β (interleukin-1 β) の遺伝子発現量は wild type の骨髄由来マスト細胞と比較し低下しており、関節炎を抑えた原因と考えられた。このことから、RasGRP4 は関節リウマチの病態と関連があることが示唆された。

我々は RA の滑膜組織において RasGRP4 の発現が亢進しており、RasGRP4 の遺伝子発現量が FLS の増殖能と相関することを報告した(Kono et al., 2015)。RA の滑膜組織では Ras の活性化および、pERK、JNK (c-Jun N-terminal kinase)、p38 のいずれの MAPK 経路も活性化していることが知られているが、RasGRP4 が FLS の増殖に関与するメカニズムは未だ不明である。FLS の増殖を促進する分子生物学的機構を解明することを、本研究の目的とした。

4.1 HEK-293 細胞における RasGRP4 強制発現による MAPK シグナル伝達経路の変化

4.1.1 方法

RasGRP4 を発現していない HEK-293 細胞 (line CRL-1573; American Type Culture Collection) を用いて RasGRP4 発現ベクターのトランスフェクションを行った。pcDNA3.1-RasGRP4 vector は FuGENE HD (Promega, Wisconsin, USA) を用いたリポフェクション法によって、HEK-293 細胞にトランスフェクションされた。Immunoblotting 法にて RasGRP4 の発現を確認した。空ベクターをトランスフェクションした HEK-293 細胞、RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした HEK-293 細胞をプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤および還元剤が入った SDS サンプルバッファーを加え 95°C 5 分でボイルし、その後アクリルアミドゲルにアプライした。ウェスタンブロッティングにはニトロセルロースメンブレンにセミドライ法で転写後、2%BSA でブロッキング処理した。一次抗体は抗 phospho c-Raf 抗体、抗 phospho-Mek 1/2 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体、ローディングコントロールとして抗 c-Raf 抗体、抗 Mek1/2 抗体、抗 Erk1/2 抗体、抗 JNK 抗体、抗 p38MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) および抗 β アクチン抗体 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を使用し検出した。結果は ImageJ 1.50 software を用いて解析した。(<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>)

4.1.2 結果

HEK-293 細胞に RasGRP4 を強制発現することにより Raf/MEK/ERK、p38、JNK のリン酸化蛋白の発現が亢進された。結果は ImageJ 1.50 software を用いて解析した (Figure 5)。

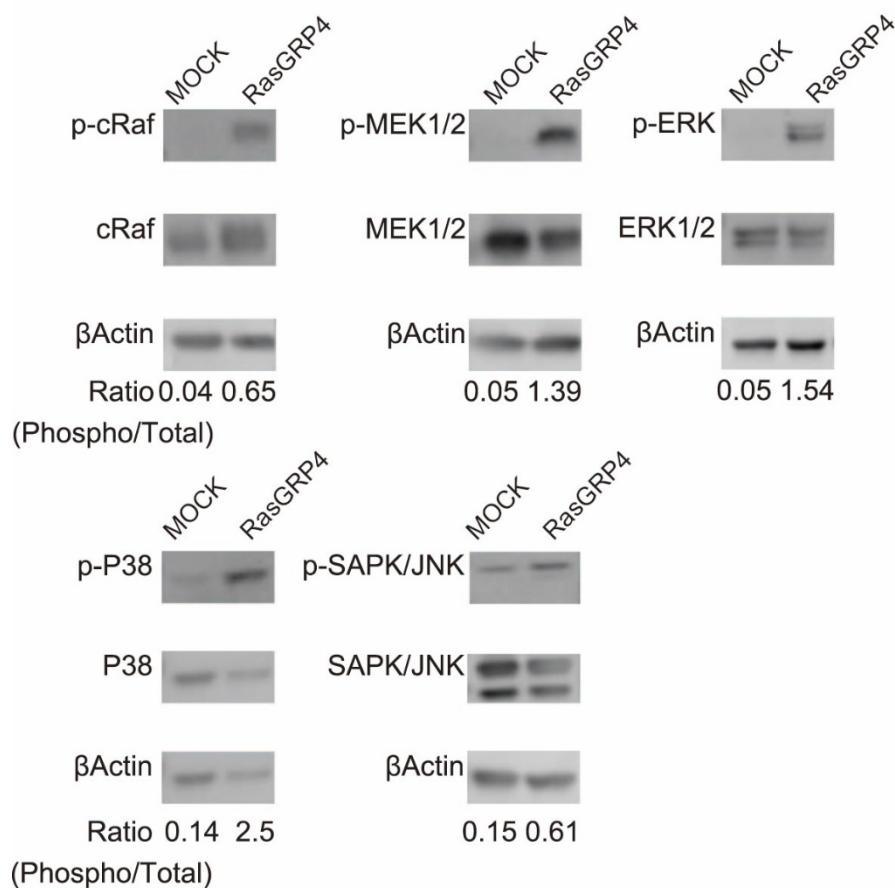


Figure 5. HEK-293 細胞における RasGRP4 強制発現による MAPK シグナル伝達経路の変化

HEK-293 細胞に空ベクター、RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした。MOCK (左) と比較し RasGRP4 発現ベクターを強制発現した HEK293 細胞 (右) では、Raf/MEK/ERK、p38、JNK のリン酸化蛋白の発現が亢進された。

4.1.3 考察

HEK-293 細胞はヒト胎児由来の腎細胞株であり、細胞培養や遺伝子導入のしやすさから、本研究で最初に用いた。増殖能に関する Ras 系のシグナル伝達経路に関して FLS と HEK293 は異なる可能性も考えられ、FLS を用いて RasGRP4 の強制発現を行い、下流の MAPK シグナル伝達経路について検討することが望ましいと考えた。

4.2 FLS における RasGRP4 強制発現による MAPK シグナル伝達経路の変化

4.2.1 方法

4.2.1.1 FLS の分離

2012 年 4 月から 2017 年 4 月までに北海道大学病院整形外科で滑膜切除術あるいは人工膝関節置換術を施行された RA および変形性関節症 (osteoarthritis:OA) の患者から文書による説明と同意取得を行った後、滑膜組織を採取した本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認（承認番号：008-0013）を得て行った。

滑膜から結合組織や脂肪を除去し、細かく切り刻み、分離し、5 mg/ml の type I コラゲナーゼ (Sigma, USA) を含んだ Hanks' balanced salt solution (HBSS) に入れ、37 度で 2 時間インキュベートを行った。その後メッシュを通し、遠心分離を行った後、10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシン含有 Iscove 's modified Dulbecco' s medium (IMDM) (Sigma, USA) で培養した。すべての FLS は 4 から 8 継代のものを使用した。FLS を分離した RA 患者背景を Table 1 に示す。

Table 1. FLS を分離した患者の患者背景

	Examination of cultured FLS
	RA
Gender, female/male	4/2
Age at the operation, years	70 (64-78)
Duration of disease, years	18.2 (5-48)
Serum CRP level, mg/d	1.6 (0.02-5.69)
MMP-3, mg/dl	193.7 (31.4-449.9)
RF, U/ml	50.7 (1.1-83)
ACPA, U/ml	134.1 (4.5-300)
Swollen joint count	3.6 (2-6)
Tender joint count	3.6 (0-10)
DAS28-ESR	4.7 (4.4-5.1)
HAQ-DI	0.9 (0-1.625)
Methotrexate use, n (%)	3(50)
Biologics agent use, n (%)	2(33, TCZ 16.5, IFX 16.5)

RA: rheumatoid arthritis, CRP: C reactive protein, MMP-3: matrix metalloproteinase-3,
 RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibody,
 DAS28: disease activity score 28, ESR: erythrocyte sedimentation rate,
 HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index, TCZ: tocilizumab,
 IFX:infliximab

4.2.1.2 FLS を用いた RasGRP4 のトランスフェクション

初めに、緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein:GFP) 発現ベクターを Neon® Transfection System(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いたエレクトロポレーション法を用いて FLS にトランスフェクションを行い、最適な条件を検討した (Figure 6)。FLS において RasGRP4 の発現は継代により低下するため (Figure 7)、RasGRP4 の発現が低下した P8 の FLS に空ベクターおよび RasGRP4 発現ベクターを同様の条件でトランスフェクションを行った。Immunblotting 法にて RasGRP4 の蛋白発現量が増加することを確認した (Figure 8)。

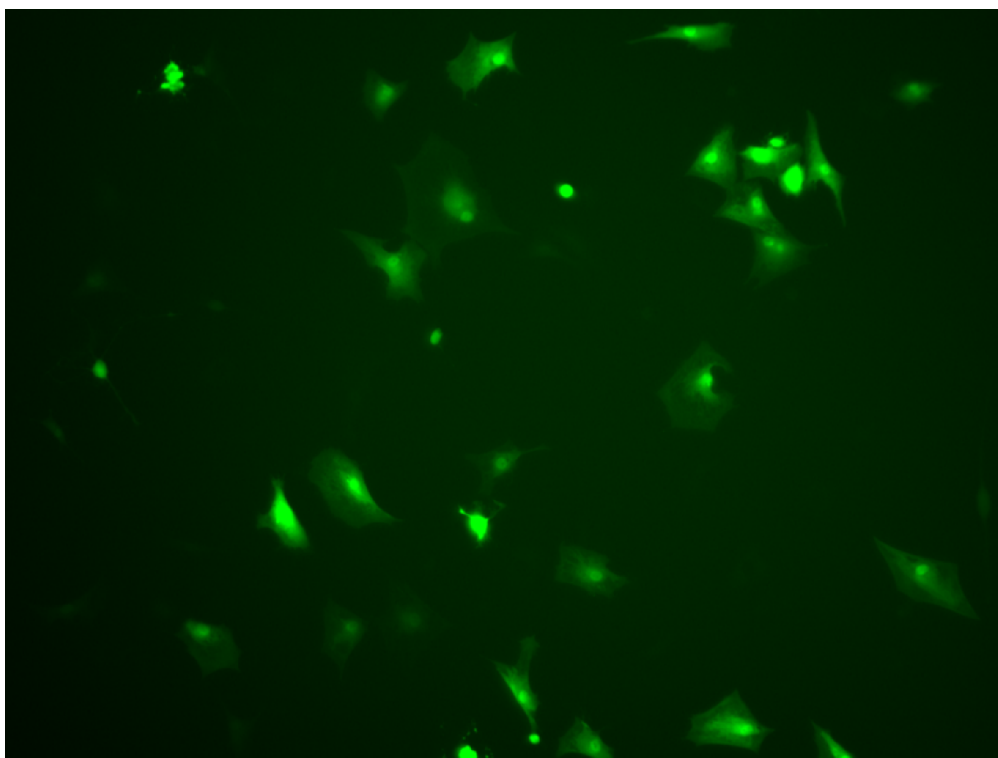


Figure 6. エレクトロポレーション法を用いた FLS へのトランスフェクション
GFP 発現ベクターをエレクトロポレーション法を用いて FLS にトランスフェクション
を行い、FLS のトランスフェクションに最適な条件を検討した。

GFP: green fluorescent protein

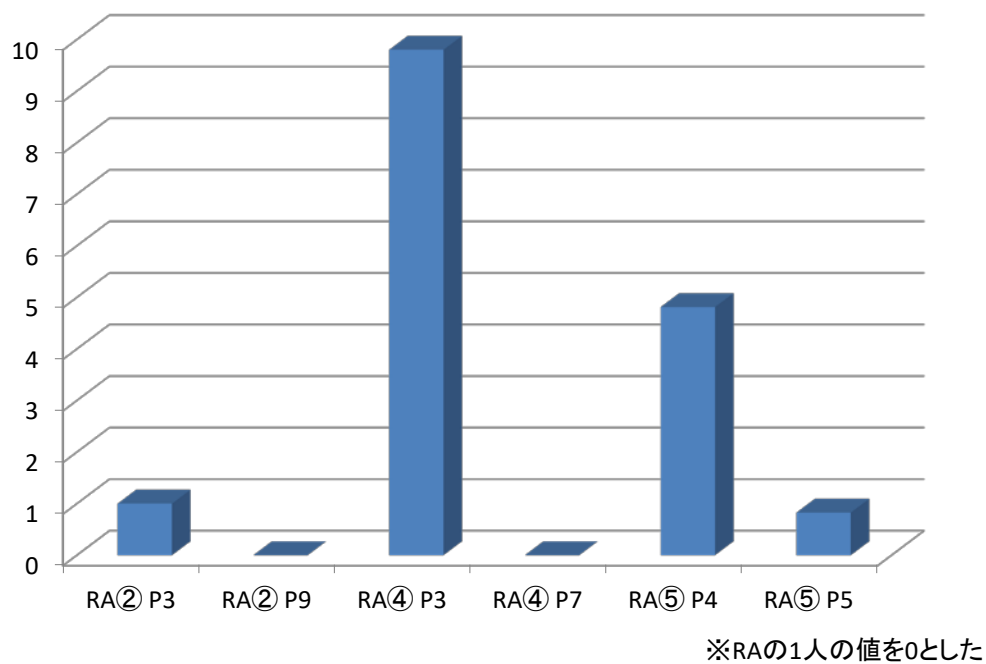


Figure 7. FLS における継代による RasGRP4 の遺伝子発現量の変化
継代により、RasGRP4 の遺伝子発現量は減少する。

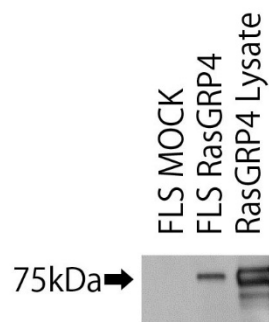


Figure 8. Immunoblotting 法を用いた FLS への RasGRP4 強制発現の確認
FLS に RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションし、Immunoblotting 法にて
RasGRP4 の蛋白発現を確認した。

