

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870493

研究課題名(和文)細胞間コミュニケーションの制御を軸とした関節リウマチの新たな治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for rheumatoid arthritis by controlling cell-cell interactions

研究代表者

土田 真嗣 (TSUCHIDA, SHINJI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10719834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)患者，変形性関節症患者，および関節外に生じた骨肉腫患者を対象とし，患者背景，遺伝子発現，組織学的所見について検討した．connexin 43(Cx43)がヒトRA滑膜表層組織で変形性関節症と比較して高発現していた．また，炎症性サイトカインの発現が高いほど，Cx43の発現も高かった．さらにRAに対する生物学的製剤，ステロイド剤，メトトレキサートなどの薬物療法の種類に関わらずCx43はRA滑膜組織で高発現していることを明らかにした．以上から，Cx43は，薬物療法で著効しないRAの単関節における滑膜炎に対する新たな治療標的となる可能性がある．

研究成果の概要(英文)：The expression of connexin 43 (Cx43) in synovial tissue from eight patients with RA, five patients with osteoarthritis, and one normal female subject was analyzed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry of tissue sections. This study shows that Cx43 is expressed in RA synovial tissue and that its expression is induced by stimulation with TNF- α . The expression of the pro-inflammatory cytokines was inhibited by transfection of siCx43. Cx43 may be a novel marker of inflammation in RA synovial tissue.

研究分野：関節リウマチ，手・末梢神経外科，軟骨代謝学

キーワード：細胞間結合装置 ギャップ結合 コネキシン

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA と略)は、難治性の関節疾患であり、滑膜炎と骨破壊を生じる。RA では複数の炎症性サイトカインの発現が病態において重要な役割を担っており、炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤が、治療として広く用いられている。しかし、生物学的製剤には、重篤な感染症、高額な医療費および中和抗体の出現などの問題がある。このため、従来とは異なる機序でも、RA を制御できる新たな治療薬の開発が切望されている。一方、ギャップ結合は、膜貫通型の細胞間結合装置の一つで、connexin (Cx と略)とよばれるタンパクの多量体により形成されている。その中心孔をカルシウムイオンやセカンドメッセンジャーなどが通過することで、隣接する細胞に情報が伝達される。ヒト Cx のアイソフォームは 21 種類あり、中でも Cx43 が滑膜組織で高発現している。近年、Cx43 はさまざまな組織で免疫応答を調整していることや、Cx43 の発現阻害が炎症反応を抑制できることが明らかにされてきた。これらの報告は、滑膜における Cx43 の発現が RA の病態に関与している可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト RA 滑膜組織における Cx43 の発現を明らかにすることである。

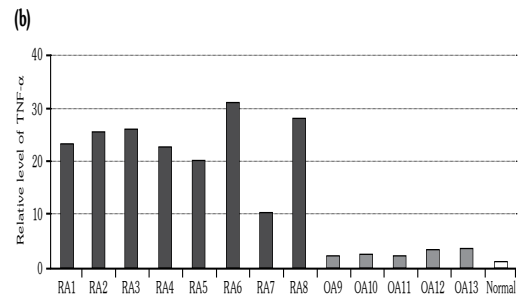
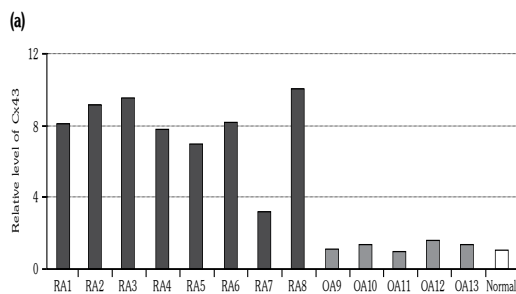
3. 研究の方法

対象は、RA 患者 8 例、変形性関節症(osteoarthritis: OA と略)患者 5 例、および関節外に生じた骨肉腫患者 1 例とした。それぞれ RA 群、OA 群、および normal 群とし、患者背景を調査した。手術時に採取した滑膜組織における Cx43 および TNF- α の遺伝子発現を解析し、Cx43 の免疫染色で組織学的に検討した。

