

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11020

研究課題名(和文) リウマチ滑膜細胞における高分子ヒアルロン酸のグリオスタチン抑制機序の解明

研究課題名(英文) Hyaluronate modulates gliostatin expression in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes

研究代表者

永谷 祐子 (Nagaya, Yuko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・高度医療教育研究センター教授

研究者番号：90291583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)治療は寛解をめざす時代になった。しかし炎症が鎮静化されたにも関わらず局所の滑膜炎の持続がみられる患者が存在する。申請者は、RAの発症にグリオスタチンが密接に関与していることを報告している。

変形性膝関節症(OA)、RAの局所治療法のひとつに高分子ヒアルロン酸(HMW-HA)の関節内注射が広く行なわれているが、滑膜細胞への作用機序はまだまだ明らかでない。本研究では培養滑膜細胞を用いて、HMW-HAがグリオスタチンあるいは血管内皮細胞増殖因子などの血管新生因子を制御する機序を明らかにし、滑膜炎や関節破壊を防止する効果的かつ安全なHMW-HAによる局所治療方法の意義を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

“関節リウマチの病態、関節破壊にグリオスタチンの過剰産生が関与する”という考え方は、申請者らの独創的な研究成果に基づくものである。生物学的製剤やメトトレキサートを使用しているにも関わらず、少数の関節腫脹が残存し、寛解目標に到達できない症例が存在することが、実臨床ではよくみられる。少数の関節腫脹に対して外科的に滑膜切除を行なうことも有用であるが、関節内注射療法の方がより侵襲性が低い。

炎症性サイトカインネットワークの下流に位置するグリオスタチン産生を高分子ヒアルロン酸により制御できれば、薬物治療不応性の関節炎に対しても、有効かつ安全な局所治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The treatment of rheumatoid arthritis (RA) is in the era of remission. However, some patients have sustained local synovitis despite systemic inflammation has subsided. We have reported that gliostatin is closely involved in the development of RA. Intra-articular injection of high molecular weight hyaluronic acid (HMW-HA) is widely used as a local treatment for osteoarthritis (OA) and RA, however the mechanism of action on synoviocytes is still unclear. In this study, we used cultured synoviocytes to clarify the mechanism by which HMW-HA controls angiogenic factors such as gliostatin and vascular endothelial cell growth factor, and to effectively and safely prevent synovitis and joint destruction. The significance of topical treatment with HMW-HA was found.

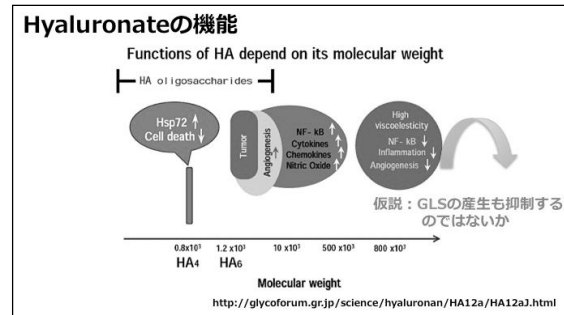
研究分野：整形外科

キーワード：関節リウマチ 滑膜細胞 グリオスタチン チミジンホシホリラーゼ ヒアルロン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性膝関節症(OA)、関節リウマチ(RA)の局所治療法のひとつに高分子ヒアルロン酸の関節内注射療法が広く行なわれている。ヒアルロン酸は分子量の違いによりその生理活性は大きく異なり、また細胞の種類によって作用が異なる。血管内皮細胞、軟骨細胞、マクロファージなどでは作用機序が明らかにされつつあるが、滑膜細胞に対する研究はいまだ少ない。本研究ではRAおよびOA由来の培養滑膜細胞を用いて、高分子ヒアルロン酸が血管新生因子を制御する機序を明らかにする。