4.2.1.3 RasGRP4 を強制発現した FLS のウェスタンブロッティング

トランスフェクション後 48 時間後に、空ベクターをトランスフェクションした FLS、RasGRP4 をトランスフェクションした FLS にプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤および還元剤が入った SDS サンプルバッファーを加え 95°C5 分でボイルし蛋白回収を行った。10%アクリルアミドゲルにアプライした。ウェスタンブロッティングにはニトロセルロースメンブレンにセミドライ法で転写後、2%BSA でブロッキング処理した。一次抗体は抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体、ローディングコントロールとして抗 Erk1/2 抗体、抗 JNK 抗体、抗 p38-MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA) および抗 β アクチン抗体 (Sigma Aldrich) を使用し検出した。結果は ImageJ 1.50 software を用いて解析した。

4. 2. 1. 4 結果

FLS に RasGRP4 を強制発現することにより ERK、p38、JNK のリン酸化が亢進され、特に ERK と p38 においてリン酸化が亢進された (Figure 9)。

結果は ImageJ 1.50 software を用いて解析した。

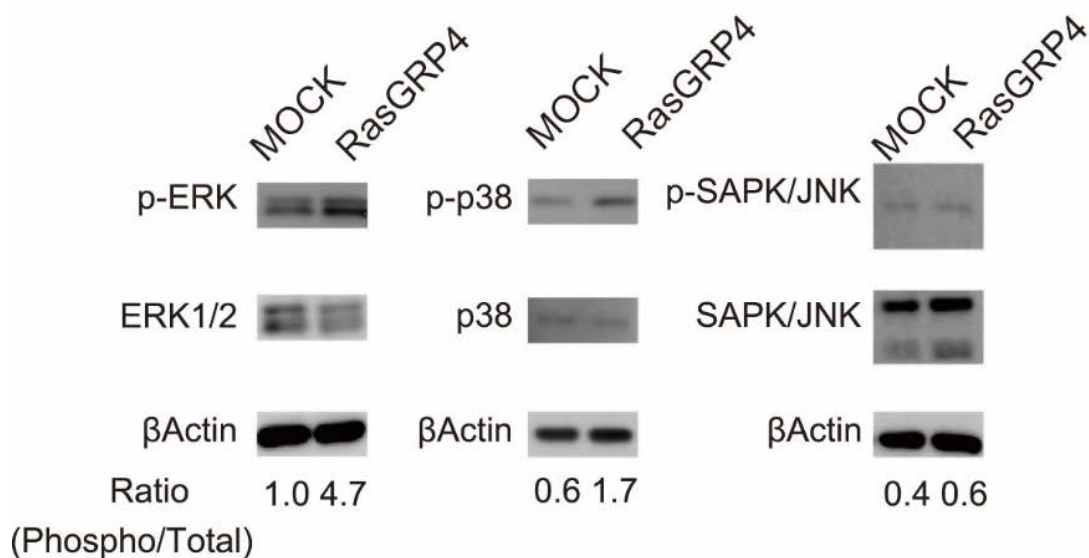


Figure 9. FLS における RasGRP4 強制発現による MAPK シグナル伝達経路の変化

FLS に空ベクター、RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした。

MOCK (左) と比較し RasGRP4 発現ベクターを強制発現した FLS (右) では、特に ERK と p38 においてリン酸化が亢進した。

4.3 ヒト滑膜組織における MAPK 活性化の評価

4.3.1 方法

2012 年 4 月から 2017 年 4 月までに北海道大学病院整形外科で人工膝関節置換術を施行された RA および OA の患者に、文書による説明と同意取得を行ったあと滑膜組織を採取した (Table2)。RA 分類基準に基づき診断された本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本試験に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認 (承認番号 008-0013) を得て行った。

滑膜組織は 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、パラフィン包埋の後、4 μ m の厚さの組織切片を作成した。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄した後、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline:PBS) に置換した。抗原賦活化として熱処理を行い、PBS で洗浄後、0.3%過酸化水素水/メタノールに 30 分室温で浸した。ブロッキングとして G-Block (Genostaff、東京)、Avidin/Biotin Blocking Kit (Dako, USA) を使用し、一次抗体として抗 RasGRP4 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体を加え 4°Cで一晩インキュベートし、それぞれ免疫組織化学染色を行なった。連続切片を用いて免疫組織化学染色をすることでこれらの蛋白の発現に関して比較し解析をおこなった。また ImageJ 1.50 software を用いて抗 RasGRP4 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体の陽性面積を定量した。

Table 2. 滑膜組織の患者背景

	RA	Histological examination
		OA
Gender, female/male	5/1	5/0
Age at the operation, years	70(58-78)	73(63-80)
Duration of disease, years	11(5-48)	NA
Serum CRP level, mg/dl	0.16(0.02-5.69)	0.05(0.02-0.32)
MMP-3, mg/dl	95.7(44.8-449.9)	NA
RF, U/ml	12(1.1-82.8)	NA
ACPA, U/ml	115(4.5-300)	NA
Swollen joint count	3(1-6)	NA
Tender joint count	2(0-16)	NA
DAS28-ESR	4.4(2.4-5.0)	NA
HAQ-DI	1(0-1.75)	NA
Methotrexate use, n (%)	4(67)	0(0)
Biologics agent use, n (%)	2(33, TCZ 16.5, IFX 16.5)	0(0)

RA: rheumatoid arthritis, OA osteoarthritis CRP: C reactive protein, MMP-3: matrix metalloproteinase-3, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibody, DAS28: disease activity score 28, ESR: erythrocyte sedimentation rate, HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index, TCZ: tocilizumab, IFX:infliximab

4.3.2 結果

RA のヒト滑膜組織において、RasGRP4 陽性部分と一致して、phospho-p38 および phospho-JNK の陽性像が得られた。phospho-ERK も陽性像が一致した部分は認められたが、phospho-p38 および phospho-JNK と比較すると淡い染色であった (Figure 10)。OA のヒト滑膜組織では RA と比較し滑膜表層に RasGRP4 陽性像が弱く認められた。RasGRP4 の陽性面積、リン酸化の程度は RA と比較して軽度であった (Figure 11、Figure12)。

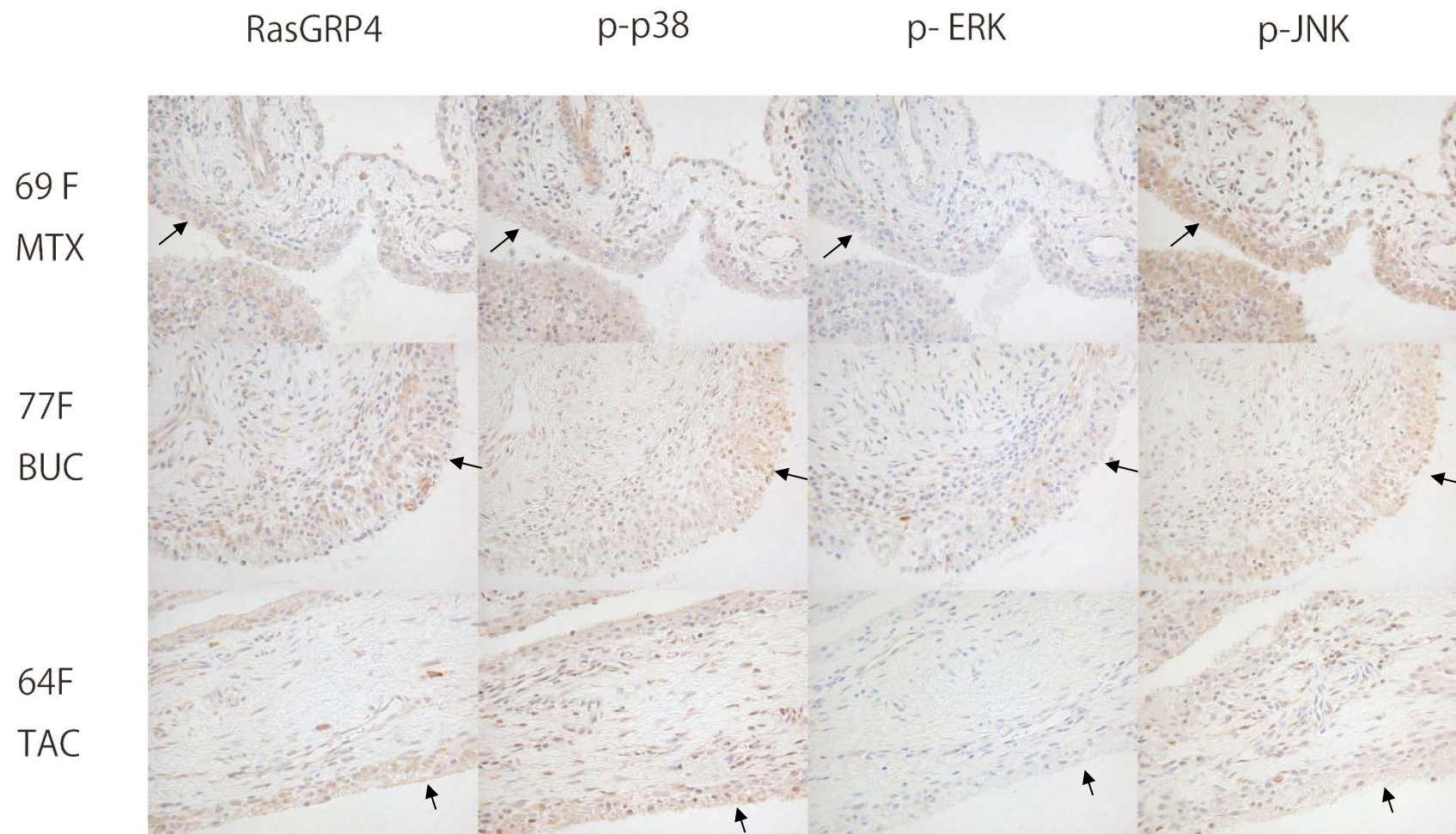


Figure 10. RA 滑膜組織における抗 RasGRP4 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体による免疫組織学染色 (×200 倍) F:Female MTX: methotrexate BUC: bucillamine TAC: tacrolimus
RA のヒト滑膜組織において、RasGRP4 陽性部分と一致して、phospho-p38 および phospho-JNK の陽性像が得られた。

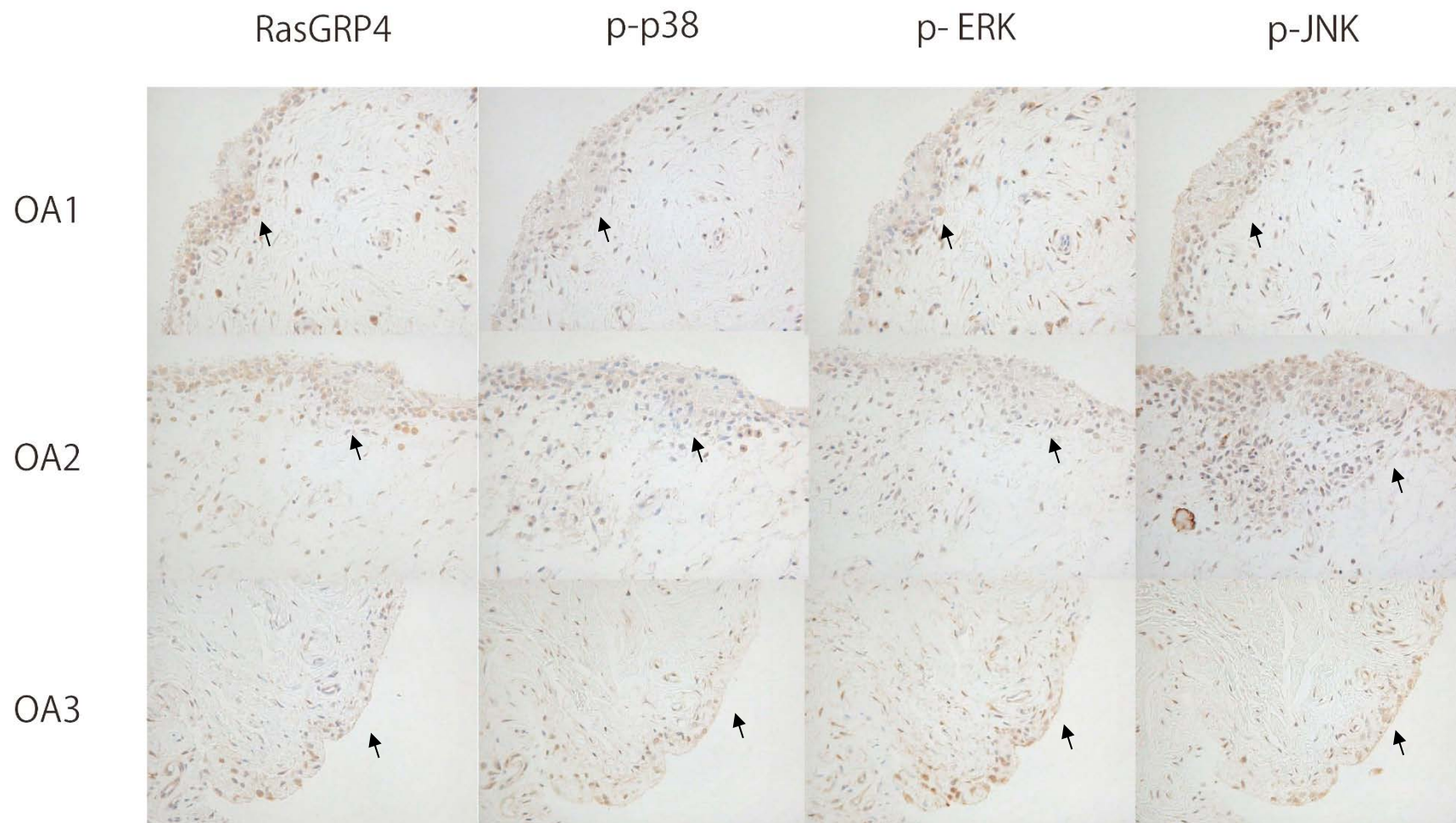


Figure 11. OA 滑膜組織における抗 RasGRP4 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体による免疫組織学染色（×200 倍）OA:osteoarthritis

