

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2020

課題番号：16KK0196

研究課題名（和文）膜チャネルPannexin 3制御によるロコモ対策：抗炎症薬と新骨再生療法の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Anti-locomotive syndrome by regulating Pannexin 3 function(Fostering Joint International Research)

研究代表者

石河 真幸 (Ishikawa, Masaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60432936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 26ヶ月

研究成果の概要（和文）：移動機能低下状態、ロコモティブシンドロームで変形性膝関節症の新治療法、そして初期型症状の診断マーカーの確定が望まれている。膜タンパクであるPannexin 3は軟骨を含む硬組織特異発現を示し、細胞増殖抑制と分化促進を行う。また、細胞内外の小分子やイオンを透過させ、細胞内シグナリング活性を調節するが、変形性膝関節症におけるPannexin 3の機能は未だ明らかでない。この度の研究では、膝関節症モデルマウスにおいて関節軟骨にPannexin 3が過発現し、Pannexin 3 KO マウスでは関節炎が減少した。また、アポトーシス軟骨細胞はPannexin 3を介して細胞内ATPを放出しマクロファージの遊走および集積を促進し、炎症を惹起した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この度の研究ではギャップジャンクションのPannexin 3が変形性膝関節症治療の標的になりうることを見出した。ロコモティブシンドローム（ロコモ）対策は超高齢化社会においては必須であり、この度の発見はロコモの代表である膝関節炎の治療法および初期診断マーカー確定による初期予防法につながる可能性があり社会的意義が大きいものである。また、Pannexin 3がダメージを受けた局部にマクロファージを遊走促進するトリガーであることが見出され、Pannexin 3を介したATPシグナルがその中心的なものであることを示すことができた。この結果はギャップジャンクションの新たな機能を提示し、学術的にも意義の深い研究結果となった。

研究成果の概要（英文）：In our hyper aging society, we seek the new clinical therapy and diagnostics for the locomotive syndrome, especially, osteoarthritis (OA). Pannexin 3 (Pannx3), A member of gap junction family expresses in hard tissue including cartilage, inhibits cell proliferation and promotes differentiation. Pannx3 channel releases intracellular small molecules and ions which turn on the intracellular signaling pathways. However, in vivo functions of Pannx3 for OA are still unknown. Here, we found that Pannx3 expression was promoted in the knee joint of OA mouse model. Pannx3 KO mice suffered OA revealed less inflammation and degradation of articular cartilage. Further, apoptotic chondrocytes expressed Pannx3 higher and released intracellular ATP, resulting the migration and accumulation of macrophages.

研究分野：歯科保存学

キーワード：炎症 変形性膝関節炎 ギャップジャンクション ATP

1. 研究開始当初の背景

近年、運動器の障害のために移動機能の低下をきたした状態である「ロコモティブシンドローム（略称：ロコモ、和名：運動器症候群）」が注目を浴びている。ロコモの進行は介護率を上げる傾向がある。つまり、超高齢社会・日本の未来を見据えると、このロコモ対策は QOL の向上には欠かせないものである。

ロコモの代表である変形性膝関節症は加齢、肥満などで膝関節の機能が低下することで膝軟骨や半月板が変形断裂し、痛みを伴う、とても頻度の高い疾患であるが、治療法としては薬物投与、装具装着、適度な運動を行う保存療法と手術療法の 2 つの方法しかない。重度のケースでは手術を行い、人工関節移植などが行われる。また、現在の医療では、初期型の膝関節症を診断できるマーカーが存在しておらず、初期治療および予防が行えず悪化するケースが多い。

Gap junction protein family, pannexin のメンバーである pannexin 3 (Pannx3) は歯、軟骨および骨といった硬組織特異的な発現を示す。Pannx3 はそれぞれの組織の構成細胞である象牙芽細胞、軟骨細胞および骨芽細胞の増殖期から文化期への転換期に発現が誘導され、細胞増殖を抑制し、分化を促進する。膜タンパクである Pannx3 は 7 量体のチャンネル構造を作り、細胞内外の小分子やイオンを透過させる。Pannx3 チャンネルは細胞膜、細胞間および小胞体 (ER) 膜に存在し、それぞれ ATP 透過型ヘミチャンネル、Ca²⁺ 透過型ギャップジャンクション、そして、ER Ca²⁺ チャンネルの機能を有する。Pannx3 チャンネルの透過する ATP や Ca²⁺ はさまざまな細胞内外のシグナリング活性を行う。例えば、Pannx3 チャンネルが細胞内 ATP を細胞外に排出すると、細胞外の微小環境の ATP 濃度が上昇し、細胞外 ATP はオートクラインまたはパラクライン的に周辺の細胞に影響を与える。ATP は細胞のプリン受容体を刺激し、細胞内の PI3K/Akt シグナルを促進する。その結果、Pannx3 ER Ca²⁺ チャンネルの活性が起こり、細胞内の Ca²⁺ 濃度が上昇することで細胞内 Ca²⁺ シグナルが活性化され、細胞分化に必要な転写因子の発現促進を行う。さらに、細胞内 ATP 放出により減少した細胞内 ATP 濃度は Wnt シグナルを抑制することで細胞の増殖を止める。このように、Pannx3 を介した小分子の移動は細胞に劇的な変化をもたらす。

