

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08122

研究課題名(和文)細胞外pHの酸性化がLPA受容体を介した関節リウマチ病態形成を促進するしくみ

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism by which extracellular acidification promotes LPA-induced inflammatory responses in rheumatoid arthritis synovial cells.

研究代表者

野地 裕美 (Nochi, Hiromi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：30183552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜細胞が異常に増殖・肥厚した関節リウマチ(RA)関節内では、関節滑液のpHが低下することが知られている。本研究では、炎症によって生じる局所的な細胞外微小環境の変化に着目し、細胞外pHの酸性化が誘発する炎症応答を調べた。その結果、細胞外環境の酸性化は、RA滑膜細胞(RASC)に発現するプロトン感知性受容体OGR1を介してCOX-2やADAMTS-4の発現を誘発すること、この応答はLPA存在下で相乗的に増大することを見出した。関節滑液のアシドーシスは、炎症性メディエーターによる炎症応答を増幅し、RAの病態形成において重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： In RA, the proliferation of synovial cells is abnormally augmented and the pH of synovial fluid from RA patients is lower than that from healthy individuals. Therefore, we hypothesized that local acidification in the intra-articular cavity affects inflammatory responses. The results revealed that an acidic extracellular pH induced COX-2 and ADAMTS-4 expressions through G protein-coupled pH-sensing receptor OGR1 in RA synovial cells from RA patients. Furthermore, the acidic extracellular pH synergistically enhanced LPA-induced COX-2 and ADAMTS-4 expressions. The results suggest that the acidification of synovial fluid is involved in exacerbation of the RA pathology by amplifying the inflammatory mediator-induced inflammatory response.

研究分野：細胞生物学

キーワード：関節リウマチ 滑膜細胞 プロトン感知性受容体 リゾホスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)では、関節腔内で炎症が惹起されると、炎症細胞から放出される炎症性サイトカインや種々のケミカルメディエーターによって刺激を受けた滑膜細胞が著しく増殖して肥厚し、パンヌスを形成すると共に、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)が誘導され、生じた PGE₂ などが炎症を亢進する。さらに、破骨細胞の活性化やマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を促して関節破壊を引き起こす。RA の原因は不明であるが、様々な因子が相互に作用して炎症の増幅と持続化に関与している。

リゾホスファチジン酸(LPA)は、LPA 特異的な G タンパク質共役型受容体(GPCR)を介して多彩な細胞機能を調節する重要な細胞外シグナル分子である。LPA は血管新生に深く関与しており、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の機能に及ぼす影響については多くの知見が蓄積されている。したがって、滑膜組織に著しい血管新生が認められる関節リウマチの病態形成にも LPA が深く関わっていることが予想される。我々は、RA の病態形成における LPA の役割を明らかにする目的で、RA 患者の滑膜細胞(RASC)の応答を種々の炎症性サイトカインや RA 関節滑液を用いて解析し、RA 患者の関節滑液に存在する LPA は、LPA 受容体を介して RASC の COX-2 の発現を誘導し、PGE₂ の生成量を増加させること、炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) の刺激で誘導される COX-2 発現や PGE₂ 生成反応は、LPA 共存下で相乗的に増大することを明らかにしており、LPA が RA 関節炎の発症と病態形成に密接に関与していると考えている。さらに、炎症部位では細胞外 pH が局所的に酸性化されてことが知られている。局所的なアシドーシスが、骨芽細胞や血管内皮細胞の細胞膜上に存在するプロトン感知性の GPCR を介して、COX-2 の発現とそれに続くプロスタグランジン類の産生を誘発することも知られている。したがって、関節滑液 pH の低下が関節滑液に含まれる LPA と協同して炎症反応

を相乗的に増強し、持続化させ、病態の増悪を促す可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外環境の酸性化が、リゾリン脂質による細胞応答を増幅・持続させて、RA の病態形成を促進するしくみを明らかにする目的で、RA 患者の関節滑膜細胞(RASC)を用いて、細胞膜上に存在するプロトン感知性受容体(OGR1)を介する細胞応答を細胞内シグナリングのレベルで解析した。また、RA モデル動物における関節炎の病態形成を magnetic resonance imaging (MRI) 装置を用いて経時的に解析することも目指した。

