

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590096

研究課題名（和文）関節リウマチ滑膜細胞におけるリゾリン脂質受容体応答が病態形成で果たす役割の解明

研究課題名（英文）Roles of intracellular signaling through lysophospholipid receptors in synovial cells in rheumatoid arthritis pathogenesis.

研究代表者

田元 浩一（TAMOTO KOICHI）

徳島文理大学・香川薬学部・教授

研究者番号：50088861

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）では、炎症細胞が滑膜組織に浸潤し、種々の炎症メディエーターを放出して滑膜炎や関節破壊を起こす。炎症メディエーターのうち、リゾホスファチジン酸（LPA）とRAの関係については不明の点が多い。また、関節滑液の酸性化がRAの病態形成に重要である可能性も考えられた。そこで、LPAや酸性で誘発されるRA滑膜細胞の炎症応答を調べ、RA関節滑液中のLPAや滑液の酸性化がRA病態形成に重要であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In rheumatoid arthritis (RA), inflammatory cells infiltrate into the synovial tissues and release inflammatory mediators which result in synovitis and destruction of articular structure. Of these inflammatory mediators, the action mechanism of lysophosphatidic acid (LPA) in RA synoviocytes is still unclear. Furthermore, the acidification of RA synovial fluid has been reported, suggesting the importance of acidic condition surrounding synovial cells in RA pathogenesis. In this study, we analysed cellular responses in RA synovial cells. Our results suggested that, in addition to inflammatory cytokines, LPA in synovial fluid and acidification of synovial fluid may be critical components in RA pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：関節リウマチ、滑膜細胞、リゾリン脂質、リゾホスファチジン酸、LPA受容体

## 1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸 (LPA) やスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) などのリゾリン脂質は、細胞の増殖、分化、生存、運動など、多彩な細胞機能を調節しており、重要な細胞外シグナル分子の一員として認知されている。これらのリゾリン脂質による細胞機能の調節は、リガンド特異的な G タンパク質共役受容体を介して行われ、これまでに6種類の LPA 受容体 (LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>6</sub>) と5種類の S1P 受容体 (S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>) が知られている。リゾリン脂質は血管新生にも関与しており、血管機能と関連した癌の浸潤や動脈硬化症などの疾患の病態形成に影響を及ぼすことが知られている。しかし、関節滑膜組織で著しい血管新生や滑膜細胞の増殖が認められる関節リウマチ (RA) の病態形成とリゾリン脂質との関連性については不明の点が多かった。

RA の主病変部位である全身の関節滑膜組織では、炎症細胞から放出される IL-1 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインや種々のケミカルメディエーターによって刺激を受けた滑膜細胞が著しく増殖し、パンヌスを形成すると共に、シクロオキシゲナーゼ (COX-2) が誘導され、生じた PGE<sub>2</sub> などのアラキドン酸代謝物が炎症を亢進し、痛みを強烈に増幅する。さらに破骨細胞の活性化やマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を促して関節の破壊を促進することも知られている。しかし、RA の病因は不明であり、現在でも RA 患者の治療は対症療法に限られている。

我々は RA の病態形成を研究する過程で、細胞外マトリックス成分のヒアルロン酸が、滑膜細胞における COX-2 の誘導や PGE<sub>2</sub> の生成を抑制することを見いだした。さらに、これらの反応を誘発する IL-1 の作用は、関節滑液に含まれる LPA によって相乗的に増大すること、LPA の作用もヒアルロン酸で抑制されることを見いだした。これらの結果から、関節滑液中の LPA は、炎症性サイトカインと協同して RA の病態を増悪するが、細胞外マトリックスの成分はそれらの作用が発現しないようにコントロールしている可能性が考えられた。

さらに、炎症部位では細胞外微小環境が酸性化しており、種々の細胞に存在するプロトン感知性受容体 (OGR1, TDAG8, GPR4, G2A) を介して様々な細胞応答が誘発されることも見いだされている。RA の関節滑液も酸性化していることから、滑膜細胞の微小環境に存在するプロトン濃度の増加もリゾリン脂質の受容体応答に影響し、RA の病態をさらに増悪する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、RA 患者の関節滑膜細胞 (RASC)

