HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	下山, 修平
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2611 他
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/2115/81847
Type	doctoral thesis
File Information	Shuhei_Shimoyama_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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*)

2021 年 3 月

北海道大学

下山　修平

Shimoyama Shuhei

【背景と目的】関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) は関節に慢性炎症をきたす自己免疫疾患であり、その病因は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。Tumor necrosing factor α (TNF-α)阻害薬や interleukin-6 receptor (IL-6R)阻害薬、Janus kinase (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。線維芽細胞や血管内皮細胞などの非免疫細胞を JAK- signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)経路を活性化する IL-6 と nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) 経路を活性化する TNF-αや IL-17 などで同時に刺激すると相乗的に NF-κB 経路が活性化され、IL-6 の発現が上昇する。NF-κB 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。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 であるアリルが 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。そこで、本研究では、「C8orf13 が IL-6 アンプの制御に関与する」との仮説を立て、C8orf13 の機能、その分子メカニズム、およびマウス、ヒトに与える影響について研究を行った。

【対象と方法】まず、C8orf13 の機能を確かめるため、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 をはじめとした炎症刺激で誘導される分子の mRNA 発現を quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)で測定した。また、*C8orf13* complementary DNA (cDNA)を挿入したプラスミドを作製して過剰発現系を構築し、レポーターアッセイを用いた IL-6 や NF-κB のプロモーター活性の測定、および分子メカニズムを絞り込むために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。さらに、免疫沈降法を用いて、C8orf13 と結合する分子の探索を行い、C8orf13 との分子相互作用の影響を確かめるため、PLA を行った。次に、同様の現象がマウスでも見られるか確かめるため、関節炎および皮膚炎マウスモデルを用いて *C8orf13* のノックダウン実験を行った。続いて、ヒトでの rs13277113 の SNP の保有率を確かめるため、RA と全身性エリテマトーデス (SLE) 患者で genotyping を行い、さらにヒトの関節で rs13277113 と C8orf13 の関係および炎症との関連を確かめるために、C8orf13 および NF-κB 経路の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と IL-6 で *in vitro* 刺激し、培養上清中の IL-6 産生量を測定したところ、発現は有意に抑制された。逆に、C8orf13 を過剰発現した細胞では IL-6 や NF-κB 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ており、C8orf13 は免疫沈降法で TNFR1 複合体内の RIPK1、Caspase-8、TNFR1、TRAF2 といった分子と結合することがわかった。さらに詳細に分子機構を検討したところ、*C8orf13* のノックダウン細胞では Caspase-8 によって切断された RIPK1 が増加しており、Caspase-8 と RIPK1 の分子相互作用を確かめるため行った 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。次に、C8orf13 の生理学的役割を調べるために、F759 を用いた関節炎および皮膚炎モデルにおいて *C8orf13* をノックダウンすると、それぞれのモデルで炎症のフェノタイプが有意に抑制された。続いて、ヒトでの rs13277113 のリスクアリルの保有率を調べたところ、健常人の 41%に比して RA 82%、SLE 97%と自己免疫疾患患者で高い傾向にあることがわかった。実際に、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く (染色強度 RA 1675 vs 変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 101.3, p=0.033)、rs13277113 のリスクアリルを持つ RA 患者で C8orf13 の発現が高い傾向にあった。rs13277113 と NF-κB 経路および JAK-STAT 経路の相関を治療による修飾がされていないヒト検体で確かめたところ、リスクアリルを持つ滑膜検体において NF-κB 経路と JAK-STAT 経路がともに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やマウスで IL-6 の産生が抑制されたことから、C8orf13 は NF-κB 経路を活性化する分子であると考えられた。またその機序として、NF-κB 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 Caspase-8 に C8orf13 が結合することによって、物理的に RIPK1 と Caspase-8 の反応を阻害する機構が考えられた。RIPK1 は切断により TNF-αによる古典的 NF-κB 経路の活性化に必要なユビキチン化部位を失うため、C8orf13 はその反応を阻害することで TNF-αに対する感受性を亢進する機序が想定された。また、関節リウマチ患者由来の滑膜において、C8orf13 の発現がコントロールと比べて有意に高く、rs13277113 のリスクアリルに依存する可能性が考えられた。このように、本研究で 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開発に寄与する可能性がある。またアポトーシス、ネクローシスに関わる RIPK1 の切断に C8orf13 が関わることから、自己免疫疾患において細胞死異常に関わる

自己抗原提示機構に介入する可能性があり、C8orf13 は炎症活性化のみならず自己免疫に関連す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 NF-κB 経路を活性化し、炎症を増悪させる分子である。