



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
Author(s)	下山, 修平; Shimoyama, Shuhei
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14492
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96781
Type	doctoral thesis
File Information	Shuhei_Shimoyama.pdf



学位論文

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

学位論文

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

目 次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
1. 緒言	6 頁
1-1 関節リウマチ	
1-2 関節リウマチと遺伝	
1-3 IL-6 アンプ (炎症回路)	
1-4 仮説及び本研究の目的	
2. 実験方法	10 頁
2-1 細胞及びマウス	
2-2 抗体及び試薬	
2-3 quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)	
2-4 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	
2-5 MTT assay	
2-6 ヒト C8orf13 に対する short hairpin RNA (shRNA)を用いた遺伝子ノックダウン	
2-7 ヒト C8orf13 に対する small interfering RNA (siRNA)を用いた遺伝子ノックダウン	
2-8 皮膚炎および関節炎誘導モデルと炎症スコアの評価	
2-9 Western Blotting	
2-10 Luciferase Reporter Assay	
2-11 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内タンパク質局在の観察	
2-12 免疫沈降法 (Immunoprecipitation assay : IP)	
2-13 ヒト滑膜組織を用いた免疫組織化学染色	
2-14 Proximity Ligation Assay (PLA)	
2-15 C8orf13 の SNP シーケンス及び variant 発現	
2-16 統計処理	

3. 結果	19 頁
3-1 C8orf13 の IL-6 アンプへの関与についての検討	
3-2 C8orf13 の NF- κ B 経路に関与するメカニズムの探索	
3-3 C8orf13 は TNFR1 複合体の分子群に結合する	
3-4 C8orf13 は RIPK1 に結合し、RIPK1 の切断を阻害することで炎症活性を示す	
3-5 C8orf13 は関節炎および皮膚炎マウスモデルにおいて炎症を抑制する	
3-6 C8orf13 は変形性関節症に対して関節リウマチで発現が高い	
4. 考察	51 頁
5. 結論	53 頁
6. 謝辞	54 頁
7. 利益相反	55 頁
8. 引用文献	56 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shuhei Shimoyama, Yuki Tanaka, Rie Hasebe, Mitsutoshi Ota, Nobuya Abe, Michihito Kono, Isao Matsumoto, Daisuke Kamimura, Ikuko Takahashi, Kumiko Tanaka, Mona Uchida, Shintaro Hojyo, Tatsuya Atsumi, and Masaaki Murakami

C8orf13 functions as a positive regulator of the NF- κ B pathway to develop inflammatory diseases.

Journal of experimental medicine、投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

下山 修平、田中 勇希、上村 大輔、渥美 達也、村上 正晃
自己免疫性疾患関連遺伝子 NFAG1 の NF- κ B 経路を介した炎症誘導機構
第 47 回日本臨床免疫学会総会、2019 年 10 月 17 日、札幌

下山 修平、田中 勇希、上村 大輔、渥美 達也、村上 正晃
自己免疫疾患関連遺伝子 NFAG1 による非免疫細胞での炎症誘導機構
第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 13 日、浜松

下山 修平、田中 勇希、上村 大輔、渥美 達也、村上 正晃
自己免疫疾患関連遺伝子 NFAG1 による非免疫細胞での炎症誘導機構
第 64 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2020 年 8 月 17 日~9 月 15 日、Web 開催

要旨

【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 necrosis 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- κ B) 経路を活性化する TNF- α や IL-17 などと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。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- κ B 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認するため、PLA を行った。次に、同様の現象がマウスでも見られるか確認するため、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認するために、*C8orf13* および NF- κ B 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- κ B 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 のリスクアレ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 のリスクアレルを持つ RA 患者で *C8orf13* の発現が高い傾向にあった。rs13277113 と NF- κ B 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、リスクアレルを持つ滑膜検体において NF- κ B 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- κ B 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- κ B 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- κ B 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 のリスクアレ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- κ B 経路を活性化し、炎症を増悪させる分子である。

略語表

本文中、および図中で使用した略語は以下の通りである。

ACPA	Anti-cyclic citrullinated peptide antibody
BLK	B Lymphocyte Kinase
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
C8orf13	Chromosome 8 open reading frame 13
DMARDs	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
eQTL	expression Quantitative Trait Locus
FAM167A	Family with sequence similarity 167 member A
FAM167B	Family with sequence similarity 167 member B
FBS	fetal bovine serum
FLS	Fibroblast-like synoviocyte
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GWAS	Genome wide association study
HEK293T	Human Embryonic Kidney cells 293 T cell
HRGEC	Human renal glomerular endothelial cell
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IKK	I κ B kinase
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 receptor
IP	Immunoprecipitation
JAK	Janus kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PAD	Peptidyl arginine deiminase
PADI4	Peptidyl arginine deiminase, type IV
PBS	Phosphate buffered saline
PLA	Proximity Ligation Assay
qPCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction

RA	Rheumatoid arthritis
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RBX1	Ring-Box 1
RIPK1	Receptor interacting Serine/Threonine kinase 1
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SKP1	S-phase kinase associated protein 1
SLE	Systemic lupus erythematosus
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
SSc	Systemic sclerosis
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TLR7	Toll-like receptor 7
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
TNF- α	Tumor necrosing factor- α
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFRSF14	Tumor necrosing factor receptor superfamily member 14
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain
TRAF1	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TYK2	Tyrosine kinase 2
WB	Western blotting

1. 緒言

1-1 関節リウマチ

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA)は関節滑膜の炎症、滑膜の肥厚・柔毛組織の増殖により骨・軟骨破壊をきたす自己免疫疾患である (Smolen et al., 2016)。本来、自己抗原は抗原提示されないが、滑膜組織に由来するペプチドが樹状細胞などの抗原提示細胞によって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)。通常、関節腔は免疫細胞のない部位であるが、炎症が起こるとマクロファージ様滑膜細胞によって形成されているバリアが破綻し、血管内から関節腔内に T 細胞、マクロファージ、B 細胞が浸潤し、滑膜の炎症を引き起こす (Culemann et al., 2019)。滑膜での炎症により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)が増殖する。FLS は matrix metalloproteinase (MMP)などを産生することで軟骨破壊を引き起こす。また 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、骨破壊を誘導する (Schett and Gravallesse, 2012)。

一部の RA 患者では多関節炎に加えて心膜炎、腸間膜動脈梗塞、腎動脈梗塞、多発神経炎、皮膚潰瘍、紫斑、上強膜炎などの多彩な血管炎症状が出現することがあり、リウマトイド血管炎と呼ばれている (Cojocaru et al., 2015)。また RA に間質性肺炎が併存することも珍しくないことから、一部の RA では血管炎病態があると考えられている。

関節リウマチは、メトトレキサートを始めとした疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease-modifying anti-rheumatic drugs : DMARDs)、Tumor necrosis factor α (TNF- α)阻害薬や interleukin-6 receptor (IL-6R)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 Janus kinase (JAK)阻害薬により治療成績は劇的に改善している (Aletaha and Smolen, 2018)。これらの薬剤開発をする上で、先の免疫細胞、非免疫細胞を標的にした治療が検討されたが、免疫担当細胞を標的とした治療は必ずしも有効ではなかった。その中で B 細胞の表面抗原である CD20 を標的としたリツキシマブや樹状細胞などの抗原提示細胞から抗原提示細胞表面の CD80/CD86 に結合し、CD28 共刺激シグナルを阻害することで T 細胞の活性化を抑制するアバタセプトは一定の効果を発揮する (Gottenberg et al., 2019)。一方、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ヒトを対象とした臨床試験では期待される有効性は認められなかった (Szekanecz and Koch, 2016)。

一方、血管内皮細胞の炎症は関節腔に免疫細胞を浸潤させる。さらに FLS は IL-6、MMP、RANKL など種々のサイトカインを産生し、骨・軟骨破壊に関わり、TNF- α 阻

害薬や IL-6R 阻害薬などの生物学的製剤の標的となっていると考えられている。

1-2 関節リウマチと遺伝

RA の原因は遺伝要因と環境要因がそれぞれ報告されている。RA は発症要因の約 50-70%が遺伝要因とされ (Karami et al., 2019)、RA の一卵性双生児の疾患一致率は 12~15%、50%の遺伝子を共有する二卵性双生児や兄弟での一致率は 2~4%とされている。家族集積性に関連する要因として、貧富、環境要因などが影響する可能性があるが、それらを加味しても遺伝要因の関与は確実であると考えられている。ヒトの全ゲノムの解読、遺伝子多型のタイピング技術の進展に伴い、ゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study : GWAS) が多く報告され、疾患関連遺伝子として報告される数が 2007 年以降増えている。GWAS は全ての染色体に分布する遺伝子多型を数十万種類調べ、その頻度を患者と健常人で比較する。とりわけ、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) が解析多型の中心になっている。一部の SNP はアミノ酸置換を介してタンパク質機能を変化させたり、遺伝子転写制御領域で転写因子の結合に影響をもたらしたりする。発現に影響をもたらすものは量的形質遺伝子座 (expression Quantitative Trait Locus : eQTL) と呼ばれる。RA の疾患感受性遺伝子がコードする分子とそれが関係する経路をみると、TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)、TNF- α -induced protein 3 (TNFAIP3)、TNF receptor superfamily member 14 (TNFRSF14) など NF- κ B シグナルに関与する遺伝子が多く、このシグナルパスウェイが RA の病態形成に深くかかわっていることを示唆している。また RA を含む自己免疫疾患の疾患関連遺伝子には T 細胞、B 細胞などの獲得免疫に関与する遺伝子群と自然免疫に関連する遺伝子群が多く、病態への関与が示唆される。また RA では抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide antibody : ACPA) が病態に深く関与することが知られているが、タンパク質中のアルギニン残基をシトルリンというアミノ酸に置換する働きを持つペプチジルアルギニン・デイミナーゼ (peptidyl arginine deiminase : PAD) をコードする遺伝子のタイプ 4 (Peptidyl arginine deiminase, type IV : PADI4) が RA と関連することが知られている (Suzuki et al., 2003)。これらのように、遺伝要因の解析は RA の病態に欠かせない因子を明らかにするとともに疾患の成立や進展予測、予後予測、薬剤反応性予測を可能にし、将来的なテーラーメイド医療に重要な情報を与える可能性がある。

1-3 IL-6 アンブ (炎症回路)

我々は自己免疫疾患、特に RA における慢性炎症誘導機構として『IL-6 アンブ (炎症回路)』を同定した (Murakami et al., 2019; Ogura et al., 2008)。IL-6 は細胞表面上の IL-6R 複合体に結合すると、細胞内に signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

依存性の正のシグナルと suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) 依存性の負のシグナルを伝達する。当研究室で樹立した F759 マウスでは、gp130 上の 759 番目の tyrosine 残基を phenylalanine に置換させた mutation (F759Y) をノックインすることにより、IL-6 受容体複合体を構成する gp130 上の SOCS3 の結合サイトが失われることで IL-6 シグナルのネガティブフィードバック機構が破綻し、慢性的な STAT3 活性化が引き起こされる。このマウスでは関節炎を自然発症する他、脾腫、自己抗体の産生などの自己免疫病態を発症する。このマウスを解析した結果、血管内皮細胞、線維芽細胞などの非免疫細胞において、NF- κ B と STAT3 が同時に活性化することで、炎症性サイトカイン、ケモカインが相乗的に発現することを発見した (Atsumi et al., 2002)。すなわち、IL-6 タンパク質の存在化で NF- κ B シグナルが活性化すると、*Il-6 messenger ribonucleic acid* (mRNA) が発現増強するポジティブフィードバック機構を見出した。この現象は正常なマウスの骨髄移植によっても起こるため、免疫細胞ではなく非免疫細胞のサイトカインシグナリングが病態形成に重要であることを示唆している (Sawa et al., 2006)。この機構により、TNF- α 阻害薬や IL-6R 阻害薬などの生物学的製剤によって単一の分子の機能を抑えることで著明な疾患活動性が抑制されることが説明可能であり、RA において FLS や血管内皮細胞が病態を形成する重要な細胞であることも示唆している。また、RA における大規模 GWAS では、TNF- α や IL-6R、Tyrosine kinase 2 (TYK2) といった NF- κ B 経路および JAK-STAT 経路に関わる分子に関連する SNP も RA の疾患関連 SNP として同定されており、遺伝要因と病態、そして有効な薬剤は密接な関連がある (Okada et al., 2014)。

1-4 仮説および本研究の目的

上述したように遺伝要因と病態、そして有効な治療法は密接な関連があり、その中でも IL-6 アンブに関わる分子が多く同定されている。一方で疾患関連 SNP の中で機能がわかっていない分子も多くあり、機能が同定されていない分子の中にも病態に重要な分子があると考えた。そこで本研究では、役割が同定されていない SNP の中で C8orf13-BLK という SNP に注目した。

C8orf13-BLK は 8 番染色体の遺伝子間にある SNP で、近傍に C8orf13 (Chromosome 8 open reading frame 13, 別名 FAM167A, Family with sequence similarity 167 member A) と B Lymphocyte Kinase (BLK) という遺伝子が存在し、2008 年に全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus : SLE) 関連のリスク SNP として初めて同定された (Hom et al., 2008)。その後、RA (Ito et al., 2009)、全身性強皮症 (Systemic Sclerosis : SSc) (Coustet et al., 2011; Gourh et al., 2010)、シェーグレン症候群 (Lessard et al., 2013)、巨細胞性動脈炎 (Torres et al., 2010)、多発性筋炎/皮膚筋炎 (Sugiura et al., 2014)、気管支喘息 (Liu et al., 2016) のリスク SNP として同定されている。既報によれば、C8orf13-BLK はアレルが

G/G の場合と比較して、リスクアレル A/A、A/G の場合に *Blk* の mRNA 発現量が下がり、逆に *C8orf13* の mRNA の発現量が上がる eQTL として同定されている (Aqrawi et al., 2018; Hom et al., 2008; Lessard et al., 2013)。BLK は Src ファミリーのチロシンキナーゼをコードする遺伝子で、B 細胞の成熟や分化に重要である (Samuelson et al., 2012) が、一方で *C8orf13* の機能についての報告は全くない。自己免疫疾患のみならずアレルギー性疾患のリスクになることから *C8orf13* は IL-6 アンプに関連する炎症増悪因子ではないかと仮説を立て、*C8orf13* の機能および分子メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

2. 方法

2-1 細胞およびマウス

本研究で用いたヒト滑膜線維芽細胞 (FLS)は北海道大学病院で行われた膝関節置換術からコラゲナーゼ D で分離培養したものを用いた。ヒト腎糸球体血管内皮細胞 (HRGEC, Human renal glomerular endothelial cell)、ヒト胎児腎細胞 293 T 細胞 (HEK293T, Human Embryonic Kidney cells 293 T)は Cell systems (DS pharma)で購入した。いずれの細胞も Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Life Technologies)に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) (Thermo Scientific)を添加したものを用いて、37°Cかつ 5% CO₂ の条件下において継代、培養した。また培養に使用した器具類はすべてオートクレーブによる滅菌処理を施し、すべての操作をクリーンベンチ内で無菌的に行った。

野生型マウス (C57BL/6)は日本 SLC 株式会社より購入して用いた。皮膚炎、関節炎モデルマウスとして、gp130 の 759 番目の tyrosine 残基を phenylalanine に置換させた変異型 gp130 (Y759F)を全身で発現する F759 マウス (gp130^{Y759F/Y759F} ノックインマウス)を使用した (Atsumi et al., 2002)。マウス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定」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。実験には開始時に 6-8 週齢のマウスを用いた。

