

(別紙様式2号)

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

津野 宏隆

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：

Effects of Methotrexate and Salazosulfapyridine on Protein Profiles of Exosomes Derived from a Human Synovial Sarcoma Cell Line of SW982

(滑膜肉腫細胞株 SW982 由来エキソソームの蛋白質プロファイルに対する、メトトレキサートとサラゾスルファピリジンの効果の検討)

共著者：

Naoya Suematsu, Toshiyuki Sato, Mitsumi Arito, Toshihiro Matsui, Nobuko Iizuka, Kazuki Omoteyama, Kazuki Okamoto, Shigeto Tohma, Manae S. Kurokawa, Tomohiro Kato

緒言

近年、直径 30-100nm の細胞外膜小胞 (エキソソーム) が持つ様々な免疫調節機能が注目されている。関節リウマチ (RA) は、慢性の多発関節炎を来す原因不明の自己免疫疾患であり、RA におけるエキソソームの病態的意義は不明であるが、これまでに、RA 患者の関節液中のエキソソームには TNF- $\alpha$  やシトルリン化蛋白が存在するという報告や、IL-1 $\beta$  で刺激した滑膜細胞から放出されたエキソソームが軟骨細胞における MMP-13 の発現を増加させるという報告があることから、RA の病態にエキソソームが少なからず関与していると思われる。しかし、それ以上

に詳細な報告はほとんどなく、さらに抗リウマチ薬がエクソソームへ及ぼす影響については、我々の知る限り報告がない。

今回我々は、RA の病態へのエクソソームの関与や、エクソソームを介した抗リウマチ薬の未知の作用機序について明らかにすることを目的として、抗リウマチ薬や炎症性サイトカインを滑膜肉腫細胞株 SW982 に添加し、それによるエクソソーム蛋白質のプロファイルの変化をプロテオミクスの手法を用いて解析した。

#### 方法・対象

RA 滑膜細胞と類似した性質を持ち、その代替として研究にしばしば用いられる滑膜肉腫細胞株 SW982 を使用した。添加薬剤としては、代表的な抗リウマチ薬であるサラゾスルファピリジン (SASP)、メトトレキサート (MTX) 及び炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$  を用いた。薬剤等の添加のパターンは、SASP、MTX、SASP+MTX、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ +SASP、IL-1 $\beta$ +MTX、IL-1 $\beta$ +SASP+MTX、及び非添加の 8 通りである。薬剤等の添加 48 時間後に培養上清及び細胞を回収し、培養上清にエクソソーム回収用試薬である Exoquick® を加え、SW982 細胞から培養上清中に分泌されたエクソソームを回収した。回収したエクソソーム及び細胞を溶解し、蛍光ディフアレンシャル二次元電気泳動法 (蛍光 2D-DIGE) に供し、蛋白質を分離した。薬剤等の添加に伴い発現量が有意に変化したエクソソーム中の蛋白質スポットを質量分析法に供し、蛋白質の同定を行った。統計は t 検定を用いた。

#### 結果

エクソソーム溶解液を 2D-DIGE に供した結果、計 294 個の蛋白質スポットが検出された。薬剤非添加群との比較で、SASP 群で 58 個、MTX 群で 44 個、SASP+MTX 群で 42 個の蛋白質スポットにおいて、蛍光強度の有意な変化を認めた ( $p < 0.05$ )。また、IL-1 $\beta$  群では非添加群と比べて、

62 個の蛋白質スポットで蛍光強度の有意な変化を認め ( $p < 0.05$ )、そのうちの 58 個で 1.5 倍以上の蛍光強度差を認めた。その 58 個のうち、SASP、MTX を同時に添加した群 (IL-1 $\beta$  +SASP 群, IL-1 $\beta$  +MTX 群、IL-1 $\beta$  +SASP+MTX 群) では、それぞれ 4、6、16 個のスポットにおいて、IL-1 $\beta$  により起きる蛍光強度変化が有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ )。

SASP、MTX の添加により 2 倍以上の蛍光強度差がみられた 35 スポットおよび、IL-1 $\beta$  添加による変化が SASP と MTX の同時添加により抑制された 21 スポットについて、質量分析法で蛋白質の同定を試み、35 個中の 17 個、及び 21 個中の 14 個の蛋白質が同定された。同定された蛋白質は機能的に 3 つにグループ (①免疫機構に関わるもの、②酸化ストレスに関わるもの、③それ以外) に分けられ、①として、Ras-related protein Rab-7b、GTP-binding nuclear protein Ran、SH2 domain containing protein 1B、②として Cytoglobin、NAD(P)H dehydrogenase 1、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、Clusterin、Thioredoxin-interacting protein などの蛋白質が同定された。

また、細胞溶解液も 2D-DIGE に供し、SASP+MTX 群と非添加群を比較した。細胞全体の蛋白質を 2 次元電気泳動で分離した結果、計 994 個のスポットが検出された。SASP+MTX 添加により大きく蛍光強度が変化したエキソソーム蛋白質スポット 36 個と同じ位置にあるスポットを、上記の細胞全体の蛋白質 994 スポットの中から検索し、細胞蛋白質としての変化を検討した。その結果、SASP+MTX 投与によりエキソソーム中で有意な量的変化を認めた蛋白質でも、細胞中での発現量はほとんど変化していないことが判明した。

## 考察

本研究の結果、SW982 細胞から分泌されるエキソソームの構成蛋白質が、抗リウマチ薬や炎症性サイトカインの投与により変化すること、及び IL-1 $\beta$  による変化の一部が抗リウマチ薬の同時投与により抑制され

ることが示された。抗リウマチ薬の投与によりエクソソーム中で有意に変化した蛋白質について、細胞中での発現量にほとんど変化がみられなかったことから、エクソソーム中の蛋白質のプロファイルの変化は、単に親細胞中での発現量の変化に起因するものではなく、細胞中においてエクソソームが生成される機構（ESCRT machinery など）に SASP、MTX が影響した可能性が考えられた。

## 結論

今回同定された蛋白質は、機能的に①免疫機構に関わるもの、②酸化ストレスに関わるものが多く、それぞれ一例をあげると、前者として抗炎症作用をもつ Rab-7b の上昇、後者として酸化ストレスに対して防御的に働く Cytoglobin の上昇などが判明した。これらの蛋白質が実際に、エクソソームにより運搬され、標的細胞に取り込まれ、その機能を発揮するかは、今後の研究で明らかにすべき課題と考える。