OA 滑膜組織において RasGRP4 陽性部分と一致して、phospho-ERK、phospho-p38 および phospho-JNK の陽性像が得られた。

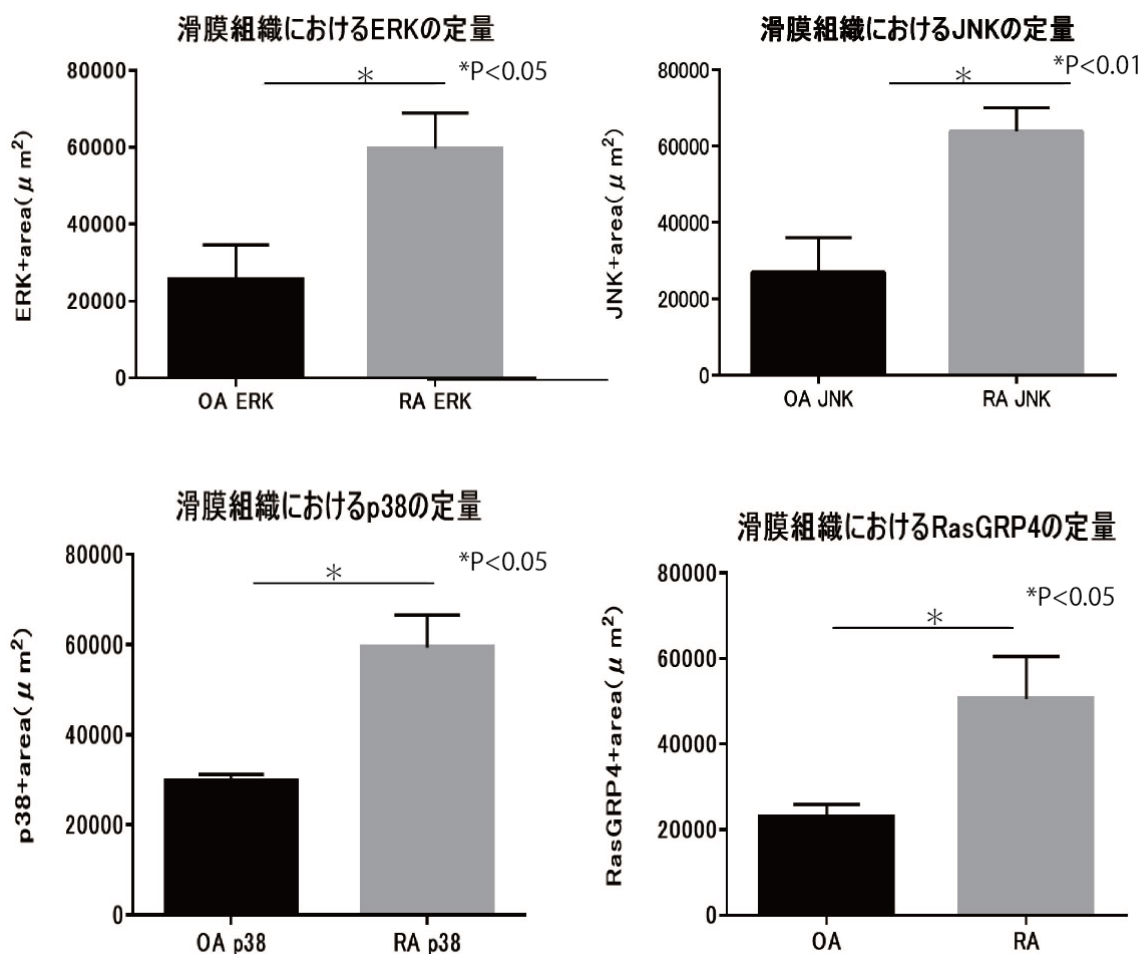


Figure 12. 滑膜組織における RA と OA における抗 RasGRP4 抗体、抗 phospho-Erk1/2 抗体、抗 phospho-p38MAPK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体による陽性面積の定量
滑膜組織において RasGRP4 および pERK、pJNK、p38 は OA と比較し RA で有意に陽性像が得られた。(Welch' s test)

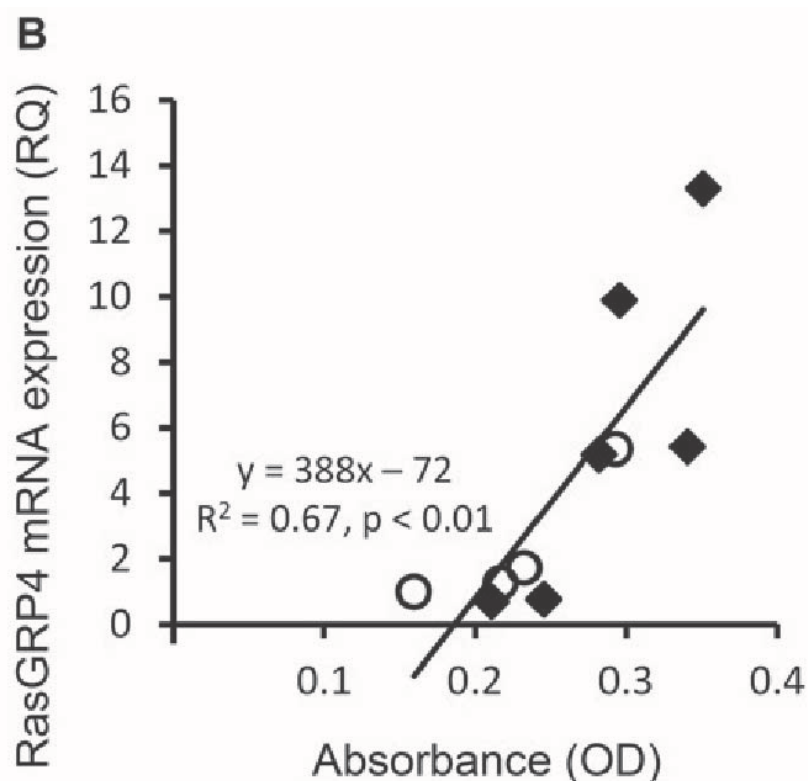
4.3.3 考察

ヒト滑膜組織において、RasGRP4 陽性部分と一致して、phospho-p38 および phospho-JNK の陽性像が得られた。前述した FLS における RasGRP4 の強制発現では ERK/p38/JNK いずれもリン酸化蛋白の発現が認められたが、特に ERK や p38 のリン酸化が認められ、本実験の結果とは異なる結果であった。本実験の RA の対象患者は、ステロイドや免疫抑制剤の治療中であり治療による影響が考えられた。本実験は連続切片による蛋白発現の解析であり、RasGRP4 と MAPK の共在に関して、正確な定量は困難であり、共在を示すためには、同一切片での抗 RasGRP4 抗体と抗 phospho-ERK 抗体、抗 phospho-p38 抗体、抗 phosphoJNK 抗体の二重染色による定量が必要と考えられた。

4.4 FLS における RasGRP4 強制発現と細胞増殖能

我々は MTT 法により、FLS の増殖能は RasGRP4 の遺伝子発現量と強い正の相関を認めていることが報告した (Kono et al., 2015) (Figure13)。

MTT は細胞代謝能を評価し、細胞増殖を間接的に評価した方法である。一方チミジンアナログである BrdU は細胞周期の S 期において新たに合成された DNA に取り込まれ、細胞増殖を反応する。我々は、細胞増殖能を直接的に評価するため、BrdU 法を用い、RasGRP4 の強制発現が FLS の増殖能に与える影響を評価した。



◆ RA (n = 6) ○ OA (n = 4)

Figure 13. FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と FLS の増殖能の正の相関 (Kono et al. 2015 より一部改変)

MTT 法により FLS の増殖能は RasGRP4 の遺伝子発現量と強い正の相関を認める。

RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis.

FLS: fibroblast-like synoviocyte, P: passage, RQ: relative quantification, R: correlation coefficient.

4.4.1 方法

上述した方法で空ベクターもしくは RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした FLS を 96well プレートに 1 ウェルあたり 4.0×10^4 個で播種し、24 時間培養した。

細胞培養液中に BrdU (Roche, Swiss) を添加し 18 時間後に、 $200 \mu\text{l}$ の FixDenat を添加した。30 分後にメディウムを除去し、抗ペルオキシダーゼ標識 BrdU 抗体を $100 \mu\text{l}$ 添加し、120 分反応させた。洗浄液にて 3 回洗浄後に、化学発光器質を添加した。ELISA プレートリーダーにて発光強度を測定した。(370 nm(リファレンス波長:492nm))

4.4.2 結果

FLS に RasGRP4 を強制発現させることにより、細胞増殖能は上昇することが、BrdU 法において確認された (Figure 14)。

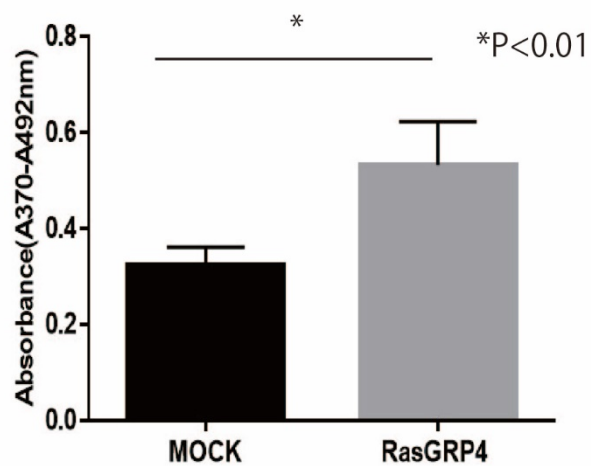


Figure 14. FLS の RasGRP4 強制発現と細胞増殖能
空ベクターもしくは RasGRP4 発現ベクターを FLS にトランスフェクションし 24 時間培養後に BrdU を添加し、BrdU 法にて細胞増殖能を測定した。

4.5 FLS における Duolink Proximity Ligation assay (PLA)

法を用いた RasGRP4 と Ras の蛋白質間相互作用の解析

4.5.1 方法

Proximity Ligation assay (近接ライゲーションアッセイ (PLA)) にて、RasGRP4 と Ras の蛋白質間相互作用を評価した。継代を経た RA FLS (Passage 8) を使用し、空ベクターもしくは RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした。48 時間培養後に、培養液を除去し 4%パラホルムアルデヒドにて 10 分間固定した。ブロッキング後に、抗 RasGRP4 抗体、抗 Ras 抗体を 4°C オーバーナイトでインキュベートした。洗浄後、proximity ligation assay (PLA) プローブ (Sigma Aldrich, USA) が共有結合した二次抗体を添加し結合させた。PLA プローブ環状化のための DNA オリゴヌクレオチドおよびライゲーション酵素を添加し、DNA サークルを形成、DNA ポリメラーゼによってサークルを増幅させた。増幅された PLA シグナルは蛍光顕微鏡 (Keyence、東京) にて評価した。

4.5.2 結果

RasGRP4 を強制発現した群では、空ベクターを強制発現した群と比較して有意に PLA シグナルが増強しており、RasGRP4 強制発現により Ras - RasGRP4 の蛋白質相互作用が確認された (Figure 15)。