2-2 抗体および試薬

以下に示す抗体は western blotting (WB)、免疫沈降法 (immunoprecipitation ; IP)、蛍光組織化学染色、および免疫組織化学染色 (immunohistochemistry; IHC)に用いた。抗 C8orf13 抗体 (HPA030426、Sigma-Aldrich、IP、IHC)、抗 C8orf13 抗体 (ab94952、abcam、WB)、抗 p65 抗体 (C-20、Santa Cruz)、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗リン酸化 IκBα 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 IκBα 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 α-tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 TNFR1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 TRADD 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 TRAF2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 RIPK1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 TNFAIP3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 Caspase-8 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 SKP1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 RBX 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 Bmi1 抗体 (Cell Signaling Technology)、horseradish peroxidase (HRP)標識抗ラビット IgG 抗体 (Southern Biotech)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Southern Biotech)、抗 cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling Technology)

2-3 quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

コントロール細胞と *C8orf13* ノックダウン細胞を 96 well プレートに 1×10^4 cells/well で播種した。播種翌日に 2 時間の血清飢餓処理の後、ヒト IL-6 (東レ) 100 ng/mL、可溶性 IL-6 R (PeproTech) 100 ng/mL、ヒト TNF- α (PeproTech) 50 ng/mL で 3 時間刺激した後に mRNA 抽出を行なった。Small interfering ribonucleic acid (siRNA) によるノックダウン細胞においては、後述する方法により siRNA による遺伝子ノックダウンを行なったのち、同様にヒト IL-6、可溶性 IL-6R、及びヒト IL-17 あるいは TNF- α を添加し 3 時間インキュベートしたのちに mRNA 抽出を行なった。細胞からの RNA 抽出は SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR (東洋紡ライフサイエンス) を用いて標準プロトコールによって行った。生検組織からの RNA 抽出は AllPrep® DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて標準プロトコールに従って行った。cDNA の合成は M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて標準プロトコールに従って行った。標的遺伝子に対する内在性コントロールとして、マウス由来細胞では hypoxanthine phosphorybosyltransferase (*Hprt*)、ヒト由来細胞では glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を用いた。測定するにあたり、7300 fast real-time PCR システム (Applied Biosystems) と SYBR Green PCR master mix (Kapa Biosystems) を使用した。

使用したプライマー配列を表 1 に示す。

表 1. qPCR で用いたプライマー

Gene	Sequence	
Human IL-6 (Taqman)	Forward	5'-CATCCTCGACGGCATCTCAG-3'
	Reverse	5'-AGCCATCTTTGGAAGGTTCAAG-3'
	Probe	5'-CTCCCAGTGCCTCTTTGCTGCTTTCA-3'
Human CCL2 (Taqman)	Forward	5'-TCACCAATAGGAAGATCTCAGTGC-3'
	Reverse	5'-CCACAATGGTCTTGAAGATCACAG-3'
	Probe	5'-GAGAAGAATCACCAGCAGCAAGTGTCCCAA-3'
Human GAPDH (Taqman)	Forward	5'-CTCCTCTGACTTCAACAGCGA-3'
	Reverse	5'-CCAAATTCGTTGTCATACCAGGA-3'
	Probe	5'-GATGCCAGCCCCAGCGTCAAAGGT-3'
Human C8orf13 (Taqman)	Forward	5'-GCTCAGGAAGGAACTGACGG-3'
	Reverse	5'-TCGTAGGTGGCATCGTTGAG-3'
	Probe	5'-CGAACACACCTGCCGCCTCCACA-3'
Human STAT3 (SYBR)	Forward	5'-CAGGAGGGCAGTTTGAGTCC-3'
	Reverse	5'-CAAAGATAGCAGAAGTAGGAGA-3'
Human GAPDH (SYBR)	Forward	5'-GAGCAACGGAGGCG -3'
	Reverse	5'-CGCCCGGAAGAGGG-3'

2-4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

コントロール HRGEC 細胞 (MOCK) および *C8orf13* ノックダウン細胞を 96-well plate に 1×10^4 個/well で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートした。次に、血清を添加していない Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) にそれぞれヒト IL-6 100ng/ml、可溶性 IL-6R 100 ng/ml、TNF- α 50 ng/ml となるように希釈し、培養液を置換した。培養細胞はサイトカインで 8 時間刺激した後に、培地を交換してさらに 24 時間培養し、上清を採取後に ELISA による IL-6 産生量の測定に供試した。ELISA は Mouse IL-6 ELISA Set (BD Biosciences) を用いて、標準プロトコールに従って行なった。すなわち、capture antibody を coating buffer で希釈し、ELISA プレートに一昼夜コートした後に、洗浄、ブロッキングを行い、サンプル上清を添加して室温で 2 時間反応させた。その後、well を洗浄し、HRP 標識検出抗体を加えて室温で 1 時間反応させた後に、2M H₂SO₄ を添加して反応を停止し、反応物の吸光度を OD₄₅₀ で測定した。

2-5 MTT assay

ELISA で用いた 96-well plate より培養上清を除去し、10% fetal bovine serum (FBS) を含む DMEM で希釈した MTT 溶液 (500 μ g/ml) を 100 μ l/well で加えて、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートして呈色反応を行った。その後、上清を除去し、DMSO を 100 μ l/well 加えて MTT の沈殿を溶解し、吸光度を OD₅₅₀ で測定した。

2-6 ヒト *C8orf13* に対する short hairpin RNA (shRNA) を用いた遺伝子ノックダウン

96-well plate に FLS 細胞および HRGEC 細胞を 1.5×10^3 個/well で播種し 24 時間培養した。目的の遺伝子に対する shRNA を含むウィルス粒子 (non-target (コントロール) shRNA, Sigma Mission SHC002V; *C8orf13* shRNA, TRCN0000072668-TRCN0000072672; Sigma-Aldrich) を氷上で緩徐に解凍し、multiplicity of infection (MOI) が約 50 程度になるように polybrene (8 μ g/ml) を加えた DMEM で調整して、40 μ l/well ずつ細胞に添加した。37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した後、puromycin (5 μ g/ml) を加えた DMEM を 100 μ l ずつ加えて 3 日間培養した。この薬剤選択により生存した細胞を一過性のノックダウン細胞株とし、培養条件を 24-well plate、12-well plate、および 100 mm dish へと段階的にスケールアップさせながら、puromycin 含有 DMEM でさらに 3-4 日間培養かつ薬剤選択を行なった。この過程で確立したクローンについて qPCR を行い、目的遺伝子のノックダウン効率の検証を行い、安定ノックダウン細胞株として以降の実験に用いた。

2-7 ヒト *C8orf13* に対する small interfering RNA (siRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

FLS 細胞および HRGEC 細胞を 96-well plate に 1×10^4 個/well で播種し、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて siRNA (5 μ M) 0.5 μ l をトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、37°C 5% CO₂ 下で 48 時間培養し、サイトカイン刺激後に 2-6 と同様に qPCR に供試した。

2-8 皮膚炎および関節炎誘導モデルと炎症スコアの評価

皮膚炎モデルにおける炎症スコアは、既報にある評価方法に従って行った (Kanada et al., 2011)。F759 マウスの耳に siRNA を耳の表裏に塗布し (day 0)、その後、day1, 2, および 3 において、Toll-like receptor 7 (TLR7) アゴニストであるイミキモド (Mochida Pharmaceuticals, Japan)とともに *C8orf13* に特異的な siRNA (Dharmacon, A-051135-13, A-051135-14, A-051135-15, A-051135-16)、NF- κ B *p65* に特異的な siRNA (Dharmacon, A-040776-13, A-040776-14, A-040776-15, A-040776-16)、あるいは non-target siRNA (Dharmacon, SMARTpool)を塗布した。なお、塗布にあたっては、クリーム (Johnson and Johnson) 5.6 μ l に siRNA 9.4 μ l と生理食塩水あるいはイミキモド 5.0 μ l を混合した液を用いた。皮膚炎は耳の皮膚の厚さをマイクロキャリパーで計測し、元の厚さからの変化量で評価した。

F759 マウスを用いた関節炎モデルにおける炎症スコアは、既報にある評価方法に従って行った (Atsumi et al., 2002)。*C8orf13* に特異的な shRNA (3.6×10^5 TU/dose, Sigma-Aldrich, TRCN0000177729, TRCN0000182739, TRCN0000197692, TRCN0000200047, TRCN0000215372) あるいはコントロールとして non-target shRNA (Sigma Mission SHC002V) を polybrene (40 μ g/dose) とともに 6-8 週齢の F759 マウスの後肢踵関節腔に 1 日おきに 3 回 (days 0, 2, 4) 注入した。関節炎の誘導には、マウス IL-6 (100 ng/dose) および IL-17 (100 ng/dose) を 3 日間連続 (days 5, 6, 7) で注射した。関節炎の重症度は踵関節の可動性を指標として、0 点 (正常)、1 点 (わずかな可動制限)、2 点 (軽度の可動制限)、3 点 (中程度の可動制限)、および 4 点 (重度の可動制限)で評価した。

2-9 Western blotting (WB)

WB に用いる細胞は、すべて 10 cm dish に播種して培養した。必要に応じてサイトカインで刺激した後に細胞を氷上に置き、培養液を吸引除去した後に氷冷した Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1 ml の PBS とセルスクレーパー (住友ベークライト) を用いて細胞を回収した。1,500 rpm、4°C、5 分間の遠心により上清を除き、細胞ペレットを適切なバッファーで溶解処理した。全細胞成分分画の抽出には高塩濃度の細胞溶解バッファー (NaCl 600 mM) を用いて細胞を溶解した後、十分な vortex を

行い、超音波処理 (30 秒間隔で 5 分間×2 回) を行い、15,000rpm、20 分間で遠心を行った後、細胞残渣を除いた上清を全細胞成分分画として回収した。すべての工程において、細胞溶解バッファーには 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich)、phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma Aldrich)、および phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich) を添加した。得られたサンプルは全て 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95℃、5 分間煮沸させ、氷冷後に WB に供試した。まず、5-12% 濃度勾配の SDS-PAGE ゲル (和光純薬工業) で Bio-Rad のウェットウエスタンブロットシステムを用いてポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、泳動分離したタンパク質を Immobilon®-P (Millipore) に転写した。転写膜は、2% Bovine serum albumin; BSA, Sigma-Aldrich)あるいは Block ACE (雪印メグミルク株式会社)を用いて 1 時間ブロックした。その後、標的分子に対する一次抗体反応を 12 時間、続く HRP 標識した二次抗体反応を 1 時間行った。全細胞分画および細胞質分画の内部コントロールとして、tubulin に対する抗体を用いた。一次抗体、二次抗体を加えた後は TBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween 20)液で 5 分間 3 回洗浄し、Chemi-Lumi One L for HRP (nacal tesque)、または Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher)を用いた基質反応を行った。反応後、現像機 FPM100 (富士メディカルフィルム)を用いて化学発光産物をフィルムに感光させタンパク質バンドの検出を行った。

2-10 Luciferase Reporter Assay

レポーター活性の測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて標準プロトコールに従い行った。96-well plate に 2×10^4 cells/well で播種した HEK293T 細胞を 24 時間培養した後、PEI (Polyethylenimine)を用いて pEF-BOS (MOCK)、*C8orf13* 発現プラスミドを 100 ng/well で導入、加えて pGL4.32 [*luc2P*/NF- κ B -RE/Hygro] (4.5 ng/well, Promega)、pGL4.32 [*luc2P*/IL-6 -RE/Hygro] (4.5 ng/well, Promega)、および pGL4.74 [*hRluc*/TK] (0.25 ng/well, Promega) を導入した。各遺伝子導入を導入してから 24 時間培養後に培養液を除去し、ヒト TNF- α (50 ng/ml)を含有した培養液で 6 時間刺激した。PBS で細胞を洗浄し、Passive lysis buffer (40 μ l/well)を加えて 4℃で 20 分間穏やかに振盪して細胞を溶解した。その後、その細胞溶解液 5 μ l と発光基質 25 μ l を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター (GloMax®-Multi Detection System, Promega) で測定した。なお、細胞間の導入効率の補正のために、遺伝子導入の際に同時に導入した pGL4.32 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとし、これとの比を算出して NF- κ B あるいは IL-6 ルシフェラーゼ活性とした。

2-11 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

TNF- α 刺激による p65 の核内移行を確認するため、コントロールおよび *C8orf13* ノ

ックダウン細胞を TNF- α 50 ng/ml で 0 分、15 分、および 30 分間刺激した。刺激後の細胞は 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、Perm/Wash solution (Cytofix/Cytoperm kit、BD Biosciences)で透過処理を施した後に、2% BSA で 30 分間ブロックした。次に、一次抗体として抗 p65 抗体を 1 時間反応させ、細胞を洗浄して余分な一次抗体を除いた後、二次抗体として抗ウサギ Alexa Fluor-488 標識抗体と Hoechst 33342 nuclear stain で 30 分間反応させた。その後、細胞内タンパク質の局在について、共焦点レーザー顕微鏡 (AxioCam MRm、Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

2-12 免疫沈降法 (Immunoprecipitation Assay : IP)

IP に用いる細胞はすべて 10 cm dish に播種、培養した。バッファーで溶解されたサンプルはプロテイン G セファロースビーズ (Pharmacia)をサンプル 1mg タンパク質相当量に対して 10 μ g 添加し、4°C下で 1 時間緩徐に転倒混和しプレクリアを行った。その後、9,000 rpm、1 分間、4°Cで遠心した後に上清を回収し、目的に応じて FLAG ビーズ (Sigma Aldrich) あるいは抗 C8orf13 抗体 (abcam) を加えて 2 時間 4°C下で緩徐に転倒混和した。サンプルとビーズ・抗体複合体は 24 時間、4°Cで混和した後、細胞溶解バッファーで 5 回洗浄した。IP 後において、FLAG 融合タンパク質は 3 $\times$ FLAG ペプチド (Sigma Aldrich)を用いて溶出し、プロテイン G セファロースビーズは 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C、5 分間煮沸し溶出した。溶出液は WB に供試し、その際に全細胞分画サンプルの一部を IP の input として用いた。

2-13 ヒト滑膜組織を用いた免疫組織化学染色

すべての患者検体は、関節リウマチまたは変形性膝関節症と診断され、北海道大学病院整形外科で関節置換術を行われた際に採取した。本研究に際して、個々の患者からインフォームド・コンセントを取得しており、また本研究は北海道大学病院の倫理委員会によって承認された自主臨床研究『関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスにおける遺伝子発現および炎症増幅回路活性化因子の解析 (臨床研究番号 自 018-0388)』の一環として実施した。

パラフィンに包埋された検体からマイクロトームにより 4 μ m 厚で切り出した切片を 40°Cの蒸留水上に浮遊させた後、スライドガラスに切片を移し一昼夜乾燥させた。キシレンで脱パラフィンを行なった後、無水エタノールで検体を完全脱水させた。超純水で洗浄した後、抗原を賦活化する目的でクエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) に浸して 10 分間煮沸した。スライドガラスが室温に戻った後、超純水で洗浄し、内在性酵素を不活化するために 3%過酸化水素水で 5 分間処理した。ブロッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories)を用いた標準プロトコールで行なった。一次抗体には抗リン酸化 p65 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体、抗 C8orf13 抗体を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質と

しては DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories) を用いた。

2-14 Proximity Ligation Assay (PLA)