近年、細胞から放出された細胞外 ATP が炎症惹起に関与することがわかってきた。アポトーシス初期の細胞から放出される細胞内 ATP がマクロファージの遊走のきっかけとなり、マクロファージが瀕死の細胞を察知し細胞の除去を行うサイン (find-me シグナル) となることが知られてきた。このマクロファージの集合は炎症惹起の起点となる。Pannx、特に Pannx1 が find-me シグナルを生み出すことが報告され、Pannx を標的にした抗炎症作用機序の解明および臨床応用が注目されている。

そこで、私どもは変形性膝関節症における炎症機構に Pannx3 が関与すると予想した。また、Pannx3 は発生過程において初期に発現促進が認められることから変形性膝関節症の初期マーカーになるとも予想した。

2. 研究の目的

この度の研究目的は、Pannx3 の機能を応用した変形性膝関節症における抗炎症作用、初期診断技術の開発および創薬を目指すことである。

その中で、この度の研究機関で以下のことを検討する。

- (1) Pannx3 が変形性膝関節症において炎症に関与するか。
- (2) Pannx3 チャンネル機構抑制が変形性膝関節症の抗炎症になるか。Pannx3 チャンネルブロックの抗炎症効果の評価。
- (3) Pannx3 が変形性膝関節症の初期マーカーとして応用可能か。

3. 研究の方法

(1) 変形性膝関節症モデルマウスにおける Pannx3 発現パターンの解析

野生型、Pannx3 KO マウスを用いて膝関節靭帯切断により変形性膝関節症モデルマウスを作製し、膝関節における Pannx3 発現レベルおよび発現箇所を生化学的および組織学的解析により確認する。また、病態モデルの時系列 Pannx3 発現レベルを観測し、初期型の変形性膝関節症を評価できるかを検討する。

(2) 炎症状態における Pannx3 の機能解析

変形性膝関節症モデルマウスにおけるマクロファージの浸潤箇所と Pannx3 陽性軟骨細胞の局在パターンを観察する。また、Pannx3 の強制発現軟骨細胞および骨芽細胞株とマクロファージの細胞を in vitro で共培養し、マクロファージの遊走能を観察する。

濃度依存的に推移したため、Panz3 のチャンネルブロックにより find-me signal を抑制できることが示唆され、かつ Panx3 の ATP 放出機能を阻害することによりマクロファージの遊走、その結果としての炎症惹起を軽減できる可能性が予想された。残念なことに in vivo、関節炎モデルマウスに直接 Panx3 ブロッカーを作用させて関節炎の進行度合いを測るまでには至らず、今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Masaki, Williams Geneva, Forcinito Patricia, Ishikawa Momoko, Petrie Ryan J., Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Pannexin 3 ER Ca ²⁺ channel gating is regulated by phosphorylation at the Serine 68 residue in osteoblast differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55371-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhang Peipei, Ishikawa Masaki, Rhodes Craig, Doyle Andrew, Ikeuchi Tomoko, Nakamura Kuniyuki, Chiba Yuta, He Bing, Yamada Yoshihiko	4. 巻 139(4)
2. 論文標題 Pannexin-3 Deficiency Delays Skin Wound Healing in Mice due to Defects in Channel Functionality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 909-918
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2018.08.033	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaki Ishikawa
2. 発表標題 Pannexin 3 ER Ca ²⁺ channel gating is regulated by phosphorylation at Serine 68 residue to promote osteoblast differentiation.
3. 学会等名 Bones & Teeth Gordon Research conferences（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Skeletal Science Retreatでの優秀discussion賞
<http://jsbmr.umin.jp/ssr/report/index.html>
 骨代謝学会、1st Author
http://www.jsbmr.jp/1st_author/170_mishikawa.html
 From our sister journals,3月の注目論文
<http://thenode.biologists.com/sister-journals-march-2016/research>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	バンドゥーラ アビナッシュ (Bhandoola Avinash)	アメリカ国立衛生研究所・National Cancer Institute・CCR	当初の計画書に記載した受け入れ先、Dr.Yoshihiko Yamadaが健康を害し、他界された。その際に受け入れを許可くださり研究を共同で推進して下さった。

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
その他の研究協力者	山田 吉彦 (Yoshihiko Yamada)	National Institute of Health・NIDCR	当初の計画書に記載した受け入れ先であったが、健康を害し、2019年に他界された。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	National Institute of Health		
米国	NIDCR		