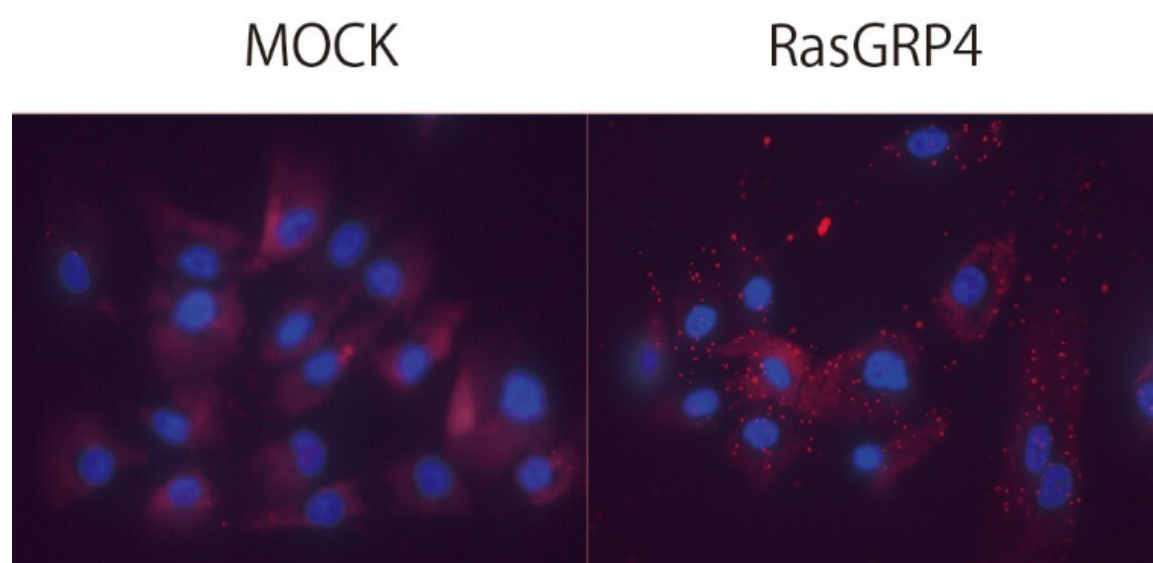


Figure 15. FLS の RasGRP4 強制発現と Ras-RasGRP4 蛋白質間相互作用
($\times 40$ 倍)

空ベクターもしくは RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションし、PLA 法にて、RasGRP4 と Ras の蛋白質間相互作用を評価した。

Red: PLA signal indicating protein-protein interaction Blue: nuclei

PLA: Proximity Ligation assay

Data are representative of three independent experiments

4.6 考察

我々は関節リウマチの患者より採取した FLS において、RasGRP4 の強制発現により、細胞増殖能が上昇することを BrdU 法にて示した。また、RasGRP4 の強制発現により、ERK/p38/JNK (c-Jun N-terminal kinase) の主要な MAP キナーゼ・カスケードがいずれもリン酸化・活性化し、特に ERK と p38 のリン酸化亢進し活性化することを示した。さらに、RasGRP4 強制発現により HEK293T 細胞で RasGRP4 を過剰発現した際と同様に (Reuther et al., 2002)、FLS においても Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用がおこることを示した。

細胞外の刺激を核内の転写制御機構へとつなぐ MAP キナーゼ (Mitogen-activated protein kinase : MAPK) カスケードには ERK 経路、p38 経路、JNK 経路が存在する。ERK は、細胞の増殖、成長、分化、遊走、代謝、転写など多種多様な役割を果たしている。ERK は細胞質内でリン酸化すると、核内移行し、ETS、c-Jun、FOS などの転写因子を合成する (Figure 16)。ERK 経路は癌、関節炎、慢性炎症などの病態形成に関わっている (Lu and Malemud, 2019)。

ERK 経路は関節リウマチの病態にも深くかかわっており、関節リウマチの患者の滑膜組織中の T リンパ球、FLS、マクロファージで ERK 経路が活性化していることが報告されている (Schett et al., 2000)。Thiel ら (Thiel et al., 2007) は関節炎モデルマウスにおいて、ERK のシグナルの上流に位置する MEK 阻害剤を使用することで、関節中のリン酸化 ERK は低下し、関節炎スコアの改善および組織学的スコアが改善することを示した。また TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) により、RA FLS の細胞増殖能が上昇し、MEK 阻害剤である PD98059、p38MAPK 阻害剤である SB203580 により、細胞増殖能は抑制された (Morel et al., 2005)。以上より、ERK 経路は RA FLS の細胞増殖に深く関与していると考えられる。

p38 は MAPK ファミリーの一つであり、特にストレスや炎症性サイトカインにより活性化されることから、JNK とともにストレス活性化プロテインキナーゼとも呼ばれている。p38 は発見当初、炎症反応に関与する $IL-1\beta$ や $TNF\alpha$ の mRNA の安定化を介して、それらの蛋白質の発現上昇を促すことが示され (Lee et al., 1994)、p38 の阻害によりそれらの炎症性サイトカインや cyclooxygenase-2 などの蛋白が抑制されたため (Saklatvala, 2004)、炎症性疾患の創薬ターゲットとして注目をされた。

関節リウマチの動物モデルである CIA (CIA: collagen induced arthritis) ラットに対し、選択的 p38 阻害剤である FR167653 を投与することにより、破骨細胞分化の抑制、 $TNF\alpha$ や $IL-1\beta$ などの炎症性サイトカインの抑制を介し関節の骨破壊抑制効果を示した (Nishikawa et al., 2003)。また、p38 の 4 つの分子種のうち主要なアイソフォームである p38 α をエンコードする Mapk14 欠失したマウスでは $TNF\alpha$ による炎症性の骨破壊が抑制された (Bohm et al., 2009)。骨吸収因子によって骨芽細胞/

骨髄ストローマ細胞の細胞膜表面に誘導される RANKL と破骨細胞前駆細胞が発現する RANK との結合により、p38 が活性化し、カテプシン K などの破骨細胞の骨吸収に必要な遺伝子を発現させる (Troen, 2006)。また、軟骨細胞において、p38 は軟骨の変性の原因となるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -13 産生に寄与している (Mengshol et al., 2001; Pei et al., 2006) (Ahmad et al., 2007)。p38 は炎症性サイトカインやケモカインの産生、骨や軟骨の破壊を通して関節リウマチの病態と深くかかわっていると考えられている (Clark and Dean, 2012)。p38 は、角膜上皮細胞の細胞増殖に関しては、ERK が関与しているが、p38 は関与していないとの報告がある (Sharma et al., 2003)。FLS において、p38 が細胞増殖能に関与しているかに関しては、p38 阻害剤を用いた検討が必要である。

p38 阻害剤は、関節炎モデルラットを対象とした動物実験では関節の骨破壊抑制効果を示し、その治療効果が大いに期待されたが、ヒトを対象とした臨床試験では治療効果が乏しく、肝障害や神経障害など副作用が起こり、多くのランダム化比較試験が中止された (Arthur and Ley, 2013) (Anand et al., 2011; Iwano et al., 2011)。p38 阻害剤が副作用をおこしやすい要因として、p38 がユビキタスに組織に発現していることがあげられる。RasGRP4 の発現は滑膜組織、骨髄やリンパ節等に発現が限定されており、よりターゲットに沿った治療が可能である。

今回、我々の行った FLS での RasGRP4 の強制発現の結果、Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用、ERK や p38 経路の活性化が認められた。RasGRP4 による FLS の増殖には、Ras を介した ERK の活性化が関与していると考ええる。

関節リウマチの FLS において、PGE₂ や MMP1 の産生は ERK を介しており、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 、MMP1/3 の産生は p38 を介していると考えられている (Paunovic and Harnett, 2013)。Kono らは FLS に RasGRP4 特異的な siRNA を用いることにより、MMP-1 と miPGES-1 の遺伝子発現量は低下することを示した (Kono et al., 2015)。MMP-1 は細胞外マトリックスのリモデリングに関わり、FLS から産生される。関節リウマチでは軟骨破壊に重要な役割を果たしている (Barchowsky et al., 2000)。miPGES-1 は、COX-2 の下流で作用し、PGE₂ 生合成の最終段階を触媒する酵素である。関節リウマチの滑膜では、滑膜細胞、軟骨細胞、マクロファージや単球などは、炎症性サイトカインで活性化され、PGE₂ を産生し、炎症、発熱、疼痛の原因となっている (Kojima et al., 2011)。COX-2 は、選択的 COX-2 阻害剤を含む非ステロイド性抗炎症薬の標的である。また、PGE₂ は破骨細胞に直接作用し、骨破壊の原因の一つとなっている。

関節リウマチにおいて RasGRP4 は FLS の増殖と関わっており、ERK や p38 を介し関節炎や骨・軟骨破壊をもたらす。RasGRP4 は関節リウマチの新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

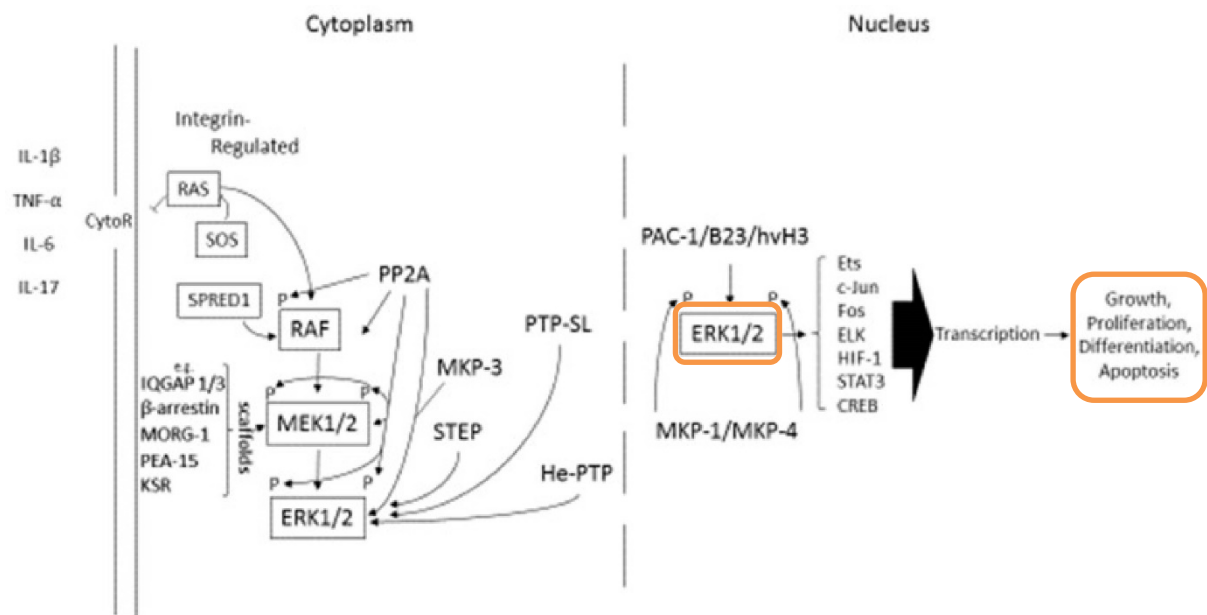


Figure 16. ERK 経路の活性化と制御因子 (Lu and Malemud et al, 2019 より一部改変)

ERK は細胞質内でリン酸化すると、核内移行し、ETS、c-Jun、FOS などの転写因子を合成する。ERK は、細胞の増殖、成長、分化、遊走、代謝、転写など多種多様な役割を果たしている。

第二章

5. 緒言

我々は、Ras の活性化因子である RasGRP4 が RA 患者の滑膜組織の FLS に高発現しており、RasGRP4 は FLS の増殖に関与していることを示した。また、Kono らは関節炎モデルラットに RasGRP4 特異的 siRNA を関節注射することにより、関節炎スコアおよび足関節径の改善、滑膜腔および滑膜組織への炎症細胞浸潤や軟骨・骨破壊が抑制されることを示した(Kono et al., 2015)。

Ras は低分子結合蛋白の一種で、不活化状態では GDP と結合している(Appels et al., 2005) (Figure 17)。GTP 結合タンパク質である Ras は、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 信号伝達系の on/off を司る分子スイッチとして細胞増殖の制御を担っている(Reuter et al., 2000)。Ras 蛋白が機能を発現するためには、ファルネシルトランスフェラーゼ(farnesyl transferase: FTase)により Ras 蛋白質の C 末端側のシステイン残基がファルネシル化翻訳後修飾を受けることが必要である(Appels et al., 2005) (Figure 18)。このファルネシル化を阻害するファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤(farnesyl transferase inhibitors: FTI)が Ras の働きを阻害する分子標的薬として臨床開発が行われた(Reuter et al., 2000)。FTI を作用させると、がん細胞の増殖は抑制される。そこで 1990 年代に FTI は様々なグループにより開発され、FTI は血液腫瘍や固形がんに対して、ヒトに対する臨床試験まで進んだのだが、顕著な成果はみられなかった(Whyte et al., 1997)。