コントロールおよび *C8orf13* ノックダウン細胞を the ibidi μ -slides で培養し、Duolink™ In situ PLA kit を用いて実験を行った。細胞を IL-6、TNF- α で 90 分間刺激し固定した後、blocking solution を用いて 30 分間ブロックを行った。その後一次抗体 (抗 RIPK1 抗体、抗 Caspase-8 抗体) を添加して 1 時間静置し、洗浄後に PLA probe (+、-) を用いて二次抗体を添加した。各プラスとマイナスの PLA probe のペアがお互いに近かった場合 (<40 nM)、ローリング・サークル増幅による DNA ライゲーションがポリメラーゼの添加によって起こるよう、DNA リガーゼを添加し 30 分間静置、続いてポリメラーゼを添加し遮光して 100 分間静置した。洗浄後、細胞を confocal microscopy で観察した。

2-15 *C8orf13* の SNP シーケンスおよび variant 発現

摘出した滑膜組織は速やかに PAXgene® Tissue Container (QIAGEN) の中に投入し、室温下で 2-4 時間反応させた。その後、生検組織を取り出して PAXgene Tissue Stabilizer (QIAGEN) の中に投入し、使用するまで -20°C で保存した。

Stabilizer の中に保存された組織の一部 (10 mg 相当量) を分割切除し、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA、ゲノム DNA を抽出した。

抽出されたゲノム DNA に対して、*C8orf13* と *Blk* の遺伝子間にある SNP (single nucleotide polymorphism) rs13277113 のアレルを確認する目的で PCR を施行した。使用したプライマーの配列は表 2 に示してある。ゲノム DNA 200 ng に対して、KOD Fx (東洋紡ライフサイエンス) を用いて PCR を行い、SNP 前後 400 bp 程度の塩基長を増幅させた後に、PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。精製した PCR 産物に対して BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス PCR を行なった。

表 2 SNP シーケンスに用いたプライマー配列

SNP	Sequence	
rs13277113	Forward	5'-TTCAGGCAAGATGTCCGTAGACT -3'
	Reverse	5'-CTAGACAAAATTGTCAGAAACAACA-3'

2-16 統計処理

実験データは平均値±標準誤差 (Mean±SEM)で示した。本研究では、2 群間の有意差検定に Student's *t* 検定を用いた。3 群間以上の有意差検定には analysis of variance (ANOVA)検定を用い、群間検定には Student's *t* 検定および Bonferroni 補正を用いた。p 値は 0.05 未満のものを有意とし、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$ で示した。

3. 結果

3-1 C8orf13 の IL-6 アンプへの関与についての検討

C8orf13 遺伝子の IL-6 アンプへの関与を明らかにするために、C8orf13 ノックダウン細胞を作製した。ヒト HRGEC 細胞に C8orf13 shRNA および non-target shRNA を含むレンチウイルスを感染させ、puromycin による薬剤セクションを行い、C8orf13 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を得た。IL-6 アンプへの関与について IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激により誘導される IL-6 mRNA 発現量を qPCR 法で測定し、C8orf13 のノックダウンにより IL-6 mRNA の発現誘導が抑制されることを確認した (図 1)。次に、IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激により誘導される IL-6 のタンパク質発現量を ELISA 法で測定し、C8orf13 のノックダウンにより IL-6 のタンパク質発現誘導が抑制されることを確認した (図 2)。また同時に、細胞増殖の定量評価を MTT アッセイで行い、細胞増殖には C8orf13 は影響しないことを確認した (図 2)。次に、C8orf13 タンパクレベルのノックダウン効率を WB で確認したところ、定常状態における内因性 C8orf13 の検出が難しかったため、2 種類の C8orf13 特異的な抗体を用いて細胞溶解液を免疫沈降し、WB を行った。その結果、C8orf13 shRNA によるノックダウンによって、当該分子のタンパク発現レベルが抑制されていることを確認した (図 3)。同様の実験を不死化したヒトの滑膜線維芽細胞においても確かめたところ、C8orf13 のノックダウンにより IL-6 mRNA の産生が有意に抑制された (図 4)。また、IL-6、TNF- α で刺激した際の C8orf13 mRNA の発現量は変化しなかった (図 5) ことから、C8orf13 は IL-6 アンプのポジティブフィードバックに与えられる遺伝子でないことがわかった。同様に、炎症メディエーターの一つである CCL2 の mRNA 発現の抑制は認められたが、STAT3 mRNA 発現は抑制されなかった (図 6)。IL-6、CCL2 は NF- κ B 経路依存的に産生されるのに対し、STAT3 は JAK-STAT 経路依存的に制御される。すなわち、これらの結果から、C8orf13 が NF- κ B 経路を制御するタンパク質である可能性が示唆された。

次にこの可能性を明らかにするために、C8orf13 の過剰発現下における IL-6 および NF- κ B のプロモーター活性をレポーターアッセイにより評価したところ、C8orf13 遺伝子導入によりいずれのプロモーター活性も亢進することがわかった (図 7)。また過剰発現した C8orf13 は WB で確認された (図 8)。これらの結果から、C8orf13 は NF- κ B 経路を活性化させる因子であることが確証づけられた。

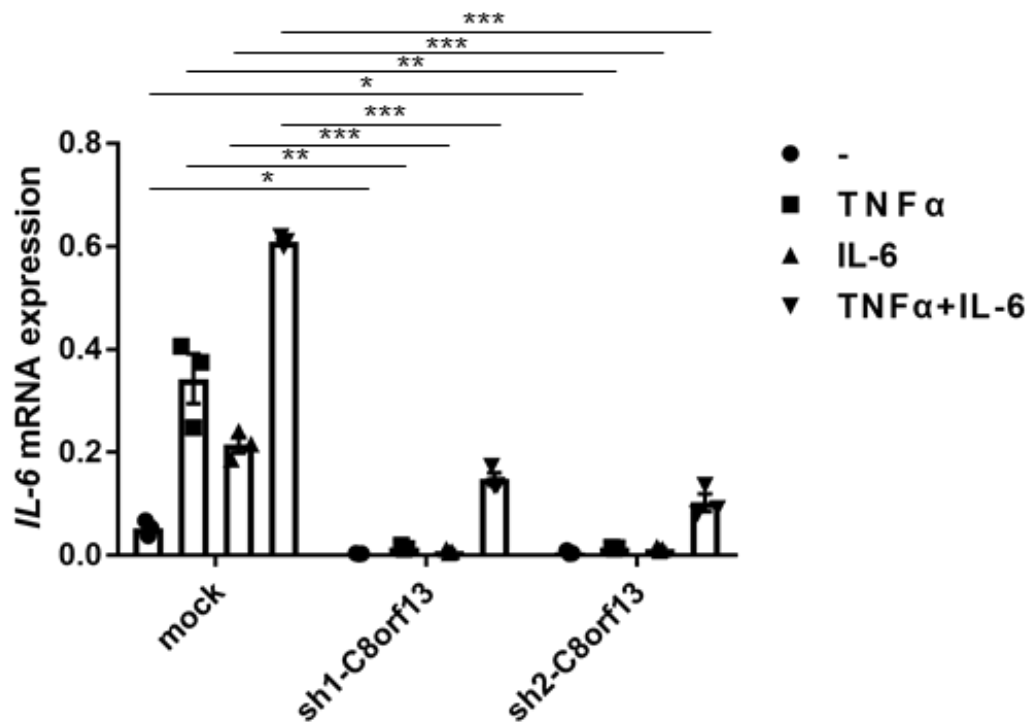


図1 ヒト血管内皮細胞における *C8orf13* ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

Lentivirus による *C8orf13* shRNA をヒト血管内皮細胞である HRGEC 細胞に感染させ、2 クローンの *C8orf13* ノックダウン細胞株を樹立した。同様に、non-target shRNA を用いてコントロール細胞 (mock) も作製した。mock および *C8orf13* ノックダウン細胞に対して、TNF- α 、IL-6、および両者の組み合わせで刺激した後の *IL-6* mRNA 発現量を qPCR で測定し比較した。内因性コントロールには GAPDH を用いた。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*、** および*** は、*t* 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.01、および 0.001 未満のものを示す。

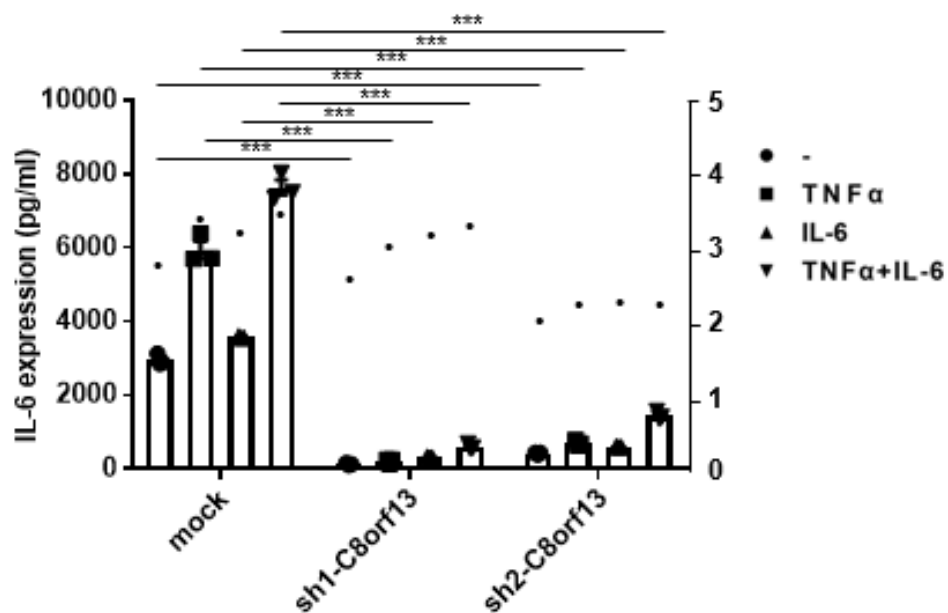


図2 ヒト血管内皮細胞における *C8orf13* ノックダウンによる IL-6 産生誘導に対する抑制効果

図1と同様に、*C8orf13* をノックダウンし、培養上清中の IL-6 産生量を ELISA で測定した。*C8orf13* ノックダウン細胞株では *IL-6* mRNA の産生が有意に抑制された。ドットは MTT アッセイによる細胞増殖の程度を示す。データは3回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*** は、*t* 検定で比較した際の *p* 値が 0.001 未満のものを示す。

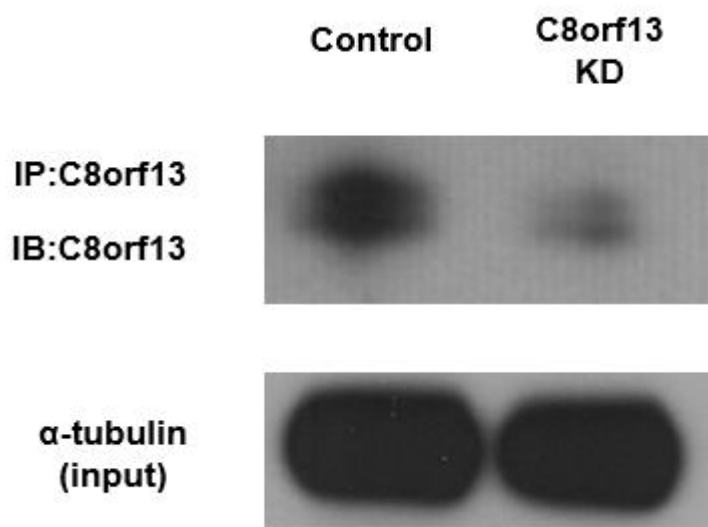


図3 免疫沈降およびWBによる C8orf13 ノックダウンの検証

HRGEC 細胞から樹立された *C8orf13* ノックダウン細胞 (sh1) およびコントロール (mock) 細胞を溶解し、抗 C8orf13 抗体による免疫沈降を行った。次に、沈降物タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜へ転写後、免疫沈降に用いた抗体とは別の抗 C8orf13 抗体、および内因性コントロールとして抗 tubulin 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を検出した。

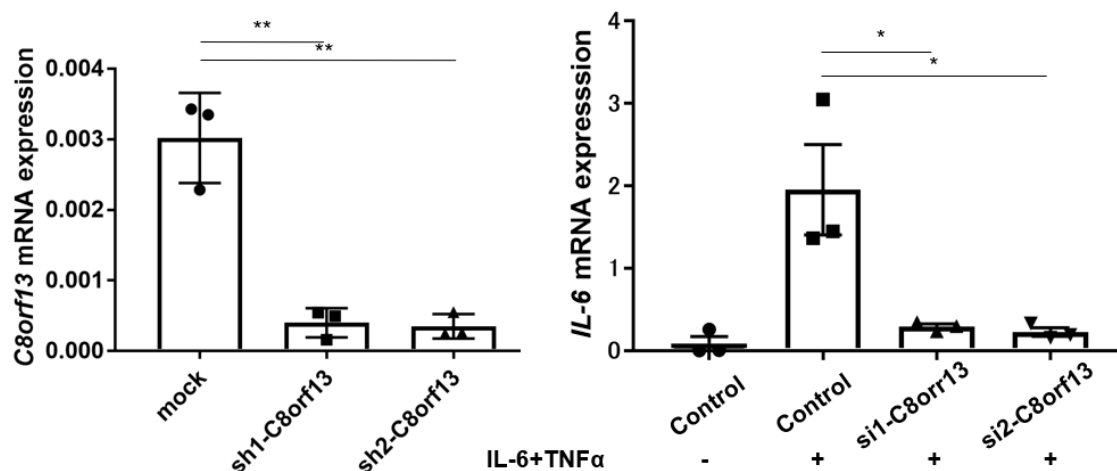


図4 ヒト滑膜線維芽細胞における *C8orf13* ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

Lentivirus による *C8orf13* shRNA を不活化した FLS に感染させ、2 クローンの *C8orf13* ノックダウン細胞株を樹立した。同様に、non-target shRNA を用いてコントロール細胞 (mock) を作成した。Mock および *C8orf13* ノックダウン細胞において、*C8orf13* mRNA 発現量 (左図)、および IL-6 と TNF- α の組み合わせで刺激した後の *IL-6* mRNA 発現量 (右図) を qPCR で測定し比較した。内因性コントロールには GAPDH を用いた。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*、** は、*t* 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。

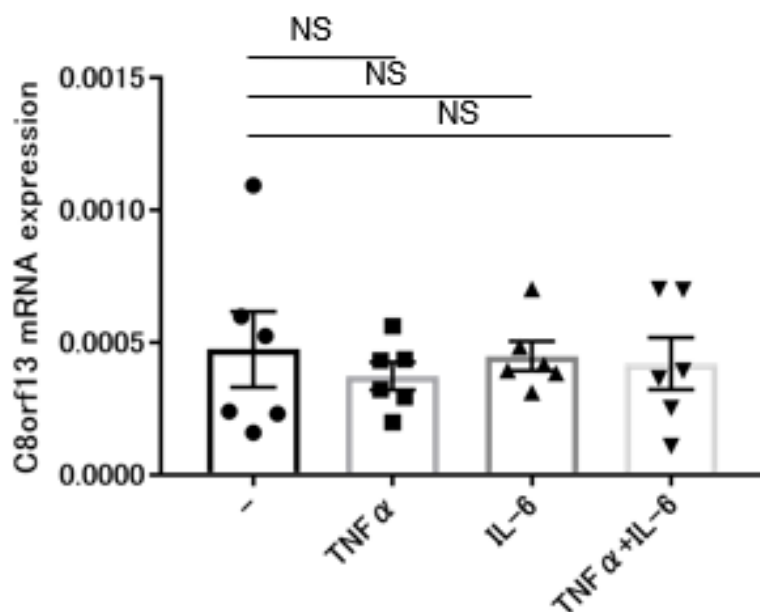


図5 ヒト血管内皮細胞における *C8orf13* の発現定量解析

HRGEC を TNF- α や IL-6 で 3 時間刺激した後に細胞を融解し、RNA を回収した。回収した RNA を qPCR に供試し、*C8orf13* mRNA 量を測定した。*C8orf13* mRNA の発現量はサイトカイン刺激によって影響を受けなかった。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。NS; 有意差なし