4. 研究成果

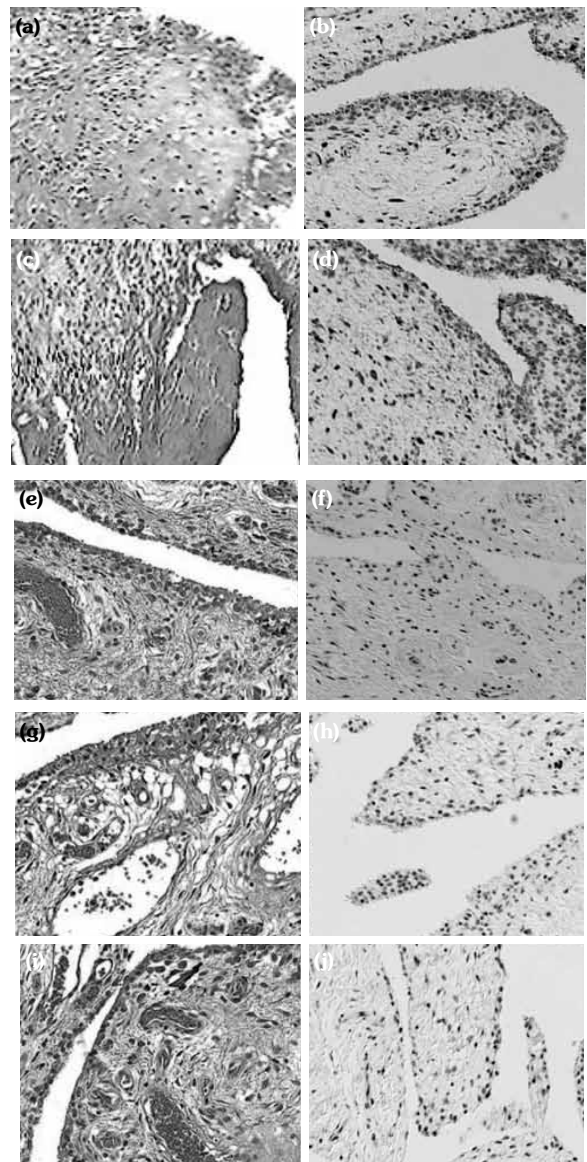
RA 群における Cx43 の遺伝子発現は、OA 群、normal 群と比較して明らかに高く、TNF- α の遺伝子発現が高い滑膜組織ほど Cx43 の発現も高かった。(図 1 a, b)

図 1



RA 群におけるすべての滑膜組織で、滑膜細胞は増殖し、炎症性細胞は浸潤していたが、OA 群および normal 群で炎症性細胞をほとんど認めなかった。Cx43 に対する染色性は、RA 群の滑膜表層細胞で高かったが、OA 群および normal 群の滑膜組織において、Cx43 抗体で染色された細胞はほとんどなかった。(図 2)

図 2



a, c, e RA 滑膜組織 (HE 染色)

b, d, f RA 滑膜組織 (免疫染色 Cx43)

g OA 滑膜組織 (HE 染色)

- h OA 滑膜組織 (免疫染色 Cx43)
- i control 滑膜組織 (HE 染色)
- j control 滑膜組織 (免疫染色 Cx43)

RA 群の薬歴は、生物学的製剤である tocilizumab (TCZ と略) と methotrexate (MTX と略) の併用が 2 例, MTX とステロイド剤の併用が 3 例, MTX と抗リウマチ薬の併用が 1 例, MTX 単独が 1 例, 抗リウマチ薬とステロイド剤の併用が 1 例であった。薬物療法は, Cx43 の発現に明らかな影響を与えなかった。(表) 表

Subject/age/gender	Disease duration, years	Larsen score for RA	K/L score for OA	CRP level presurgery, mg/liter
RA patients				
RA 1/52/F	8	IV	-	0.03
RA 2/54/M	10	IV	-	1.21
RA 3/64/F	18	IV	-	0.55
RA 4/71/F	29	IV	-	0.83
RA 5/52/F	24	IV	-	2.31
RA 6/64/F	12	IV	-	0.04
RA 7/52/F	15	IV	-	0.33
RA 8/67/M	7	IV	-	0.29
OA patients				
OA 9/65/M	-	-	IV	0.12
OA 10/66/F	-	-	IV	0.21
OA 11/79/F	-	-	IV	0.08
OA 12/68/F	-	-	IV	0.09
OA 13/64/M	-	-	IV	0.11
Normal subject 14/61/F	-	-	-	0.08

