

## 論 文 要 旨

### Activation of synoviolin promoter in rheumatoid synovial cells by a novel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha.

リウマチ滑膜細胞におけるシノビオリンプロモーター

活性化機構の研究

泉 俊彦

#### 【序論および目的】

Synoviolin は関節リウマチ (RA) 患者の滑膜細胞よりクローニングされた、小胞体関連分解 (ERAD) を担う E3 ユビキチンリガーゼである。これまでに我々は Synoviolin が RA の原因遺伝子の一つであることを見出した。また Synoviolin の発現量が RA の関節炎の severity に関与することに加え、抗 TNF  $\alpha$  製剤への感受性にも関与することが証明された。

我々はすでに、生理的状态において GA binding protein (GABP)  $\alpha/\beta$  complex が Synoviolin promoter 上の Ets binding site を介し Synoviolin の構成的発現を担い、細胞の恒常性維持に寄与していることを明らかとした。

そこで今回、病的状態である RA における滑膜特異的な Synoviolin 転写活性化機構を明らかにするため検討を行った。

#### 【材料および方法】

変形性関節症 (OA) と RA の滑膜細胞核抽出液を用い、electrophoretic mobility shift (EMSA) にて Synoviolin promoter への転写因子の結合パターンを解析した結果、いくつかのタンパクが RA における転写活性化に寄与していることが示唆された。そこで Synoviolin promoter への結合パターンが RA 滑膜細胞 (RSCs) と類似していた線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞を大量培養し、調製した核画分を 4 段階のカラムを用いて EMSA におけるプロモーターへの結合を指標に精製を行い、得られた最終精製画分中に含まれるタンパクを LC-MS/MS 法にて同定した。また同定したタンパクの synoviolin promoter 上への結合を EMSA、co-immunoprecipitation assay にて検討した。さらに reporter assay, RNA interference による knockdown assay にて同定したタンパクの Synoviolin 転写活性への関与を検討した。

## 【結果】

Mas spectrometry による解析の結果、先に明らかとなっていた GABP  $\alpha/\beta$  に加え、核内に存在する新たな転写因子の候補として、interleukin enhancer binding factor 2(ILF2)、interleukin enhancer binding factor3 (ILF3) が同定された。

両者の抗体を用いた EMSA の結果、ILF3 抗体により complex formation の inhibition を認めた。また共沈にて ILF3 と GABP  $\alpha$  との interaction が確認され GABP  $\alpha$  と ILF3 が EBS-1 上で complex を形成していることが明らかとなった。

Reporter assay による検討から、これまで明らかとなっていた GABP  $\alpha/\beta$  による活性化に加え、GABP  $\alpha$  + ILF3 による転写の活性化を認めた。更に GABP  $\beta$ 、ILF2 を加えると活性が亢進することからこれら 4 因子が協調的に転写を活性化させる可能性が示唆された。

siRNA により ILF3 を knock down した際の synoviolin 発現への影響を RT-PCR にて確認した結果、ILF3 の siRNA 処理により synoviolin の siRNA 処理と同程度の発現抑制を認めた。

## 【結論及び考察】

これらの結果より T cell における IL-2 の発現に関与することが知られている interleukin enhancer binding factor (ILF) 3 が、RSCs において GABP  $\alpha$  と complex を形成し Synoviolin 転写を活性化することが明らかとなった。その結果 Synoviolin 発現が亢進し、滑膜増生が生じ関節炎が引き起こされると考えられる。

Synoviolin の転写制御機構の解明により、Synoviolin 発現制御による新しい R A 治療法開発の手がかりとなることが期待される。ILF3 は RA 治療の新たな target となりうる。

(Arthritis Rheum. 2009 Jan;60(1):63-72. 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 117 号	学位申請者	泉 俊彦
審査委員	主査	松山 隆美	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	鄭 忠和	副査 岸田 昭世
	副査	武井 修治	副査 金蔵 拓郎

**Activation of synoviolin promoter in rheumatoid synovial cells by a novel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha.**

(リウマチ滑膜細胞におけるシノビオリンプロモーター活性化機構の研究)