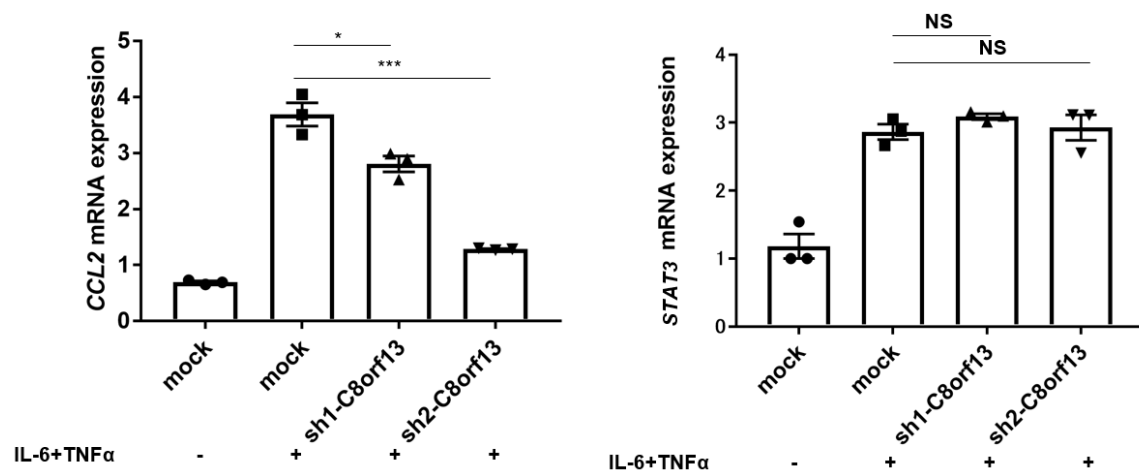


図6 *C8orf13* ノックダウン細胞におけるサイトカイン刺激後の *CCL2*、*STAT3* mRNA 発現量の変化

C8orf13 siRNA を投与し 48 時間かけてノックダウンした HRGEC を TNF- α と IL-6 で 3 時間共刺激し、細胞を溶解後に RNA を回収した。回収した RNA を qPCR に供試し、*CCL2* (左図)、*STAT3* mRNA (右図) の発現量を評価した。IL-6、*CCL2* の発現量は NF- κ B 経路の活性化に伴って増強されるのに対し、*STAT3* の発現は JAK-STAT 経路の活性化で制御される。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*、** および*** は、*t* 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.01、および 0.001 未満のものを示す。

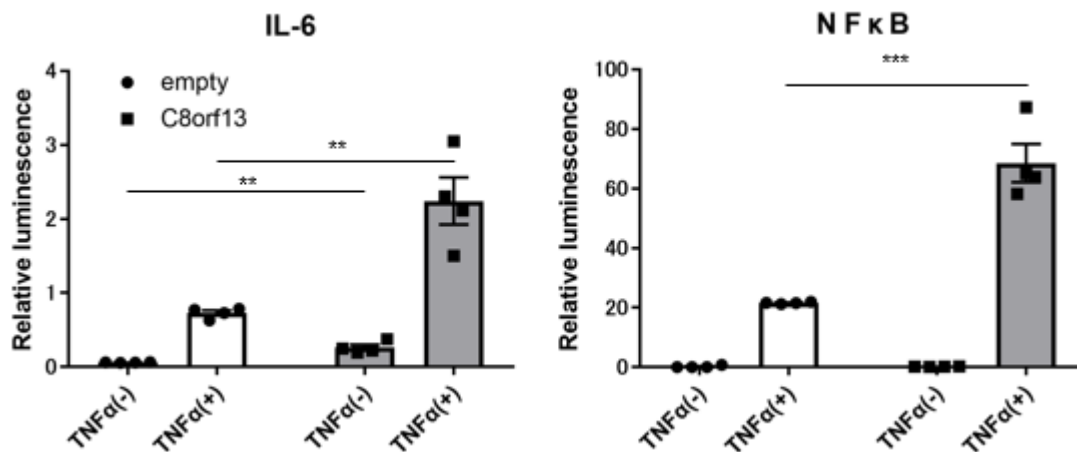


図7 C8orf13 を強制発現させた HEK293T 細胞でのレポーターアッセイ

(左図) HEK293T 細胞へ *C8orf13* 発現プラスミドをトランスフェクションし、TNF- α 刺激後の IL-6 プロモーター活性 (左図)および p65 プロモーター活性 (右図)の変化を dual luciferase assay により評価した。プロモーター活性は、ホタルルシフェラーゼ活性 (内部コントロール)で補正し、算出した。データは 4 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。** および *** は、*t* 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.01 および 0.001 未満のものを示す。

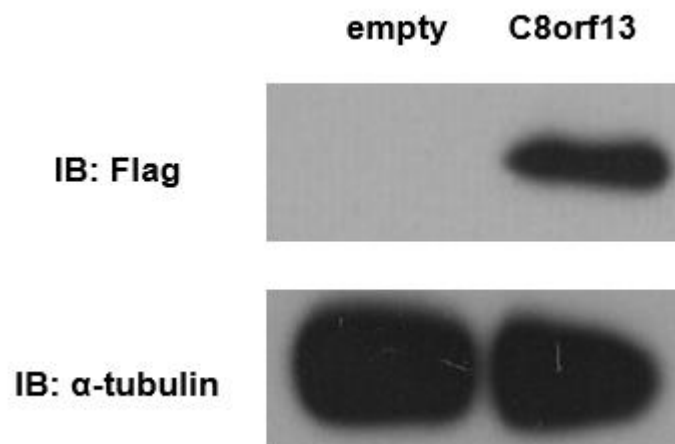


図 8 WB による C8orf13 過剰発現の検証

HEK293T 細胞に C8orf13-FLAG 発現ベクターをトランスフェクションし、SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、PVDF 膜へ転写し、抗 FLAG 抗体、および内部コントロールとして抗 tubulin 抗体を用いて各タンパク質を検出した。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

3-2 C8orf13 の NF- κ B 経路に関与するメカニズムの探索

次に、C8orf13 がどのように NF- κ B 経路に関与しているかについて検討した。NF- κ B 経路は IL-1、IL-17、あるいは TNF- α など様々な炎症性サイトカインにより活性化することが知られている。NF- κ B 経路において転写活性を有する重要な分子の一つが p65 分子である。p65 は細胞質では I κ B α (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) と結合して非活性化状態で存在するが、先述したようなサイトカイン刺激により IKK (I κ B kinase) 複合体のリン酸化を経て I κ B α がリン酸化を受け、その結果プロテアソーム系により分解される。I κ B α が分解された p65 分子はリン酸化により活性化し、核局在シグナルが露出することにより核内へ移行して転写活性を有するようになる。そこでまず、C8orf13 をノックダウンした細胞を TNF- α で 0、5、15、30 分間刺激し、タンパク質を抽出した後に I κ B α の分解について WB で確認したところ、C8orf13 ノックダウン細胞では I κ B α の分解が抑制された (図 9)。また C8orf13 のノックダウン細胞で p65 の核内移行を共焦点顕微鏡で観察したところ、p65 の核内移行が抑制されていることがわかった (図 10)。これらの結果は、C8orf13 が NF- κ B 経路において I κ B α の分解よりも上流で作用している可能性を示している。

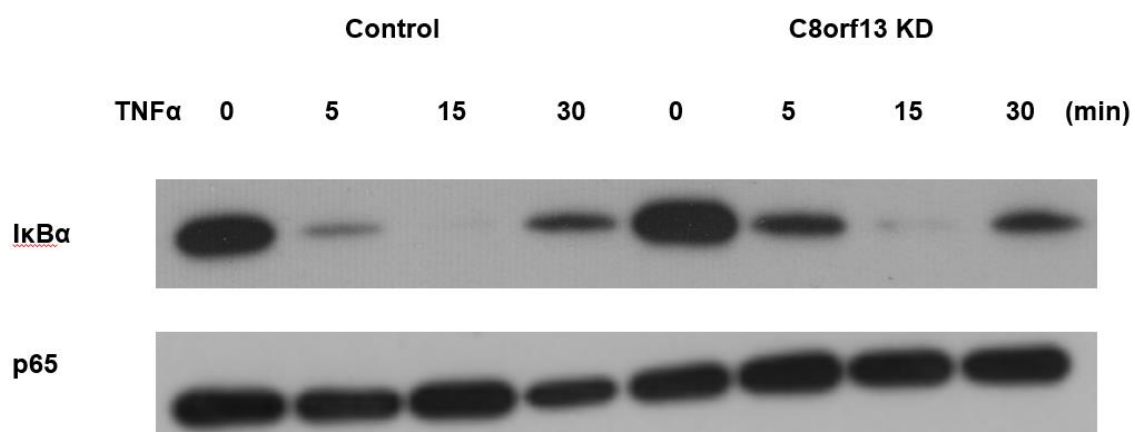


図9 *C8orf13* ノックダウンによる TNF- α 刺激依存的な I κ B α 分解への影響

C8orf13 ノックダウン血管内皮細胞およびコントロール細胞を 10 cm dish で培養し、TNF- α で 0、5、15、30 分間刺激した後に細胞を溶解した。細胞溶解物を WB に供試し、刺激依存的な I κ B α の分解を評価した。内因性コントロールには p65 を用いた。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

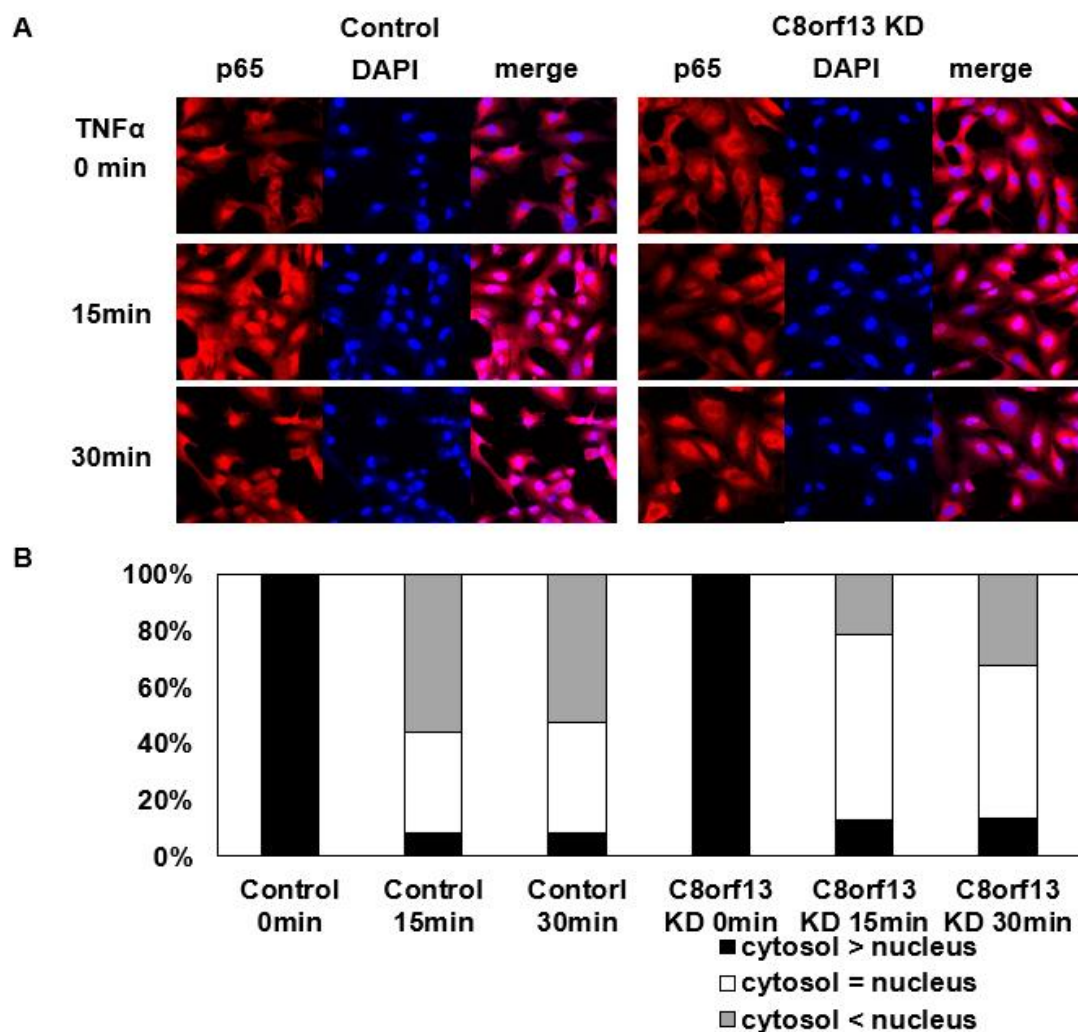


図 10 *C8orf13* ノックダウンによる p65 の核内移行の変化

(A) *C8orf13* ノックダウン細胞および mock 細胞を 24 時間血清飢餓状態で培養し、TNF- α で 0、15、30 分間刺激した後に共焦点顕微鏡で p65 の核内移行を観察した。(B) (A)の結果について、各サンプルにつき 500 個以上の細胞について p65 の核内移行の有無を計測した。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

3-3 C8orf13 は TNFR1 複合体分子に結合する

これまでの結果から、C8orf13 が NF- κ B 経路において I κ B α が分解を受ける過程よりも上流で機能していることが明らかとなった。そこで、本節では C8orf13 が結合している NF- κ B 経路関連分子について調べた。

一般的に TNF- α が TNFR1 に結合すると、TNFR1 受容体は細胞質領域にあるデスドメインを介して三量体化し、この凝集によって tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD) アダプタータンパク質の局在化が起こる。さらに、TRADD によって誘導された receptor interacting Serine/Threonine kinase 1 (RIPK1)が凝集する結果、Caspase-8 が活性化される。TRADD は、アダプター分子の 1 つである Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF2) と複合体を形成後に、RIPK1 によって活性化され、さらに下流の IKK をリン酸化し、I κ B α の分解を介して NF- κ B 経路を活性化する。

HEK293T 細胞に FLAG タグを融合させた C8orf13 を強制発現させ、その細胞溶解液を抗 FLAG ビーズで免疫沈降に供試し、得られた沈降物を TNFR1 複合体および I κ B α 分解に関わる分子について WB を行った。その結果、C8orf13 は I κ B α 分解に必要な SKP1 (S-phase kinase associated protein 1)、RBX-1 (Ring-Box 1)、Bmi1 といった分子とは結合せず、TNFR1、TRAF2、RIPK1、Caspase-8 と結合することがわかった (図 11)。このことから、C8orf13 は TNFR1 複合体の中で機能する分子であることが示唆された。