(2) グリオスタチンはチミジンホスホリラーゼ活性をもち、*in vivo*、*in vitro* において血管新生作用を有している。申請者らは、RAの発症に、グリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。すなわち、RA患者の関節液中には高濃度にグリオスタチンが存在し、血清グリオスタチン濃度はRAの病勢も反映している。ウサギを用いた*in vivo*の実験系にて、グリオスタチンの関節内投与によりRA様の慢性滑膜炎と関節軟骨破壊が惹起されることを確かめた。またグリオスタチンは滑膜細胞に作用し、軟骨基質を破壊するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-3の発現を増強することを報告した。さらにグリオスタチンは、MMP-3のみならず、MMP-1、MMP-9、MMP-13も誘導し、これらの誘導がSp1阻害剤によって抑制されることを初めて見出した。

(3) 申請者らは、RA、OAにおける関節水腫の発症に滑膜組織でのアクアポリン-9の発現が関与していることを報告している。アクアポリン-9は炎症性サイトカインによって誘導され、関節炎の遷延化にも関与していることが推察される。興味深いことにアクアポリン-9の発現にも高分子ヒアルロン酸が影響を及ぼすことを予備実験で確認している。一連の研究によりOA、RAにおける関節水腫の発症機序解明にもつながる。以上より本研究では新たな高分子ヒアルロン酸の作用機序を明らかにできる。

### 2. 研究の目的

申請者らは、これまでの基礎研究成果に基づき、グリオスタチン遺伝子の発現から関節炎惹起活性の発現に至る諸相を阻害することにより、RAの関節破壊を制御する方法を確立することを最終目標としている。強力な生物学的製剤、分子標的薬を全身投与しても、まだ残存する腫脹関節に対する局所療法としての高分子ヒアルロン酸の関節内投与が、アップストリーム治療薬となることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組換え型グリオスタチンの精製(永谷祐子、浅井清文)

グリオスタチンcDNAを組み込んだ発現ベクター(pET-His)を*E. Coli*にトランスフェクトし、グリオスタチン組換え体を調製する。精製した組換え体はAffi-Prep Polymyxin Bにてlipopolysaccharideを除去する。

#### (2) 滑膜培養細胞の継代培養(野崎正浩、永谷祐子)

RA 患者の人工膝関節置換術の際に患者の承諾を得て採取した滑膜を培養し、3 から 6 代継代して *in vitro* の実験系に供する。

(3) 滑膜細胞におけるグリオスタチン産生に対する高分子ヒアルロン酸の影響 (永谷祐子)

RA 由来の滑膜培養細胞でのグリオスタチン産生は TNF- $\alpha$ によって誘導される。このグリオスタチンの発現が高分子ヒアルロン酸により抑制されることを real time PCR と申請者らが開発した ELISA を用いて定量的に検討する。

分子量約 300 万の高分子ヒアルロン酸を用いて、刺激時間、刺激濃度を变化させ、グリオスタチン産生を効率よく抑制する条件を検索する。

(4) 滑膜細胞における血管内皮細胞増殖因子(VEGF) 産生に対する高分子ヒアルロン酸の影響 (永谷祐子、野崎正浩)

RA 由来の滑膜培養細胞を用いて、VEGF 産生が高分子ヒアルロン酸により抑制されることを real time PCR および VEGF ELISA kit を用いて検討する。

(5) グリオスタチンの autocrine 作用に対する高分子ヒアルロン酸の影響 (野崎正浩、浅井清文)

滑膜培養細胞を用いた *in vitro* 実験系において、グリオスタチン 300ng/ml の濃度で刺激すると autocrine 作用を有し、また血管新生作用をもつ VEGF を誘導することを明らかにした。そこで精製したグリオスタチンを用いて、滑膜細胞を刺激して、高分子ヒアルロン酸によりこの autocrine 作用が抑制されることを検討する。またグリオスタチン刺激に対する VEGF の発現動態についても検討する。

