

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09219

研究課題名（和文）家兔関節炎モデルにおける抗ポドプラニン抗体による滑膜炎抑制効果の検討

研究課題名（英文）Inhibition of Synovitis by Anti-Podoplanin Antibody in a Rabbit Arthritis Model

研究代表者

本間 龍介（Honma, Ryusuke）

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70716688

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ポドプラニンは、型膜貫通型タンパク質であり、腎系球体上皮細胞や肺I型肺胞上皮細胞、骨細胞、軟骨細胞などの正常組織に発現しているほか、悪性腫瘍や関節リウマチの滑膜組織などの病的組織にも発現が認められている。ウサギの膝関節にリポポリサッカライドを注入することで滑膜炎を誘発し、滑膜組織にポドプラニンが発現していることを発見した。滑膜炎誘発後に抗ポドプラニン抗体を注入することで滑膜炎を抑制することができると仮説を立てたが、自己免疫による自然軽快でもポドプラニン発現の低下が見られ、抗ポドプラニン抗体による滑膜炎抑制作用の判断が困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜炎に発現するポドプラニンを抑制することができれば、関節リウマチなどの関節炎治療に応用可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Podoplanin is a type I transmembrane protein and is expressed in normal tissues such as renal glomerular epithelial cells, lung type I alveolar epithelial cells, osteocytes, and chondrocytes, as well as in pathological tissues such as malignant tumors and synovial tissue of rheumatoid arthritis. We induced synovitis by injecting lipopolysaccharide into the knee joints of rabbits and found that podoplanin is expressed in synovial tissues. We hypothesized that injecting anti-podoplanin antibody after induction of synovitis could suppress synovitis, but since podoplanin expression was decreased even after spontaneous remission by autoimmunity, it was difficult to determine the suppressive effect of anti-podoplanin antibody on synovitis.

研究分野：医学

キーワード：ポドプラニン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポドプラニン (PDPN) は、型膜貫通型タンパク質であり、特異的リンパ管マーカーとして知られている。PDPN は腎系球体上皮細胞や肺 I 型肺胞上皮細胞、骨細胞、軟骨細胞などの正常組織に発現している。また、悪性脳腫瘍や口腔扁平上皮癌、肺癌、食道癌、悪性中皮腫、精巣腫瘍、骨肉腫、軟骨肉腫などの多くの悪性腫瘍にも PDPN の発現が報告されている。さらに、近年では関節リウマチの滑膜でも PDPN の発現が報告され、PDPN の機能解明が病態解明につながる可能性が示唆されている。

ウサギは動物実験で最も頻繁に使用される動物の一つであり、関節症や離断性骨軟骨炎、骨形成、骨癒合、軟骨修復などの整形外科領域の研究で多く使用されている。われわれは、ウサギ PDPN に対する新規のモノクローナル抗体である PMAb-32 の樹立に成功した。この抗体は免疫組織染色、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法に使用可能である。

### 2. 研究の目的

ウサギ膝関節に滑膜炎を誘発し、抗ウサギポドプラニン抗体注入により滑膜炎が鎮静化するかについて調べる。

### 3. 研究の方法

メス日本白色家兔 (12 週齢) を 18 羽使用した。35 mg/kg のケタミン塩酸塩 (Daiichi Sankyo Propharma, Tokyo, Japan) と 5 mg/kg の 2%キシラジン塩酸塩 (Bayer Yakuhin, Osaka, Japan) の筋肉注射による全身麻酔下に仰臥位とし、右膝関節にのみ関節内注射を行った。case 1 ~ case 9 の 9 羽のウサギの右膝関節に、リポポリサッカライド (LPS, 大腸菌 0111 由来, Wako Pure Chemical Industries) 50 µg を生理食塩水 1000 µL 溶解し、関節内注射した。case 10 ~ case 18 の 9 羽には、右膝関節に生理食塩水 1000 µL のみを関節内注射した。注射回数は合計 3 回で、初回投与日を day 1 とし、day 4, day 8 に関節内注射を行った。case 1 ~ case 3 と case 10 ~ case 12 は初回注射から 2 週後に、case 4 ~ case 6 と case 13 ~ case 15 は初回注射から 6 週後に、case 7 ~ case 9 と case 16 ~ case 18 は初回注射から 12 週後に、ペントバルビタールナトリウム (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) 4 mL を耳介の静脈に注入して安楽死させ、両膝関節から滑膜を採取し、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Nacalai Tesque) にて固定し、パラフィンに包埋した。

#### 免疫組織化学

4 µm 切片をキシレンで脱パラフィン化した後、アルコール濃度を段階的に下げて水和した。クエン酸緩衝液 (pH 6.0; Dako, Agilent Technologies) に浸漬してオートクレーブで 121 °C, 20 分間加熱し、抗原賦活化処理を行った。0.3%過酸化水素含有メタノール液で 30 分間の内因性ペルオキシダーゼブロックを行った。5 µg/mL 濃度の PMAb-32 を 1 時間室温で反応させ、続いて Envision+ kit (Dako, Agilent Technologies) を 30 分間反応させた。3,3'-ジアミノベンジジン 4 塩酸塩 (DAB; Dako, Agilent Technologies) で 1 分間発色させ、ヘマトキシリン (Wako Pure Chemical Industries) で核染色を行った。

滑膜炎誘発後に抗ウサギポドプラニン抗体を注入する。

### 4. 研究成果

#### LPS 群

LPS を関節内注射してから 2 週後の case 1 ~ case 3 の右膝関節の滑膜は、lining cell の肥厚を認め、lining cell は PMAb-32 により細胞膜が強く染色された (図 3-1)。

LPS を関節内注射してから 6 週後の case 4 ~ case 6 (図 3-2)、12 週後の case 7 ~ case 9 (図 3-3) の右膝関節では、lining cell の肥厚を認めず、PMAb-32 で染色される細胞も認めなかった。滑膜細胞層における PDPN 陽性細胞の平均面積は、2 週、6 週、12 週でそれぞれ 38.9%、4.67%、3.22%であった。2 週の PDPN 陽性細胞の面積は、6 週および 12 週よりも有意に大きかった ( $p < 0.005$ )。

case 1 ~ case 9 の左膝関節の滑膜では、lining cell の肥厚を認めず、PMAb-32 で染色される細胞も認めなかった (図 3-4)。

#### 生理食塩水群

生理食塩水を関節内注射した case 10 ~ case 18 の右膝関節 (図 3-5)、関節内注射を行っていない左膝関節 (図 3-6) では、lining cell の肥厚や PMAb-32 で染色された細胞は認めなかった。

滑膜炎は時間経過とともに、鎮静化する。抗ウサギポドブラニン抗体による鎮静化であるかの判別が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Ryusuke Honma
2. 発表標題 Podoplanin expression in rabbit arthritis model
3. 学会等名 23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022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
---------------------------	-----------------------	----

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