

令和 3 年 6 月 1 4 日現在

機関番号：3 2 6 2 2

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：1 9 K 1 7 8 9 6

研究課題名（和文）関節リウマチの骨破壊の病態とADAM-17の関連・新規薬剤の開発

研究課題名（英文）Pathogenesis of bone destruction in rheumatoid arthritis and its relation to ADAM-17 and development of novel drugs

研究代表者

古屋 秀和（Furuya, Hidekazu）

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：8 0 7 4 8 8 6 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチの骨組織および骨芽細胞にはADAM-17が高発現していることが示された。また、関節リウマチの骨芽細胞(RA-HOB)に発現するADAM-17はTNF- $\alpha$ による刺激実験を行うことにより、炎症の状況下でさらに発現が亢進することが分かった。またRA-HOBにおけるADAM-17の細胞内シグナルはNF- $\kappa$ Bを介することが示された。RA-HOBにおけるADAM-17の機能に関して、ADAM-17を抑制すると骨芽細胞の細胞増殖および遊走を抑制することが証明された。以上から関節リウマチの骨芽細胞にはADAM-17が高発現しており、骨芽細胞の遊走と増殖を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで関節リウマチの炎症病態におけるADAM-17の関与に関しては報告が散見されていたが、骨代謝との関連に関しては報告がない。今回の研究から関節リウマチの骨芽細胞にはADAM-17が高発現しており、骨芽細胞の遊走と増殖を促進するという結果が得られ、ADAM-17が関節リウマチにおける骨代謝に関与するという初めての報告となる。今後ADAM-17が関節リウマチの治療の標的となる可能性もあり、治療学の発展に寄与するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：ADAM-17 was shown to be highly expressed in bone tissue and osteoblasts of rheumatoid arthritis. The expression of ADAM-17 in RA osteoblasts (RA-HOB) was further enhanced under inflammatory conditions by stimulation with TNF- $\alpha$ . In addition, the intracellular signaling of ADAM-17 in RA-HOB was shown to be mediated by NF- $\kappa$ B. Regarding the function of ADAM-17 in RA-HOB, it was demonstrated that suppression of ADAM-17 inhibited osteoblast cell proliferation and migration. These results suggest that ADAM-17 is highly expressed in osteoblasts of rheumatoid arthritis and may promote migration and proliferation of osteoblasts.

研究分野：関節リウマチの病態の解明

キーワード：ADAM-17 関節リウマチ 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは関節滑膜を主座とする全身性、多発性の関節炎と、これに引き続いて起こる軟骨・骨破壊を主症状とする。高度の関節破壊が生じると、患者の日常生活活動や生活の質を著しく損ない、臨床上大きな問題となる。骨破壊の原因として種々のサイトカインや破骨細胞の活性化があるが、これらをターゲットにした薬剤の使用を行うも未だ骨破壊の進行を止められないケースも多く存在し、未知の骨破壊に関与する要因がある可能性が高い。

A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)は細胞膜表面に発現する蛋白のsheddingに関与し細胞表面における分子制御に重要な役割を担っている。ADAM familyは21種類が同定されている。ADAM-17はTNF- $\alpha$  Converting Enzyme(TACE)として、TNF- $\alpha$ を発現細胞の表面で切り離すことが分かっている。これまでADAM-17は関節リウマチの滑膜組織に高発現しており、疾患活動性とも相関し、さらには治療により低下することを報告されていて、関節リウマチの炎症病態に関与している可能性が高い。しかし、関節リウマチの骨破壊におけるADAM-17の関与に関しては不明である。

## 2. 研究の目的

関節リウマチの骨破壊の病態については、種々のプロテアーゼによる直接的な基質障害とともに、サイトカインにより分化誘導された破骨細胞が大きく関与していることが知られているが、その機序に関しては不明な点も多い。以上から本研究は関節リウマチの骨破壊における骨免疫とプロテアーゼの関与について、特にADAM-17との関連を同定することとした。

## 3. 研究の方法

1) 関節リウマチの骨組織を用いて、ADAM-17の発現を免疫染色法にて確認した。また、関節リウマチ患者の骨組織より骨芽細胞を分離培養し、それを用いて免疫染色法にてADAM-17の発現を確認した。

2) 骨芽細胞を分離培養し、無刺激のものとTNF- $\alpha$ で刺激したもので、培養液上清中のADAM-17をELISA法で、mRNAをqPCR法で、細胞内の蛋白質をWestern blot法で測定した。

3) TNF- $\alpha$ 刺激での骨芽細胞におけるADAM-17の産生経路を同定するためにchemical inhibitor assayを用いて検討した。Chemical inhibitorはSB、PP2、PD、LY、Erk、PDTCを用いて行った。これらのChemical inhibitorを添加した骨芽細胞の培養液上清中のADAM-17をELISA法にて測定した。

4) 骨芽細胞におけるADAM-17の発現を確認したのち、機能解析を行った。siRNA法を用いてADAM-17を抑制し、骨芽細胞の増殖能をみるためproliferation assayを行った。また骨芽細胞内のADAM-17が同細胞の遊走に関与するかどうか調べるためにchemotaxis assayを行った。

#### 4．研究成果

- 1) 免疫染色法では関節リウマチの骨組織および骨芽細胞に ADAM-17 の高発現が確認された。
- 2) TNF- $\alpha$  で刺激した細胞上清中の ADAM-17 は無刺激と比較し濃度依存的に高発現した。 ADAM-17 mRNA も同様に無刺激と比較し高発現を認めた。 WB 法では TNF- $\alpha$  の濃度依存的に細胞内に高発現を認めた。
- 3) NF- $\kappa$ B を抑制する事により、細胞内および細胞上清中の ADAM-17 は発現が低下した。
- 4) RA-HOB では ADAM-17 を抑制することによって細胞の増殖能が  $13 \pm 5\%$  低下した。 また、ADAM-17 を抑制することにより、RA-HOB の遊走も抑制された。

以上の実験に加え、ADAM-17 を抑制した際の単球系細胞の破骨細胞への分化を検討したが有意な結果が得られなかった。今後も別の方法を用いて検証が必要である。現在これらの研究成果を論文化し投稿中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------