を用いて、細胞膜上に存在するリゾリン脂質受容体、特に、LPA 受容体を介する細胞応答を細胞内シグナリングのレベルで解析し、リゾリン脂質が RA の病態形成で果たす役割を明らかにすることを目的とした。また、細胞外の微小環境が病態形成と密接に関連すると考えられるので、RASC が関節滑膜中に存在する状況を想定し、微小環境の因子として pH の変化に着目し、pH の変化が LPA 受容体応答に及ぼす影響を明らかにすることも目的とした。さらに、RASC 上に発現分布する LPA 受容体のサブタイプの局在性や機能を明らかにする目的で、サブタイプの異なる LPA 受容体に特異的なマウスモノクローナル抗体の作製も目指した。

## 3. 研究の方法

RA 患者由来の関節滑膜細胞 (田中信用博士が人工関節置換術を施した患者さんから採取した滑膜組織を、患者さんに十分な説明と同意を得たものを、五輪橋整形外科病院の倫理委員会で承認を得て提供していただき、コーナーゼ処理して調製した) を用いた。ヒト正常滑膜細胞は市販品 (ScienCell 社) を購入して用いた。細胞内シグナル伝達機構の解析には、種々のシグナル分子に特異的な阻害薬を用いた。siRNA は Thermo Fisher Scientific 社のものを使用した。細胞増殖の分析は TetraColor One reagent (生化学工業) を用いた。種々の mRNA の発現量は、細胞から分離した mRNA の cDNA を調製し、SYBR Green を用いるリアルタイム PCR を定量 PCR 装置 (BioFlux 社) で行い、定量した。種々の細胞内タンパク質やリン酸化タンパク質は、特異抗体を用いるウエスタンブロット法で検出し、定量した。PGE<sub>2</sub> は Cayman 社の EIA kit を用いて定量した。モノクローナル抗体作製の目的で、LPA 受容体の N 末端部分に相当するペプチド (LPA<sub>1</sub>: 15 残基、LPA<sub>3</sub>: 13 残基) を合成 (ペプチド研究所) し、KLH との結合物を Balb/c マウスに3週間隔で4回免疫した。免疫の際にはフロインドの完全アジュバントを用いた。免疫後の脾臓細胞をミエロマ細胞と融合した。抗体のスクリーニングは、それぞれのペプチドと牛血清アルブミンとの結合物を用いる ELISA 法で行った。

## 4. 研究成果

本研究を行い、以下の研究成果を得た。

### 4-(1). 生理的条件下での LPA 受容体応答 4-(1)-①. 関与する LPA 受容体のサブタイプと細胞内シグナリング経路

RASC には LPA<sub>1</sub> が主要な LPA 受容体として発現しており、LPA<sub>2</sub> や LPA<sub>3</sub> の発現量はきわめて少ない。LPA の作用で誘発される COX-2 合成は、LPA<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の Ki16425 や LPA<sub>1</sub>-siRNA で強く抑制されることから、LPA<sub>1</sub> を介して起き

ており、他の LPA<sub>2</sub> や LPA<sub>3</sub> を介していないことを明らかにできた。IL-1 と LPA が相乗的に COX-2 を誘導する反応も、LPA の作用が Ki16425 や LPA<sub>1</sub>-siRNA で抑制されることから、LPA<sub>1</sub> を介していると考えられた (図 1)。

