慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	分泌蛋白質キナーゼの制御機構の解明と関節リウマチ治療への応用
Sub Title	Investigation of regulatory mechanism of secretory protein kinase and its application for treatment of rheumatoid arthritis
Author	竹内, 勤(Takeuchi, Tsutomu) 鈴木, 勝也(Suzuki, Katsuya) 中川, 種昭(Nakagawa, Taneaki) 仲, 哲治(Naka, Tetsuji) 竹下, 勝(Takeshita, Masaru)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	研究代表者は末梢血を用いた研究で, 関節リウマチの病態と関連する分子として翻訳後修飾にかかわる分子であるFAM20Aを同定している。本研究ではFAM20Aに対する抗体を作成し, FAM20Aの遺伝子発現, タンパク発現について病変部位との関連含めて検討した。その結果, 関節リウマチの滑膜線維芽細胞においてもFAM20Aが発現しており, さらに複数のサイトカインによりFAM20Aが誘導されていることが明らかになり, 翻訳後修飾と関節リウマチ病態の関わりが強く示唆される知見を得た。 We have identified FAM20A which regulates post-transcriptional protein modification as a molecule associated with pathophysiology of rheumatoid arthritis in the previous research using peripheral blood. In this research, we generated anti-FAM20A antibody and deeply analyzed association between FAM20A and affected sites. Our investigation successfully revealed the expression affected site and its induction by inflammatory cytokines. These findings suggested that post-transcriptional protein modification involved in pathophysiology of rheumatoid arthritis.
Notes	研究種目 : 基盤研究(B)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26293233 研究分野 : リウマチ・膠原病学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26293233seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２９　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(B)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６２９３２３３

研究課題名（和文）分泌蛋白質キナーゼの制御機構の解明と関節リウマチ治療への応用

研究課題名（英文）Investigation of regulatory mechanism of secretary protein kinase and its application for treatment of rheumatoid arthritis

研究代表者

竹内　勤（Takeuchi, Tsutomu）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：５０１７９６１０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　12,600,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は末梢血を用いた研究で、関節リウマチの病態と関連する分子として翻訳後修飾にかかわる分子であるFAM20Aを同定している。本研究ではFAM20Aに対する抗体を作成し、FAM20Aの遺伝子発現、タンパク発現について病変部位との関連含めて検討した。その結果、関節リウマチの滑膜線維芽細胞においてもFAM20Aが発現しており、さらに複数のサイトカインによりFAM20Aが誘導されていることが明らかになり、翻訳後修飾と関節リウマチ病態の関わりが強く示唆される知見を得た。

研究成果の概要（英文）：We have identified FAM20A which regulates post-transcriptional protein modification as a molecule associated with pathophysiology of rheumatoid arthritis in the previous research using peripheral blood. In this research, we generated anti-FAM20A antibody and deeply analyzed association between FAM20A and affected sites. Our investigation successfully revealed the expression affected site and its induction by inflammatory cytokines. These findings suggested that post-transcriptional protein modification involved in pathophysiology of rheumatoid arthritis.

研究分野：　リウマチ・膠原病学

キーワード：　関節リウマチ　FAM20A　キナーゼ

１．研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチは、自己免疫学的機序を基盤とする持続性滑膜炎により関節破壊を来たす難治性疾患である。滑膜炎の分子病態の解析によって、TNF-αおよび IL-6 が中心的役割を果たしている事が明らかとなった。それらを標的とした生物学的製剤は RA 治療に大きな進歩をもたらし、治療目標は、滑膜炎がほぼ消失した寛解にまで高められものの、その先の寛解維持のための新たな治療法の確立が急務となっている。

(2) 自己免疫疾患の病態において、上記の炎症性サイトカインの異常と関連してあるいは独立して、細胞内シグナル伝達分子を中心としたリン酸化の異常に関する多数の報告が申請者らを含めてある。RA に対しては主に細胞内シグナルに関与するキナーゼを標的として開発が進み、2013 年には、細胞内分子のリン酸化の異常を標的とした分子医薬が本邦でも実用化された。JAK 阻害薬と呼ばれる新しい作用機序の抗リウマチ薬で、血球系細胞を主な標的細胞として、サイトカイン受容体の直下のシグナル伝達分子である JAK(ヤーヌスキナーゼ)を標的として各種のサイトカイン受容体からのシグナルを阻害することにより効果を発揮し、生物学的製剤と匹敵する治療効果を認める期待の経口薬である。