RAS には H-、N-、K-Ras という 3 種類のアイソフォームがある。H-Ras は FTase によりファルネシル化される。一方、N-RAS と K-RAS は通常 FTase によるファルネシル化をうけるが FTI 存在下で GGTase -I(Geranylgeranyltransferase type1) によるゲラニルゲラニル化を受けることがわかった(Philips and Cox, 2007) (Figure19)。ヒトの癌細胞で変異を起こしているのは主に K-RAS と N-RAS であるためヒトの癌細胞を抑制するためには Ras のファルネシル化とゲラニルゲラニル化の両方を抑えなければならない(Whyte et al., 1997)。しかし、K-Ras 変異由来の癌細胞の場合、FTase を阻害すると K-Ras がゲラニルゲラニル化される機構が存在し、増殖を抑制できず(Sebti and Der, 2003)、そのため FTI は抗がん剤としては副作用が少ないが(Lancet et al., 2007)、K-Ras 変異由来の癌には FTI の効果が乏しいと考えられた。関節リウマチの滑膜組織では H-Ras、K-Ras、N-Ras いずれも認められ、いずれのアイソフォームも RA の病態に関わっているといわれている(Sebti and Der, 2003)。特に H-Ras は $Il-1\beta$ 依存性に matrix metalloproteinase-3 や IL-8 の産生に関わっ

ており、pan Ras LNA により主に H-Ras を阻害した関節炎モデルマウスの実験では、関節炎および関節破壊を抑制した (de Launay et al., 2010)。RasGRP4 阻害薬は、関節リウマチの治療に有効である可能性が考えられるが、RasGRP4 阻害薬は未だに存在しない。今回我々は、Ras 阻害薬の FTI の一種である Tipifarnib が FLS の増殖能に及ぼす影響、RasGRP4-Ras の蛋白質間相互作用に及ぼす影響、最後に Tipifarnib の関節炎モデルマウスに対する治療効果を検討することにした。

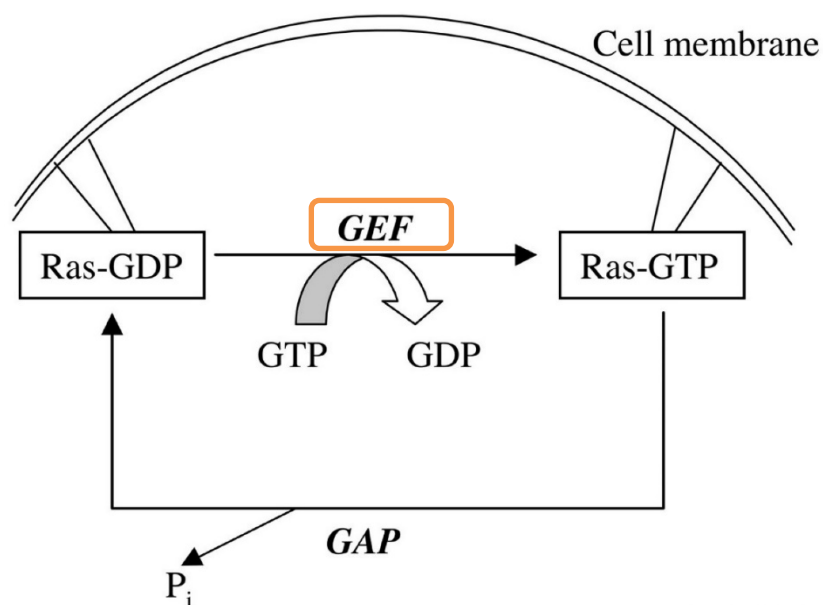


Figure 17. Ras 活性化経路 (NM.GM. Appels et al, 2005 より一部改変)

Ras は不活化状態では GDP と結合し、GEF により活性化されると GTP と結合する。

GEF: guanine nucleotide exchange factor

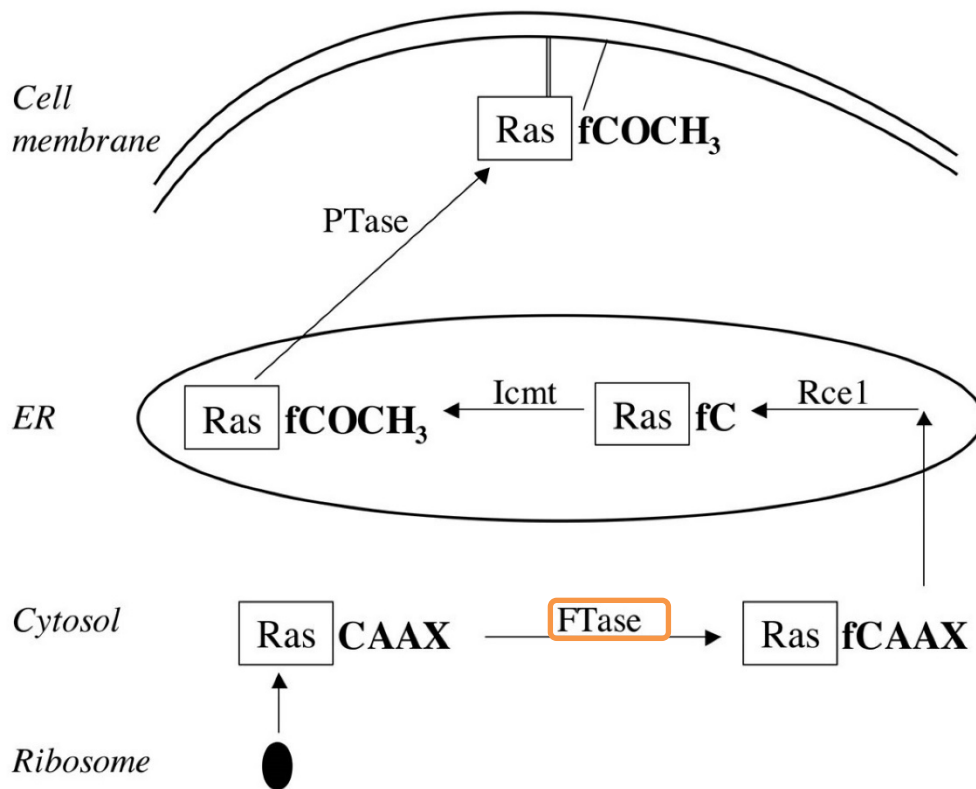


Figure 18. Ras の翻訳後修飾 (NM. GM. Appels et al, 2005 より一部改変)

Ras 蛋白が機能を発現するためには、ファルネシルトランスフェラーゼ (farnesyl transferase: FTase) により Ras 蛋白質の C 末端側のシステイン残基がファルネシル化翻訳後修飾を受けることが必要である。

ER: endoplasmic reticulum

FTase: farnesyltransferase

Icmt: isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase

Rce1: Ras-converting enzyme 1

PTase: palmitoyltransferase.

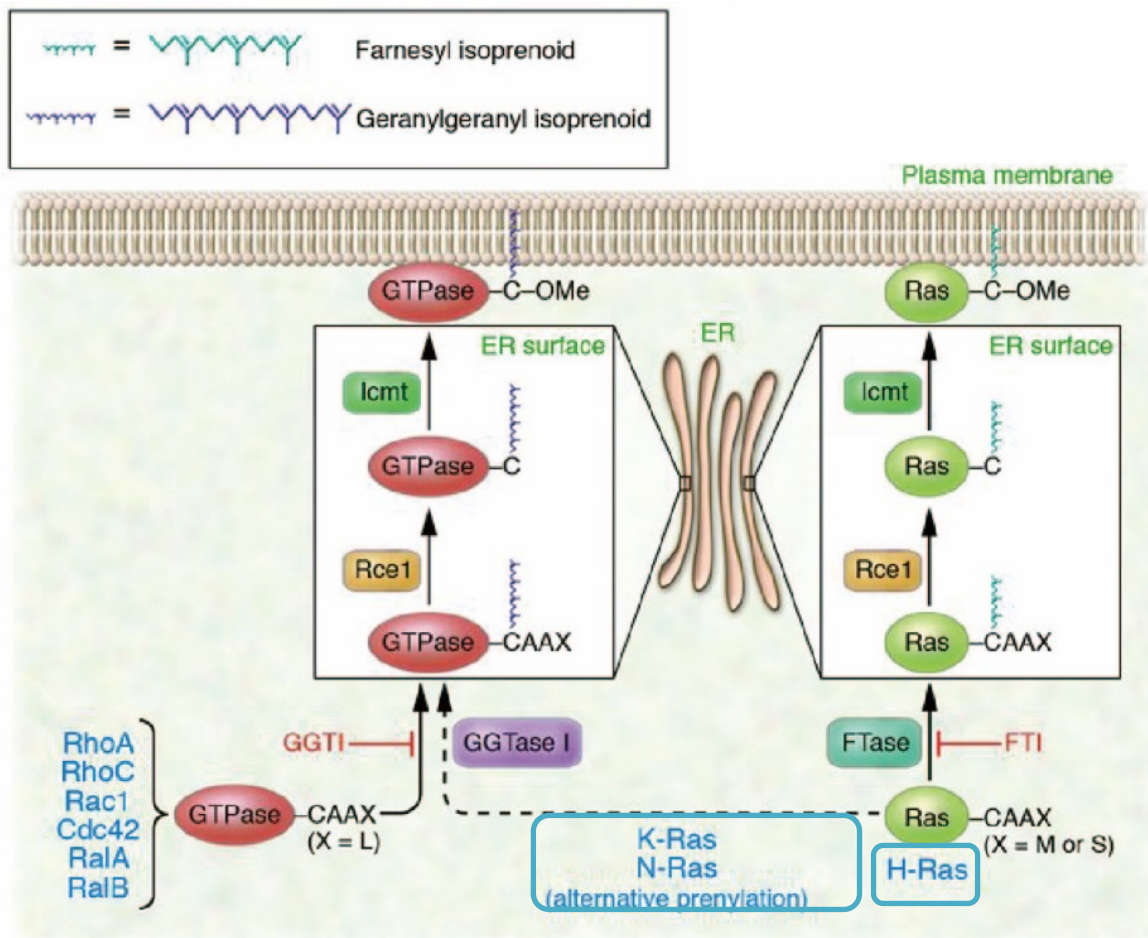


Figure 19. CAAX 蛋白のプレニル化 ((Philips and Cox, 2007) より一部改変)
 N-RAS と K-RAS は通常 FTase によるファルネシル化をうけるが、FTI 存在下で
 GGTase -I (Geranylgeranyltransferase type1) によるゲラニルゲラニル化を受け
 る。

farnesyl transferase inhibitor : FTI

GGTase-I : Geranylgeranyltransferase type1

GGTI : Geranylgeranyltransferase I Inhibitor

5.1 Tipifarnib が FLS の増殖能に与える影響

5.1.1 方法

FLS を 96well プレートに 1 ウェルあたり 5.0×10^4 個で播種し、24 時間培養した。メディウムに Tipifarnib (AdooqBioscience, CA, USA) (10nM, 100nM, 1 μ M) を添加し、24 時間後に BrdU (Roche, Swiss) を細胞培養液中に添加した。18 時間後に、200 μ l の FixDenat を添加した。30 分後にメディウムを除去し、抗ペルオキシダーゼ標識 BrdU 抗体を 100 μ l 添加し、120 分反応させた。洗浄液にて 3 回洗浄後に、化学発光器質を添加した。ELISA プレートリーダーにて発光強度を測定した。(370 nm (リファレンス波長: 492nm))

5.1.2 結果

Tipifarnib を細胞培養液中に添加することで、濃度依存性に FLS の細胞増殖能は抑制された (Figure 20)。

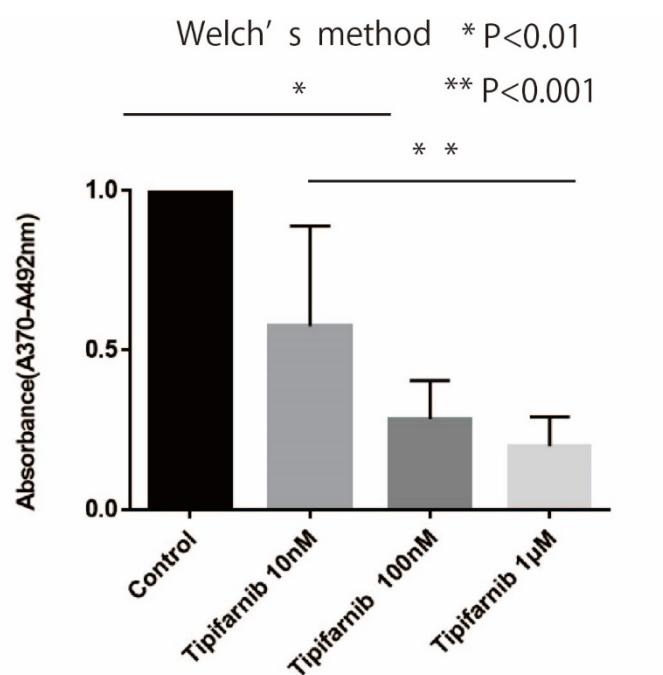


Figure 20. Tipifarnib による FLS の細胞増殖能の変化

FLS の培養液中に Tipifarnib を添加し、BrdU 法にて細胞増殖能の変化を測定した。

5.2. Tipifarnib が RasGRP4-Ras の蛋白質間相互作用に与える影響

5.2.1 方法

前述した Proximity Ligation assay (近接ライゲーションアッセイ (PLA)) にて、RasGRP4 強制発現により、空ベクターを強制発現した群と比較して、有意に PLA シグナルが増強しており、RasGRP4 と Ras の蛋白質が相互作用することを確認された。