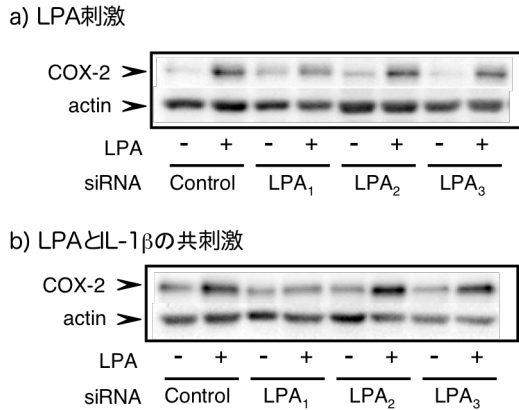


図1 LPA単独およびLPAとIL-1β共刺激で誘発されるCOX-2タンパク質の発現に及ぼすLPA受容体-siRNAの影響

また、LPA<sub>1</sub> を介する応答は、三量体 G 蛋白質の Gi を阻害する百日咳毒素、Rock 阻害薬の Y27632、ERK 阻害薬の PD98059 および p38 MAPkinase 阻害薬の SB203580 で阻害されることから、LPA 刺激は LPA<sub>1</sub> → (Gi および G<sub>12/13</sub>) → (ERK および p38) の活性化経路で伝達され、COX-2 合成が誘導されると考えられる。一方、アグリカン分解するマトリックスメタロプロテアーゼであるアグリカナーゼ (ADAMTS4) の産生は、LPA の刺激後、LPA<sub>1</sub> → G<sub>12/13</sub> → (p38 および NFκB) の活性化経路を介して誘発されることを示す結果が得られ、COX-2 の発現誘導とは異なっていることが示唆された。なお、4-(1)-①の研究結果については、査読ある英文雑誌への投稿準備中である。

#### 4-(1)-②. 細胞増殖と LPA 受容体

RASC は、IL-1 非存在下でも牛胎児血清を含む培地中で分裂増殖するが、IL-1 を共存すると著しい分裂増殖の亢進が認められた。しかし、LPA の場合には、LPA の存在下でも非存在下でも、分裂増殖の速度に相違は認められず、LPA には用いた RASC に対しては細胞増殖促進効果を示さないものと考えられた。なお、ある 1 種類の塩基配列を有する特別な LPA<sub>1</sub>-siRNA をトランスフェクトした RASC の場合、LPA<sub>1</sub> はノックダウンされるが、LPA 刺激すると COX-2、ADAMTS4、MMP-3 などの発現量が増大すると共に、Caspase3/7 活性も増大し、細胞増殖が著しく阻害される結果が得られた。

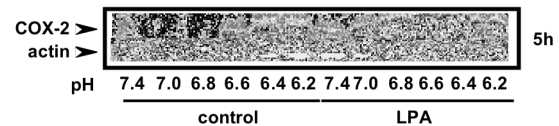
COX-2、ADAMTS4、MMP-3 などのタンパク質発現量が増大することとアポトーシスが誘導されることの関連性については現在のところ明確な説明ができず、不明である。さらに解析を行っている。

#### 4-(2). 酸性条件下での LPA 受容体応答

##### 4-(2)-①. 関与するプロトン感知性受容体

RASC を種々の pH に調製した培地中で培養すると、未刺激の状態でも pH6.8 より酸性の条件下で COX-2 の発現と PGE<sub>2</sub> の生成が誘導され、pH6.4 で最大の応答が認められた。酸性条件下で LPA を共存させると、著しく COX-2 誘導反応が増大し、pH が中性の条件で LPA 刺激した際の 5-6 倍の応答となった。しかも、中性条件下では、LPA による COX-2 発現の誘導は一過性に起こるが、酸性条件下では長時間にわたって持続的に増大することが見いだされた (図 2)。

##### a) pHの影響



##### b) 経時変化

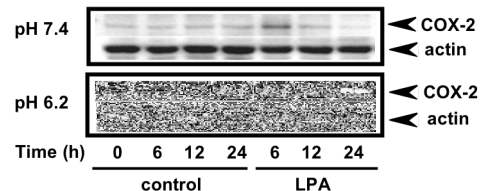


図2 細胞外pHの低下がCOX-2タンパク質の発現に及ぼす影響

細胞外環境が酸性に傾くだけで誘発される COX-2 の発現は、OGR1-siRNA、Gq 阻害薬の YM254890、およびホスホリパーゼ C (PLC) 阻害薬の U73122 を用いた実験によって、H<sup>+</sup> が OGR1 に結合すると、GR1 → Gq → PLC → Ca<sup>2+</sup> の活性化経路を介して誘導されることが認められた。したがって、用いた RASC では、プロトン感知性受容体として OGR1 が機能していると考えられる (図 3)。なお、ADAMTS4 の発現も、同じ経路を介して誘導されることが認められた。

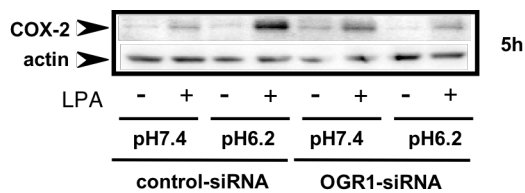


図3 細胞外pHの低下が誘発するCOX-2の発現に及ぼすOGR1-siRNAの影響

#### 4-(2)-②. 酸性条件下で関与するLPA受容体のサブタイプ

RASCを酸性条件下で培養するとLPA<sub>1</sub>とLPA<sub>2</sub>のmRNA発現量が増大した。しかし、酸性条件下でLPA刺激した際に誘導されるCOX-2の発現は、LPA<sub>1</sub>-siRNAを用いてLPA<sub>1</sub>をノックダウンしても影響を受けず、LPA<sub>2</sub>をノックダウンした場合に抑制されることが見いだされた(図4)。

