

令和元年6月26日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08567

研究課題名(和文) CD147シグナルを基盤とした関節リウマチの骨破壊分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis based on CD147

研究代表者

西奥 剛 (NISHIOKU, TSUYOSHI)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90435115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチにおいて発現増加するCD147が、破骨細胞のポドソームを介したアクチンリング形成を亢進させるという仮説について検討を行った。破骨細胞の分化において、CD147の発現は有意に増加し、細胞膜に局在していた。破骨細胞においてポドソームマーカーの発現とアクチンリングの形成を確認し、CD147はアクチンリングと共局在していた。アクチンリングによるシーリングに関与しているMT1-MMPの発現について検討し、破骨細胞において発現増加が見られた。しかし、CD147とMT1-MMPとの相互作用は確認できなかった。破骨細胞において発現増加するCD147はポドソームの形成に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物学的製剤はその優れた有効性の反面、安全性や投与経路の問題ならびに高額な治療費のため寛解導入率は3割にすぎない。また、薬物治療の効果が十分に得られない患者も存在しており、経口投与可能かつ安価で安全性の高い新規抗リウマチ薬の開発が重要課題となっている。破骨細胞のポドソーム形成におけるCD147の分子機構をより詳細に解明し、CD147を標的とした新規抗リウマチ薬の創薬基盤の提示、関節リウマチの治療法構築の活路を開くことが可能である。本研究成果ならびに研究の継続による生物学的製剤と同等の有効性かつ安価な新規抗リウマチ薬の開発は、骨破壊の抑制を可能とし、患者のADL障害を防御することが可能である。

研究成果の概要(英文)：We examined the hypothesis that CD147, which is upregulated in rheumatoid arthritis, enhances actin ring formation via podosome. In osteoclastogenesis, CD147 expression was significantly increased and localized to the cell membrane. We confirmed podosome marker expression and actin ring formation in osteoclasts, and CD147 co-localized with actin ring. We examined the expression of MT1-MMP, which is involved in the sealing by actin ring, and increased expression was observed in osteoclasts. However, the interaction between CD147 and MT1-MMP could not be confirmed. It has been shown that CD147, which is upregulated in osteoclasts, may be involved in podosome formation.

研究分野：骨代謝

キーワード：CD147 ポドソーム 破骨細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは関節炎を病変の主座とし、骨破壊を必発する自己免疫疾患である。関節リウマチの治療において、生物学的製剤による分子標的治療の導入は、疾患活動性と関節破壊の制御を可能とし、治療目標を「痛みの制御」から「寛解導入」へとシフトさせ、関節リウマチ治療に新展開をもたらした。しかし、生物学的製剤はその優れた有効性の反面、安全性や投与経路の問題ならびに高額な治療費のため寛解導入率は3割にすぎない。また、薬物治療の効果が十分に得られない患者も存在しており、経口投与可能かつ安価で安全性の高い新規抗リウマチ薬の開発が重要課題となっている。

関節リウマチにおいて、関節炎症の持続は早期より小関節の骨破壊をきたし、荷重関節などの大関節まで及ぶと、ADLに著しい障害をきたすようになる。骨破壊において主役をなす破骨細胞は、単球/マクロファージ系前駆細胞を由来とし、細胞融合を繰り返して分化した多核巨細胞である。破骨細胞は細胞融合により、波状縁やアクチンリングといった骨吸収能を発揮するために必要な構造を形成する。アクチンリングは、骨との接着面に無数のポドソームをドーナツ状に配置したシーリングリング構造で、リングの内側に酸やプロテアーゼを濃縮する骨吸収に必須な構造である。ポドソームは浸潤突起のひとつで、その1つは小さいが、寄り集まることにより細胞融合やアクチンリングの形成を担っている。浸潤突起はアクチンをコアとし、アクチン重合に関わるタンパク質やチロシキナーゼ、接着分子やプロテアーゼなどが集積する複雑な細胞膜構造であり、がん細胞に形成され、細胞外基質分解活性によって、がんの浸潤・転移に関与している。破骨細胞に形成されるポドソームは浸潤突起の生理的なカウンターパートであるが、その形成および制御機構についての詳細は不明である。

CD147は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する1回膜貫通型の糖タンパク質である。その機能はマトリックスメタロプロテアーゼの発現誘導であり、がん細胞の浸潤・転移の大役を担っている。CD147は関節リウマチにおいても発現増加することが報告されており、また健常者と比較して関節リウマチ患者のマクロファージでCD147の発現が高いこと報告がされている。しかし、関節リウマチにおけるCD147の役割についてその詳細は不明である。最近、がん細胞においてCD147が膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1(MT1-MMP)の発現を誘導し、浸潤突起の形成と活性化に関与することが報告された。浸潤突起に局在するMT1-MMPは、細胞外基質の分解により基底膜や間質組織を破壊し、がん細胞の浸潤に関わっている。また、がんの骨転移部において、がん細胞と破骨細胞の融合が認められ、この細胞融合に破骨細胞のポドソームとがん細胞の浸潤突起が寄与していることが示された。しかし、破骨細胞のポドソームを介した細胞融合ならびにアクチンリング形成におけるCD147の役割は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、では、関節リウマチにおいて発現増加するCD147が、破骨細胞のポドソームを介した細胞融合ならびにアクチンリング形成を亢進させ、過剰な骨吸収を起こすという仮説について次の項目について検証する。