(3) 申請者らは、これまでにトランスクリプトミクスの手法を用いて生物学的製剤の有効性を予測する遺伝子の組み合わせを同定した。続いて対象を拡大し、RA の病態形成に関わる分子標的を DNA マイクロアレイ法により網羅的に探索を行った。RA 患者 212 名 402 例の末梢血検体を用い、健常人および疾患コントロールを対照群とした検討において、RA で発現亢進し疾患活動性と最も相関する遺伝子として FAM20A(Family with sequence similarity 20, member A) を同定した。FAM20A は複数プローブにおいて DAS28-CRP と高い相関性(R=0.54-0.61)を示すだけでなく、性質の異なる DAS28-CRP の 4 項目全てと有意な相関を示した。これは解析に用いた一部の症例の mRNA を利用した定量的 PCR でも確認された。FAM20A は別の検体を用いたコホートでも抽出され、免疫ブロット法にて蛋白質レベルでも RA で高発現であることが明らかとなった。

(4) FAM20A はマウスで骨髄前駆細胞への薬剤投与後 24-72h 後に一過性に増加する mRNA として最初に報告された。シグナル配列により小胞体やゴルジに送られ、同部位のグリコシル化を受けて細胞外に分泌される。ファミリーとして B、C が存在する。最近、FAM20 ファミリーのノックアウトマウス（KO）の表現型が報告された。FAM20A の KO でエナメル質の形成不全と、全身の筋性動脈・腎臓・肺内に異常石灰化が出現する。FAM20B の KO は胎生致死であった。FAM20C の KO では 20%が胎生致死で、出生した場合にはエナメル質形成不全、全身の骨のミネラル低下と異常石灰化、成長障害を起こす。ヒトにおいても、FAM20A はエナメル質形成不全と腎髄質の石灰化を引き起こす Enamel Renal Syndrome の原因遺伝子であることがごく最近報告されたが、分子の機能は不明のままである。一般的に未知の分子の機能に関しては、相同性のある分子の機能から推測する手法が行われる。同じファミリーの FAM20B はグリコサミノグリカン合成時に働く、Ser 残基に結合した Xylose をリン酸化する酵素で、軟骨形成に関わることが分かっている。また、数十年にわたり存在が示唆されていた、細胞外に分泌されるタンパク質の S-x-E の配列をリン酸化する Goldi Casein Kinase が、FAM20C であったことが報告された。FAM20C の基質は分泌タンパクのリン酸化修飾を受けることが判明している部位の実に 75%程度に働く生体にとって極めて重要な分子であることが判明した。

(5) FAM20A は FAM20C に最も相同性の高い分子であるが、FAM20C の基質タンパク質をリン酸化しないことは前述の文献の中で確認されており、FAM20C とは異なる配列をリン酸化するキナーゼである可能性が検討されている。FAM20A の機能は未知であるが、申請者らはこれまでの報告から新規の分泌タンパク質キナーゼの可能性が極めて高いと考えた。RA において本分子の発現が亢進しており活動性と高い相関を示すことから、RA の病態形成に関わる新たな鍵分子と考えた。

２．研究の目的

FAM20A を含む分泌タンパク質キナーゼは、RA における軟骨の破壊、骨破壊、動脈硬化の増悪などに関与していることが想定され、疾患マーカー候補であるとともに治療標的にもなりうる重要な分子であることを仮説として実証を行うことを本研究課題の目的とした。本研究課題では下記のテーマに分け目標を設定した。

(1) FAM20A 蛋白質のキナーゼとしての標的基質配列の同定

(2) FAM20A と相互作用する基質蛋白質の同定と生理機能の解明

(3) RA の病態における分泌蛋白質キナーゼの役割の解明

(4) ヒト組織における FAM20A の発現分布

３．研究の方法

(1) FAM20A および関連遺伝子のクローニング：ヒト FAM20A およびその関連分子の全長配列をヒト末梢血 cDNA 等からクローニングし、発現ベクターに組み込んだ。各種 tag を融合させた FAM20A を哺乳類細胞で発現させ、アフィニティーカラムで精製した。