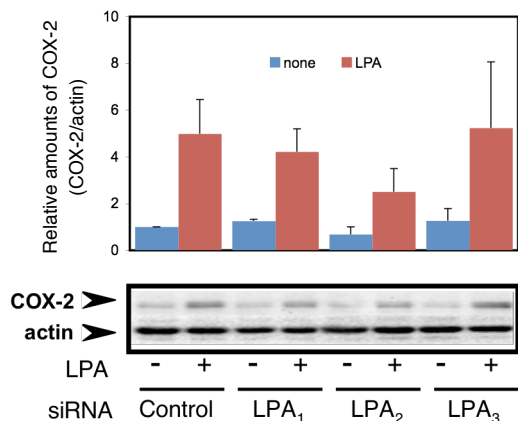


図4 細胞外pHの低下が誘発するCOX-2の発現に及ぼすLPA受容体-siRNAの影響

さらに、酸性条件下でLPA刺激した際に誘導されるCOX-2発現は、ERKの阻害薬PD98059やp38 MAPkinase阻害薬のSB203580で抑制され、NFkBの阻害薬APDCでは影響を受けなかった。したがって、酸性条件下でLPAが作用する受容体は、中性条件下で作用するLPA<sub>1</sub>からLPA<sub>2</sub>へとスイッチしており、LPA→LPA<sub>2</sub>→(Gi/G<sub>12/13</sub>)→(ERK/p38)の活性化経路を介してCOX-2発現を誘導すると考えられた。この詳細な機構については、現在さらに解析している。なお、4-(2)の研究成果については、査読ある英文雑誌への投稿準備中である。

#### 4-(3). LPA受容体に対するモノクローナル抗体の作製

免疫学的手法を用いてLPA受容体の局在性の

解析や抗体によるLPA受容体機能の調節を目指して、ヒトLPA<sub>1</sub>の細胞外部分およびヒトLPA<sub>3</sub>の細胞外部分に特異的なモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、得られた抗ヒトLPA<sub>1</sub>モノクローナル抗体と抗LPA<sub>3</sub>モノクローナル抗体の性質を解析したところ、これらのモノクローナル抗体は、用いたペプチド抗原だけでなく、細胞から可溶化したLPA受容体、およびLPA受容体を発現している生細胞に結合できる抗体であることが認められた。しかし、いずれの抗体もIgMクラスのモノクローナル抗体であった。現在これらの抗体を用いて、細胞形態や細胞機能に及ぼす影響について、さらに解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 野地裕美、徳永絢香、原香織、田中信行、戸村秀明、岡島史和、田元浩一「細胞外環境の酸性化は関節リウマチ滑膜細胞のLPA受容体を介した炎症応答を増大させる」日本薬学会第133年会、2013年3月27日-30日(横浜)
- ② 野地裕美、中川堯亮、石原悠衣、田中信行、戸村秀明、岡島史和、田元浩一「細胞外環境の酸性化が関節リウマチ滑膜細胞の炎症応答に及ぼす影響」日本薬学会第132年会、2012年3月28日-31日(札幌)
- ③ 野地裕美、中川堯亮、戸村秀明、岡島史和、田元浩一「細胞外環境の酸性化が関節リウマチ滑膜細胞のCOX-2発現に及ぼす影響」第84回生化学会、2011年9月21日-24日(京都)
- ④ 田元浩一、野地裕美、田中信行、岡島史和「ヒアルロン酸による炎症応答の調節」セルロース学会第17回年次大会、2010年7月15日-16日(さぬき)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田元 浩一 (TAMOTO KOICHI)  
徳島文理大学・香川薬学部・教授  
研究者番号：50088861

##### (2) 研究分担者

野地 裕美 (NOCHI HIROMI)  
徳島文理大学・香川薬学部・准教授  
研究者番号：30183552