当研究室では、関節リウマチ ( Rheumatoid arthritis; RA ) の滑膜細胞より新規 E3 ユビキチンリガーゼを同定し、滑膜細胞にちなみ遺伝子シノビオリンと命名した。シノビオリンは RA 滑膜細胞に過剰発現し、過剰発現マウスは関節炎をきたし、発現量が約半分であるヘテロノックアウトマウスでは関節炎の発症に抵抗性を示すことから シノビオリンの発現量が滑膜増殖を伴う関節炎の発症に重要であることが明らかとなっている。シノビオリンの発現量調節の第一段階である転写制御機構に関して、生理的状态において GA binding protein ( GABP )  $\alpha/\beta$  complex がシノビオリンプロモーター上の Ets binding site ( EBS ) を介しシノビオリンの構成的発現を担い、細胞の恒常性維持に寄与していることを明らかにした。

そこで今回、RA における滑膜特異的なシノビオリン転写活性化機構を明らかにするため、他の転写因子の検討を行った。

変形性関節症 ( Osteoarthritis; OA ), RA 滑膜細胞の核抽出液を用い、gel shift assay にてシノビオリンプロモーターへの転写因子の結合パターンを解析した結果、いくつかのタンパクが RA における転写活性化に寄与していることが示唆された。そこでシノビオリンプロモーターへの結合パターンが類似していた線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞を大量培養し、調製した核分画を 4 段階のカラムを用いてプロモーターへの結合を指標に精製を行い、得られた最終精製分画中に含まれるタンパク質を LC-MS/MS 法にて同定した。同定された候補転写因子について、シノビオリン転写制御への関与を reporter assay, および siRNA を用いた knock down により検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) T 細胞における IL-2 発現を調整する interleukin enhancer binding factor 3 ( ILF3 ) が GABP  $\alpha$  とシノビオリンプロモーターの EBS 上で complex を形成していることが明らかとなった。
- 2) これまで明らかとなっていた GABP  $\alpha/\beta$  によるシノビオリン転写活性化に加え新たに GABP  $\alpha$  / ILF3 による活性化が示された。またそれぞれの partner protein である GABP  $\beta$ 、ILF2 との協調的な転写活性化も示唆された。
- 3) ILF3 の knock down によりシノビオリンの knock down 処理と同程度の発現抑制効果が認められた。

生化学的手法を用いシノビオリンプロモーター上に結合する転写因子の精製・同定を試み、ILF3 が GABP  $\alpha$  と相互作用し複合体を形成しうること、およびこれらの因子が実際シノビオリン転写活性化に寄与することを初めて明らかとした。

本研究は、RA 滑膜細胞で、T 細胞での IL-2 の転写制御にかかわるとされていた ILF3 が GABP  $\alpha$  と複合体形成を成すことを明らかとした。この発見によって RA の自己免疫的側面と滑膜細胞増殖を同一分子で説明できる可能性があり非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 117 号	学位申請者	泉 俊彦
審査委員	主査	松山 隆美	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	鄭 忠和	副査 岸田 昭世
	副査	武井 修治	副査 金蔵 拓郎

主査および副査の5名は、平成 23 年 2 月 1 日、学位申請者 泉 俊彦 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) シノビオリンはユビキチンリガーゼ活性を持つとのことだが、E3 は基質特異性があることが知られているがこれまでに基質で明らかになっているものは？

(回答) p53 がシノビオリンによりユビキチン化されることが報告されている。

質問 2) p53 の E3 としては MDM2 が知られているが活性の強さの比較などはなされているか？

(回答) 活性の強さの比較は未施行。

質問 3) 滑膜細胞の不死化は試みたことがあるか？

(回答) 滑膜細胞は自己増殖能があることが知られているが継代が進むと形質が変わることが知られている。不死化は試みていない。

質問 4) EMSA で用いた probe 配列はヒトとマウスでは同一か？

(回答) まったく同一である。

質問 5) Figure 3 での EMSA での ILF3 抗体での結合抑制が Figure 4B の siRNA の実験結果からすると弱い印象だが、抗体の titration は行ったか？

(回答) 抗体の評価は十分行っていない。

質問 6) Reporter assay での ILF2 と GABP  $\beta$  の組み合わせは？ ILF3 のみ加えない組み合わせは？

(回答) 活性化する傾向は認めしたが、有意差は出なかった。

質問 7) ILF3 を overexpression / knock down した時に ER signal にかかわる ATF6、XBP1、CHOP、PERK などの動きは確認されているか？

