

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791014

研究課題名(和文) 関節リウマチの骨破壊に対するS1P/S1P1シグナルの役割

研究課題名(英文) Effect of S1P/S1P1 signaling on bone destruction in rheumatoid arthritis

研究代表者

北野 将康 (Kitano, Masayasu)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00412031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)での骨破壊機序におけるS1Pとその受容体シグナルの役割を検討した。S1P/S1P1シグナルはRA滑膜細胞株(MH7A細胞)とCD4陽性T細胞でのRANKL発現を増強した。またS1Pは骨芽細胞株(C2C12)でのRunx-2 mRNA発現とALP活性を上昇させ、osteocalcinの産生を促進すること明らかにした。S1PはRAにおいて滑膜細胞とCD4陽性細胞でのRANKL発現を上昇させ破骨細胞分化を促進させることで炎症性骨破壊に關与するいっぽう、骨芽細胞新生に対しても促進的に作用していることが明らかとなった。S1PはRAの骨の恒常性を担う重要な因子であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) / S1P receptor 1 (S1P1) signaling plays an important role in synoviocyte proliferation and inflammatory gene expression in rheumatoid arthritis (RA). In the present study, we investigate the role of the S1P/S1P1 signaling on bone destruction in RA. As a results, S1P/S1P1 signaling enhanced RANKL mRNA expression by RA synovial cell line (MH7A cells) and CD4+ T cells. On the other hands, S1P/S1P1 signaling enhanced Runx-2 mRNA expression, ALP activity and osteocalcin production by osteoblast cell line (C2C12 cells). S1P has a dual potential which promotes both osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. Taken together, S1P/S1P1 signaling is the important factor which involves bone homeostasis of RA.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ スフィンゴシン1リン酸

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) は細胞膜の構成成分である、スフィンゴミエリンからセラミド、スフィンゴシンと代謝され、スフィンゴシンキナーゼ (SphK) でリン酸化されることで派生するリン脂質である。近年、免疫異常・血管新生・炎症・発癌などに深く関与する生理活性脂質として注目されている。S1Pには、細胞内でのセカンドメッセンジャーとしての作用のほかに、細胞外に放出された後に受容体を介し作用するセカンドアゴニストとしての作用機序が存在する。これまでに、S1P₁~S1P₅の5種類のS1P受容体サブタイプが同定されている。近年、受容体を介したS1Pの生理作用の解析が進み、S1P/S1P受容体シグナルが細胞の増殖・分化誘導・アポトーシスなどの過程に密接に関与していることが明らかにされている。

関節リウマチ (RA) の主要な病態は滑膜細胞の腫瘍様増殖・血管新生・慢性炎症とこれらによる骨軟骨破壊である。いずれの過程にも prostaglandin E₂ (PGE₂) を中心としたアラキドン酸カスケード機構や炎症性サイトカインが重要な役割を担っている。これまで、申請者は RA 病態での S1P/S1P₁ シグナルの役割に着眼し検討を行い、①RA 滑膜組織において増殖した滑膜細胞、血管内皮細胞、浸潤した炎症性単核球に S1P₁ が強発現していること、②RA 患者の関節滑液中に高濃度に S1P が存在すること、③局所での S1P 産生亢進に関して RA 滑膜での S1P 誘導酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SphK1) 発現の亢進が認められること、④S1P/S1P₁ シグナルが RA 滑膜細胞での細胞増殖と cyclooxygenase-2 (COX-2) 誘導を介した PGE₂ 産生を強く促進することを報告した (Arthritis Rheum, 54:742-53, 2006) (Ann Rheum Dis, 65:S132, 2006)。これらの知見から S1P/S1P₁ シグナルが RA 病態での滑膜細胞増殖・血管新生・慢性炎症に関与していること

が示唆される。本研究では、S1P/S1P₁ シグナルの RA での骨破壊に対する役割について解析を行った。

2. 研究の目的

RA での骨破壊に対する S1P/S1P₁ シグナルの役割を明らかにする。まず RA 病態での重要な炎症性サイトカインである TNF- α と S1P の誘導酵素である SphK1 との関連を明らかにし、次に破骨細胞と骨芽細胞の分化誘導と活性化に関与する、遺伝子発現に対する S1P/S1P₁ シグナルの役割を解析する。具体的には①滑膜細胞での RANKL・dicckopf (DKK)-1 発現に対する S1P/S1P₁ シグナルの効果。②骨芽細胞での RANKL・osteoprotegerin (OPG) オステオカルシン・ALP・Runx-2 発現に対する S1P/S1P₁ シグナルの効果。さらに③活性化 T 細胞での RANKL 発現に対する S1P/S1P₁ シグナルの効果を明らかにする。これらを解析することで RA 病態の骨破壊における S1P/S1P₁ シグナルの関与を明らかにする。

