

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

嶋崎 孝輔

専攻分野：疾患プロテオーム・分子病態治療学

コース：

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：

Role of Layilin in Human Synovial Fibroblasts Revealed by Proteomic Analysis.

(プロテオミクス法を用いた、ヒト滑膜線維芽細胞株におけるライリンの機能解析)

共著者：

Mitsumi Arito, Toshiyuki Sato, Kazuki Omoteyama, Masaaki Sato, Manae S Kurokawa, Naoya Suematsu, Hisateru Niki, Tomohiro Kato

緒言

ライリンは、C型レクチン様の膜蛋白質でヒアルロン酸受容体である。一方で、ライリンの発現抑制により癌細胞の浸潤・転移が阻害されること、疲弊 CD8⁺T 細胞でライリンの発現が増強していること、糸球体腎炎患者の腎臓でライリンの発現が増強していることなどが報告され、ライリンに様々な生理的および病態的役割があることが推測されるが、不明な点が多い。

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) におけるライリンの役割についても同様に不明な点が多い。RA の病態には TNF- α などの炎症性サイトカインが関与していることが知られている。近年、TNF- α が上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 誘導転写因子 Snail を介して滑膜線維芽細胞を活性化すること、尿細管上皮細胞においてライリンが TNF- α 刺激により増加し、尿細管上皮細胞において、TNF- α 誘導性 EMT に必須であることが報告されている。しかしながら、

滑膜線維芽細胞におけるライリンの役割は EMT との関連を含め明らかでない。本研究では、滑膜線維芽細胞株におけるライリンの役割を明らかにするために、プロテオミクスを用いて TNF- α 存在下および非存在下で small interfering RNA (siRNA) によるライリンの発現抑制が発現蛋白質にどのような影響を与えるか網羅的に調べた。

方法・対象

滑膜線維芽細胞 (immortalized human synovial membrane fibroblasts, HSFs) は、ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンを含んだ Prigrow III 培地で 37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。ライリン特異的 siRNA (siL) を用いて、ライリン発現を抑制した。同様にコントロール siRNA (siC) を導入した HSFs を作製した。ライリンの発現抑制は mRNA の逆転写後リアルタイム PCR により評価した。その上で、無刺激時、および TNF- α 刺激時における、siL 群と siC 群との蛋白質プロファイルを比較した。具体的には、抽出した蛋白質を蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム (2D-DIGE) に供し、検出された蛋白質スポットを網羅的に定量した。無刺激時、TNF- α 刺激時で、siC 群に比べ siL 群で ± 1.3 倍以上増加もしくは減少する蛋白質スポットについて質量分析により蛋白質名を同定した。統計処理は、Student' s test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

リアルタイム PCR の結果、siL によりライリンの発現は約 7% まで抑制されていた。次に 2D-DIGE による蛋白質展開の結果では、1092 個の蛋白質スポットが検出された。その中で、無刺激時でも TNF- α 刺激時でも siL により約 1/5 の蛋白質スポットの強度が変化した (TNF- α 無刺激下 239 個、刺激下 201 個)。無刺激時で siL によってスポット強度が ± 1.3 倍以上変化した蛋白質スポットが 53 個、TNF- α 刺激時で siL によって

スポット強度が±1.3 倍以上変化した蛋白質スポット 34 個であった。それら、計 87 個を質量分析の対象とした。質量分析の結果、24 個の蛋白質スポットが同定された。その 24 個の蛋白質スポットうち 15 スポット (62.5%) で同定された蛋白質が、EMT との関連が報告されている蛋白質であった。

考察

15 スポットで同定された EMT 関連蛋白質のうち、10 個は EMT を促進するか EMT 時に増加するとの報告がある蛋白質であった。この 10 個の蛋白質のうち、7 個は siL により増加し、3 個は減少した。また、15 スポットで同定された EMT 関連蛋白質のうち残りの 5 個は EMT を抑制するか EMT 時に減少する蛋白質であった。この 5 個の蛋白質のうち、4 個は siL により減少し、1 個は増加した。それゆえ、ライリンの EMT に対する影響は現段階では決定できず、今後 EMT におけるライリンのより正確な役割を明らかにする必要がある。

また、同定蛋白質の 62.5%が EMT 関連蛋白質であったことから、RA 病態でライリンは EMT に関与する可能性が考えられる。RA 患者の滑膜繊維芽細胞は増殖能が高く、また軟骨や骨への浸潤能が高いことが知られている。近年、RA の滑膜繊維芽細胞の変化は、様々な EMT マーカーの上昇が伴うことが報告された。それ故、滑膜繊維芽細胞は上皮細胞ではないが、ライリンが関与し得る EMT 様現象が RA における滑膜線維芽細胞の性状変化に関与している可能性がある。

結論

ライリンは滑膜線維芽細胞において EMT 関連蛋白質の調節に深く関与していることが示唆された。今後、滑膜線維芽細胞におけるライリンの生理的および病態的意義を EMT の観点から調べる必要がある。