Subject/age/gender	Source of synovium	DAS 28 ^{ESR}	Medication
RA patients			
RA 1/52/F	Knee	3.89	TCZ 8 mg/k/4 week, MTX 6 mg/week
RA 2/54/M	Knee	4.04	MTX 6 mg/week, BUC 300 mg/day
RA 3/64/F	Knee	3.64	MTX 8 mg/week, Pred. 10 mg/day
RA 4/71/F	Elbow	4.55	Pred. 10 mg/day, SSZ 2 g/day
RA 5/52/F	Knee	4.66	MTX 8 mg/week, Pred. 6 mg/day
RA 6/64/F	Elbow	5.03	TCZ 8 mg/k/4 week, MTX 6 mg/week
RA 7/52/F	Knee	3.65	MTX 6 mg/week, Pred. 10 mg/day
RA 8/67/M	Wrist	4.22	MTX 8 mg/week
OA patients			
OA 9/65/M	Knee	-	NSAIDs
OA 10/66/F	Knee	-	NSAIDs
OA 11/79/F	Knee	-	None
OA 12/68/F	Knee	-	None
OA 13/64/M	Knee	-	NSAIDs
Normal subject 14/61/F	Knee	-	-

RA = rheumatoid arthritis; K/L = Kellgren/Lawrence; OA = osteoarthritis; CRP = C-reactive protein; TCZ = tocilizumab; MTX = methotrexate; Pred. = prednisolone; BUC = bucillamine; SSZ = sulfasalazine; NSAIDs = nonsteroidal antiinflammatory drugs.

滑膜で発現している Cx は, Cx26, 32 および 43 である。Cx43 は, ヒト正常滑膜で最も高発現している。本研究において, Cx43 の遺伝子発現は, OA および正常滑膜組織と比較して RA 滑膜組織で高かった。また, Cx43 の発現は, ヒト RASFs において TNF- α による炎症性刺激で亢進することを明らかにした。さらに, Cx43 は RA 滑膜組織における炎症性細胞の浸潤に伴い高い染色性を示した。以上から, Cx43 の発現は, RA における滑膜炎の病態において重要な役割を果たしている可能性がある。TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現は, RA の滑膜炎に強く関与している。また, RA 群における Cx43 の発現は, 生物学的製剤である TCZ, MTX, 抗リウマチ薬およびステロイド剤によって明らかに影響しなかった。Cx43 の発現は, 既存の薬物療法に抵抗する RA

における滑膜炎の病勢を反映できる可能性がある。TNF- α の発現が亢進することで, 破骨細胞は活性化し, RA の骨破壊は進行する。近年, Cx43 はヒト破骨細胞を活性化させることが明らかにされてきた。本研究において, Cx43 の発現は RA 滑膜組織における TNF- α の発現に伴い亢進した。Cx43 の発現は, TNF- α 誘導性の骨破壊に関与している可能性がある。

本研究で, Cx43 が生物製剤, メトトレキサート, ステロイド剤などの薬物療法の選択に関わらずヒト RA 滑膜組織で高い発現を示している Cx43 は, RA の滑膜炎に対する新たな治療標的となる可能性がある。

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 1 件)

Tomohiro Matsuki, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Ryu Terauchi, Ryo oda, Hiroyoshi Fujiwara, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Expression of Connexin 43 in Synovial Tissue of Patients With Rheumatoid Arthritis, Arch Rheumatol, 査読有, Vol 31, 2016, i-ix

doi: 10.5606/ArchRheumatol.2016.5597

<http://www.archivesofrheumatology.org/abstract/726>

[学会発表] (計 2 件)

- ① Shimomura Seiji, Tsuchida Shinji, Arai Yuji, Nakagawa Shushi, Inoue Hiroaki, Ichimaru Shouhei, Mazda Osam, Kubo Toshikazu, Analysis of the expression of connexin 43 in synovial tissue of patients with arthritis, 19th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) 2016. 3. 31-4. 3 (Amsterdam, Netherlands)

- ② 下村征史, 土田真嗣, 新井祐志, 寺内 竜, 市丸昌平, 溝尻直毅, 森 裕貴, 小田 良, 久保俊一, 関節リウマチ滑膜における connexin 43 の発現解析, 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016. 04. 21 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu->

[m.ac.jp/k/orthoped/study/nankotsu.html](http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/orthoped/study/nankotsu.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田真嗣 (TSUCHIDA SHINJI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10719834