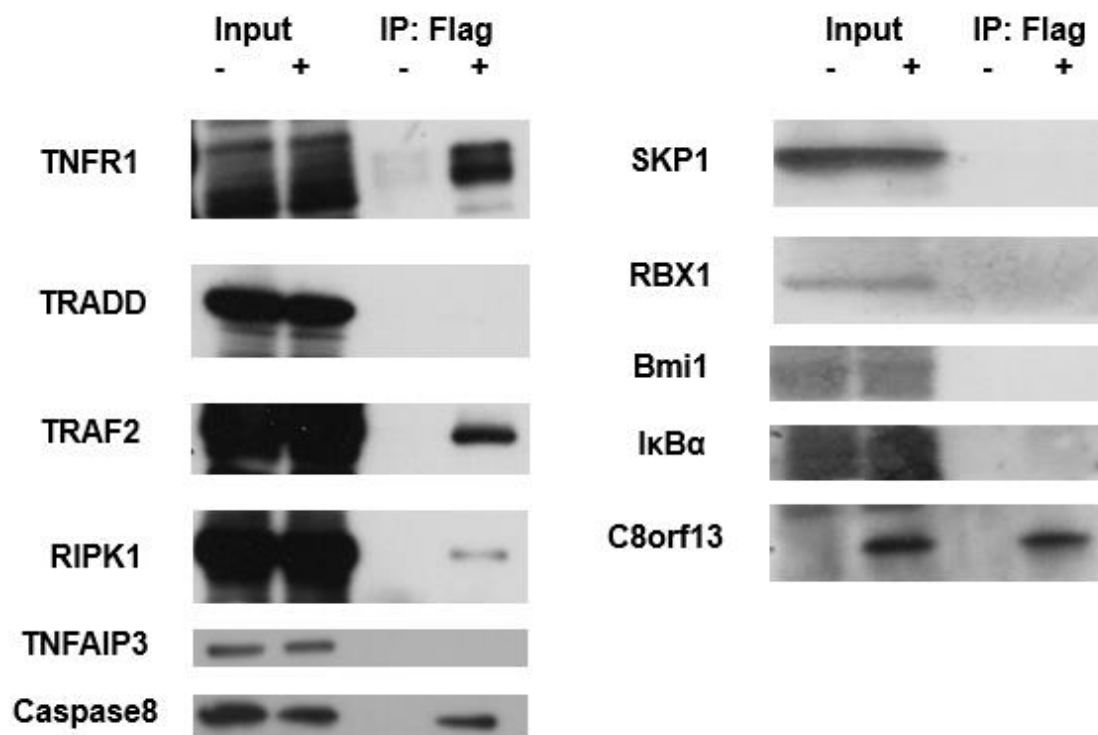


図 11 免疫沈降法による C8orf13 結合分子の探索

HEK293T 細胞に C8orf13-FLAG を過剰発現させ、細胞溶解液を抗 FLAG ビーズで免疫沈し、NF-κB 経路の上流分子との結合を調べた。複数回施行したデータのうち、代表的なデータを示す。

3-4 C8orf13 は RIPK1 に結合し、RIPK1 の切断を阻害することで炎症活性を示す

次に、NF- κ B 経路における C8orf13 の機能を詳細に調べるために、C8orf13 と結合した分子の中で RIPK1 に着目した。RIPK1 は炎症のみならずアポトーシス経路、RIPK3 を介したネクローシス経路にも関わるマスター調節因子として報告されている (Dannappel et al., 2014)。RIPK1 は TNF- α による刺激によってユビキチン化され、TNFR1 複合体の分子群のリクルートを介して下流のシグナルを亢進するが、Caspase-8 によって切断されるとユビキチン化部位を失う。この過程に C8orf13 が関与するのかノックダウン細胞を用いて WB で調べたところ、TNF- α の有無に関わらず、C8orf13 ノックダウン細胞において切断型 RIPK1 の発現が増加していた (図 12)。次に、RIPK1 がその切断酵素である Caspase-8 と結合することが知られていたことから、C8orf13 は物理的に RIPK1 と Caspase-8 の相互作用を阻害しているのではないかと仮説を立てた。RIPK1 と Caspase-8 の相互作用を見るために、Proximity Ligation Assay (PLA) を利用して両分子の物理的な近接について視覚化を試みた。その結果、C8orf13 ノックダウン細胞では RIPK1 と Caspase-8 の相互作用を示すシグナルが有意に増加していた (図 13、図 14)。以上の結果より、C8orf13 は RIPK1 と Caspase-8 に直接結合することによって、両者の相互作用を阻害していることが考えられた。

そこで、C8orf13 の RIPK1 への結合と炎症活性の関係を調べるため、C8orf13 のアミノ酸配列を一部欠損させた変異タンパク質を複数種作製した。C8orf13 は 214 個のアミノ酸から成るタンパク質である。C8orf13 (FAM167A) は FAM167B とよばれる同じファミリーに属するタンパク質と 130-214 番目のアミノ酸から成るモチーフ構造を共有している。134-154 番目のアミノ酸はコイルドコイル構造を取りうるものが 3 次元構造予測ソフトで推察されている。コイルドコイル構造は他分子と結合する構造モチーフの一つである。そこで上記の情報からコイルドコイル構造を欠失させた変異タンパク質 (Variant1、V1) を作製した。また N 末端側の 2-56 番目、57-130 番目のアミノ酸まで欠失させた変異タンパク質 (それぞれ Variant 2; V2、Variant 3; V3) を作製し、免疫沈降法で RIPK1 との結合性を調べたところ、V1 と V3 では RIPK1 との結合性が部分的に減退していた。そこで、これら二つの領域を欠失させたタンパク質 (Variant 4; V4) を作製して同様の実験を行ったところ、RIPK1 と C8orf13 の結合が完全に消失した。欠損タンパク質のシェーマと免疫沈降法の結果は、それぞれ図 15 と図 16 で示した通りである。この結果は、コイルドコイル構造と 57-130 番目のアミノ酸から成る領域の二つが RIPK1 との結合に関与していることを示唆している。さらに、これら領域と炎症活性との相関を見るため、野生型と変異型 C8orf13 タンパク質を過剰発現させ、Luciferase Reporter Assay で IL-6 のプロモーター活性を測定したところ、RIPK1 との結合能の減弱に相関して、変異型 C8orf13 を導入した細胞ではプロモーター活性が減弱していた (図 17)。すなわち、C8orf13 と RIPK1 との結合が、TNF- α によって惹起され

る炎症活性に重要であることが示唆された。

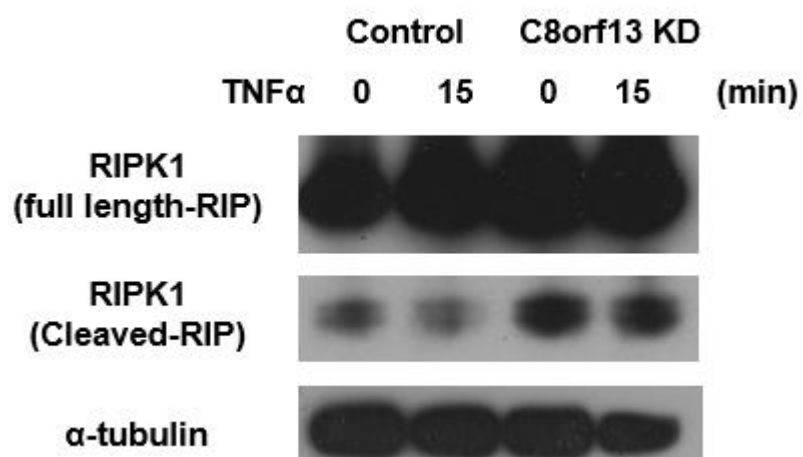


図 12 *C8orf13* ノックダウン細胞における RIPK1 の挙動

無刺激あるいは TNF- α で刺激した *C8orf13* ノックダウン細胞とコントロール細胞よりタンパク質を抽出し、RIPK1 および α -tubulin で WB を行った。切断されていない full length の RIPK1 は分子量が 74kDa、切断型 (cleaved-) RIPK1 は分子量が 35kDa の位置にバンドが確認された。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

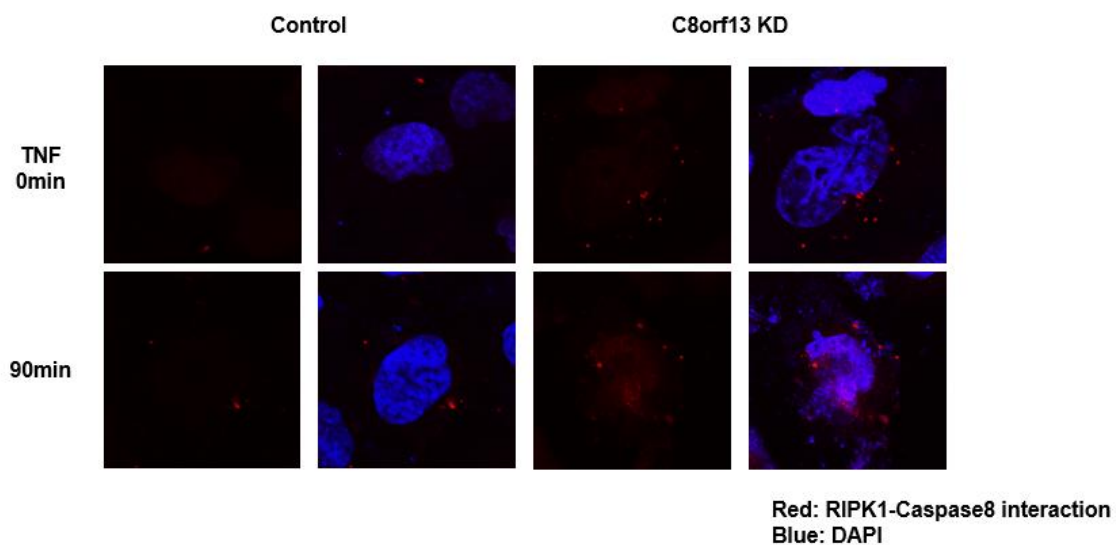


図 13 Proximity Ligation Assay (PLA)による RIPK1 と Caspase-8 の相互作用の可視化

C8orf13 存在下で RIPK1 の切断が阻害されることを明らかにするため、RIPK1 切断酵素である Caspase-8 と RIPK1 との物理的近接を PLA で評価した。赤で示されるシグナルは、RIPK1 と Caspase-8 が 40 nm 以内にある場合に検出される。4 回の実験のうち代表的なものを示す。

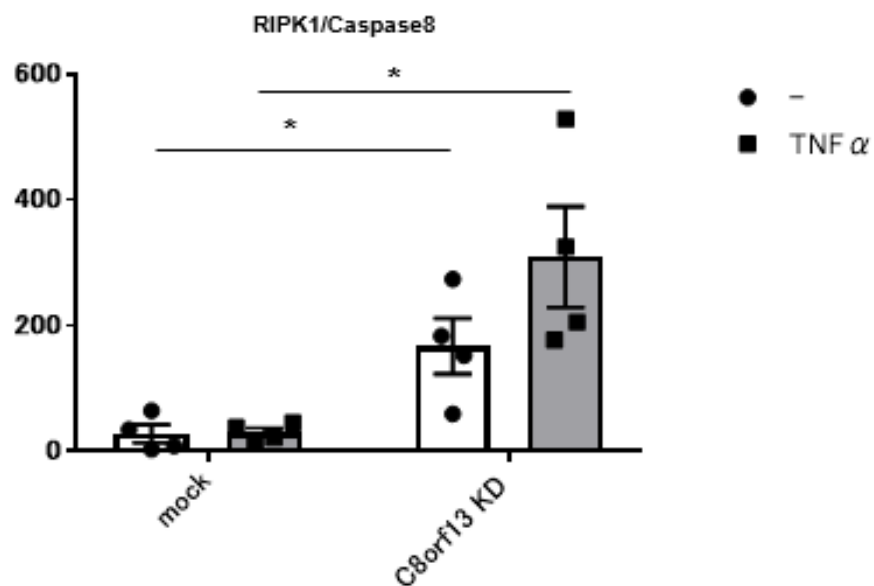


図 14 PLA による RIPK1 と Caspase-8 の相互作用の定量化

図 13 で行った PLA にて観察した RIPK1 と Caspase-8 の相互作用を ImageJ で定量化した。*C8orf13* ノックダウン細胞では RIPK1 と Caspase-8 の相互作用が有意に増加した。データは 4 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*は、*t* 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05 未満のものを示す。

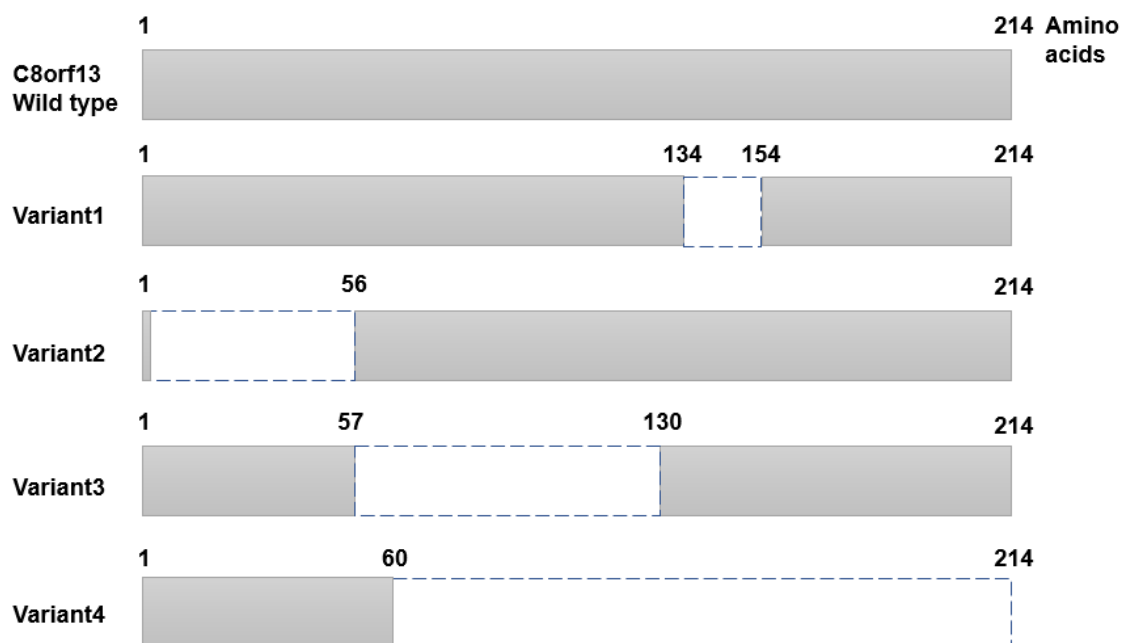


図 15 作製した C8orf13 の欠損変異型タンパク質

C8orf13 cDNA を挿入したプラスミドを用いて inverse PCR を行い、欠損変異型タンパク質を作製した。配列はサンガー法で確認した。野生型 (WT)と比較して Variant 1 はコイルドコイル構造を取りうる領域 (134-154 番目のアミノ酸)を欠失、Variant 2 は開始コドンを除く N 末端を含む領域 (2-56 番目のアミノ酸)を欠失、Variant 3 は Variant 2 の欠損部位から C8orf13 固有のアミノ酸配列を持つ部位 (57-129 番目のアミノ酸)まで欠失、Variant 4 は Variant 2 およびコイルドコイル構造を含む C 末端部位を欠失している。