#### 4 . 研究成果

(1) 高分子ヒアルロン酸の細胞毒性

本実験に先立ち分子量約 300 万の高分子ヒアルロン酸を 0-1600  $\mu\text{g/ml}$  にて滑膜培養細胞を 24 時間刺激し、細胞生存率を測定したが、いずれの濃度でも細胞生存率に変化は生じない。(Fig 1)

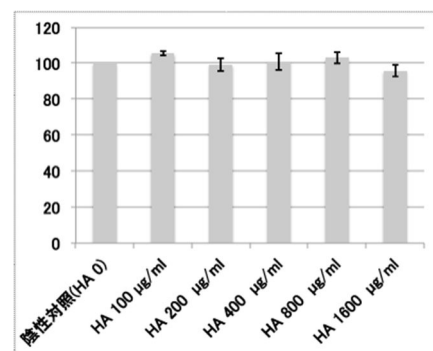


Fig. 1

(2) TNF- $\alpha$ 刺激によるグリオスタチン(GLS) 産生に対する高分子ヒアルロン酸の影響

滑膜細胞を 6 well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well 播種し、1 週間後に confluent になったことを確認し、高分子ヒアルロン酸 (HA) にて 1 時間前処置したのち、TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) で刺激した。RT-PCR 法にて GLS mRNA 発現を測定した。これまでの申請者らの報告どおり TNF- $\alpha$  単独では有意に グリオスタチンの発現が誘導された。24 時間後の GLS は高分子ヒアルロン酸処置により抑制された (Fig. 2)。

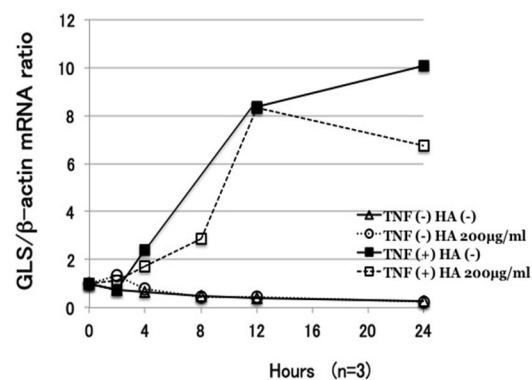


Fig.2

高分子ヒアルロン酸 (200  $\mu\text{g/ml}$ )の前処置のみでは GLS の発現の発現に影響は与えない。さらに高分子ヒアルロン酸濃度を 400  $\mu\text{g/ml}$  にするとグリオスタチン産生はさらに抑制される (Fig 3)。

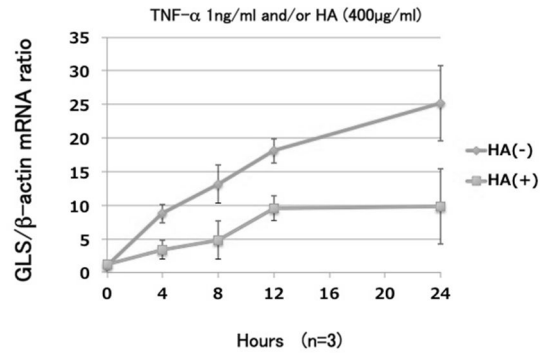


Fig 3

(3) 高分子ヒアルロン酸の前処置により TNF- $\alpha$ 刺激による VEGF 産生への影響

(2)と同様に滑膜細胞を 6 well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well 播種し、1 週間後に confluent になったことを確認し、高分子ヒアルロン酸 (HA)にて 1 時間前処置したのち、TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) で刺激した。RT-PCR 法にて VEGF mRNA 発現を測定した。TNF- $\alpha$ 刺激で有意にグリオスタチンの発現が誘導されたが、高分子ヒアルロン酸による抑制効果はみられなかった。

