

## 多機能プロテアーゼによる抗体産生および自己免疫疾患制御機構の解明

西 英一郎

滋賀医科大学 薬理学講座

### 【研究の背景】

我々はメタプロテアーゼのナルディライジン(NRDC)を、増殖因子HB-EGFの細胞表面受容体として同定し(EMBO.J, 2001)、NRDCがHB-EGFやTNF $\alpha$ など様々な膜タンパク質の細胞外ドメイン切断を増強すること(JBC,2006、Nat. Neurosci. 2009 など)、さらに核内においては転写コレギュレーターとして適応熱産生、グルコース反応性インスリン分泌などを制御していることを報告した(Nat Commun. 2014, Diabetes 2016 など)。以上の結果はNRDCが細胞局在に応じた多機能性を有することを示した。一方我々はNRDCが関節リウマチ(RA)の病態生理において重要な働きを有すること、すなわち 1)マウスRAモデルにおいてNRDC欠損が関節炎発症を抑制したこと、2)変形性膝関節症患者(OA)患者と比較して、RA患者関節液中NRDC濃度は著明に上昇していることを示した(RMD Open 2017)。NRDC欠損による関節炎抑制は、1) CAIA(collagen antibody-induced arthritis :自己抗体起因)モデル、2) SKGマウスモデル(自己反応性T細胞起因)という発症プロセスが異なる二つのRAモデルで示されており、NRDCが多能的にRAの病態を制御している可能性が高い。

### 【目 的】

本研究においては、マクロファージおよびB細胞特異的NRDC欠損マウスを用いて、自己免疫性関節炎および免疫制御における細胞特異的なNRDCの役割を明らかにすることを目的とする。

### 【方 法】

- 1) マクロファージ特異的NRDC欠損マウス(M-CKO)の作製および表現型解析:
  - 1)-1 *Nrdc* floxed マウスと *LysM Cre* マウスの交配にて M-CKO マウスを作製し、CAIA モデルにて関節炎を評価。
  - 1)-2 *Nrdc* floxed および M-CKO マウスから骨髄由来マクロファージを単離し、リポポリサッカライド(LPS)刺激によるTNF $\alpha$ 発現及び分泌を検討。
  - 1)-3 *Nrdc* floxed および M-CKO マウスに免疫複合体(OVA+anti-OVA antibody)を腹腔投与し、腹腔マクロファージを回収し、TNF $\alpha$ 発現及び分泌を検討(Reverse passive Arthus reaction peritonitis model)。
- 2) B細胞特異的NRDC欠損マウス(B-CKO)の作製および表現型解析:
  - 2)-1 *Nrdc* floxed マウスと *MB-1 Cre* マウスの交配にて B-CKO マウスを作製し、抗体産生能を評価。
  - 2)-2 *Nrdc* floxed マウスと B-CKO マウスにおいて、骨髄におけるB細胞分化過程、末梢B細胞数などを検討。
  - 2)-3 *Nrdc* floxed マウスと B-CKO マウス由来脾細胞からB細胞分画を分離し、細胞増殖・周期、形質細胞への分化効率などを評価。

## 【結 果】

- 1) マクロファージ特異的 NRDC 欠損マウス(M-CKO)の作製および表現型解析:  
M-CKO を作製して CAIA モデルで検討したところ、対照マウスと比較して関節炎発症は遅延し、その程度も軽度であった。M-CKO マウスおよび対照マウスから骨髄由来マクロファージを単離して検討したところ、LPS 刺激による TNF- $\alpha$  の分泌は M-CKO マウス由来マクロファージで有意に低下していた。さらに免疫複合体投与による腹膜炎モデルにおいて、M-CKO マウス腹腔マクロファージからの TNF- $\alpha$  の分泌は低下していた。以上から、マクロファージに発現する NRDC が TNF- $\alpha$  分泌の調節を介して自己免疫性関節炎を制御していることが示唆された。
- 2) B 細胞特異的 NRDC 欠損マウス(B-CKO)の作製および表現型解析:  
予備の結果では、B-CKO マウスにおいて抗体産生能が低下している可能性が示唆された。一方骨髄における B 細胞分化には明らかな異常を認めなかった。*In vitro* における形質細胞への分化実験(LPS 刺激)は、NRDC 欠損により形質細胞への分化が阻害される可能性を示唆した。

## 【考 察】

本研究で得られたデータは、NRDCが抗体産生における新たな鍵分子である可能性を示唆している。本研究をさらに発展させることで、自己免疫疾患発症における抗体産生の意義を新たな切り口から検討できる。一方NRDCが抗原プロセッシング酵素のひとつであるという可能性が他のグループから示唆されている(Nat Immunol 2011)が、*in vivo*での検証はされていない。我々は現在、非活性型変異体ノックインマウスを作製しており、このマウスを用いてNRDCのプロテアーゼ活性の抗原提示における役割を明らかにしたい。我々のこれまでのデータは、NRDCのプロテアーゼ活性が、細胞外作用(シェディング増強)には必要ないが、核内作用(転写調節)には必要であることが示唆されている(JBC 2006, Nat Commun 2014, Diabetes 2016)。ペプチダーゼ機能が個体レベルの炎症抵抗性とリンクすることが明らかになれば、NRDCをターゲットとした治療薬開発へとスムーズに繋がる可能性がある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

NRDC に対する siRNA を関節腔に注入することで関節炎レベルが低下したことから、NRDC 阻害の臨床的有用性が示唆された。一方 OA 患者と比較して、RA 患者関節液中 NRDC 濃度が上昇していたこと(RMD Open, 2017)から、NRDC 測定が鑑別診断に役立つ可能性が示された。我々はベッドサイドで迅速に NRDC を半定量できるキット(point-of-care testing)を開発しており、新たな診断薬として役立てたい。

## 【参考・引用文献】

- 1) Fujii T, \*[Nishi E](#), \*Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Okabe N, Ohno M, Nishi K, Morita Yus, Morita Yug, Azukizawa M, Okahata A, Tomizawa T, Kimura T, and Matsuda S. Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of TNF- $\alpha$  secretion *RMD Open* 3: e000436, 2017
- 2) Morita Y, Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Saijo S, Matsuda S, Kita T, Kimura T and \*[Nishi E](#) Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression *Sci Rep.* 7: 14801, 2017
- 3) Kanda K, Sakamoto J, Matsumoto Y, Ikuta K, Goto N, Morita Y, Ohno M, Nishi K, Eto K, Kimura Y, Nakanishi Y, Ikegami K, Yoshikawa T, Fukuda A, Kawada K, Sakai Y, Ito A, Yoshida M, Kimura T, Chiba T, \*[Nishi E](#) and \*Seno H Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation *JCI Insight* 2018; 3(8): e91316
- 4) Yoh T, \*Hatano E, Kasai Y, Fuji H, Nishi K, Toriguchi K, Sueoka H, Ohno M, Seo S, Iwaisako K, Taura K, Yamaguchi R, Kurokawa M, Fujimoto J, Kimura T, Uemoto S, and \*[Nishi E](#). Serum nardilysin, a surrogate marker for epithelial-

mesenchymal transition, predicts prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical resection *Clin Cancer Res* 2019; 25:619-628. (Featured in Highlights of This Issue)