3. 研究の方法

関節リウマチ (RA) と診断された患者の人工関節置換術施行時に、膝関節滑膜組織を採取後コラゲナーゼ処理して滑膜細胞を分離した。コンフルエントの状態に増殖した 4 - 10 継代時のヒト RA 滑膜細胞 (RASC : rheumatoid arthritis synovial cell) を実験に用いた。なお、患者さんからはインフォームドコンセントを得た上で五輪橋整形外科病院の倫理委員会で承認を得て提供していただいた。

ヒト正常滑膜細胞は市販品 (ScienCell 社) を購入して用いた。

siRNA は Thermo Fisher Scientific 社の ON-TARGET plus siRNA Reagent を使用した。種々の mRNA の発現量は、細胞から抽出した RNA の cDNA を合成し、これを鋳型としてサイバークリーン法を用いて行った。標的遺伝子の発現量は、ハウスキープング遺伝子である GAPDH の発現量に対する相対値として算出した。

種々の細胞内タンパク質やリン酸化タンパク質は、特異抗体を用いるウエスタンブロット法で検出した。標的タンパク質の発現量は、アクチンの発現量に対する相対値として算出した。

PGE₂ は Cayman 社、ADAMTS-4 は R&D 社の EIA kit を用いて定量した。

抗コラーゲン抗体(Chondrex 社)を尾静脈投与した3日後にLPSを腹腔内投与して抗コラーゲン抗体関節炎(CAIA)を発症させたBalb/c マウスを、1.5 テスラ永久磁石を装備した小型動物専用のMRI装置で観察し、T2強調画像(T2WI)、T1強調画像(T1WI)画像とGdを用いた造影MRIの撮像条件を検討した。

4. 研究成果

RASCの炎症応答に関するプロトン感知性受容体の解析

我々は、RASCの細胞外pHが低下すると細胞膜上のプロトン感知性受容体(OGR1)を介する刺激でCOX-2の発現を誘導し、PGE₂の生成量を増加させることを見出している。そこで、関節軟骨の破壊に関するマトリックスメタロプロテアーゼの発現に及ぼす影響を検討したところ、細胞外pHの酸性化はアグリカンを分解するADAMTS-4(アグリカナーゼ1)の発現を顕著に増大させたが、関節破壊に重要な役割を果たすMMP-3の発現には影響を示さなかった。興味深いことに、pH6.2の酸性環境下で誘発するADAMTS-4の発現誘導はIL-1よりも強く認められ、細胞外環境の酸性化はアグリカンの分解に深く関与していると考えられた(図1)。

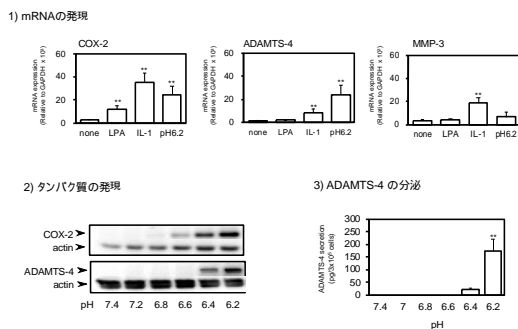


図1

RASC上に発現するプロトン感知性GPCRとしては、OGR1 mRNAが最も多く検出され($20.95 \times 10^{-3} \pm 9.85 \times 10^{-3}/\text{GAPDH mRNA}$), GPR4 mRNA ($0.0058 \times 10^{-3} \pm$

$0.0029 \times 10^{-3}/\text{GAPDH mRNA}$) および TDGA8 mRNA ($0.0011 \times 10^{-3} \pm 0.0011 \times 10^{-3}/\text{GAPDH mRNA}$) の発現量はごく僅かであった。pH6.2で誘発するCOX-2およびADAMTS-4の発現誘導は、OGR1のノックダウン、あるいはGq阻害剤のYM254890(YM)によって強く抑制されたことから、プロトンが誘発するCOX-2およびADAMTS-4の発現は、Gqが共役するOGRを介して生じることが明らかになった(図2)。