今回、我々は Tipifarnib が、Ras - RasGRP4 の蛋白質相互作用を抑制するかどうか、PLA 法にて検討した。

継代を経た RA FLS (Passage8) を使用し、空ベクターもしくは RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした。48 時間培養後に RasGRP4 発現ベクターをトランスフェクションした群に、薬剤を添加しない培養液、Tipifarnib ($1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$) を添加した培養液を交換した。18 時間後に培養液を除去し、4%パラホルムアルデヒドにて 10 分間固定した。その後、Duolink in situ set (Sigma Aldrich, USA) を使用し、前述した方法で、蛍光顕微鏡にて蛍光シグナル数を測定し、Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用を評価した。結果は、ImageJ 1.50 を用い定量解析した。

5.2.2 結果

Tipifarnib は、Ras のファルネシル化を阻害することにより Ras 蛋白の細胞膜結合を抑制する。Tipifarnib 添加により濃度依存性に、RasGRP4-Ras の蛋白質間相互作用を抑制した。(Figure 21)

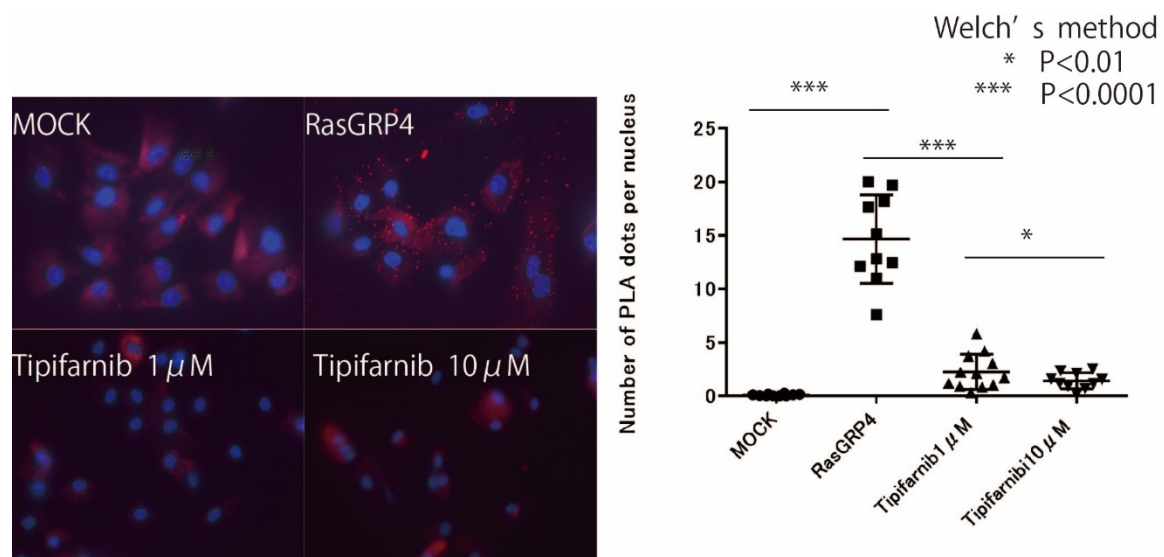


Figure 21. TipifarnibによるRas-RasGRP4の蛋白質間相互作用の抑制
FLSに空ベクターもしくはRasGRP4発現ベクターをトランスフェクションした。48時間培養後にTipifarnib (1 μ M、10 μ M)を添加し、PLA法にてRas-RasGRP4の蛋白質間相互作用を評価した。

PLA: Proximity Ligation assay

5.3. Tipifarnib が関節炎モデルマウスに与える影響

5.3.1 方法

8 週 齢 の 雄 DBA/1 マウスに対して Day0 に complete Freund's adjuvant (Chondrex, USA) 100 μ l に溶解したブタ Type II collagen 100 μ g (Chondrex, USA) を尾に皮下投与し免疫を行った。また、Day18 には、incomplete Freund's adjuvant 100 μ l に溶解したブタ Type II collagen 100 μ g を尾に再度皮下投与し追加免疫を行った。Day18 以降は誘導された関節炎について、関節炎スコアと足関節の直径の測定を行った。関節炎スコアは既報に従って、0 点：関節に発赤および腫脹を認めない。1 点：足根骨または足関節に軽度の発赤と腫脹を認める、2 点：足関節から足根骨にかけて軽度の発赤と腫脹を認める。3 点；足関節から中足骨にかけて中等度の発赤と腫脹を認める、4 点：足関節、足部、中足骨にまで広がる重度の発赤と腫脹を認める、または足趾の関節強直を認める、と定めた。

Day25 にマウスの背部の皮下組織に Alzet 浸透圧ポンプ（室町機械、東京）を埋め込んだ。Tipifarnib は 20% シクロデキストリンに溶解し、10mg/kg/day に調整した。CIA マウスは Day46 に麻酔下の心臓全採血により安楽死処理した。以上の動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと、北海道大学動物実験に関する規定に従い行った（承認番号 18-0085）。

5.3.2 結果

関節炎モデルマウスにおいて、Alzet 浸透圧ポンプを用いて、Tipifarnib を 10mg/kg/日にて持続皮下投与を 28 日間継続した。関節炎の発症早期において、Tipifarnib 投与群は、コントロール群と比較し足関節径は有意に低く、関節炎スコアも低い傾向が認められた (Figure 22、23)。

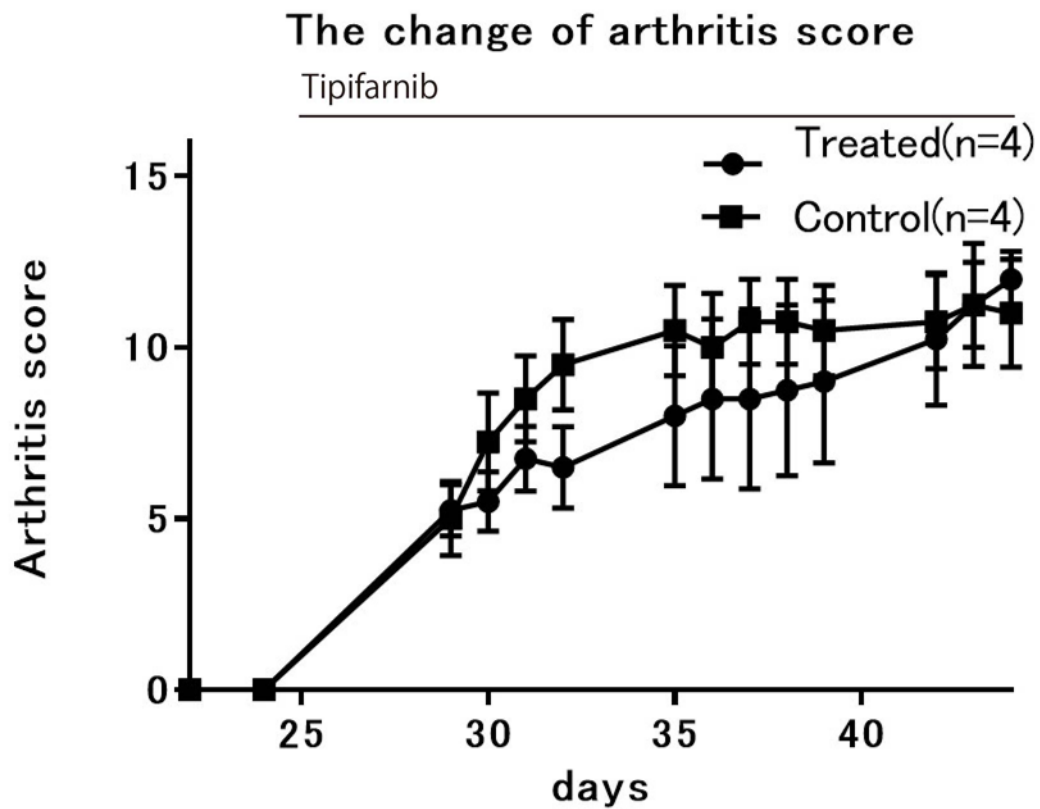


Figure 22. Tipifarnib 持続皮下注による CIA モデルマウスの関節炎スコアの変化
 関節炎モデルマウスにおいて、Tipifarnib を 10mg/kg/日にて持続皮下投与を継続し
 関節炎スコアを測定した。

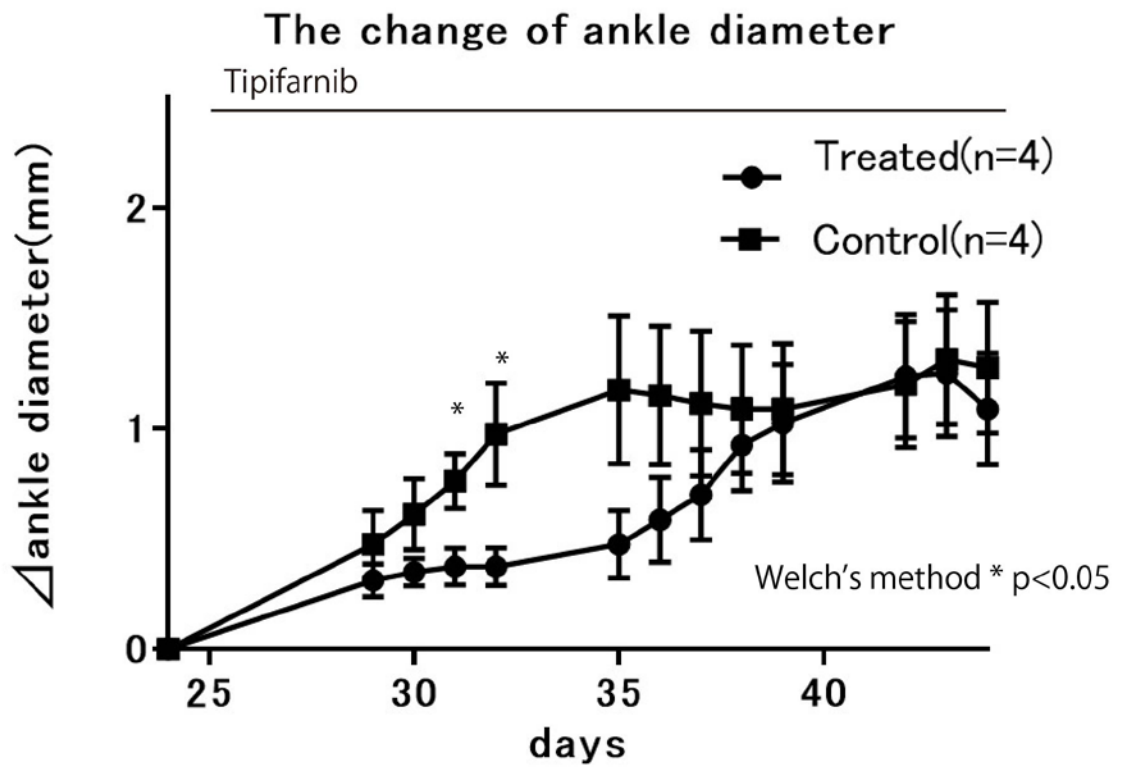


Figure 23. Tipifarnib 持続皮下注による CIA モデルマウスの足関節径の変化
 関節炎モデルマウスにおいて、Tipifarnib を 10mg/kg/日にて持続皮下投与を継続し
 足関節径測定した。

5.3.3 再実験

関節炎モデルマウスに Tipifarnib を持続皮下注することで、関節炎の発症早期において、Tipifarnib 投与群は、コントロール群と比較し足関節径は有意に低く、関節炎スコアも低い傾向が認められたが、後半の経過においては関節炎スコアおよび足関節径の有意差は消失していた。我々は、関節炎が出現する前に Tipifarnib を投与することで、より治療的効果が認められる可能性を考えた。2 回目の追加免疫を行う前日より、Tipifarnib (10mg/kg/day) の持続皮下投与を Alzet 浸透圧ポンプにて開始した。しかし、関節炎発症前に Tipifarnib を投与した再実験では、関節炎の改善効果は確認できず、逆に Tipifarnib 投与群で関節炎が増悪する傾向が認められた。その後も Tipifarnib 投与による関節炎改善効果は得られず、Day32 に安楽死処理を行った (Figure 24)。

