

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11007

研究課題名(和文) 関節リウマチの病態にミトコンドリアが与える影響についての検討

研究課題名(英文) Effect of mitochondrial function for rheumatoid arthritis

研究代表者

酒井 良忠 (Sakai, Yoshitada)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：90397802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：RA滑膜細胞ではミトコンドリア生合成が低下しており、その改善はRA滑膜細胞のアポトーシスを亢進させ、細胞増殖能およびMMP3/RANKL分泌を低下させた。CIAマウスへのAICARの投与は、手足の厚さ、関節炎スコアを有意に低下させ、滑膜炎細胞浸潤、滑膜増殖、軟骨変性及び破骨細胞増殖を抑制し、骨破壊の抑制とともに、関節破壊抑制の効果をin vivoでも証明した。RA滑膜でのミトコンドリア低下は、炎症時のミトコンドリアのアポトーシスを低下させ、滑膜細胞の増殖を亢進させ、関節破壊の引き金となっている可能性があり、ミトコンドリアをターゲットにした治療の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

現在RAの治療はIL-6やTNFといった炎症性サイトカインの抑制を中心に行われており、その治療には免疫抑制という大きな副作用がある。このため、活動性ウイルス性肝炎や結核、さらには人工関節などの感染後など感染症のある患者に対する治療は困難を極める。また近年の新興感染症の流行など、免疫不全状態をもたらす薬物治療においては一定の危険性がある。今回、ミトコンドリア機能、量を増加、亢進させることで、RAの滑膜細胞におけるアポトーシスを誘導し、さらに関節破壊を抑制する効果がある可能性が示唆された。ミトコンドリアを増加させる薬剤はいくつか存在しており、今後RAの安全な治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the relationship between mitochondrial biogenesis and joint destruction in RA. We investigated cell proliferation and MMP3/RANKL secretion by mitochondria biogenesis activated AICAR in RA-FLS. We also investigated joint destruction and inflammation by mitochondria biogenesis activated on AICAR in CIA-mice in vivo. The mRNA expressions of mitochondrial biogenesis genes and mtDNA were enhanced by AICAR in RA-FLS. In addition, AICAR inhibited cell proliferation, MMP3 and RANKL production. In vivo study, AICAR inhibited arthritis score and joint destruction in CIA mice. AICAR inhibited joint destruction in CIA mice. These results showed that enhancement of mitochondria biogenesis inhibited disease activity of RA.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：関節リウマチ ミトコンドリア アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、T細胞主体の免疫異常がもたらす、関節滑膜細胞の異常増殖とそれに伴う滑膜組織の肥大化と炎症、RA滑膜細胞に発現する Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)により誘導される破骨細胞の活性化、マトリクスメタロプロテアーゼ(MMPs)による軟骨破壊により関節破壊が進行し、患者の日常生活動作(ADL)を著明に低下させる慢性疾患である。この関節滑膜細胞の異常な増殖が起こる理由の1つにアポトーシスの抵抗性の亢進が理由の1つとして考えられる。通常、炎症における細胞応答として、一定のアポトーシス誘導が惹起されるが、リウマチ滑膜細胞では十分にこの細胞応答が起きず、アポトーシスの抵抗性の改善により滑膜の異常増殖を抑制できる可能性が示唆される。近年、RAの治療は生物学的製剤の登場により劇的に進歩し、治療の目標は疾患活動性の低下から、構造的寛解、機能的寛解へと変化してきている。しかし、その一方でその強力な免疫抑制作用により、感染症などのリスクが増加し、生命にかかわる重篤な副作用も報告されている。またメソトレキサート(MTX)やレフルノミド、タクロリムスといった、臨床で頻用される疾患修飾性抗リウマチ薬も、その殆どが強い免疫抑制作用をもつため、RA患者は非常に強力な免疫抑制状態にあり、感染症のリスクにさらされているのが現状である。しかしながら、このような治療を行っても寛解に至らない患者やこれらの薬剤が使用できない患者も多数存在する。このような背景から、さらなる新たな作用機序をもつRA治療法、特に副作用および免疫抑制作用の少ない治療法の開発は非常に重要である。悪性腫瘍細胞において、細胞内のミトコンドリア機能、生合成能、ミトコンドリア量が低下していることが我々のグループからも含めて報告されており、ミトコンドリア機能、生合成、ミトコンドリア量の改善がアポトーシスの正常化につながることも報告している。しかしながら、リウマチ領域におけるミトコンドリアの研究は、ミトコンドリア由来の遺伝子異常や生物製剤有効例での遺伝子異常の改善などの報告がわずかにあるだけで、ミトコンドリア生合成やミトコンドリア量について着目した研究はほとんどなく、リウマチ滑膜のミトコンドリア量がリウマチ病態にどのように関与しているかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、関節リウマチ滑膜細胞のミトコンドリア生合成が関節リウマチの関節破壊を制御する可能性について、検討を行うことである。RA滑膜細胞のミトコンドリア量を増加させる方法として、全身投与可能な薬剤として、5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)を用い、*in vitro*、*in vivo*での検討を行う他、その他のミトコンドリア量を増加させる方法を数種施行する。*in vitro*での検討は、滑膜細胞の増殖能、アポトーシス作用とそのメカニズムの解析、各種サイトカインやMMP、RANKLの発現を検証し、*in vivo*での検討は、コラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いて、滑膜の過形成、関節腫脹、関節破壊への影響とその分子メカニズムを検討した。