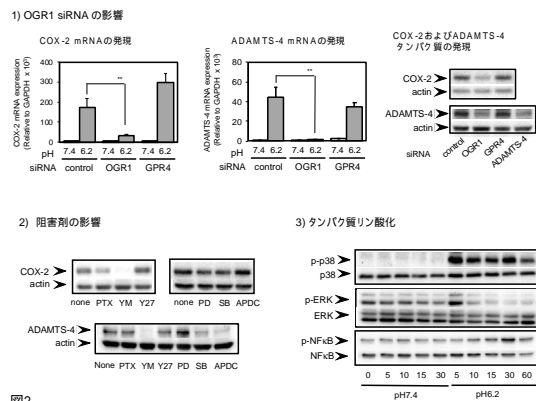


図2

OGR1は、正常人由来の線維芽細胞様滑膜細胞(NSC)および正常人由来の線維芽細胞(HDF)と比べてRASC(RA1~RA8)およびOA患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞(OASC: OA1, OA2)において高発現する。pH6.2の酸性環境下で誘発されるCOX-2 mRNAの発現誘導は、OGR1を高発現しているRASCおよびOASCで強く亢進したが、低発現の正常細胞においては有意な増加は認められなかった。一方、非常に興味深いことに細胞外pHの酸性化は、用いたすべてのRASCのADAMTS-4 mRNAの発現量を著しく増大させたが、OASCと正常細胞ではADAMTS-4発現が誘導されることはなかった(図3)。このようなOGR1発現量や酸性pHによるADAMTS-4発現誘導の相違がRAの病態形成のどの過程で生じているかについては、RAの病態形成を考える上でも興味深く、さらに詳細に解析する必要があると考

えている。

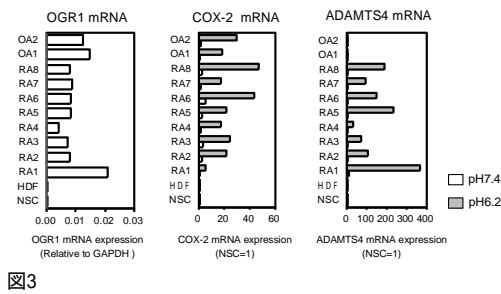


図3

細胞外 pH の酸性化が COX-2 や ADAMTS-4 の発現を誘導する細胞内シグナリングの解析

酸性環境下で RASC をインキュベートすると、p38MAPK の強いリン酸化と ERK および NFκB の弱いリン酸化が認められた。さらに、これらキナーゼの阻害剤の影響を検討したところ、プロトンで誘発される COX-2 の発現誘導は、ERK1/2 を特異的に阻害剤する PD98059(PD)、および p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580(SB)を共存させると部分的に抑制されたが、NFκB の特異的阻害剤である APDC では影響を受けなかった。一方、ADAMTS-4 の発現誘導は、SB および APDC により強く抑制された(図 2)。以上のことから、COX-2 の発現誘導は、OGR1 Gq p38MAPK および ERK の経路を介して活性化されるが、ADAMTS-4 の発現誘導は、OGR1 Gq p38MAPK および NFκB の経路を介した異なった経路で活性化されることが認められた。

細胞外 pH の酸性化が LPA 受容体を介した細胞応答に及ぼす影響

酸性環境下において RASC を LPA で刺激すると、LPA₂ を介して COX-2 の発現が持続的に増大し、生理的条件下で認められる LPA₁ を介した一過性の COX-2 の発現誘導とは異なった応答を示す。