- (1) 破骨細胞におけるCD147の発現
- (2) 破骨細胞におけるポドソーム形成とポドソームマーカーとCD147の共局在
- (3) 破骨細胞におけるMT1-MMPの発現とCD147との相互作用

### 3. 研究の方法

#### (1) 破骨細胞の分化

C57/6Nマウスの大腿骨ならびに脛骨より骨髓細胞を採取し、M-CSF20ng/mLにより破骨細胞前駆細胞に分化させた。3日間培養後、破骨細胞前駆細胞を回収し、M-CSF10ng/mL、RANKL10ng/mLにより、破骨細胞に分化させた。培養2日目に培養液を交換し、3日間培養した。

#### (2) ウェスタンブロッティング

破骨細胞は、M-PERで可溶化し、試料溶液とした。試料溶液中のタンパク質は、SDSアクリルアミドゲル電気泳動後、PVDFメンブレンに転写後、ブロッキングを行い、1次抗体を4で一晚反応させた。1次抗体は抗CD147抗体、抗カテプシンK抗体、抗ATP6V0D2抗体、抗cortactin抗体、抗c-Src抗体、抗MT1-MMP抗体、抗β-actin抗体を用いた。1次抗体処理後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体を反応させECL法により可視化して高感度CCD画像解析システムにて、画像イメージを取り込み、ImageJにて解析した。

#### (3) 酒石酸抵抗性ホスファターゼ(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; TRAP)染色

破骨細胞は4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit (SIGMA-ALDRICH)を用いて染色を行った。TRAP染色は製品のプロトコールに従って

行った。

#### (4) 免疫染色

破骨細胞は4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、ブロッッキングを行い、ファロイジン Alexa-488 ならびに1次抗体を4℃で一晩反応させた。1次抗体は抗CD147抗体を用いた。1次抗体処理後、蛍光標識2次抗体を反応させ、DAPI含有包埋剤で包埋し共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。

#### (5) 免疫沈降

破骨細胞を培養後、Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降の抗体には、抗CD147抗体と抗MT1-MMP抗体を用いた。免疫沈降を行った試料は、ウェスタンブロッティングを行い解析した。

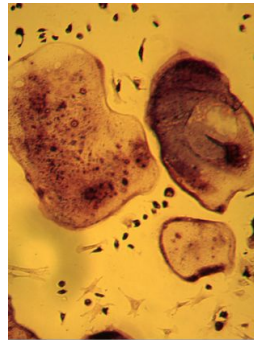


図1 TRAP染色

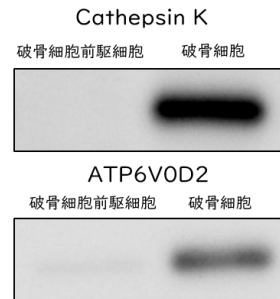
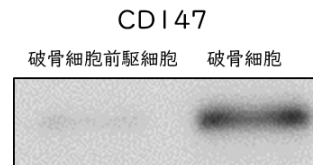


図2

### 4. 研究成果

#### (1) 破骨細胞におけるCD147の発現

破骨前駆細胞をM-CSFとRANKLの存在下で3日間培養し、破骨細胞へ分化させた。対照群は、破骨前駆細胞をM-CSFのみで3日間培養した。RANKL刺激群では、破骨細胞の形態的特徴である多核化した巨細胞が見られ、この細胞はTRAP陽性を示した(図1)。一方、RANKL未処理群では、多核化した巨細胞は見られず、TRAP陰性であった。さらに、破骨細胞の特異的マーカーであるカテプシンKとATP6V0D2の発現について解析を行った。カテプシンKならびにATP6V0D2は、RANKL刺激により強い発現が見られた(図2)。次にCD147の発現変化について解析を行った。CD147の発現はRANKL刺激により有意に増加した。さらに免疫染色によりCD147の局在について検討したところ、破骨細胞において、CD147は細胞膜に局在していた(図3)。



破骨細胞(緑:CD147)

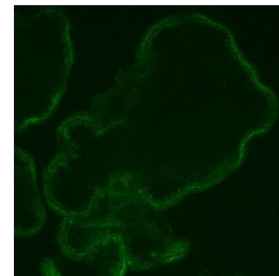


図3

#### (2) 破骨細胞におけるポドソーム形成とポドソームマーカーとCD147の共局在

破骨細胞の分化におけるポドソームの形成について、そのマーカーであるcortactinならびにc-Srcのウェスタンブロッティングを行った。cortactinならびにc-Srcは、破骨細胞にのみ発現が見られ、破骨細胞前駆細胞では発現は見られなかった(図4)。次に、ポドソームの形成を観察するため、アクチンリングをファロイジン Alexa-488を用い染色した。破骨細胞において、ファロイジンによるアクチンリングが染色されポドソームが観察された。破骨細胞前駆細胞では、アクチンリングは観察されなかった。そこで、破骨細胞におけるCD147の局在を、ファロイジン Alexa-488との二重染色を行い、ポドソームに存在しているか検討を行った。破骨細胞において、

