

学 位 論 文 題 名

慢性関節リウマチ滑膜細胞活性化における
転写コアクチベーターの役割とその制御に関する研究

学位論文内容の要旨

慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis;RA)は滑膜細胞の異常増殖を主病変とした関節軟骨の変性、骨破壊を特徴とする疾患で、罹患期間が長期にわたる難病である。これまで RA の病因について様々な手法により検討されてきたが、いまだその詳細は不明である。近年、RA 滑膜細胞の増殖・分化シグナル異常を標的とした研究により、Hox、NF- κ B および AP-1 などの転写因子の異常活性化が認められ、細胞活性化との関連が示唆されている。これらの転写因子の活性化には転写コアクチベーター CRE binding protein (CREB) binding protein (CBP) との複合体形成が必要である。CBP は多くの核内シグナルの統合装置として機能するとともに、その異常が白血病や動脈硬化症などの病因となる可能性が報告された。本研究では RA 滑膜細胞における CBP とその共役する転写因子の役割について分子生物学的、生化学的および薬理学的手法を用いて検討した。

1. 滑膜細胞におけるヒト成人白血病ウィルス TypeI (HTLV-I) Tax による CREB 活性化への CBP のコアクチベーターとしての関与について

HTLV-1 感染患者では RA に類似した関節炎が認められ、さらに HTLV-I ウイルス産物である Tax のトランスジェニックマウスにおいても関節炎が認められる。その後の研究から滑膜細胞活性化に転写活性化因子 Tax が関与していることが明らかとなった。そこで、HTLV-1 Tax による滑膜細胞活性化に CBP が関与しているか否かを検討した。関節炎を発症している HTLV-1 感染患者の滑膜細胞で Tax は CBP と結合して CREB による cAMP response element (CRE) プロモーター活性を増強していること、さらにその作用には Protein Kinase A (PK-A)によるリン酸化が必要であることがわかった。したがって、HTLV-1Tax による滑膜細胞の転写活性化に転写コアクチベーターCBP が関与していることが示唆された。

2. RA 滑膜細胞より CBP 結合因子の単離とその滑膜細胞活性化への関与

CBP は転写に必須なコアクチベーターであることから、RA 滑膜細胞由来 cDNA ライブラリを作成し、yeast two-hybrid 法を用いて CBP に結合する因子の単離を試みた。Bait として組織特異的因子が結合する CBP の C/H3 領域を用いスクリーニングを行った結果、Notch-1 を得た。Notch-1 はレセプターとして発現しており、活性化により細胞内ドメインが核内に移行し

て転写因子として作用することがわかっている。そこで RA 滑膜細胞における Notch-1 の発現を細胞内ドメインに対する抗体を用いた免疫染色法にて検出した。Notch-1 陽性細胞はコントロールと比較して、RA 滑膜細胞に多く認められ、核内に特異的に検出された。さらにウエスタンブロッティングにより核画分に約 60 kDa のバンドが検出され、この量は $\text{TNF}\alpha$ 処理により増強した。Notch-1 の細胞内ドメインはプレセニンにより切断されることが報告された。そこでプレセニンの酵素活性を抑制するペプチド (MW167) の RA 滑膜細胞増殖への作用を検討した結果、 $\text{TNF}\alpha$ による細胞増殖に対して選択的抑制作用が認められた。これらの結果は Notch-1 が滑膜細胞活性化に関与しており、かつ Notch-1 の活性化（核内移行）が $\text{TNF}\alpha$ シグナルの下流に存在することを示唆している。

3. RA 滑膜細胞における核内アセチル化と Tumor necrosis factor α ($\text{TNF}\alpha$) の作用について

CBP による転写活性化機構の一つに自身のアセチル基転移酵素活性が知られている。アセチル化されたヒストンは DNA と安定な構造体をとれなくなり、クロマチンの構造が変化し転写活性が増強すると考えられている。そこで、RA 滑膜細胞におけるコアクチベーター機能を核内アセチル化によって評価した。抗アセチル化リジン抗体により RA 滑膜細胞核内においてアセチル化した蛋白質が検出された。 $\text{TNF}\alpha$ は RA 患者の関節内で高濃度に認められるサイトカインの一つで、RA の病因・病態と密接に関わっている。そこで $\text{TNF}\alpha$ 処理した滑膜細胞において核蛋白質がアセチル化されるか否か検討したところ、約 62 kDa および約 53 kDa の蛋白質が濃度依存的にアセチル化されることがわかった。このうち 53 kDa 蛋白質は、がん抑制遺伝子 p53 であることが明らかとなった。