3. 研究の方法

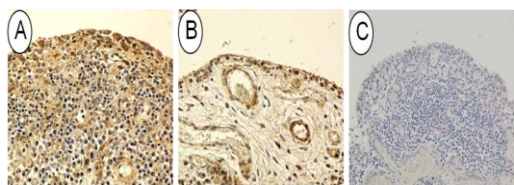
(1) 炎症性サイトカインによる S1P 誘導機序の解析: ①RA 滑膜組織での SphK1 の発現を抗 SphK1 抗体を用いた免疫組織染色で評価し、つぎに②培養 RA 滑膜細胞株である MH7A 細胞を使用し、TNF α 刺激 (1~100ng/mL) での SphK1 mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。

(2) 破骨細胞の分化誘導と活性化に関与する遺伝子発現に対する S1P/S1P₁ シグナルの効果: ①MH7A 細胞での S1P 単独 (0~0.5 μ M)、また S1P+TNF α (100ng/mL) 刺激による RANKL mRNA 発現に及ぼす効果を RT-PCR 法で検討した。さらに S1P による効果が Gi 特異的阻害薬である百日咳菌毒素の前処置で抑制可能か検討した。また MH7A 細胞での DKK-1 蛋白発現に対する S1P (0~0.1 μ M) の効果を ELISA 法で検討した。②骨芽細胞株 (C2C12) での検討: bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) 刺激で骨芽細胞への分化能を有する細胞株

である C2C12 細胞を使用し S1P または S1P 受容体の agonist (機能的 antagonist) である FTY720 刺激 (0~0.1 μ M) での osteocalcin 蛋白の発現を ELISA 法で、さらに ALP 活性と Runx-2 mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。また C2C12 細胞での、破骨細胞分化誘導・活性化に関する因子の発現として RANKL と OPG 蛋白の発現を ELISA 法で検討した。③CD4 +T 細胞での検討：健康者ボランティアの末梢血を使用し、比重遠心法を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を分離後、MACS で CD4+T 細胞を分離回収し、つぎに CD4+T 細胞に S1P (0~0.5 μ M) を添加し 6 時間培養し RANKL mRNA 発現に対する効果を解析した。さらに S1P と TNF- α の共刺激で同様の検討を行い相加効果の有無を検討した。

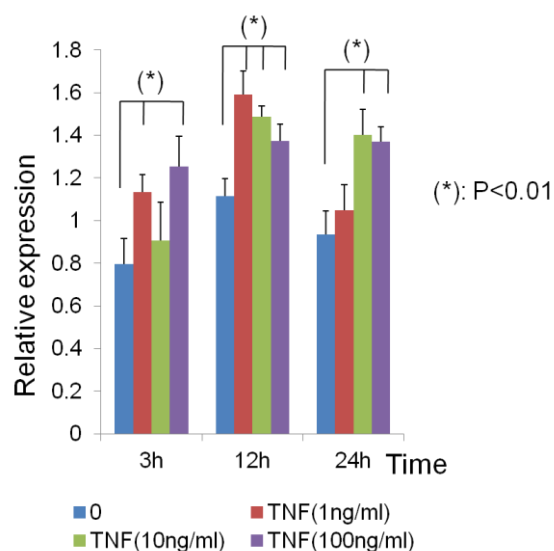
4. 研究成果

(1) -①RA 滑膜組織での SphK1 の発現：RA 滑膜組織では変形性関節症 (OA) 滑膜組織と比較し表層滑膜細胞と炎症性単核球に SphK1 の強い発現を認めた。

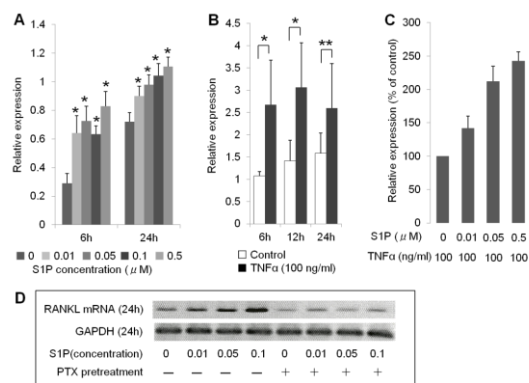


(A) RA 滑膜：抗SphK1抗体、(B) OA滑膜：抗SphK1抗体、(C) RA滑膜：negative control

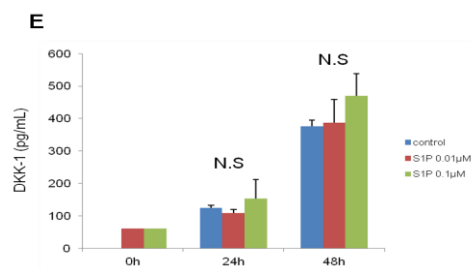
(1) -②MH7A 細胞での TNF α 刺激による SphK1 mRNA の発現：TNF α は MH7A 細胞での SphK1 mRNA 発現を増強した。



(2) -①S1P の MH7A 細胞での RANKL mRNA 発現に対する効果の検討：S1P は濃度依存性に MH7A 細胞での RANKL mRNA 発現を増強し、さらにこの効果は TNF α との共刺激で相加的であった (A, B, C)。さらに S1P の効果は百日咳菌毒素 (PTX) の前処置で抑制可能であった (D)。MH7A 細胞での DKK-1 蛋白発現に対する効果の検討では S1P (0.1 μ M) で増加傾向であるものの有意差は認めなかった (E)。