図 16 C8orf13 欠損変異型タンパク質の RIPK1 への結合能の減弱

FLAG タグを付けた C8orf13 野生型 (WT)および欠損変異型タンパク質 (V1～V4; 図 15 参照)を HEK293T 細胞に過剰発現させ、細胞溶解後に抗 FLAG ビーズを用いて免疫沈降を行った。その後、抗 RIPK1 抗体を用いて沈降物を WB し、各 C8orf13 タンパク質の RIPK1 への結合能を評価した。野生型 C8orf13 と比較して、V1、V3 では部分的に RIPK1 への結合が低下し、その両領域を欠損させた V4 では結合が完全に消失した。

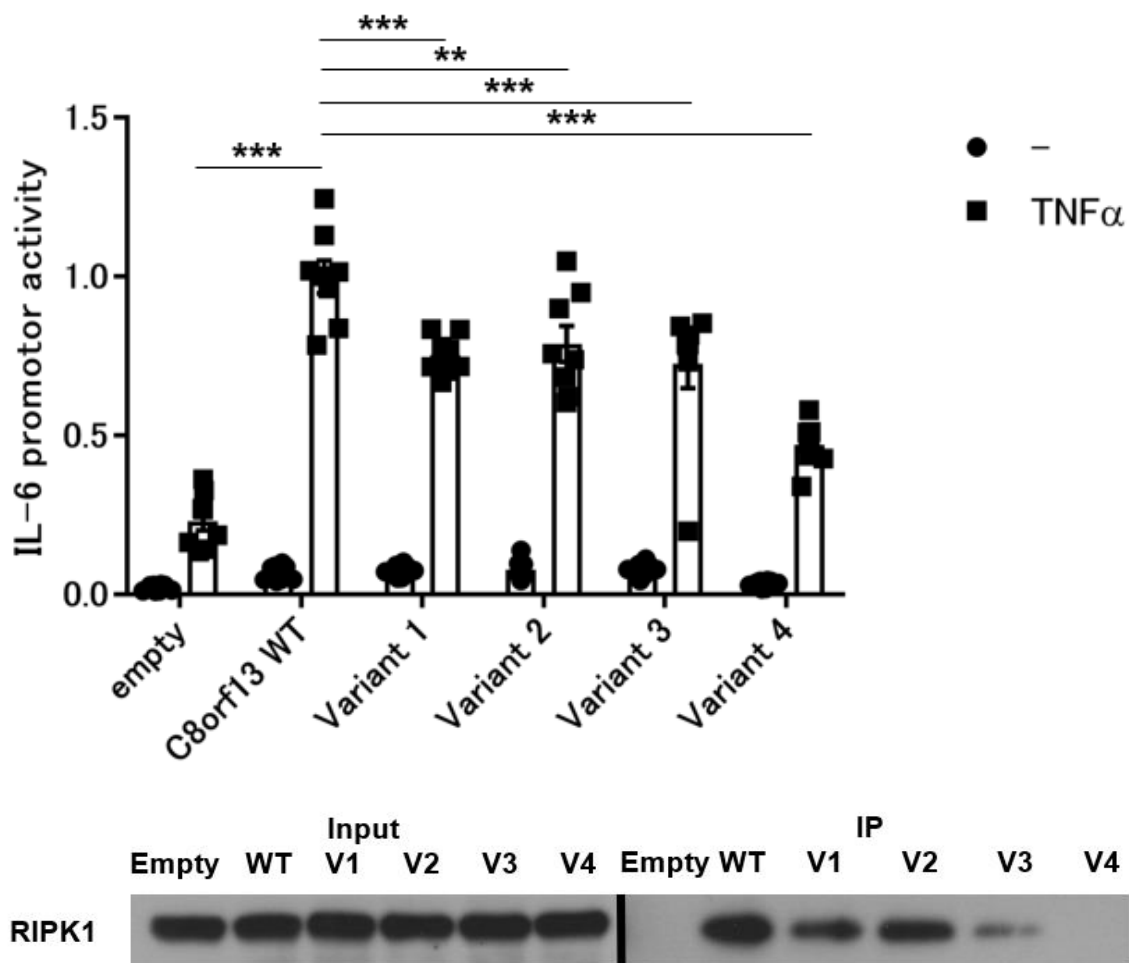


図 17 C8orf13 欠損変異型タンパク質の炎症活性への影響

作製した C8orf13 野生型 (WT) および欠損変異型タンパク質 (V1~V4; 図 15 を参照) を HEK293T 細胞に過剰発現させ、TNF- α で刺激後に細胞を溶解して IL-6 プロモーター活性を測定した。実験は 4 回行い、データは 4 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。** および *** は、*t* 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。欠損変異タンパク質はいずれも野生型 C8orf13 と比較して有意に炎症活性が低下した。その程度は RIPK1 との結合能と相関した。

3-5 C8orf13 は関節炎および皮膚炎マウスモデルにおいても炎症を抑制する

ここまで主に細胞を使った *in vitro* 実験を行ってきたが、本節では *in vivo* における C8orf13 の生理学的役割について、F759 マウスを用いた関節炎誘導実験に加え、関節炎モデルや関節リウマチに合併症状として表出する皮膚炎（血管炎）のマウスモデルを用いて検討した。その結果、C8orf13 shRNA を関節腔に投与することによって、サイトカイン誘導性関節炎の発症が有意に抑制され (図 18)、F759 マウスにおけるイミキモドによる皮膚炎誘導においても皮膚炎の発症が有意に抑制された (図 19)。

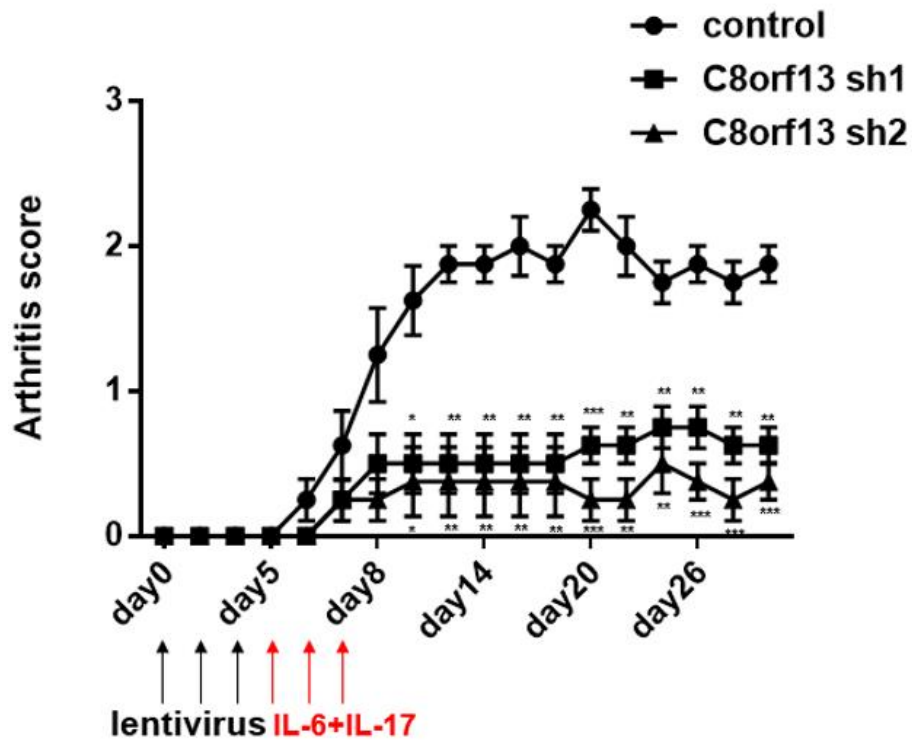


図 18 関節炎モデルマウスの炎症活性における C8orf13 の役割

F759 マウスの後肢踵関節腔に non-target shRNA および C8orf13 shRNA を day 1、day 3 および day 5 に注入し、引き続き day 6、day 7、および day 8 に IL-6 (100ng) ならびに IL-17 (100ng) を同関節腔に共注入して各個体における関節炎スコアを評価した。各群 n=4 で、データは平均値と標準誤差を示す。*、**、および***は、2-way ANOVA (Bonferroni 補正)で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.01、及び 0.001 未満のものを示す。

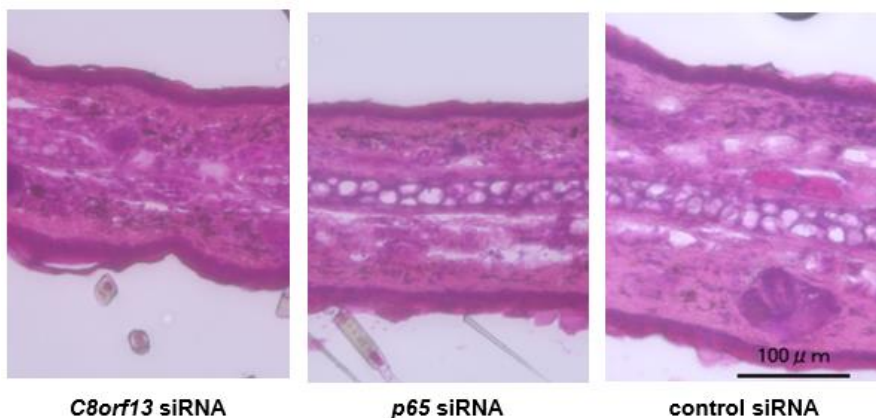
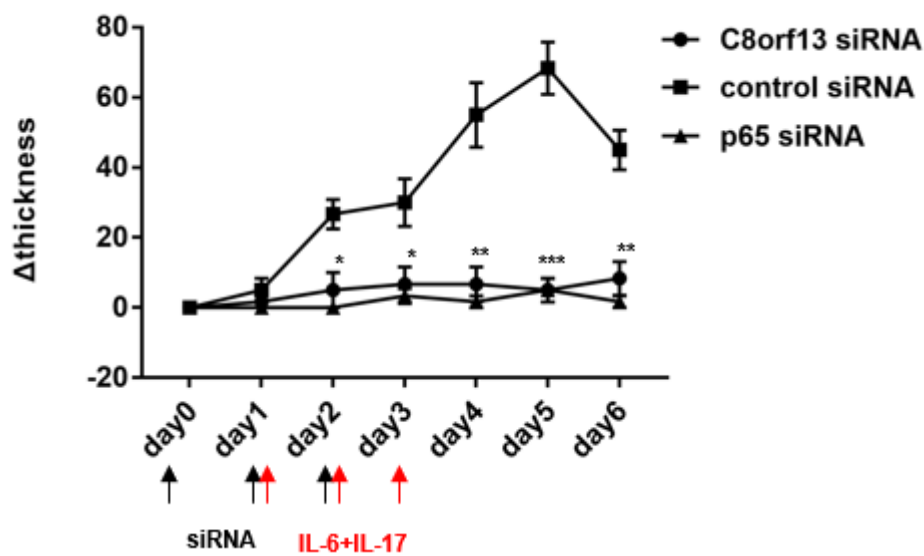


図 19 皮膚炎モデルマウスの炎症活性における C8orf13 の役割

F759 マウスの耳に non-target siRNA および C8orf13 siRNA、p65 siRNA を day 0、day 1 および day 2 に注入し、day 1、day 2、および day 3 に IL-6 ならびに IL-17 を共塗布し、各個体における耳の肥厚をマイクロキャリパーで測定することによって皮膚炎病態を定量評価した。各群 n=6 でデータは平均値と標準誤差を示す。またそれぞれの群のマウスの耳を HE 染色した代表的なデータを示す。*、**、および***は、2-way ANOVA (Bonferroni 補正)で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.01、及び 0.001 未満のものを示す。

3-6 C8orf13 は変形性関節症に対して関節リウマチで発現が高い

次にヒトでの C8orf13 の病的意義について検討した。まず自己免疫疾患の疾患感受性部位である rs13277113 SNP 保有率について、北海道大学病院内科Ⅱおよび整形外科に通院する RA 患者および SLE 患者を調べた。サンガー法により DNA シークエンスを行ったところ、これら患者において A/A、A/G、G/G の 3 パターンを認めた (図 20)。また、SNP 保有率を疾患別に比較したところ、健常人が 41% に比して関節リウマチ患者では 82%、SLE では 97% の SNP 保有率であった (図 21)。この結果から、rs13277113 は健常人でもリスクアレルを持ちうるが、自己免疫疾患の病態を形成する上で重要な loci である可能性が示唆された。

次にヒトの関節における C8orf13 の発現について検討した。IHC 解析を行ったところ、関節では滑膜線維芽細胞と血管内皮細胞に C8orf13 が高発現していた。また変形性関節症 (osteoarthritis; OA) より RA で C8orf13 は有意に高発現していた (図 22、23)。また、RA における rs13277113 で SNP の有無と C8orf13 の発現量との相関について検討したところ、サンプル数は少ないものの、リスクアレル A がある場合に C8orf13 の発現が高いことが滑膜でも示唆された (図 24、25)。

最後に C8orf13 と IL-6 アンプの関係について検討した。ヒトの組織で NF- κ B 経路の活性化を見るために抗リン酸化 p65 抗体 (phospho-p65 抗体)、JAK-STAT3 経路の活性化を見るために抗リン酸化 STAT3 抗体 (phospho-STAT3 抗体) を用いて IHC を行った。いずれの転写因子も刺激依存的に活性化すると、核内移行に移行し、当該分子は特異的抗体によって核内で染色像が得られる。RA 患者は免疫抑制剤を使用していることから、SNP と手術時点での炎症との相関は見られなかったが、OA では A/A の患者では G/G の患者よりも phospho-p65、phospho-STAT3 とともに核で強い染色像が見られた (図 26)。これらの結果から、rs13277113 でリスクアレルを有する患者は、そうでない患者に比べて炎症が増悪しやすい可能性が示唆された。

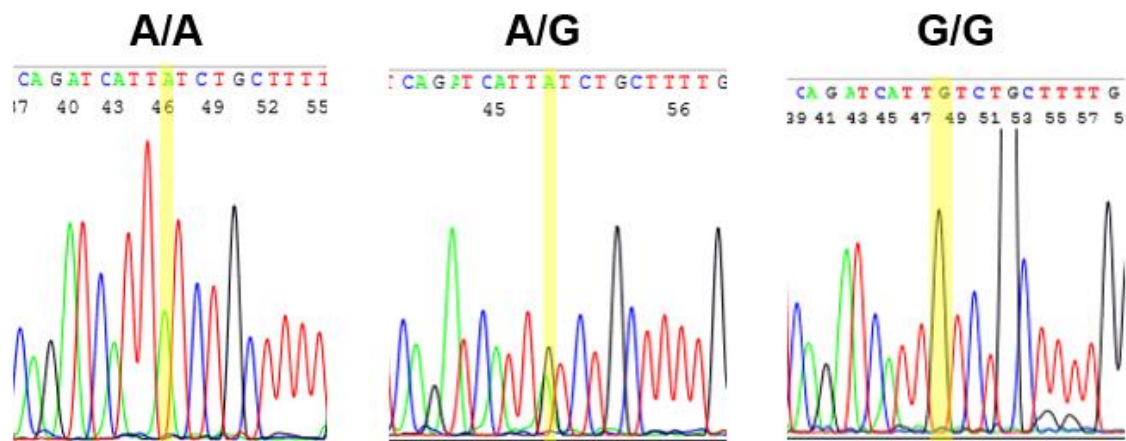


図 20 RA 患者および SLE 患者における intergenic SNP rs13277113 の確認

健常人、RA 患者および SLE 患者の血液検査または手術検体から抽出されたゲノム DNA を用いて、8 番染色体上に存在する rs13277113 を DNA シーケンスにより確認した。