4. RA 滑膜細胞における p53 のアセチル化と CBP の役割について

p53 はアセチル化によりその転写能が増強することが報告されている。そこで、RA 滑膜細胞核抽出画分の p53 標的配列への結合をゲルシフトアッセイ法によって検討した。その結果、p53 の DNA 結合は $\text{TNF}\alpha$ の濃度依存的に上昇した。一方、プロモーター活性をレポーター遺伝子の発現として測定したところ、 $\text{TNF}\alpha$ は濃度依存的に p53 プロモーター活性を減少させた。したがって、 $\text{TNF}\alpha$ は p53 のアセチル化を誘導し、プロモーターへの結合を上昇させるものの、その転写活性化を抑制することが示唆された。p53 の転写活性化にはコアクチベーターとして CBP が必要である。そこで CBP を過剰発現させた RA 滑膜細胞における $\text{TNF}\alpha$ の p53 転写活性化について検討したところ、 $\text{TNF}\alpha$ によるプロモーター活性の抑制作用が回復した。このことから RA 滑膜細胞では何らかの原因で CBP が不足しており、その結果 p53 の活性が抑制されていることが推測された。p53 は紫外線や放射線照射等により誘導され、細胞周期を停止させアポトーシスを誘導し、損傷した細胞を排除する役割を有する。そこで CBP を過剰発現させた RA 滑膜細胞に $\text{TNF}\alpha$ を処理したところ、アポトーシスが誘導されることを見いだした。これらの結果から RA 滑膜細胞では p53 の活性化が起こっているものの、CBP の欠乏によりアポトーシスが惹起されないことが推定された。

以上の結果は、RA 滑膜細胞活性化にコアクチベーター CBP が関与していること、その制御による滑膜細胞活性化抑制が可能であることを示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野村	靖幸
副査	教授	横沢	英良
副査	助教授	上原	孝
副査	助教授	澤田	均

学位論文題名

慢性関節リウマチ滑膜細胞活性化における 転写コアクチベーターの役割とその制御に関する研究

申請者は慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis;RA)の主病変である滑膜細胞の異常増殖のメカニズムを明らかにする目的で、RA 滑膜細胞における CBP とその共役する転写因子の役割について分子生物学的、生化学的および薬理学的手法を用いて検討し、次の3つの結論を得た。1) CBP が転写コアクチベーターとして滑膜細胞活性化に関与している、2) RA 滑膜細胞由来 cDNA ライブラリより CBP 結合性因子として Notch-1 を単離し、そのシグナル活性化が滑膜細胞増殖に関与している、および3) CBP の重要な機能の一つでもある蛋白質アセチル化活性化が滑膜細胞にて亢進しており、滑膜細胞特異的にアセチル化される蛋白の一つとして p53 を見だし、さらにその転写活性化メカニズムに CBP のスケルチングに関与していることを証明した。これらの結果は RA の病因解明につながる独創的な新知見であるため、本学位論文として申請した。

はじめに、RAに類似した関節炎が認められるヒト成人白血病ウィルス type I (HTLV-I) 感染患者(HTLV-I associated arthropathy (HAAP)患者)由来滑膜細胞では HTLV-I ウィルス産物である Tax が転写活性化因子として関与しており、この HTLV-1 Tax による滑膜細胞活性化に CBP が関与していることを初めて証明した。すなわち、HAAP 滑膜細胞で Tax は CBP と結合して CREB による cAMP response element (CRE)プロモーター活性を増強していること、さらにその作用には Protein Kinase A (PK-A)によるリン酸化が必要であることを示唆した。したがって、HTLV-1Tax による滑膜細胞の転写活性化に転写コアクチベーター CBP が関与していることを明らかとした。