3. 研究の方法

滑膜細胞株

RA関節手術から得た滑膜組織より作成した初代培養系滑膜細胞株を使用した。

ミトコンドリアの機能亢進

SLC社から、ミトコンドリアの機能亢進には、アカデシン(AICAR)を使用した。

Collagen-Induced Arthritis (CIA) mice

SLC社から、2回目の感作後のCIAマウス(DBA/1JmsSlc)を購入。検疫終了後、CTを撮影し関節破壊の有無を確認。AICAR(又はSaline)を毎日500ng/kg、3週間(計21回)投与。週2回、Arthritis Score及び体重を計測。3週後、CT撮影を行い、関節部位の組織を固定後、脱灰しパラフィン包埋後の切片からTRAP染色で破骨細胞を評価

ミトコンドリア生合成機能/量の評価

Real-time PCR法を用い、PGC-1、NRF-1、TFAM mRNA定量とミトコンドリアDNA定量により評価した

炎症刺激

培養液中にAICARを2.0µM(又は0µM)含有した際の5nMのIL-1及び1nMのTNFで48時間刺激後の滑膜細胞株を用いて以前の報告[3]に基づきWST法による細胞増殖能評価を行い、培養上清を用いウエスタンブロット法及びELISAで評価した。

細胞増殖能

細胞増殖能はCell Counting Kit-8(同仁化学)を用いてWST法を用いて評価。96穴マイクロプレートに5000細胞/100µl播種し、CO2インキュベーター内で、24時間前培養し、

炎症刺激および、AICAR を添加後、48 時間後に評価した。

ウエスタンブロッティング

MMP-3 と RANKL の分泌は、培養上清を用いたウエスタンブロット法で評価した。

統計処理

ANOVA 及び Mann-Whitney U-test を用いて解析を行い、 $P > 0.05$ を有意差ありとした。また図のエラーバーは標準誤差を示す。

4 . 研究成果

RA 滑膜細胞におけるミトコンドリア生合成因子の検討

以前の準備実験の結果を図 1 に示す。OA-FLS(変形性関節症由来滑膜細胞)に比べて RA-FLS(RA 滑膜細胞)において、ミトコンドリア量やミトコンドリア生合成に関わる因子の発現低下がみられた。

