

# 論文内容要旨

The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte.

(関節リウマチ由来滑膜繊維芽細胞のサバイビンスプライスバリエント 2B は、PDGF によって誘導され、細胞増殖を促進する。)

Scientific Reports, 2015, in press.

主指導教員：菅野 雅元教授

(基礎生命科学部門 免疫学)

副指導教員：杉山 英二教授

(病院 リウマチ膠原病学)

副指導教員：安井 弥教授

(基礎生命科学部門 分子病理学)

茂久田 翔

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

関節リウマチ(RA)は、全身の滑膜増殖と関節周囲の骨軟骨破壊を特徴する炎症性疾患である。リウマチ性関節炎において、滑膜線維芽細胞 (RA-FLS) は、増殖能、IL-6 産生能、及び、骨破壊のエフェクター細胞である破骨細胞を誘導する分子 RANKL の発現能などに優れ、RA 滑膜病変の中心的な役割を担うとされている。1990 年頃より、RA-FLS における Ras や c-Myc などの腫瘍性蛋白の発現が報告され、RA-FLS が有する腫瘍類似の性質が注目されてきた。2005 年になり、アポトーシスの抑制や細胞周期の調節に関わるサバイビン (腫瘍性蛋白の一つ) が RA 患者の血清中で検出されることが報告された。その後、651 名の早期 RA 患者を対象とした臨床試験において、関節破壊の独立した危険因子であることも報告され、サバイビンが RA の病態に重要な因子である可能性が疫学的に示された。

しかしながら、RA におけるサバイビンの発現、及び、その機能については未解明の部分が多い。例えば、サバイビンの発現臓器は関節滑膜であると考えられているが、加齢性病変である変形性関節炎 (OA) と RA を比較した場合、両者とも発現を認め、明らかな差が認められないという報告も複数存在する。

これまでの報告の検証の為、我々も RA について、血清を ELISA で、滑膜組織を免疫組織化学で、サバイビンの発現確認を行った。結果、血清では OA と比較し RA で高値であった。滑膜組織におけるサバイビンの発現は、滑膜線維芽細胞 (CD55 陽性細胞) に加え、血管内皮細胞にも発現を認め、RA と OA の両方で発現を認めた。RA よりも OA で発現レベルが高かったが、OA でもしばしば発現を認める為、特異性は低いと考えられた。

サバイビンは BIRC5 という遺伝子によってコードされる蛋白であるが、代替スプライシングの結果、1本の遺伝子から複数の成熟した mRNA が産生され、機能の異なる数種類の蛋白が発現することが報告されている。RA におけるサバイビン発現のバリエーション別の解析はこれまでに報告がなく、これを検討することで、より特異性の高いマーカーの開発や、治療標的の開発につながるのではないかと、我々は考えた。ヒトでは、野生型 (WT) を含む 5 種類以上のバリエーションが文献で報告されている。滑膜全組織の RNA を抽出し、RT-PCR を行うと、その内の 3 種類 (WT、2B、 $\Delta$  Ex3) が検出された。リアルタイム PCR で定量比較を行うと、WT 及び 2B では OA よりも RA で有意に発現レベルが高値であった。また、免疫組織化学でも検討を行った。結果、サバイビン 2B は滑膜表層の細胞、特に FLS (CD55 陽性細胞) に発現を認め、OA よりも RA で圧倒的に発現細胞が多かった。一方、 $\Delta$  Ex3 は主に血管内皮細胞に発現を認め、RA と OA の両方で発現を認めた。以上より、RA 滑膜におけるサバイビン 2B の発現解析は、バリエーションを区別しないサバイビン発現解析と比べ、より特異的なマーカーになりうると思われた。

これまでの結果から、RA 滑膜でのサバイビンの産生は FLS が主体と考えられた。そこで我々は、RA-FLS 初代培養実験を試みた。RA-FLS の培養を行いながら、サ

バイビンの発現確認を行うと、継代3代目付近でウェスタンブロットでの検出感度以下まで発現レベルが低下することが確認された。そこで、「FLSがサバイビン発現を維持する為には、何らかの外的刺激が必要である」という仮説を立て、発現を亢進させる因子を検索した。結果、rhPDGFによってRA-FLSのサバイビン(WT及び2B)発現が亢進することが確認された。

RA-FLSにおけるサバイビンの機能解析を行う為、rhPDGF刺激下にRNA interferenceを行い、検討を行った。その際、全BIRC5を抑制するRNAと、サバイビン2Bのみを特異的に抑制するRNAの2種類のsiRNAを用いた。評価項目として、生存細胞数、Ki-67陽性細胞比率、Annexin Vによるアポトーシス細胞比率(過酸化水素刺激下)を挙げた。結果、サバイビン2B特異的に抑制した場合のみ、生存細胞数の減少を認めた。また、サバイビン2Bの抑制はKi-67陽性細胞数の減少とアポトーシス細胞の増加を誘発した。さらに確認の目的で、RA-FLSにNucleofectionを用いた過剰発現を行い、サバイビン2Bの機能解析を行った。結果、サバイビン2Bの過剰発現により、生存細胞数の増加、Ki-67陽性細胞数の増加、アポトーシス細胞の減少を認めた。よって、サバイビン2BはRA-FLSの細胞増殖に重要な役割を担っていると考えられた。

さらに、サバイビン2Bが血清でもマーカーになりうるかをELISAで検討した。結果、RA患者の血清から高値のサバイビン2Bが検出された。また、RA患者をサバイビン2Bの高値群・低値群の2群に分けると、低値群と比較し、高値群でRAの疾患活動性指標が高値であった。サバイビン2Bは、血清での診断及び病勢把握のマーカーとなる可能性が示唆された。

以上より、サバイビン2Bは、血清・組織において、OAと比較しRAでより特異的なマーカー、及び、疾患活動性マーカーになる可能性を持ち、同時に同蛋白は、中心的なエフェクター細胞であるFLSの増殖を制御していることから、新規のRA治療標的となる可能性も有すると考えられた。