



Title	自己免疫疾患の疾患関連遺伝子C8orf13についての機能解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	下山, 修平
Description	配架番号 : 2611
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14492号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81846
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shuhei_Shimoyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 下山 修平

学 位 論 文 題 名

自己免疫疾患の疾患関連遺伝子 *C8orf13* についての機能解析
(A functional analysis of autoimmune disease-associated gene *C8orf13*)

【背景と目的】 関節リウマチ (RA) は関節に慢性炎症をきたす自己免疫疾患であり、遺伝要因と環境要因から成る。遺伝要因と病態は深く関連しており、その多くは炎症に関わるサイトカインによるものである。TNF α 阻害薬や IL-6R 阻害薬、JAK 阻害薬といった分子標的薬は関節リウマチに対してよく奏効するが、これらの遺伝子異常が RA でよくみられることが報告されている。線維芽細胞や血管内皮細胞などの非免疫細胞では JAK-STAT3 経路を活性化する IL-6 と NF κ B 経路を活性化する TNF α や IL-17などを同時に刺激すると相乗的に NF κ B 経路が活性化され、IL-6 の発現が上昇する。NF κ B 経路活性下で IL-6 刺激が IL-6 産生を促すポジティブフィードバック機構のことを IL-6 アンプと言う。RA では機能が同定されている疾患感受性部位の多くが、IL-6 アンプに関わるものである。一方、ゲノムワイド関連解析で同定されている疾患感受性部位の中で機能がよくわかっていないものも多い。今回、RA を始めとした自己免疫疾患で同定されている rs13277113 という遺伝子間にある一塩基多型 (SNP) が量的形質遺伝子座として同定されており、本来 G であるアレルが A に置き換わると免疫細胞で rs13277113 の近傍にある *C8orf13* の発現が上昇することが報告されているが、*C8orf13* がどのような機能を持つかわかっていない。本研究では *C8orf13* が IL-6 アンプに関わるものだと仮説を立て *C8orf13* の機能、その分子メカニズム、マウス、ヒトに与える影響について研究を開始した。

【対象と方法】 *C8orf13* の機能を確認するため、血管内皮細胞で siRNA および shRNA を用いたノックダウン実験を行い、IL-6 を始めとした炎症刺激で誘導される mRNA の発現をリアルタイム PCR で測定した。また *C8orf13* を挿入したプラスミドを作成し過剰発現系を作成し、レポーターアッセイを用いた IL-6 や NF κ B のプロモーター活性を測定した。また分子メカニズムを絞り込むためウェスタンブロッティングを用いて、シグナルパスウェイに関わる分子のダイナミクスを観測した。免疫沈降法を用いて、*C8orf13* と結合する分子の探索を行った。*C8orf13* による分子相互作用の影響を確認するため、PLA assay を行った。同様の現象がマウスでも確認できるか確認するため、関節炎および皮膚炎マウスモデルを用いてノックダウン実験を行った。ヒトでの rs13277113 の SNP の保有率を確認するため RA と全身性エリテマトーデス (SLE) 患者で genotyping を行った。またヒトの関節で rs13277113 と *C8orf13* の関係および炎症との関連を確認するため、*C8orf13* および NF κ B 経路活性化マーカーであるリン酸化 p65、JAK-STAT3 経路の活性化マーカーであるリン酸化 STAT3 の免疫組織化学染色を行った。

【結果】 *C8orf13* のノックダウンを行った血管内皮細胞を TNF α 、IL-6 で刺激し、IL-6 の測定したところ、IL-6 の発現が有意に抑制された。また *C8orf13* の過剰発現した細胞では IL-

6 や NFκB のプロモーター活性が有意に亢進した。C8orf13 のノックダウン細胞では p65 の核内移行が抑制された。C8orf13 は免疫沈降法で TNFR1 複体内の RIPK1、Caspase8、TNFR1、TRAF2 といった分子と結合し、C8orf13 のノックダウン細胞では Caspase8 によって切断された RIPK1 が増加していた。Caspase8 と RIPK1 の分子相互作用を確かめるために行った PLA assay では C8orf13 ノックダウン細胞で相互作用の頻度が増加していた。また RIPK1 を介したアポトーシスマーカーも C8orf13 ノックダウン細胞では抑制されていた。F759 を用いた関節炎および皮膚炎モデルでは C8orf13 のノックダウンによってそれぞれの炎症のフェノタイプが有意に抑制された。ヒトでの rs13277113 のリスクアレルの保有率は健常人の約 40% に比して RA 80%、SLE 97% で高い傾向にあった。ヒトの関節滑膜を用いた免疫組織化学染色では C8orf13 の発現はコントロールと比較して RA 患者で有意に発現が高かった。また rs13277113 のリスクアレルを持つ RA 患者で C8orf13 の発現が高い傾向にあった。rs13277113 と NFκB 経路、JAK-STAT 経路の相関を治療による修飾がされていない検体で確かめたところ、リスクアレルを持つ滑膜検体で NFκB 経路、JAK-STAT 経路が活性化されている傾向がみられた。

【考察】 C8orf13 のノックダウン細胞およびマウスで IL-6 を始めとする炎症が抑制されたことから C8orf13 は NFκB 経路を活性化する分子と考えられた。またその機序として、NFκB 経路の上流で TNFR1 複合体にある RIPK1 と RIPK1 を切断する酵素である Caspase8 に結合することで物理的に RIPK1 と Caspase8 の反応を阻害する機構が考えられた。RIPK1 は切断により TNFα による古典的経路活性化に必要なユビキチン化部位を失うため、その反応を阻害することで TNFα に対する感受性を亢進する機序が想定された。また、関節リウマチ患者において、C8orf13 の発現がコントロールと比べて有意に高く、それは rs13277113 のリスクアレルに依存する可能性が考えられた。C8orf13 を介した rs13277113 の機能が明らかになったことで、rs13277113 の genotyping によるリスク層別化および個別化医療の最適化が進む可能性がある。またアポトーシス、ネクローシスに関わる RIPK1 の切断に C8orf13 が関わりとわかったことで、今後細胞死に関わる自己免疫疾患の異常な自己抗原提示機構に関わる可能性があり、炎症のみならず免疫に与える分子である可能性も示唆された。

【結論】 関節リウマチにおいて C8orf13 は rs13277113 を介して NFκB 経路を活性化し炎症を増悪させる分子である。