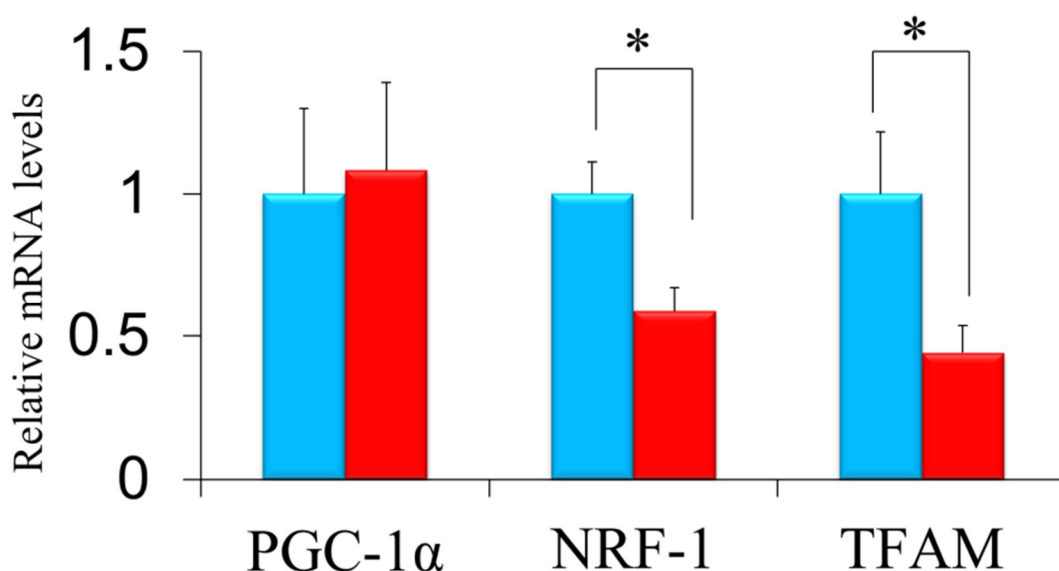


図 1 A OA 滑膜細胞と RA 滑膜細胞におけるミトコンドリア生合成因子の違い (青:OA 滑膜細胞、赤:RA 滑膜細胞)

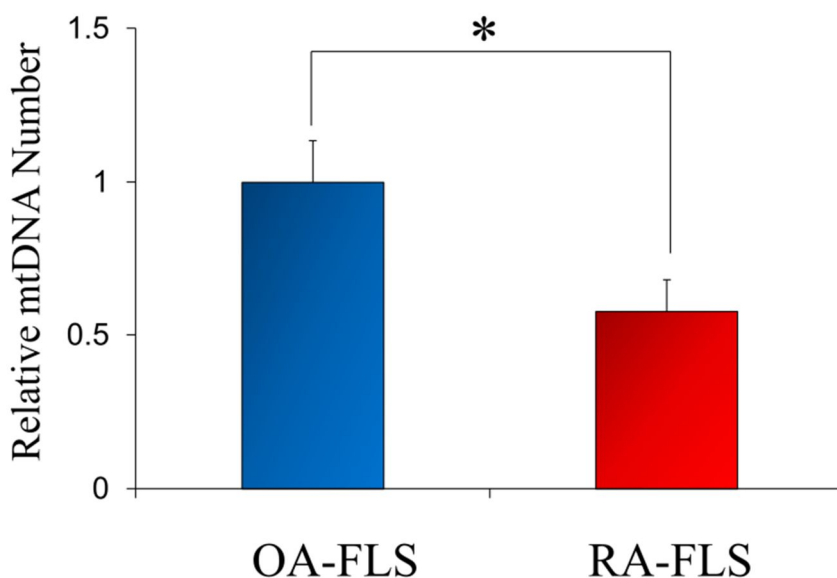


図 1 B OA 滑膜細胞と RA 滑膜細胞におけるミトコンドリア DNA 量の違い ((青:OA 滑膜細胞、赤:RA 滑膜細胞)