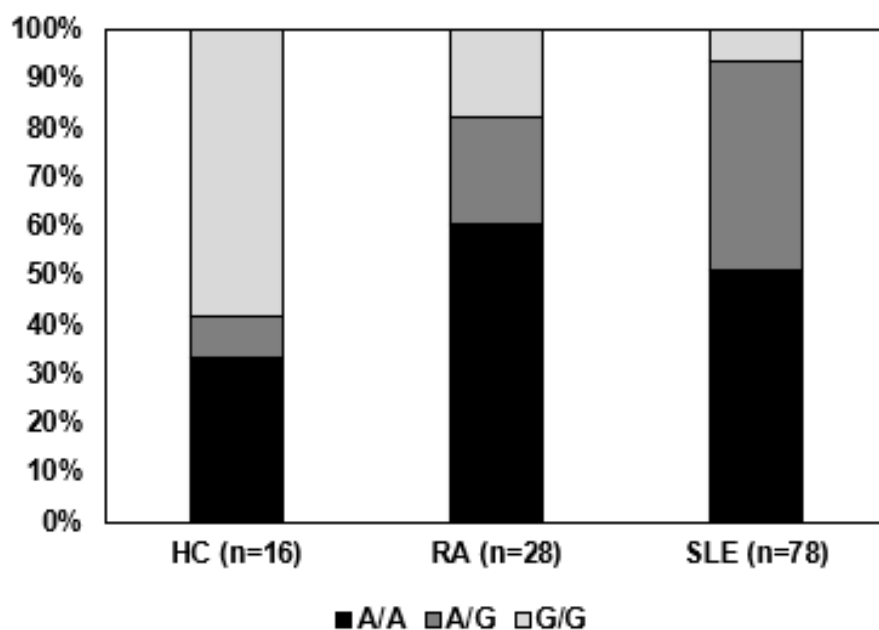


図 21 当院での健常人、関節リウマチ、および全身性エリテマトーデス患者における rs13277113 の SNP の保有率

北海道大学病院における同意が得られた健常人、関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血液および手術検体から DNA を抽出し、DNA シーケンスを行うことによって rs13277113 の SNP 保有率を調べた。

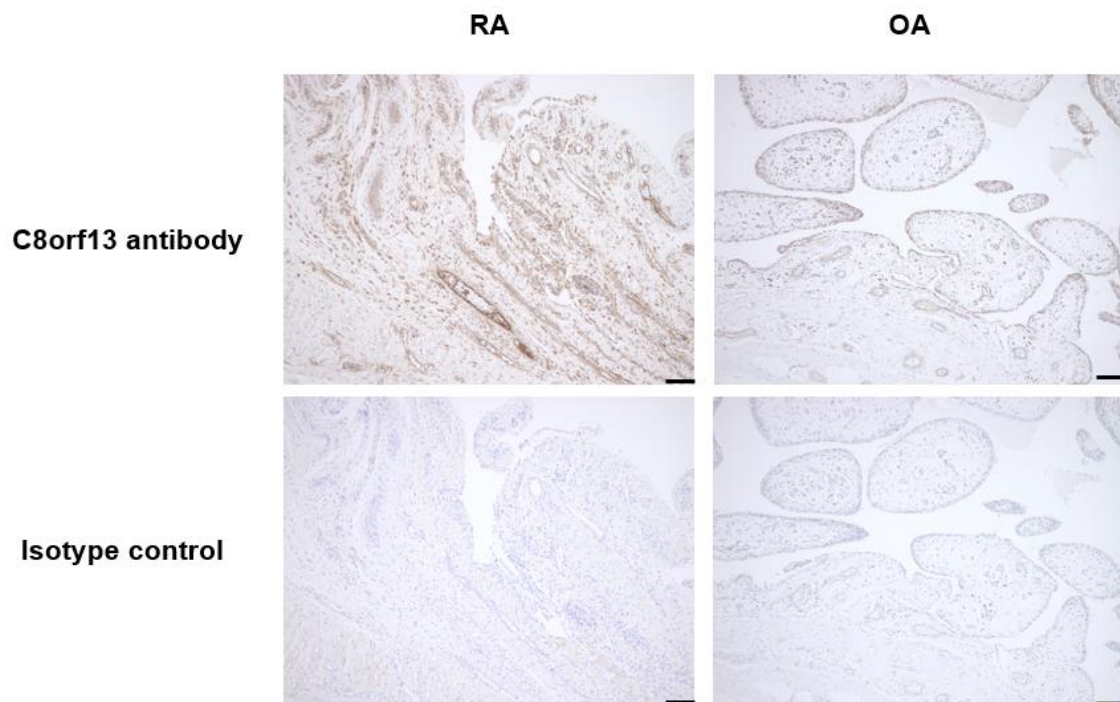


図 22 関節リウマチ患者と変形性関節症患者の滑膜における C8orf13 の発現
 抗 C8orf13 抗体を用いて人工関節置換術を行った RA および OA 患者の滑膜を IHC した。スケールバー 100 μ m。

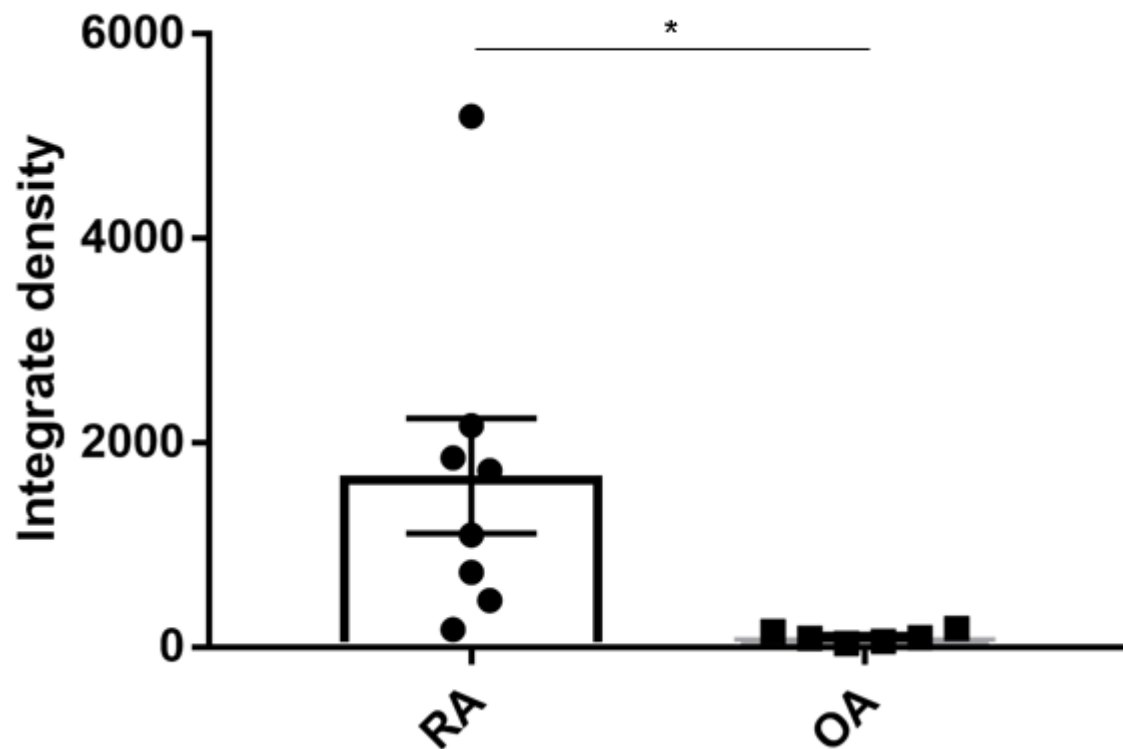


図 23 滑膜組織における C8orf13 の定量解析

図 22 で得られた IHC 結果を ImageJ で定量解析し、RA 患者 (n=8) と OA 患者 (n=6) の滑膜の発現について統計解析を行った。RA 患者の滑膜では、C8orf13 発現が OA 患者と比較して有意に高値であった。

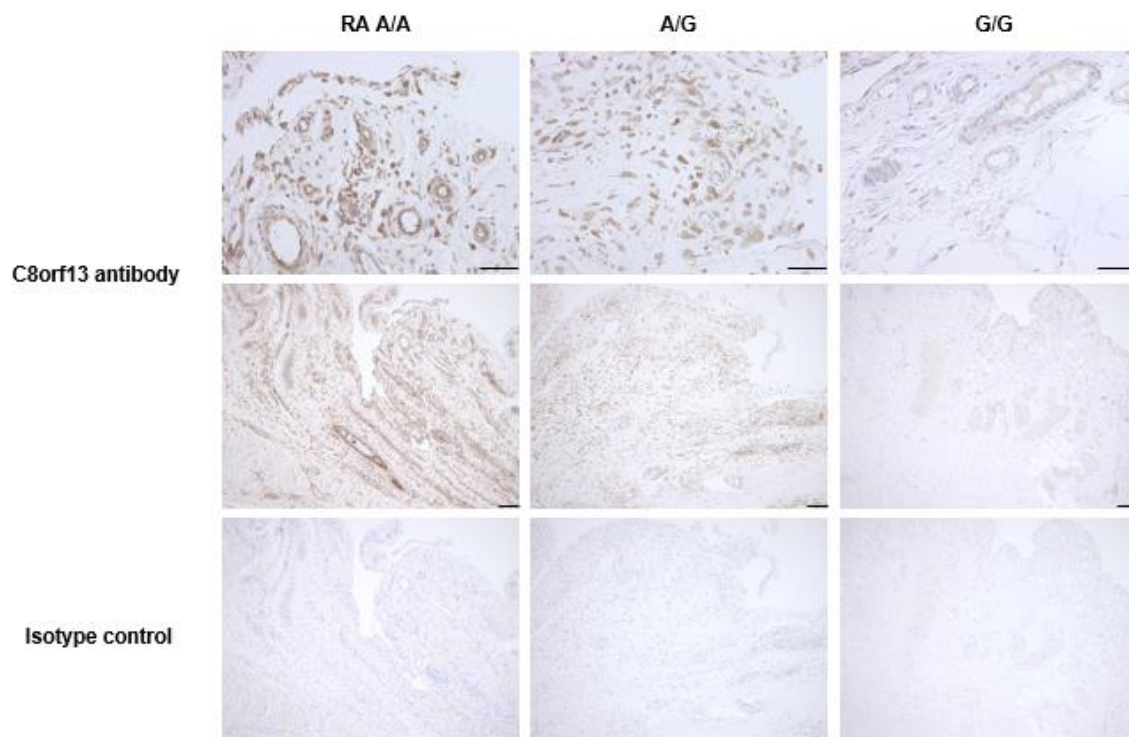


図 24 RA 患者における rs13277113 別の滑膜での C8orf13 発現

滑膜から一部細胞を溶解し、DNA をサンガー法でシーケンスし、rs13277113 について genotyping した。リスクアレル A/A をもつホモ、A/G のヘテロ、G/G の 3 群に分類し、抗 C8orf13 抗体を用いて滑膜を IHC 解析した。スケールバー上段: 50 μ m、中段および下段 100 μ m。

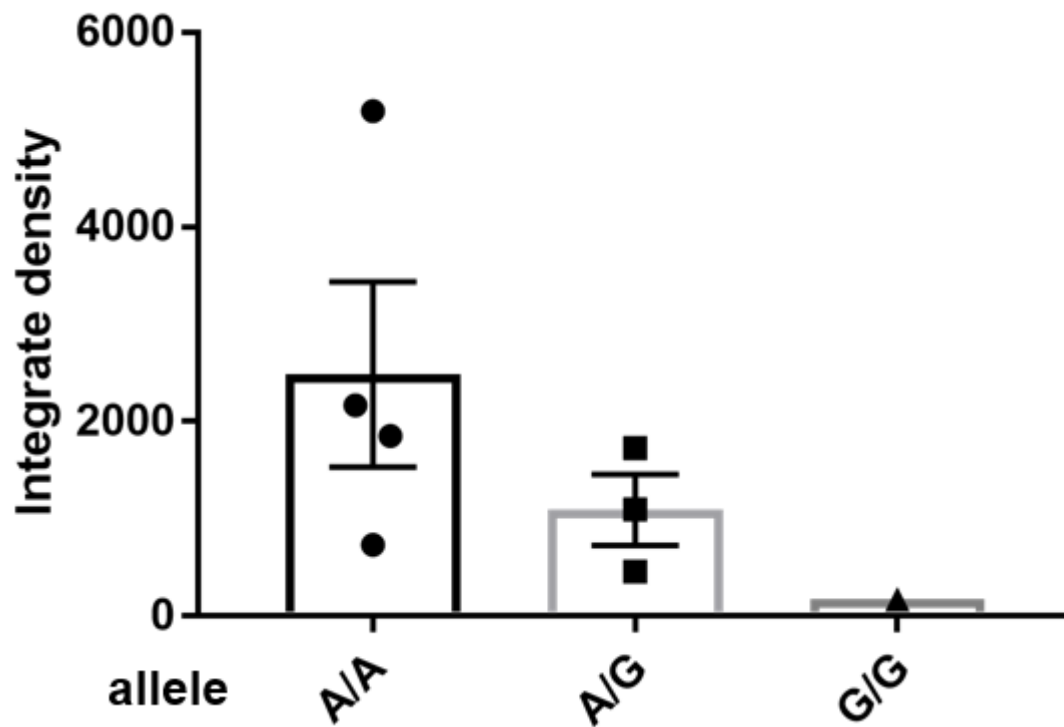


図 25 RA における rs13277113 の C8orf13 発現への影響

得られた滑膜検体について DNA シーケンスを行ったところ、rs13277113 について A/A (n=4)、A/G (n=3)、G/G (n=1)であった。図 23 の IHC の結果を ImageJ で定量解析した。

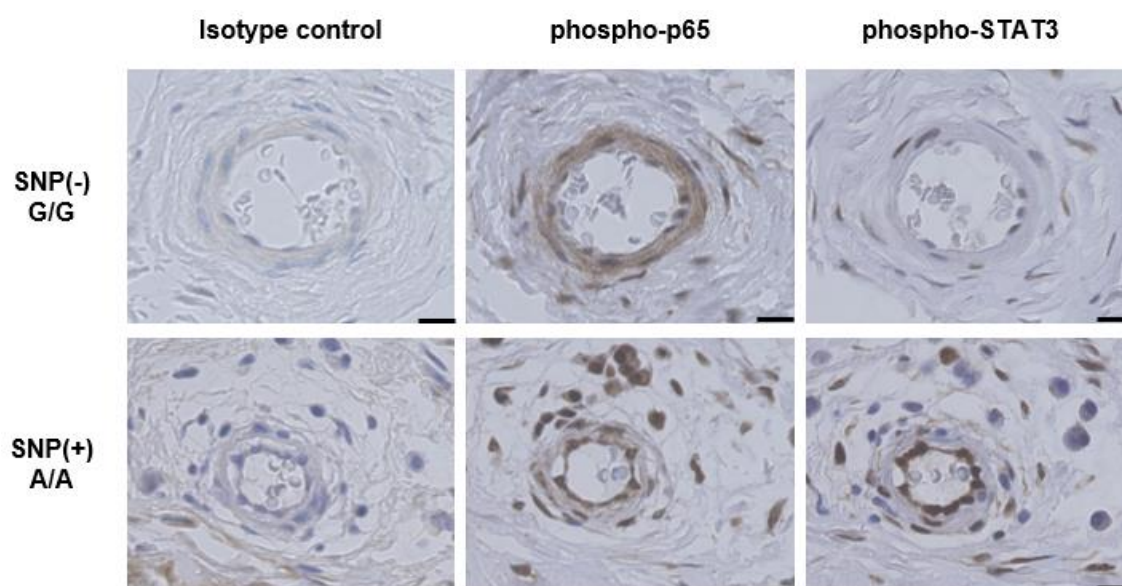


図 26 滑膜での炎症と rs13277113 との関係

OA 患者の DNA を genotyping し、rs13277113 が G/G である患者と A/A である患者において滑膜におけるリン酸化 p65 とリン酸化 STAT3 の IHC を行った。非活性状態において細胞質に局在する p65 と STAT3 は、活性化によってリン酸化され、核内移行する。リスクアリルを持つ患者の滑膜では、リン酸化 p65 とリン酸化 pSTAT3 がともに核内で強染色される傾向にあった。SNP スケールバー 10 μ m。