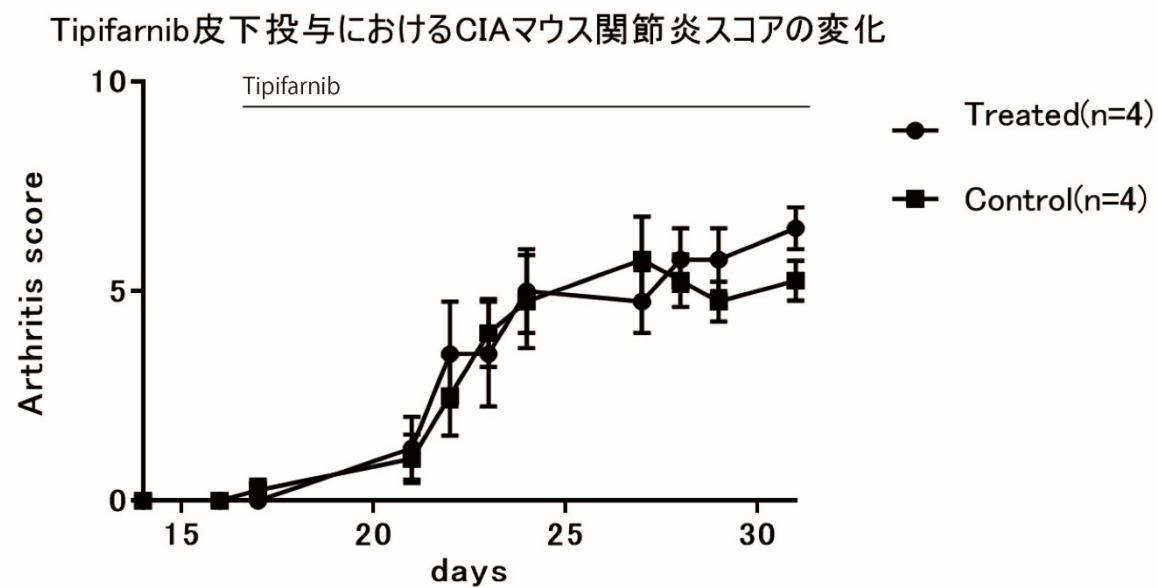


Figure 24. Tipifarnib 持続皮下注による CIA モデルマウスの関節炎スコアの変化
関節炎発症前に、Tipifarnib(10mg/kg/day)の持続皮下注を継続し、関節炎スコアを測定した。

5.3.4 考察

CIA マウスに対する Tipifarnib の持続皮下注により、Tipifarnib 投与群は、コントロール群と比較し足関節径は有意に抑制され、関節炎スコアも低い傾向が認められたが、再実験を行った際には有意な差は認められず、関節炎の抑制効果を再現できなかった。

CIA マウスに対する Tipifarnib の持続皮下注射では持続する治療効果は示されなかった。過去に他の薬剤と併用し、Alzet 浸透圧ポンプを用いて、乳がんモデルマウスに Tipifarnib を 14 日間持続皮下注射し有効であった報告はあるが (Balasis et al., 2011) CIA マウスに対する Tipifarnib の有効性評価のためには、安定した薬剤投与のために、経口投与や腹腔内投与など他の投与方法での検討が必要である。また治療効果を発揮し、安全性確保するために、薬剤の投与時期、投与量、投与間隔など解決すべき課題も多い。

また、CIA マウスは極めて強い炎症を誘導する関節炎モデルマウスであり、Tipifarnib は抗炎症効果よりも抗関節破壊効果が期待されるため、他の CIA マウス以外の関節炎モデルマウスでの検討も必要である。

5.4 考察

我々は、Tipifarnib が FLS の細胞増殖能を抑制すること示した。また、Tipifarnib により RasGRP4 強制発現による RasGRP4-Ras 間の蛋白質間相互作用を抑制することを示した。

血液腫瘍領域において、Tipifarnib は in vitro および in vivo のいずれの実験系においても、細胞増殖能を抑制することが報告されている (Cox and Der, 2002; Lancet and Karp, 2003)。

Tipifarnib は RasGRP4-Ras 間の蛋白質間相互作用を抑制することで、RasGRP4 による FLS の細胞増殖効果を抑制する。Ras を活性化する Ras guanine nucleotide exchange factor (Ras GEF) には RasGRP4 以外にも SOS1、SOS2、RasGRF1-2、RasGRP1-4 が存在する (Rojas et al., 2011)。関節リウマチにおいて、RasGRF1 は滑膜組織内に高発現しており、RasGRF1 は FLS の MMP-3 産生との関連が報告されている (Abreu et al., 2009)。関節炎モデルラットにおいて、RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射は、関節炎スコア、滑膜組織の炎症細胞の低下、および関節破壊抑制効果を示したが (Kono et al., 2015)、さらに CIA モデルラットに RasGRP2 および RasGRP4 に特異的な siRNA を関節注射することで、RasGRP2 siRNA 単独投与群および RasGRP4 siRNA 単独投与群に比較し、更なる関節炎および関節破壊抑制効果が認められた (Shimamura et al., 2018)。本実験より Tipifarnib は RasGRP4 による Ras 活性化による FLS の増殖を抑制することによる関節炎抑制効果が期待できる。また、RasGRF1 や RasGRP2 等、RasGRP4 以外の RasGEF の関節炎に対する影響を抑制できる可能性があるが、それは今後の検討課題である。

本実験では、CIA モデルマウスに対する Tipifarnib の関節炎抑制効果は再現ができなかったが、他のファルネシルトランスフェラーゼインヒビターでは関節炎抑制効果が報告されており (Na et al., 2004)、Tipifarnib 投与条件の最適化により関節炎抑制効果が期待される。

Tipifarnib による Ras を介した FLS の増殖抑制効果は、RA の病因により近い新たな治療薬となりうる可能性がある。

6. 総合考察

私は、RA 患者の FLS に RasGRP4 を強制発現させることで、主要な MAP キナーゼである、ERK/p38/JNK のいずれもリン酸化し、特に ERK と p38 のリン酸化が亢進し、活性化することを示した。また、RasGRP4 の強制発現により、Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用がおこることを示した。ERK 経路は細胞増殖と密接に関わっており、ヒトの癌では Ras や Raf の変異が多く認められ、腫瘍化には ERK 経路の異常な活性化が認められている (Kubota et al., 2011)。RA の滑膜組織においても MAPK 経路は活性化していることが知られており、RA FLS においても ERK 経路は活性化し、シグナルにおいて ERK の上流に位置する MEK 阻害剤により細胞増殖は抑制される (Thiel et al., 2007)。

一方、p38 は JNK と共にストレス応答 MAP キナーゼと呼ばれており、ストレスにตอบสนองして活性化し、アポトーシスを誘導する (Miura et al., 2018)。炎症性サイトカインやケモカインの産生、骨や軟骨の破壊を通して関節リウマチの病態と関わっている。RasGRP4 の FLS 増殖作用は、RasGRP4 による ERK 経路の活性化に起因すると考えられる。

動物実験での RasGRP4 特異的な siRNA 使用による関節炎・関節破壊抑制の効果は (Kono et al., 2015)、RasGRP4 阻害による、ERK 経路の抑制による FLS の増殖抑制、p38 経路の抑制の効果と考えられるが、その証明には、TNF α で刺激し RasGRP4 が発現した FLS に対し、RasGRP4 特異的な siRNA を使用することで MAPK シグナル伝達への影響を確認する必要がある。

本実験では、ファルネシル化を阻害するファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) の一種である、Tipifarnib により、RasGRP4-Ras の蛋白質間相互作用は抑制され、細胞増殖能は抑制された。Tipifarnib は K-Ras 変異による腫瘍に対する細胞増殖抑制効果は乏しいが (Sebti and Der, 2003)、RA の病態には H-Ras、K-Ras、N-Ras いずれも関与しており、RA に対しては有効であることが期待される。

また、スタチンがメバロン酸経路の下流に存在するゲラニルゲラニルピロリン酸 (geranylgeranyl pyrophosphate: GGPP) の産生を抑制することで、低分子量 G 蛋白のイソプレニル化を阻害することが知られており (Brown et al., 2006) (Yanae et al., 2011)、スタチンと Tipifarnib の併用による RA への治療効果も期待される。

Tipifarnib による Ras を介した FLS の増殖抑制効果は、RA の病因により近い新たな治療薬となりうる可能性が考える。

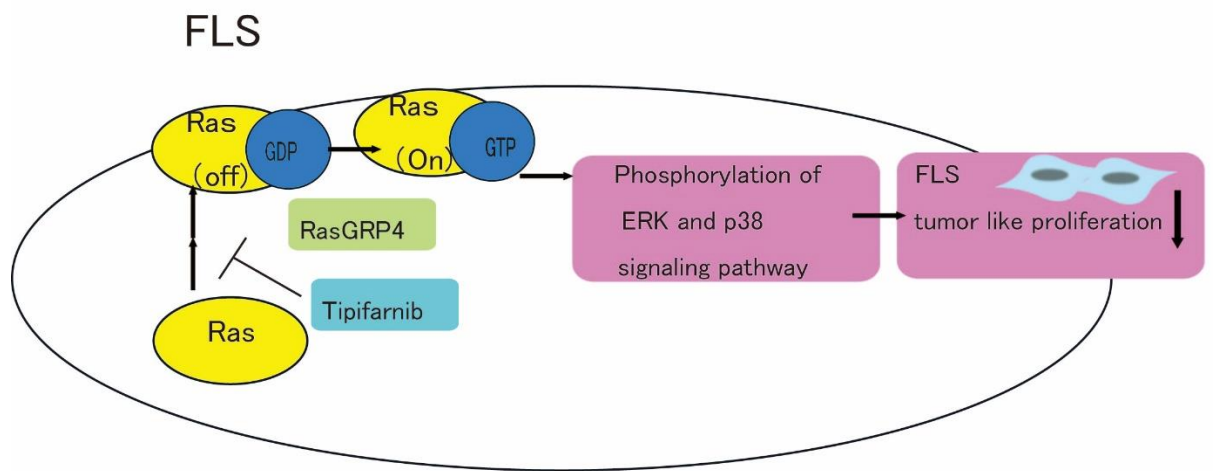


Figure 25. 本研究のまとめ

FLS において RasGRP4 は Ras を活性化し、ERK 経路や p38 経路の活性化し、細胞増殖能を上昇させる。Tipifarnib は Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用を抑制し、FLS の細胞増殖を抑制する。

6. 結論

第一章

FLS に RasGRP4 を強制発現することにより、Ras-RasGRP4 の蛋白質間相互作用が認められ、ERK や p38 経路の活性化が認められた。RasGRP4 における FLS の増殖には、Ras を介した ERK の活性化が関与していると考えられた。

第二章

Tipifarnib により、FLS の細胞増殖能は抑制された。また、RasGRP4 強制発現による RasGRP4-Ras 間の蛋白質間相互作用は Tipifarnib により抑制された。関節炎モデルマウスである CIA マウスに対する Tipifarnib の持続皮下注により、Tipifarnib 投与群は、関節炎発症早期においてコントロール群と比較し足関節径は有意に抑制され、関節炎スコアも低い傾向が認められたが、持続する治療効果は示されなかった。Tipifarnib による抗関節破壊効果を示すためには、薬剤の投与時期、投与量、投与間隔など更なる検討が必要である。

8. 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費 15K09514、18K0838008、日本医療研究開発機構 PH42180003、Bristol Myers Squibb の助成をうけたものである。

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学分野教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室 渥美達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループの保田晋助准教授には本研究の遂行にあたり、終始御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ講師 奥健志先生、助教 Olga Amengual 先生、坊垣暁之先生、加藤将先生、藤枝雄一郎先生、河野通仁先生には日頃より有益な御討論、御助言をいただきました。同じ研究グループとして常に研究の相談にのってくださった中村浩之先生、適切な助言をくださった河野通大先生にも深い感謝の意を示します。また大学院生の大西直樹先生、Lee Wenshi 大学院生、工藤友喜大学院生にはいつも共に学び、励ましあい大学院生活の支えとなって下さり感謝を申し上げます。

また大学院を修了された清水裕香先生、渡邊俊之先生、志田玄貴先生、中川育磨先生、野口淳史先生、神田真聡先生には基礎実験の基本的な手技についてご指導を賜りました。心より感謝を申し上げます。大村一将先生、久田諒先生、菅原恵理先生、谷村瞬先生、柴田悠平先生、尾形裕介先生、狩野皓平先生、阿部靖矢先生、下山修平先生、麻生邦之先生、佐藤太貴先生、蜷川慶太先生、吉村大先生、菅原正成先生、曾若櫻大学院生には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論、ご助言をいただきました。ここに深く感謝の意を示します。

当科実験助手の小出秀之さん、下道真由美さん、櫻井美和さん、金子由美子さん、山田あや香さん、石倉唯さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。感謝を申し上げます。

また滑膜検体の採取にあたり多大なるご協力をいただきました整形外科の諸先生方、研究の趣旨にご理解とご協力をいただき研究の遂行を可能にしてくださった多くの患者様方に心より感謝申し上げます。

この他にも、この論文作成にあたり、御協力、御助言、ご支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩の皆様に対しまして、心より感謝を申し上げます。