(2) FAM20A の標的基質配列の探索：CelluSpots ペプチドアレイを利用して、33γP-ATP からペプチド内の特定の配列にリン酸基の転移が起こるか検討した。また、基質と思われるタンパク質を個別に購入も

しくはクローニングおよびタンパク精製し、FAM20A によってリン酸化が行われるのかを Phostag gel を用いたウェスタンブロット等で検討した。
(3) FAM20A の抗体の作成：市販の抗ヒト FAM20A 抗体では研究には不十分と考えらえたため、作成したリコンビナント FAM20A をマウスに免疫し、抗ヒト FAM20A 抗体を作成した。できた抗体をウェスタンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫組織染色に使用できるか検討した。
(4) 免疫組織染色：作成した抗ヒト FAM20A 抗体を用いて、ヒト組織アレイおよび関節リウマチの滑膜組織切片を染色し FAM20A のタンパクレベルでの発現を検討した。
(5) Rea-Time PCR を用いた FAM20A の発現の検討：ヒト組織由来の RNA パネルを購入し、Real-Time PCR を用いて FAM20A および FAM20C の発現を検討した。それに加え、関節リウマチの病変局所の細胞である滑膜線維芽細胞を用いて FAM20A の発現を検討した。

４．研究成果

(1)リコンビナントヒト FAM20A 及び抗体作成
ヒト FAM20A は Free style 293 system および Expi293 system を用いて作成し、Strep-tag を用いて高純度に精製することができた。作成したタンパクをマウスに免疫し、Histag で作成したヒト FAM20A を使用しスクリーニングを行い、6 種類のハイブリドーマを得ることができた。
6 種類のうち 3 種類がウェスタンブロットが可能、6 種類全部で免疫沈降可能であり、1 種類が免疫組織染色も可能であった。
(2) FAM20A の標的基質配列の検討
FAM20A はゴルジキナーゼである FAM20C と相同性が高かったことや、KO マウスの表現型が FAM20A と C で似ていることから、当初、FAM20A のリン酸化の標的は FAM20C の標的と一部同じであるか、違うとしても何らかのタンパク質を想定していた。ペプチドアレイを用いて様々な配列と FAM20A を反応させたが、リン酸化シグナルは得られなかった。また、FAM20C の標的タンパクと反応させてもリン酸化は認められなかった。
その後、FAM20A は FAM20C の補酵素的な役割を果たす pseudokinase であることが発見された（eLife 2015;10.7554/eLife.06120）。
(3) FAM20A の免疫組織染色
作成した FAM20A 抗体を用いて免疫組織染色を行った。ヒト組織アレイで検討したところ、肝臓、腎臓、唾液腺などで陽性となり、既報のマウスでの検討結果と一致した。さらに特に FAM20A が高発現しているとされる副甲状腺の組織も追加で検討したが、こちらもよく染色された。我々は以前、末梢血の FAM20A 遺伝子発現の強弱が活動性と相関するとして報告したが、念のため関節リウマチの滑膜組織でも染色を行った。すると意外なことに、滑膜に浸潤しているリンパ球ではなく、滑膜線維芽細胞自体に FAM20A の発現が認められた（図 1）。

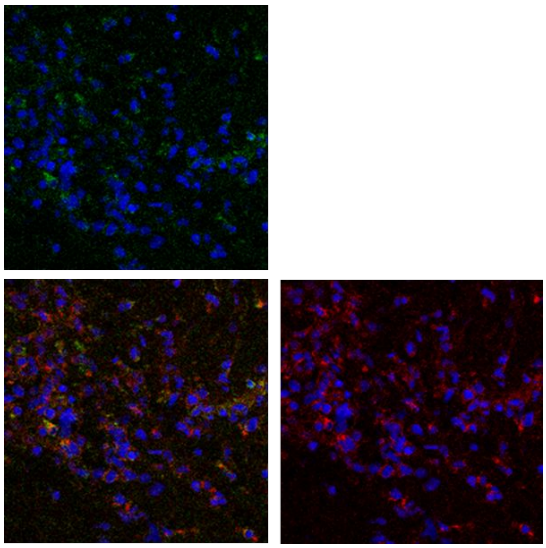

図 1 二重蛍光免疫染色による FAM20A の発現細胞の同定：凍結ヒト滑膜組織切片、左上の HSP47 と右下の FAM20A の発現が一致している(左下)、緑：HSP47(滑膜線維芽細胞)、赤：FAM20A