つぎに、RA 滑膜細胞由来 cDNA ライブラリを作成し、yeast two-hybrid 法を用いて CBP に結合する因子の単離を試みた。Bait として組織特異的因子が結合する CBP の C/H3 領域を用いスクリーニングを行った結果、Notch-1 を得た。Notch-1 はレセプ

ターとして発現しており、活性化により細胞内ドメインが核内に移行して転写因子として作用することがわかっている。そこで RA 滑膜細胞における Notch-1 の発現を細胞内ドメインに対する抗体を用いた免疫染色法にて検出したところ、Notch-1 陽性細胞はコントロールと比較して、RA 滑膜細胞に多く認められ、核内に特異的に検出された。さらにウエスタンブロッティングにより核画分に約 60 kDa のバンドが検出され、この量は $\text{TNF}\alpha$ 処理により増強した。Notch-1 の細胞内ドメインはプレセニンにより切断されることが報告された。そこでプレセニンの酵素活性を抑制するペプチド (MW167) の RA 滑膜細胞増殖への作用を検討した結果、 $\text{TNF}\alpha$ による細胞増殖に対して選択的抑制作用が認められた。これらの結果は Notch-1 が滑膜細胞活性化に関与しており、かつ Notch-1 の活性化（核内移行）が $\text{TNF}\alpha$ シグナルの下流に存在することを示唆している。

さらに、CBP による転写活性化機構の一つであるアセチル基転移酵素活性に着目し、RA 滑膜細胞におけるコアクチベーター機能を核内アセチル化によって評価した。抗アセチル化リジン抗体により RA 滑膜細胞核内においてアセチル化した蛋白質が検出された。 $\text{TNF}\alpha$ は RA 患者の関節内で高濃度に認められるサイトカインの一つで、RA の病因・病態と密接に関わっている。そこで $\text{TNF}\alpha$ 処理した滑膜細胞において核蛋白質がアセチル化されるか否か検討したところ、約 62 kDa および約 53 kDa の蛋白質が濃度依存的にアセチル化されることがわかった。このうち 53 kDa 蛋白質は、がん抑制遺伝子 p53 であることが明らかとなった。p53 はアセチル化によりその転写能が増強することが報告されている。そこで、RA 滑膜細胞核抽出画分の p53 標的配列への結合をゲルシフトアッセイ法によって検討した。その結果、p53 の DNA 結合は $\text{TNF}\alpha$ の濃度依存的に上昇した。一方、プロモーター活性をレポーター遺伝子の発現として測定したところ、 $\text{TNF}\alpha$ は濃度依存的に p53 プロモーター活性を減少させた。したがって、 $\text{TNF}\alpha$ は p53 のアセチル化を誘導し、プロモーターへの結合を上昇させるものの、その転写活性化を抑制することが示唆された。p53 の転写活性化にはコアクチベーターとして CBP が必要である。そこで CBP を過剰発現させた RA 滑膜細胞における $\text{TNF}\alpha$ の p53 転写活性化について検討したところ、 $\text{TNF}\alpha$ によるプロモーター活性の抑制作用が回復した。このことから RA 滑膜細胞では $\text{TNF}\alpha$ 刺激によって CBP の不足(スケルチング)しており、その結果 p53 の活性が抑制されていることが推測された。p53 は紫外線や放射線照射等により誘導され、細胞周期を停止させアポトーシスを誘導し、損傷した細胞を排除する役割を有する。そこで CBP を過剰発現させた RA 滑膜細胞に $\text{TNF}\alpha$ を処理したところ、アポトーシスが誘導されることを見いだした。これらの結果から RA 滑膜細胞では p53 の活性化が起こっているものの、CBP のスケルチングによりアポトーシスが惹起されないことが推定された。

したがって、申請者は、RA の主病変のひとつである滑膜細胞活性化に CBP が転写コアクチベーターとして関与していることを示し、その制御による細胞増殖抑制が可能であること、また、Notch-1 および p53 シグナルへの $\text{TNF}\alpha$ の関与、p53 の CBP スケルチングによる活性抑制を世界に先がけて明らかとした。

以上、本審査委員会は本論文を RA 滑膜細胞の新しい活性化メカニズムについて新知見を得るとともに、これらの知見は RA の治療法開発に大きく貢献すると判定し、博士（薬学）の学位を受けるに十分値すると認めた。