最後に、温かい励ましを与えてくれた夫、いつも笑顔で応援してくれた息子達、常に温かく接し、この道を進むきっかけを与え、どんな時でも常に自分の意思を尊重してくれた両親に心から感謝いたします。

9. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

10. 参考文献

- Abreu, J.R., de Launay, D., Sanders, M.E., Grabiec, A.M., van de Sande, M.G., Tak, P.P., and Reedquist, K.A. (2009). The Ras guanine nucleotide exchange factor RasGRF1 promotes matrix metalloproteinase-3 production in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis research & therapy* 11, R121.
- Adachi, R., Krilis, S.A., Nigrovic, P.A., Hamilton, M.J., Chung, K., Thakurdas, S.M., Boyce, J.A., Anderson, P., and Stevens, R.L. (2012). Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 (RasGRP4) involvement in experimental arthritis and colitis. *J Biol Chem* 287, 20047-20055.
- Ahmad, R., Sylvester, J., and Zafarullah, M. (2007). MyD88, IRAK1 and TRAF6 knockdown in human chondrocytes inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-13 gene expression and promoter activity by impairing MAP kinase activation. *Cellular signalling* 19, 2549-2557.
- Aletaha, D., and Smolen, J.S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA* 320, 1360-1372.
- Anand, P., Shenoy, R., Palmer, J.E., Baines, A.J., Lai, R.Y., Robertson, J., Bird, N., Ostefeld, T., and Chizh, B.A. (2011). Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapiomod in neuropathic pain following nerve injury. *European journal of pain* (London, England) 15, 1040-1048.
- Appels, N.M., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H. (2005). Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *The oncologist* 10, 565-578.
- Arthur, J.S., and Ley, S.C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature reviews Immunology* 13, 679-692.
- Balasis, M.E., Forinash, K.D., Chen, Y.A., Fulp, W.J., Coppola, D., Hamilton, A.D., Cheng, J.Q., and Sehti, S.M. (2011). Combination of farnesyltransferase and Akt inhibitors is synergistic in breast cancer cells and causes significant breast tumor regression in ErbB2 transgenic mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2852-2862.

Barchowsky, A., Frleta, D., and Vincenti, M.P. (2000). Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine* 12, 1469-1479.

Bohm, C., Hayer, S., Kilian, A., Zaiss, M.M., Finger, S., Hess, A., Engelke, K., Kollias, G., Kronke, G., Zwerina, J., et al. (2009). The alpha-isoform of p38 MAPK specifically regulates arthritic bone loss. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183, 5938-5947.

Bottini, N., and Firestein, G.S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 9, 24-33.
Brown, J.H., Del Re, D.P., and Sussman, M.A. (2006). The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circulation research* 98, 730-742.

Clark, A.R., and Dean, J.L. (2012). The p38 MAPK Pathway in Rheumatoid Arthritis: A Sideways Look. *The open rheumatology journal* 6, 209-219.

Cox, A.D., and Der, C.J. (2002). Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities. *Current opinion in pharmacology* 2, 388-393.

de Launay, D., Vreijling, J., Hartkamp, L.M., Karpus, O.N., Abreu, J.R., van Maanen, M.A., Sanders, M.E., Grabiec, A.M., Hamann, J., Orum, H., et al. (2010). Silencing the expression of Ras family GTPase homologues decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *The American journal of pathology* 177, 3010-3024.

Guerne, P.A., Zuraw, B.L., Vaughan, J.H., Carson, D.A., and Lotz, M. (1989). Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest* 83, 585-592.

Hashimoto, T., Yasuda, S., Koide, H., Kataoka, H., Horita, T., Atsumi, T., and Koike, T. (2011). Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 13, R154.

Hashizume, M., Hayakawa, N., and Mihara, M. (2008). IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1635-1640.

Hashizume, M., Hayakawa, N., Suzuki, M., and Mihara, M. (2009). IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF- α induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. *Rheumatol Int* 29, 1449-1454.

Iwano, S., Asaoka, Y., Akiyama, H., Takizawa, S., Nobumasa, H., Hashimoto, H., and Miyamoto, Y. (2011). A possible mechanism for hepatotoxicity induced by BIRB-796, an orally active p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Journal of applied toxicology : JAT* 31, 671-677.

Izquierdo, E., Canete, J.D., Celis, R., Del Rey, M.J., Usategui, A., Marsal, S., Sanmarti, R., Criado, G., and Pablos, J.L. (2011). Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum* 63, 2575-2583.

Kiener, H.P., Niederreiter, B., Lee, D.M., Jimenez-Boj, E., Smolen, J.S., and Brenner, M.B. (2009). Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 60, 1305-1310.

Kiener, H.P., Watts, G.F., Cui, Y., Wright, J., Thornhill, T.S., Skold, M., Behar, S.M., Niederreiter, B., Lu, J., Cernadas, M., et al. (2010). Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture. *Arthritis Rheum* 62, 742-752.

Kojima, F., Matnani, R.G., Kawai, S., Ushikubi, F., and Crofford, L.J. (2011). Potential roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen* 31, 157-166.

Kono, M., Yasuda, S., Stevens, R.L., Koide, H., Kurita, T., Shimizu, Y., Kanetsuka, Y., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., et al. (2015). Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation. *Arthritis Rheumatol* 67, 396-407.

Kubota, Y., O'Grady, P., Saito, H., and Takekawa, M. (2011). Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. *Nature cell biology* 13, 282-291.

Kumkumian, G.K., Lafyatis, R., Remmers, E.F., Case, J.P., Kim, S.J., and Wilder, R.L. (1989). Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol* 143, 833-837.

Lancet, J.E., Gojo, I., Gotlib, J., Feldman, E.J., Greer, J., Liesveld, J.L., Bruzek, L.M., Morris, L., Park, Y., Adjei, A.A., et al. (2007). A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 109, 1387-1394.

Lancet, J.E., and Karp, J.E. (2003). Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy. *Blood* 102, 3880-3889.

Lebre, M.C., Jongbloed, S.L., Tas, S.W., Smeets, T.J., McInnes, I.B., and Tak, P.P. (2008). Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP-dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am J Pathol* 172, 940-950.

Lee, A., Qiao, Y., Grigoriev, G., Chen, J., Park-Min, K.H., Park, S.H., Ivashkiv, L.B., and Kalliolias, G.D. (2013). Tumor necrosis factor alpha induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 65, 928-938.

Lee, D.M., Kiener, H.P., Agarwal, S.K., Noss, E.H., Watts, G.F., Chisaka, O., Takeichi, M., and Brenner, M.B. (2007). Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 315, 1006-1010.

Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.

Li, L., Yang, Y., and Stevens, R.L. (2002). Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors. *Mol Immunol* 38, 1283-1288.

Li, L., Yang, Y., Wong, G.W., and Stevens, R.L. (2003). Mast cells in airway hyporesponsive C3H/HeJ mice express a unique isoform of the signaling protein Ras guanine nucleotide releasing protein 4 that is unresponsive to diacylglycerol and phorbol esters. *J Immunol* 171, 390-397.

Lotz, M., and Guerne, P.A. (1991). Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 266, 2017-2020.

Lu, N., and Maleski, C.J. (2019). Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression. *International journal of molecular sciences* 20.

McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205-2219.

Mengshol, J.A., Vincenti, M.P., and Brinckerhoff, C.E. (2001). IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic acids research* 29, 4361-4372.

Miura, H., Kondo, Y., Matsuda, M., and Aoki, K. (2018). Cell-to-Cell Heterogeneity in p38-Mediated Cross-Inhibition of JNK Causes Stochastic Cell Death. *Cell reports* 24, 2658-2668.

Morel, J., Audo, R., Hahne, M., and Combe, B. (2005). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *The Journal of biological chemistry* 280, 15709-15718.

Muller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B.N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R.E., and Gay, S. (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 149, 1607-1615.

Myasoedova, E., Crowson, C.S., Kremers, H.M., Therneau, T.M., and Gabriel, S.E. (2010). Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum* 62, 1576-1582.

Na, H.J., Lee, S.J., Kang, Y.C., Cho, Y.L., Nam, W.D., Kim, P.K., Ha, K.S., Chung, H.T., Lee, H., Kwon, Y.G., et al. (2004). Inhibition of farnesyltransferase prevents collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory gene expression through suppression of p21(ras)-dependent NF-kappaB activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 173, 1276-1283.

Nakayamada, S., Kubo, S., Iwata, S., and Tanaka, Y. (2016). Recent Progress in JAK Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *BioDrugs* 30, 407-419.

Nishikawa, M., Myoui, A., Tomita, T., Takahi, K., Nampei, A., and Yoshikawa, H. (2003). Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis Rheum* 48, 2670-2681.

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, 628-636.

Paunovic, V., and Harnett, M.M. (2013). Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs* 73, 101-115.

Pei, Y., Harvey, A., Yu, X.P., Chandrasekhar, S., and Thirunavukkarasu, K. (2006). Differential regulation of cytokine-induced MMP-1 and MMP-13 expression by p38 kinase inhibitors in human chondrosarcoma cells: potential role of Runx2 in mediating p38 effects. *Osteoarthritis and cartilage* 14, 749-758.

Philips, M.R., and Cox, A.D. (2007). Geranylgeranyltransferase I as a target for anti-cancer drugs. *The Journal of clinical investigation* 117, 1223-1225.

Raponi, M., Lancet, J.E., Fan, H., Dossey, L., Lee, G., Gojo, I., Feldman, E.J., Gotlib, J., Morris, L.E., Greenberg, P.L., et al. (2008). A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 2589-2596.

Redlich, K., and Smolen, J.S. (2012). Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 11, 234-250.

Rein, P., and Mueller, R.B. (2017). Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Rheumatol Ther* 4, 247-261.

Reuter, C.W., Morgan, M.A., and Bergmann, L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 96, 1655-1669.

Reuther, G.W., Lambert, Q.T., Rebhun, J.F., Caligiuri, M.A., Quilliam, L.A., and Der, C.J. (2002). RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *The Journal of biological chemistry* 277, 30508-30514.

Rojas, J.M., Oliva, J.L., and Santos, E. (2011). Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes & cancer* 2, 298-305.

Saklatvala, J. (2004). The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Current opinion in pharmacology* 4, 372-377.

Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Smolen, J.S., Schmid, B.J., Steiner, C.W., Bitzan, P., Zenz, P., Redlich, K., Xu, Q., and Steiner, G. (2000). Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 2501-2512.

Sebti, S.M., and Der, C.J. (2003). Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 3, 945-951.

Sharma, G.D., He, J., and Bazan, H.E. (2003). p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *The Journal of biological chemistry* 278, 21989-21997.

Shigeyama, Y., Pap, T., Kunzler, P., Simmen, B.R., Gay, R.E., and Gay, S. (2000). Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 2523-2530.

Shimamura, S., Nakamura, H., Yasuda, S., Kono, M., Kono, M., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Bohgaki, T., Shimizu, T., et al. (2018). Ectopic RASGRP2 (CalDAG-GEFI) expression in rheumatoid synovium contributes to the development of destructive arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 77, 1765-1772.

Smith, M.D. (2011). The normal synovium. *The open rheumatology journal* 5, 100-106.

Smolen, J.S., and Aletaha, D. (2015). Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol* 11, 276-289.

Suire, S., Lecureuil, C., Anderson, K.E., Damoulakis, G., Niewczas, I., Davidson, K., Guillou, H., Pan, D., Jonathan, C., Phillip, T.H., et al. (2012). GPCR activation of Ras and PI3Kc in neutrophils depends on PLCb2/b3 and the RasGEF RasGRP4. *EMBO J* 31, 3118-3129.

Szekanecz, Z., and Koch, A.E. (2016). Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12, 5-13.

Thiel, M.J., Schaefer, C.J., Lesch, M.E., Mobley, J.L., Dudley, D.T., Tecle, H., Barrett, S.D., Schrier, D.J., and Flory, C.M. (2007). Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms. *Arthritis Rheum* 56, 3347-3357.

Tolboom, T.C., van der Helm-Van Mil, A.H., Nelissen, R.G., Breedveld, F.C., Toes, R.E., and Huizinga, T.W. (2005). Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1999-2002.

Troen, B.R. (2006). The regulation of cathepsin K gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068, 165-172.

Whyte, D.B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T.N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J.J., Bishop, W.R., and Pai, J.K. (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* 272, 14459-14464.

Yanae, M., Tsubaki, M., Satou, T., Itoh, T., Imano, M., Yamazoe, Y., and Nishida, S. (2011). Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 74.

Yang, Y., Li, L., Wong, G.W., Krilis, S.A., Madhusudhan, M.S., Sali, A., and Stevens, R.L. (2002). RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-

releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis, and mast cell leukemia patients and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function. *J Biol Chem* 277, 25756-25774.

Zhu, L., Xia, C., Wu, L., Zhang, Y., Liu, J., Chen, Y., Liu, J., Xiao, Y., Nie, K., Huang, L., et al. (2019). The critical role of RasGRP4 in the growth of diffuse large B cell lymphoma. *Cell Commun Signal* 17, 92.