ミトコンドリア量の増加が RA 滑膜細胞に与える影響についての検討

1) AICAR(2 μ M)添加の有無によるミトコンドリア生成とミトコンドリア量の変化を検討した。RA 滑膜細胞に 48 時間 AICAR を添加したのち、real-time PCR 法にてミトコンドリア生成因子、とミトコンドリア DNA 量を測定した。その結果、AICAR を添加した群はミトコンドリア量や生成機能が增加していることが判明した(図 2)

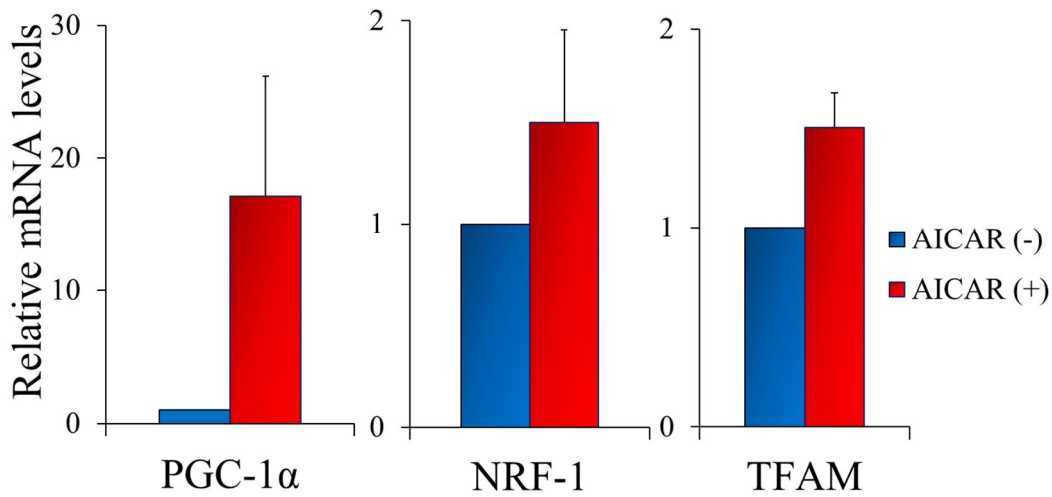


図 2 A RA 滑膜細胞における AICAR 添加によるミトコンドリア生成機能の変化

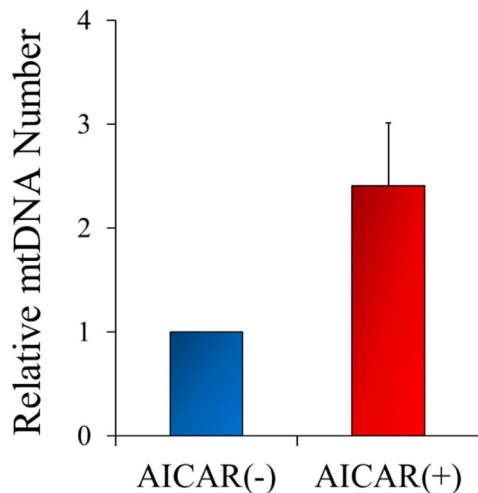


図 2 B RA 滑膜細胞における AICAR 添加によるミトコンドリア DNA 量の変化

2) AICAR の添加濃度による RA 滑膜細胞増殖能の変化についての検討

次に、AICAR の添加濃度を変化させながら、IL-1、TNF による炎症刺激下において、細胞増殖能の変化を検討した。AICAR の濃度が上昇するとともに、細胞増殖能はどちらの炎症刺激においても、低下した(図 3)