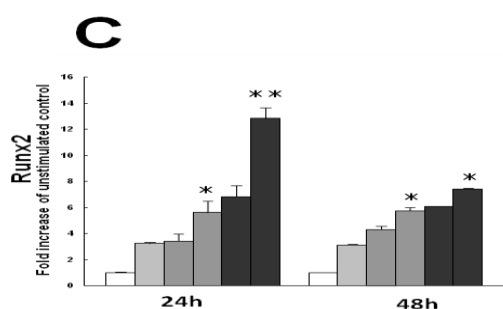
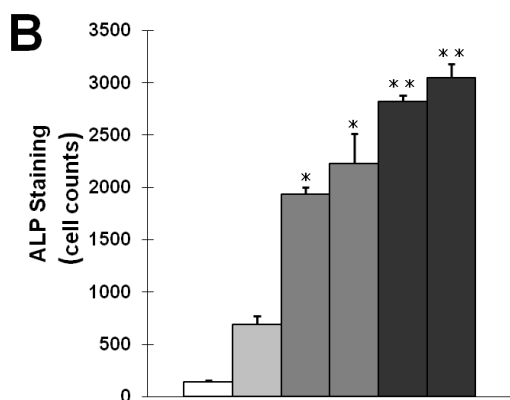
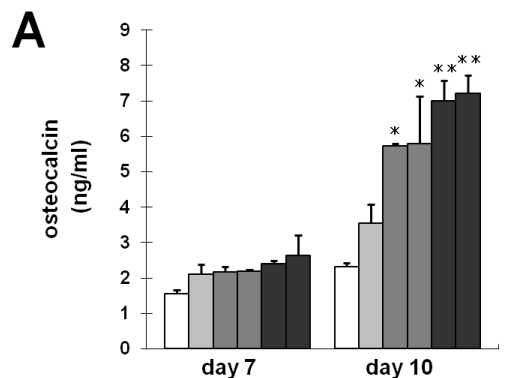


(*P<0.01, **P<0.05)



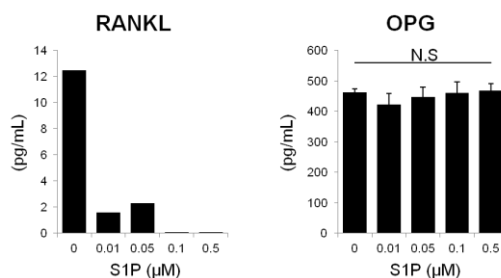
(2) -②C2C12 細胞での osteocalcin (A)、ALP 活性 (B)、Runx-2 mRNA (C)、RANKL、OPG 蛋白 (D) 発現に対する S1P、FTY720 (0~0.1

μM) の効果の検討: S1P、FTY720 は濃度依存的に osteocalcin 発現、ALP 活性、Runx-2 mRNA の発現を増強した。RANKL 蛋白発現に対しては抑制傾向を認めるものの有意差は得られず。また OPG 蛋白発現に対して影響は認めなかった。(* P <0.05、** P <0.01)

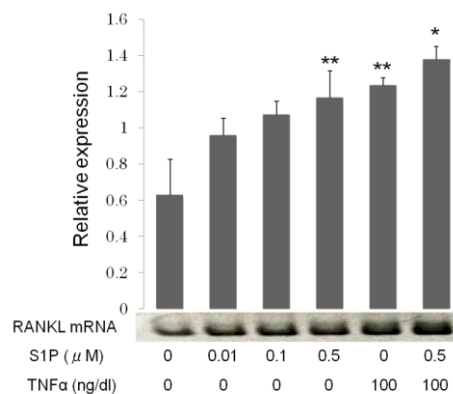


(-)
 BMP-2 (300ng/ml)
 BMP-2 (300ng/ml) + S1P (0.01μM)
 BMP-2 (300ng/ml) + S1P (0.1μM)
 BMP-2 (300ng/ml) + FTY (0.01μM)
 BMP-2 (300ng/ml) + FTY (0.1μM)

D



(3) CD4+T 細胞での RANKL mRNA 発現に対する S1P (0~0.5 μM) の効果の検討: S1P は濃度依存的に CD4+T 細胞での RANKL mRNA 発現を増強した。さらにこの作用は TNF α との共刺激で相加的であった。(* P <0.01、** P <0.05)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- Harunori Takeshita, Masayasu Kitano, Hajime Sano (8名省略2番目)、Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor 1 signaling regulates receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) expression in rheumatoid arthritis, Biochem. Biophys. Res. Commun、査読有、419、2012、154-159

[図書] (計1件)

- 北野将康、関口昌弘、佐野 統、リゾリン脂質と免疫抑制—基礎から応用へ—① スフィンゴシン 1-リン酸、炎症と免疫 2015年1月号 (Vol. 23 no.1) 先端医学社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北野 将康 (KITANO Masayasu)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00412031