(4) FAM20A の遺伝子レベルでの発現
ヒト組織由来の RNA パネルを用いた PCR では、免疫組織染色の結果と一致して唾液腺、腎臓、肝臓などで FAM20A の発現が確認された。また、滑膜組織の免疫染色で滑膜線維芽細胞で FAM20A の発現が認められたため、培養した滑膜線維芽細胞を用いて遺伝子レベルでの発現も確認した（図 2）。その結果、線維芽細胞でも他の FAM20A 発現組織と同程度の発現がみられ、さらにいくつかのサイトカインにより FAM20A の発現が誘導されることも確認された。関節リウマチの病変部では線維芽細胞からのサイトカイン・ケモカインなどのメディエーター放出が炎症を増悪する一要素となっており、FAM20A がそれらのタンパクをリン酸化するのに必要な補酵素であることから、これまで以上に FAM20A の病態への関りが示唆される結果であった。

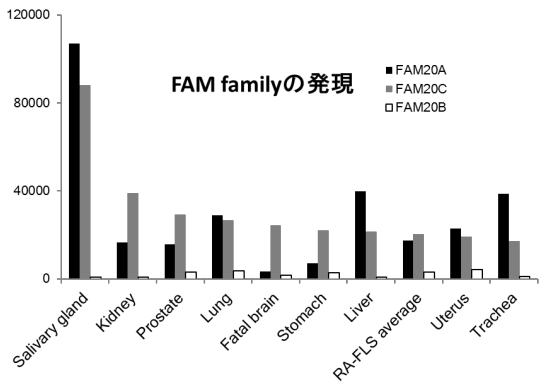

図 2 RT-PCR における FAM20 ファミリーの遺

伝子発現：GAPDH をコントロールとしてΔΔCT 法を用いて計算した。縦軸は GAPDH=100 万とした際の相対発現値。RA-FLS は 3-6 継代した滑膜線維芽細胞を使用、その他はヒト組織由来の RNA panel を使用した

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　1 件）

1. Seiji Nakamura, Katsuya Suzuki, Hiroshi Iijima, Yuko Hata, Chun Ren Lim, Yohei Ishizawa, Hideto Kameda, Koichi Amano, Kenichi Matsubara, Ryo Matoba and Tsutomu Takeuchi. Identification of baseline gene expression signatures predicting therapeutic responses to three biologic agents in rheumatoid arthritis: a retrospective observational study Arthritis Research & Therapy 201618:159 DOI: 10.1186/s13075-016-1052-8(査読あり)

〔学会発表〕（計　2 件）

1. Nakamura S, Iijima H, Hata Y, Ishizawa Y, Chun Ren Lim, Matoba R, Suzuki K, Amano K and Takeuchi T：Identification of the Gene Expression Signatures Predicting the Responses to Three Biologics (infliximab, tocilizumab, and abatacept) in Rheumatoid Arthritis. ACR2015. (San Francisco, USA) 2015.11.6-11 Poster.
2. 中村 誠二，鈴木 勝也，飯島 寛，羽田 裕子，リム チュンレン，石澤 洋平，亀田 秀人，天野 宏一，松原 謙一，的場 亮，竹内 勤 関節リウマチ患者に対する３つの生物学的製剤の治療効果と関連する遺伝子発現シグネチャの同定 第 31 回日本臨床リウマチ学会、2015 年 10 月 30 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕（計　0 件）

６．研究組織
(1)研究代表者
竹内　勤（TAKEUCHI Tsutomu）
慶應義塾大学・医学部リウマチ内科・教授
研究者番号：50179610

(2)研究分担者
鈴木　勝也（SUZUKI Katsuya）
慶應義塾大学・医学部リウマチ内科・講師
研究者番号： 70306695

中川　種昭（NAKAGAWA Taneaki）
慶應義塾大学・医学部歯科口腔外科・教授
研究者番号： 00227745

仲　哲治（NAKA Tetsuji）
高知大学・教育研究部臨床医学部門・教授
研究者番号： 30303936

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
竹下　勝　（TAKESHITA Masaru）
慶應義塾大学・医学部リウマチ内科・特任助教
研究者番号：10571135