1) 経時変化

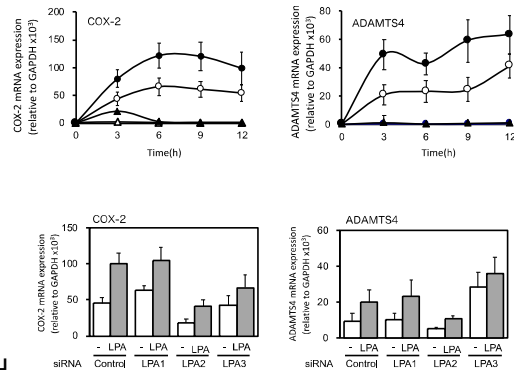


図4

生理的条件下で LPA 刺激しても ADAMTS-4 の発現誘導は認められないが、LPA は LPA₂ を介して酸性環境下で誘発する ADAMTS-4 の発現を相乗的に増大させた(図 4)。

RASC を pH6.2 の酸性環境下で 24 時間培養すると LPA₂ mRNA の発現量が増大することから、酸性環境下での LPA 刺激による COX-2 や ADAMTS-4 発現の相乗的な増大が LPA₂ の発現量の増大によって引き起こされる可能性を示唆しており、その点についてさらに解析を行っている。

MRI を用いた滑膜炎の検出

早期 RA においては、滑膜細胞の増殖、間質浮腫などの炎症がすでに生じているが、このような時期の関節組織における微細な変化をレントゲンの確認することは難しい。しかし、MRI 装置を用いるならば、早期 RA における微細な病態変化を有効に評価できると考えられており、診断に利用されている。特に、増殖滑膜には血流が多いことから、T2 強調画像(T2WI)による MRI 撮像とガドリニウム(Gd)による造影 MRI が有用である。

抗コラーゲン抗体投与 3 日後に LPS を投与すると抗コラーゲン抗体関節炎(CAIA)が発症し、LPS 投与 4 日後から後肢に強い腫れが認められた。この CAIA マウスと正常マウスを小型動物専用の MRI 装置で観察し、T2W1 画像と Gd を用いた造影 MRI の撮像条件を検討した。CAIA を発症した後肢に強い腫れが認められるマウスでは正常マウスに比べて、浮

腫による T2W1 の高信号、血管透過性亢進による造影 MRI の高信号が認められた。しかし、炎症の初期に認められる微細な変化を検出するには至っておらず、さらに解析を進める必要がある。

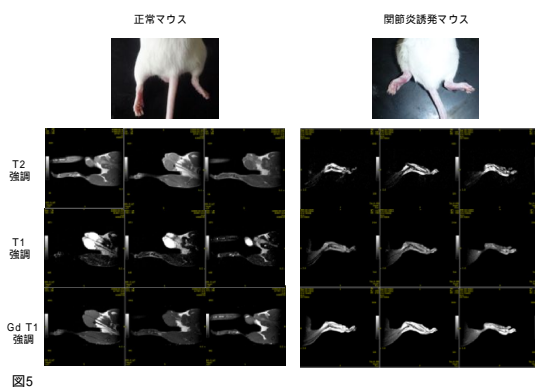


図5

野地裕美 (Nochi Hiromi)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
研究者番号：30183552

(2)研究分担者

伊藤康一 (Itoh Kouichi)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
研究者番号：30291149

(3)研究協力者

田元浩一 (Tamoto Koichi)

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)

Itoh, K., Ishihara, Y., Komori, R., Nochi, H., Taniguchi, R., Chiba, Y., Masaki Ueno, Takata-Tsuji, F., Dohgu, S., Kataoka Y. Levetiracetam treatment influences blood-brain barrier failure associated with angiogenesis and inflammatory responses in the acute phase of epileptogenesis in post-status epilepticus mice. **Brain Research**, 1652, 1-13 (2016) (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

深田和寛、岡島史和、田元浩一、野地裕美「細胞外 pH の酸性化は関節リウマチ滑膜細胞の ADAMTS4 発現を誘導する」日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日(仙台)
竹内 一、大岡嘉治、野地裕美「食用油が変敗する条件の検討と変敗食用油が免疫系に与える影響の解析」第 13 回日本食品免疫学会、2017 年 11 月 9 日(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者