(回答) シノビオリンは ER stress や IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-17 の刺激で発現亢進することは報告されているが、これらを含め ILF3 とこれらの signal の因果関係はまだ検討できていない。

質問 8) beta-actin promoter を用いたシノビオリンの過剰発現マウスでは EBS は保たれているか？ 保たれていれば治療効果判定の実験に使えると思う。

(回答) 把握できておりません。

質問 9) シノビオリンは全身性に発現しているとのことだが、シノビオリンは RA 滑膜以外に過剰発現しているのか？

(回答) TNF $\alpha$  製剤に抵抗性を示した患者の末梢血中の CD3 陽性 T 細胞にて発現が亢進していることが報

告されており、治療法選択のマーカーとなりうることが報告されている。

質問 1 0) ILF3 の Knock out mouse の報告は？

(回答) 出生時の size が小さく、筋肉での apoptosis 亢進を認め、出生後の横隔膜機能不全からくる呼吸器障害で死亡するとの報告がある。過剰発現マウスは作製している研究室があるがその詳細はまだ報告されていない。

質問 1 1) ILF3 が疾患に関連している報告はあるか？

(回答) Nasopharyngeal carcinoma で発現が亢進していることが報告されている。また ILF3 を抑制すると survivin の発現が抑制されるとのことから survivin 関連疾患（癌など）との関連が言われている。最近、三重大学より ILF3 遺伝子に変異があると日本人の心筋梗塞の発症 risk があがるとの報告もあるが詳しい機構はまだ分かっていない。

質問 1 2) 末梢血中のシノビオリン濃度を測ることで RA の活動性や骨破壊の予測などをできるような可能性はあるか？

(回答) RA の病勢とシノビオリンの発現量が直接関連する data は今のところない。しかし TNF $\alpha$  製剤の適応を判断するには末梢血中のシノビオリン濃度はその判断材料になりうる。

質問 1 3) 全身性に発現しているシノビオリンを今後治療で抑制する際に考えられる副作用は？ シノビオリンを target とすることで現在の生物学的製剤で問題となる日和見感染などを clear できるか？

(回答) シノビオリンの knock out mouse が胎生致死になることから全身的な抑制の際は副作用の発生は懸念される。ILF3 を target とすると T 細胞の機能障害の懸念はある。滑膜特異的に抑制できるよう、滑膜特異的な drug delivery system の発展や、decoy 核酸や siRNA による knock down が望ましい。

質問 1 4) 今回の報告では ILF3 の重要性は説明されているが ILF2 はどうだったのか？

(回答) ILF2、GABP $\beta$  も協調的に作用していると考えているが、今回実験に用いた抗体が実験系で work せず証明するに至らなかったため、ILF3 に絞って報告した。

質問 1 5) GABP $\alpha$ 、GABP $\beta$ 、ILF2、ILF3 の 4 因子が同時に一つの複合体を形成しているのか？

(回答) まだ証明できていない。今後明らかにしたい点である。

質問 1 6) GABP $\alpha$  と ILF3 の promoter への結合様式は？

(回答) ILF3 には明らかになっている DNA 結合 domain の報告がないので、GABP $\alpha$  が EBS に結合し ILF3 を recruit すると考えている。

質問 1 7) Synoviolin の RA 滑膜での発現亢進は primary なものなのか？ OA 滑膜を活性化させると synoviolin 発現は亢進するのか？ 炎症の落ち着いた RA 滑膜でのシノビオリンの発現はどうなっているのか？

(回答) ヘテロノックアウトマウスにコラーゲン誘導性関節炎モデルを適応し関節炎を人為的に誘導した際、免疫反応は正常に应答しているのにもかかわらず関節炎の発症に抵抗性を示しているので、シノビオリンの RA 滑膜での発現亢進は免疫系から独立した primary なものと考えている。炎症の落ち着いた RA 滑膜でのシノビオリンの発現の data はない。

質問 1 8) ER stress との関連は？

(回答) ER stress でのシノビオリン発現亢進は報告されていて、酵母のシノビオリンホモログの Hrd1 にて ATF6、XBP1 の signal での発現亢進が認められている。

質問 1 9) Complex 1 と 3 に関してはわかっていることがあるか？

(回答) まだ検討できておりません。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。