4. 考察

C8orf13 はこれまで機能的な研究が全くされてこなかった遺伝子である。本研究では C8orf13 が NF- κ B 経路を正に制御する因子であること、またその機序として RIPK1 の切断を抑制することによって NF- κ B の古典的経路に対する感受性を高めることを発見した。NF- κ B 経路を活性化する因子は TNF- α 、IL-1 β 、IL-17、リポポリサッカライド (LPS) など多数存在するが、関節リウマチでは TNF- α 阻害薬が一定の効果を発揮することが知られているため、TNF- α を介した古典的経路が C8orf13 によって制御される主な炎症経路と考えられる。RIPK1 は切断されない状態でのみユビキチン化され、IKK 複合体と結合することによって古典的経路を活性化する。また、脱ユビキチン化された状態では RIPK1 は Caspase-8 による切断を受け、アポトーシスやネクローシスが抑制される (Newton et al., 2019)。通常は、RIPK1 の作用が全細胞の細胞死や炎症を引き起こさないように、Caspase が特定の位置で RIPK1 タンパク質を切断する。しかしながら、RIPK1 の切断部位にアミノ酸変異が起こり、RIPK1 が切断されない患者は発熱、リンパ節腫脹、重度の腹痛、消化管疾患、頭痛などの症状を呈する。このような経緯から、切断不可 RIPK1 起因自己炎症 (cleavage-resistant RIPK1-induced autoinflammatory ; CRIA) 症候群という疾患概念が新たに提唱された (Lalaoui et al., 2020)。CRIA 症候群患者では TNF- α 阻害薬であるエタネルセプトや IL-1 β 阻害薬であるアナキンラは奏功せず、IL-6R 阻害薬であるトシリズマブが奏功する。また CRIA 症候群患者のように、正常型と変異型の RIPK1 を対立遺伝子座に各々 1 つずつ保有するマウスは、成長可能でおおむね正常であるが、各種の炎症性刺激に対する反応が増大する (Lalaoui et al., 2020)。これらの報告は、RIPK1 の切断異常に起因する炎症が、NF- κ B 経路の亢進のみならず、NF- κ B 経路の活性化によって生成される IL-6 によって JAK-STAT3 経路の活性化も促し、IL-6 アンプの形成によって発熱などのフェノタイプを形成させることを示唆される。また、NF- κ B 経路を活性化する因子が下流にある場合は TNF- α 阻害薬による効果は不十分であり、代替経路のない IL-6R のシグナルを抑制することで治療効果を発揮することが想定される。この見解は、本研究で C8orf13 過剰発現細胞において TNF- α 刺激に対する反応性が亢進していることから支持される。

一般的に、アポトーシスした細胞は、細胞膜内のホスファチジルセリン (PS) が細胞外に暴露されることでマクロファージによって認識され、炎症を引き起こすことなく体内で処理される。PS に結合してマクロファージによる死細胞の貪食を促進する分子を欠損したマウスでは、アポトーシス細胞のクリアランスに異常が見られ、SLE 様の自己免疫疾患を発症する (Suzuki et al., 2013)。また、RIPK1 の切断抑制はアポトーシスを亢進することが知られている (Newton et al., 2019)。すなわち、アポトーシス細胞のクリアランスに異常がある自己免疫疾患患者に C8orf13 関連 SNP がある場合には、ア

ポトーシスの亢進とクリアランスの不全により、アポトーシス細胞由来の自己抗原が抗原提示細胞によって提示される機会が増えると考えられ、これらの機序は関節リウマチよりも SLE の発症においてより重要だと考えられる。本研究対象として SLE の DNA シーケンスも行ったが、疾患リスク SNP 陰性の SLE 患者がほとんど存在せず、フェノタイプを比較することが困難であった。しかしながら、同じ疾患内でアレルの異なる患者間を比較することで、関節リウマチにおいては C8orf13 および rs13277113 の果たす役割を明らかにすることができた。rs13277113 で A を持つ患者は C8orf13 の発現が多いことで、RIPK1 が切断されにくい状況になっていると考えられる。CRIA 症候群の病態と照らし合わせると、A のアレルを持つ患者では TNF- α 阻害薬よりも IL-6R 阻害薬や JAK 阻害薬を用いることでより有効な治療戦略を立てられる可能性があり、今後患者の genotyping がテーラーメード医療につながる可能性がある。自己免疫疾患は多因子疾患と考えられ、遺伝要因が明らかになりつつあるにも関わらず、遺伝子解析を基盤とした治療方針への応用が限定的であるのは、未だ機能がわかっていない要素が多いからだと考えられる。ゲノム解析からリスク層別化を行い、治療応用につなげるためには、生体内での役割が不明なより多くの遺伝子や SNP の機能を明らかにしていく必要があると考える。

本研究では、局所炎症に焦点を絞ってきたが、C8orf13 を標的にした治療薬応用の可能性はどうであろうか。本研究を通して C8orf13 が RIPK1 に作用する分子であることが明らかとなった以上、免疫細胞も含めた全身への影響を検討するべきである。SLE のモデルマウスである MRL/lpr において、C8orf13 を欠損させた遺伝子改変マウスを作製した場合、腎炎や中枢神経、自己抗体などの免疫系異常が弱まれば、C8orf13 を介した SLE の病態を説明しうる。C8orf13 は TNFR1 複合体直下の細胞質にあるタンパク質だと考えられ、JAK 阻害薬のような低分子化合物による阻害が理論的には可能だと考えられるが、生物学的製剤のような膜タンパクや液性因子をターゲットにした抗体製剤の開発は不可能である。また、低分子化合物は不本意なオフターゲット効果を想定しなければならないが、近年、トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーなど一部の疾患で siRNA 製剤も開発されていることから、病態の中核を担う特異的分子の発見によってサイレンシング技術を利用した薬剤開発も現実的になりつつある。今後、難治性疾患に関連する新たな核酸やタンパク質などの標的分子の発見により、新規治療薬の開発を介して治療手段のバリエーションを拡張できることが期待される。この意味において、本研究のように、新しい疾患関連タンパク質の発見と機能の解明は、新たな臨床介入法を確立する上で重要である。

5. 結論

- C8orf13 は NF- κ B 経路を活性化する。
- C8orf13 は RIPK1 の切断を阻害することで、TNF- α 刺激に対する感受性を高める。
- C8orf13 のノックダウンは、*in vitro*、*in vivo* ともに炎症活性を有意に抑制する。
- C8orf13-BLK は関節リウマチの疾患感受性部位の SNP である。
- C8orf13 は RA の滑膜で有意に発現が高い。
- C8orf13-BLK のリスクアレルと C8orf13 の発現は相関する。

本研究では、疾患感受性部位として同定されていた C8orf13-BLK の機能の一端を明らかにした。機能が全くわかっていなかった C8orf13 が、RIPK1 に結合することによって Caspase-8 による切断を阻害し、血管内皮細胞や滑膜において炎症感受性を高めることを当該分子のノックダウンや変異タンパク質の過剰発現系から明らかにした。また、*in vivo* で C8orf13 の発現を抑制することによって、マウスの関節炎や皮膚炎を有意に抑制することができた。さらに、C8orf13 の発現が RA の滑膜で高いことを示すとともに、その一因として C8orf13-BLK リスクアレルと C8orf13 の発現量の相関性を見出した。これら一連の研究を通して、これまで自己免疫疾患の遺伝要因として指摘されてきた機能未知な分子による病態制御機構の一端を解明することができた。

今後、C8orf13 のノックアウトマウスを作製することで、C8orf13 が全身に与える影響を調べ、アンタゴニストの開発や創薬に向けた前臨床試験を展開すること期待される。また、並行して他の疾患感受性 SNP の機能解析を進めることによって、テーラーメイド医療の発展に貢献することが期待される。

本研究では、C8orf13 の炎症に関わる機能に局限しており、細胞死異常や抗原提示に当該分子がどのように関わるのか検討していない。既存のマウス疾患モデルに C8orf13 の遺伝的欠損背景を加えることによって、C8orf13 が様々な疾患にどのような影響を及ぼすか明らかにすることが今後の課題である。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野、渥美達也教授に謝意を表します。

本研究全般にわたり直接ご指導ご鞭撻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の村上正晃教授に深く感謝いたします。また，基礎的な部分から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准教授・北條慎太郎先生、講師・上村大輔先生，同助教・田中勇希先生に心から感謝いたします。さらに，各種研究材料を提供して頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野内科学分野、北海道大学整形外科教授・岩崎倫政先生、准教授高畑雅彦先生に深く感謝致します。また滑膜検体を用いるに当たって、ご提供くださったすべての患者様に感謝致します。

最後に本研究を遂行するにあたり，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科内科学講座免疫・代謝内科学分野および遺伝子病制御研究所分子神経免疫学の全ての皆様に心より御礼申し上げます。

7. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

8. 引用文献

- Aletaha, D., and Smolen, J.S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA* 320, 1360-1372.
- Aqrabi, L.A., Mentlein, L., Meneghel, L., Bjork, A., Thorlacius, G.E., Ivanchenko, M., Ramirez Sepulveda, J.I., Skarstein, K., Kvarnstrom, M., Brauner, S., *et al.* (2018). Clinical associations and expression pattern of the autoimmunity susceptibility factor DIORA-1 in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 77, 1840-1842.
- 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, 979-990.
- Cojocaru, M., Cohocaru, I.M., and Chico, B. (2015). New insight into the rheumatoid vasculitis. *Rom J Intern Med* 53, 128-132.
- Coustet, B., Dieude, P., Guedj, M., Bouaziz, M., Avouac, J., Ruiz, B., Hachulla, E., Diot, E., Cracowski, J.L., Tiev, K., *et al.* (2011). C8orf13-BLK is a genetic risk locus for systemic sclerosis and has additive effects with BANK1: results from a large french cohort and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 63, 2091-2096.
- Culemann, S., Gruneboom, A., Nicolas-Avila, J.A., Weidner, D., Lammle, K.F., Rothe, T., Quintana, J.A., Kirchner, P., Krljanac, B., Eberhardt, M., *et al.* (2019). Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* 572, 670-675.
- Dannappel, M., Vlantis, K., Kumari, S., Polykratis, A., Kim, C., Wachsmuth, L., Eftychi, C., Lin, J., Corona, T., Hermance, N., *et al.* (2014). RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature* 513, 90-94.
- Gottenberg, J.E., Morel, J., Perrodeau, E., Bardin, T., Combe, B., Dougados, M., Flipo, R.M., Saraux, A., Schaefferbeke, T., Sibilia, J., *et al.* (2019). Comparative effectiveness of rituximab, abatacept, and tocilizumab in adults with rheumatoid arthritis and inadequate response to TNF inhibitors: prospective cohort study. *BMJ* 364, l67.
- Gourh, P., Agarwal, S.K., Martin, E., Divecha, D., Rueda, B., Bunting, H., Assassi, S., Paz, G.,

Shete, S., McNearney, T., *et al.* (2010). Association of the C8orf13-BLK region with systemic sclerosis in North-American and European populations. *J Autoimmun* 34, 155-162.

Hom, G., Graham, R.R., Modrek, B., Taylor, K.E., Ortmann, W., Garnier, S., Lee, A.T., Chung, S.A., Ferreira, R.C., Pant, P.V., *et al.* (2008). Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 358, 900-909.

Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., *et al.* (2009). Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 60, 553-558.

Kanada, S., Nishiyama, C., Nakano, N., Suzuki, R., Maeda, K., Hara, M., Kitamura, N., Ogawa, H., and Okumura, K. (2011). Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood* 117, 2211-2222.

Karami, J., Aslani, S., Jamshidi, A., Garshasbi, M., and Mahmoudi, M. (2019). Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review. *Gene* 702, 8-16.

Lalaoui, N., Boyden, S.E., Oda, H., Wood, G.M., Stone, D.L., Chau, D., Liu, L., Stoffels, M., Kratina, T., Lawlor, K.E., *et al.* (2020). Mutations that prevent caspase cleavage of RIPK1 cause autoinflammatory disease. *Nature* 577, 103-108.

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.

Lessard, C.J., Li, H., Adrianto, I., Ice, J.A., Rasmussen, A., Grundahl, K.M., Kelly, J.A., Dozmorov, M.G., Miceli-Richard, C., Bowman, S., *et al.* (2013). Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet* 45, 1284-1292.

Liu, Y., Ke, X., Kang, H.Y., Wang, X.Q., Shen, Y., and Hong, S.L. (2016). Genetic risk of TNFSF4 and FAM167A-BLK polymorphisms in children with asthma and allergic rhinitis in a Han Chinese population. *J Asthma* 53, 567-575.

Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2019). Pleiotropy and Specificity: Insights from

the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 50, 812-831.

Newton, K., Wickliffe, K.E., Dugger, D.L., Maltzman, A., Roose-Girma, M., Dohse, M., Komuves, L., Webster, J.D., and Dixit, V.M. (2019). Cleavage of RIPK1 by Caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature* 574, 428-431.

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.

Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., *et al.* (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376-381.

Samuelson, E.M., Laird, R.M., Maue, A.C., Rochford, R., and Hayes, S.M. (2012). Blk haploinsufficiency impairs the development, but enhances the functional responses, of MZ B cells. *Immunol Cell Biol* 90, 620-629.

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, 1459-1470.

Schett, G., and Gravalles, E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 8, 656-664.

Smolen, J.S., Aletaha, D., and McInnes, I.B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 388, 2023-2038.

Sugiura, T., Kawaguchi, Y., Goto, K., Hayashi, Y., Gono, T., Furuya, T., Nishino, I., and Yamanaka, H. (2014). Association between a C8orf13-BLK polymorphism and polymyositis/dermatomyositis in the Japanese population: an additive effect with STAT4 on disease susceptibility. *PLoS One* 9, e90019.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., *et al.* (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34, 395-402.

Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R., and Nagata, S. (2013). Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* *341*, 403-406.

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

Torres, O., Palomino-Morales, R., Vazquez-Rodriguez, T.R., Castaneda, S., Morado, I.C., Miranda-Fillooy, J.A., Ortego-Centeno, N., Fernandez-Gutierrez, B., Martin, J., and Gonzalez-Gay, M.A. (2010). Role of the C8orf13-BLK region in biopsy-proven giant cell arteritis. *Hum Immunol* *71*, 525-529.