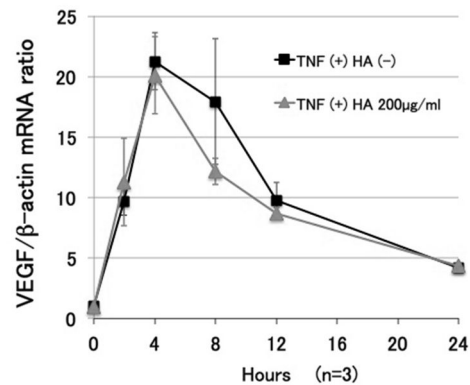


Fig. 4

(4) 高分子ヒアルロン酸によるアクアポリン(AQP)-9 の発現

関節水腫のある関節の滑膜組織において AQP-9 が強く発現している。関節水腫の治療に高分子ヒアルロン酸が用いられていることから、滑膜細胞における AQP-9 の発現を検討した。AQP-9 も TNF- $\alpha$ 刺激で誘導される。AQP-9 の発現は、高分子ヒアルロン酸 (HA) 400  $\mu\text{g/ml}$  にて抑制された。

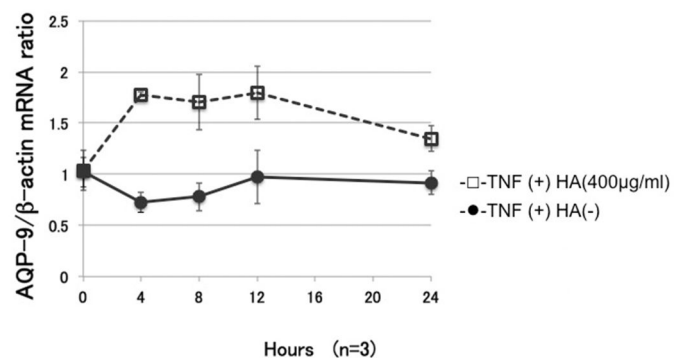


Fig.5

<引用文献>

- Moghaddam A, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1995;92:998-1002.
- Miyadera K, et al. Cancer Res 1995;55:1687-90
- Takeuchi M, Asai K, et al. Arthritis Rheum 1994
- Waguri Y, Asai K, et al. Br J Rheumatol 1997; 36: 315-321.
- Waguri-Nagaya Y, Asai K, et al. Rheumatol Int 2000 ;20: 13-19.
- Muro H, Waguri-Nagaya Y, et al. Rheumatol 1999;38: 1195 -1202.
- Tatematsu N, et al. Mod Rheumatol 2018;28:495-505
- Nagahara M, Waguri-Nagaya Y, et al. Rheumatol 2010;49 :898-906.
- Waguri Y, et al. Br J Rheumatol 1997; 36: 315-321
- Tanikawa T, et al. Rheumatol Int 2007;27:553-559.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Aiba Hisaki, Kobayashi Masaaki, Waguri-Nagaya Yuko, Goto Hideyuki, Mizutani Jun, Yamada Satoshi, Okamoto Hideki, Nozaki Masahiro, Mitsui Hiroto, Miwa Shinji, Kobayashi Makoto, Endo Kojiro, Saito Shiro, Goto Taeko, Otsuka Takanobu	4. 巻 19
2. 論文標題 Treatment of aneurysmal bone cysts using endoscopic curettage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-018-2176-6	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 -
1. 著者名 Aiba H, Kobayashi M, Waguri-Nagaya Y, Goto H, Mizutani J, Yamada S, Okamoto H, Nozaki M, Mitsui H, Miwa S, Kobayashi M, Endo K, Saito S, Goto T, Otsuka T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Treatment of simple bone cysts using endoscopic curettage: a case series analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Surg Res	6. 最初と最後の頁 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13018-018-0869-z	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 -
1. 著者名 Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Oguri Y, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T	4. 巻 36
2. 論文標題 The Janus kinase inhibitor tofacitinib inhibits TNF- $\alpha$ -induced gliostatin expression in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol	6. 最初と最後の頁 559-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Oguri Y, Ikuta K, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T	4. 巻 28
2. 論文標題 Mithramycin has inhibitory effects on gliostatin and matrix metalloproteinase expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 495-505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1350332	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Murase A, Nozaki M, Kobayashi M, Goto H, Yasuma S, Takenaga T, Nagaya Y, Mizutani J, Okamoto H, Iguchi H, Otsuka T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparison of quantitative evaluation between cutaneous and transosseous inertial sensors in anterior cruciate ligament deficient knee: A cadaveric study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 874-879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2017.04.010.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Oguri Y, Nozaki M, Kobayashi M, Otsuka T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Septic spondylodiscitis due to non-typhoidal Salmonella in a patient with rheumatoid arthritis treated with a TNF inhibitor and methotrexate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/24725625.2017.1417673	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tamura T, Aoyama M, Ukai S, Kakita H, Sobue K, Asai K.	4. 巻 1662