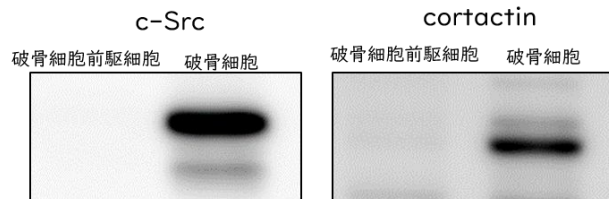


図4

CD147はアクチンと共局在しており、発現増加したCD147はポドソーム上にあることが示唆された(図5)。CortactinとCD147の共局在に関しては現在検討中である。

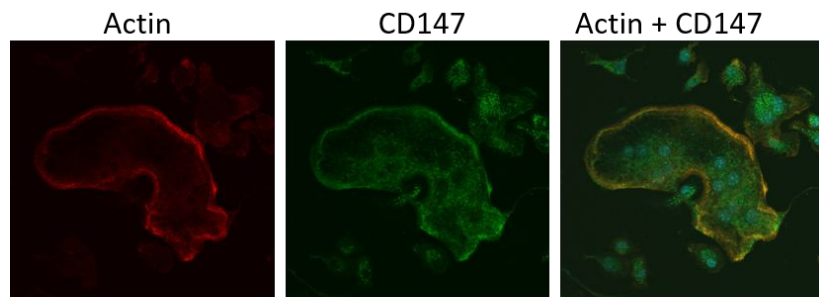


図5

#### (3) 破骨細胞におけるMT1-MMPの発現とCD147

## との相互作用

破骨細胞のアクチンリング形成による、骨表面へのシーリングにおいてMT1-MMPが関与している。破骨細胞の分化において、MT1-MMPの発現についてウエスタンブロッティングを行った。MT1-MMPは、破骨細胞にのみ発現が見られ、破骨細胞前駆細胞では発現は見られなかった。MT1-MMPの免疫染色ならびにMT1-MMPの活性については現在検討中である。次に破骨細胞における、CD147とMT1-MMPの相互作用について免疫沈降を行った。CD147とMT1-MMPのそれぞれの抗体で免疫沈降を行い、その後、CD147とMT1-MMPのウエスタンブロッティングを行った。結果より、CD147とMT1-MMPの相互作用は示されなかった。

以上、本研究の成果により、破骨細胞において発現増加するCD147はポドソームを介したアクチンリングの形成に関与している可能性が示唆された。

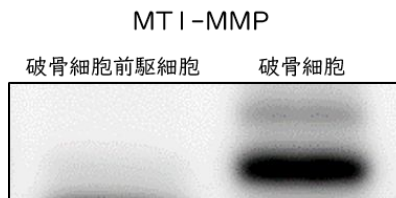


図6

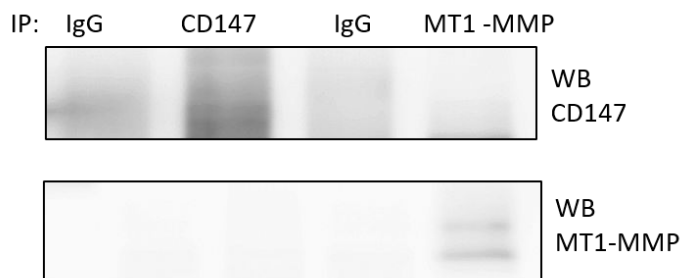


図7

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

「フマル酸ジメチルによる破骨細胞分化抑制機構の解析」

沖園竜弥、川本百実、坂井詠子、岡元邦彰、筑波隆幸、西奥剛

長崎国際大学・薬・薬理学、長崎大院・医歯薬・口腔病態薬理、岡山大院・医歯薬・歯科薬理学

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2018

福岡、2018年8月

「没食子酸エピガロカテキンによる破骨細胞分化抑制機構のメカニズム」

久保利樹、宇都拓洋、正山征洋、西奥剛

長崎国際大学・薬・薬理学、長崎国際大学・薬・薬品資源学

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2018

福岡、2018年8月

〔図書〕(計 1件)

桂林秀太郎、西奥剛 他、南江堂、新しい疾患薬理学、2018、43-86

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：筑波隆幸  
ローマ字氏名：TAKAYUKI TSUKUBA  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：30264055

研究分担者氏名：岡本邦彰  
ローマ字氏名：KUNIAKI OKAMOTO  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：医歯薬学総合研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：10311846

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。