2. 論文標題 Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 65-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2017.02.023.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 3095-3102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.7016.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Inatani H, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Yamada S, Asai K, Otsuka T, Tsuchiya H.	4. 巻 475
2. 論文標題 Do Mesenchymal Stem Cells Derived From Atypical Lipomatous Tumors Have Greater Differentiation Potency Than Cells From Normal Adipose Tissues?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Orthop Relat Res	6. 最初と最後の頁 1693-1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11999-017-5259-z	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawaguchi Y, Okamoto H, Endo K, Iwata H, Jyo Y, Nozaki M, Tamechika S, Waguri-Nagaya Y, Murakami H.	4. 巻 99
2. 論文標題 Pyogenic tenosynovitis of the wrist due to Corynebacterium striatum in a patient with dermatomyositis. A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e18761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000018761.	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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Oguri Y, Kawaguchi Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y
2. 発表標題 Circulating gliostatin correlates with serological feature and response to IL-6 inhibitor therapy in patients with RA.
3. 学会等名 39th SICOT Orthopaedic World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi Y, Oguri Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y
2. 発表標題 Serum GLS levels were significantly decreased in patients with RA who were treated with tofacitinib.
3. 学会等名 39th SICOT Orthopaedic World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小栗雄介, 永谷祐子, 川口洋平, 立松尚衛, 小林正明, 浅井清文, 大塚隆信.
2. 発表標題 トシリズムブを使用した関節リウマチ患者血清中グリオスタチン濃度と疾患活動性の推移.
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T.
2. 発表標題 The inhibitory effects of tacrolimus on gliostatin production in RA synoviocytes.
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小栗雄介, 永谷祐子, 川口洋平, 小林正明, 立松尚衛, 浅井清文, 大塚隆信.
2. 発表標題 トシリズムブを使用した関節リウマチ患者血清ちゅうグリオスタチンの濃度と疾患活動性の推移
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sanshiro Yasuma, Masahiro Nozaki, Atsunori Murase, Masaaki Kobayashi, Hideyuki Goto, Yuko Nagaya, , Hiroataka Iguchi, Takanobu Otsuka,
2. 発表標題 Quantitative Evaluation of the Biomechanical Function of the Anterolateral structure using an inertial sensor
3. 学会等名 Orthopedic Research Society Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Joyo Y, Kawaguchi Y, Oguri Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y.
2. 発表標題 The JAK inhibitor (baricitinib) inhibits IFN -induced gliostatin expression in human fibroblast-like synoviocytes.
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi Y, Oguri Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y.
2. 発表標題 Novel anti-angiogenic effects of tofacitinib in fibroblast-like synoviocytes derived from patients with RA. Novel anti-angiogenic effects of tofacitinib in fibroblast-like synoviocytes derived from patients with RA
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	浅井 清文  (Asai Kiyofumi)  (70212462)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	野崎 正浩  (Nozaki Masahiro)  (00509309)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師   (23903)	