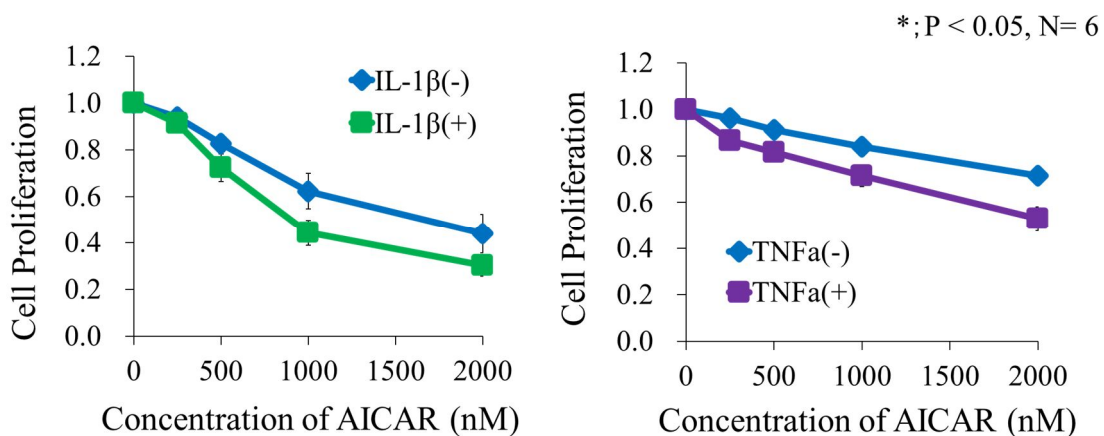


図3 炎症刺激下におけるRA滑膜細胞増殖能に対するAICARの影響

3) RA滑膜細胞におけるAICARのRANKL, MMP-3発現に対する影響の検討
 RAの関節破壊においては、破骨細胞の誘導因子であるRANKLや軟骨破壊を引き起こすMMP-3の影響が重要である。AICARによるミトコンドリア生合成能の増加により、これらの因子がどう変化するかについて検討を行った。IL-1の共刺激を加えた群も含めて検討を行った。その結果、AICARの添加により、RANKLとMMP-3の発現は有意に減少し、それはIL-1の刺激により、より顕著にみられた(図4)

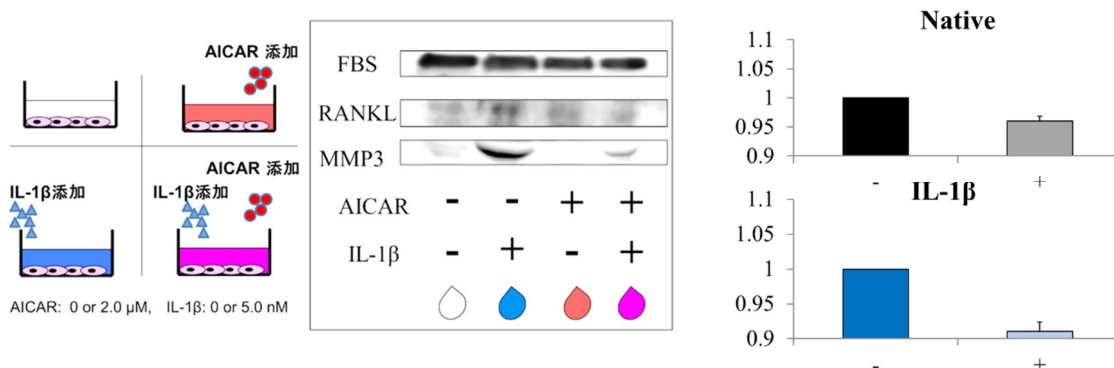


図4 AICAR投与によるRANKL, MMP-3の発現の変化(中段:ウェスタンブロット、右段:ELISA(RANKL))

4) CIAモデルマウスを用いたAICARの関節炎、関節破壊に対する影響

前述のとおり、CIAモデルマウスにAICARを腹腔内投与を行い、関節炎スコア、体重、3D-CTによる骨破壊の計測、組織学的検討を行った。その結果、AICARの投与により、関節炎スコアは減少し、3D-CTによる骨計測では、骨びらんの減少がみられた。また組織学的検討により、破骨細胞数の低下がみられ、骨破壊が抑制されていた。また体重減少はみられず、有害事象は少ないものと推察された(図5)

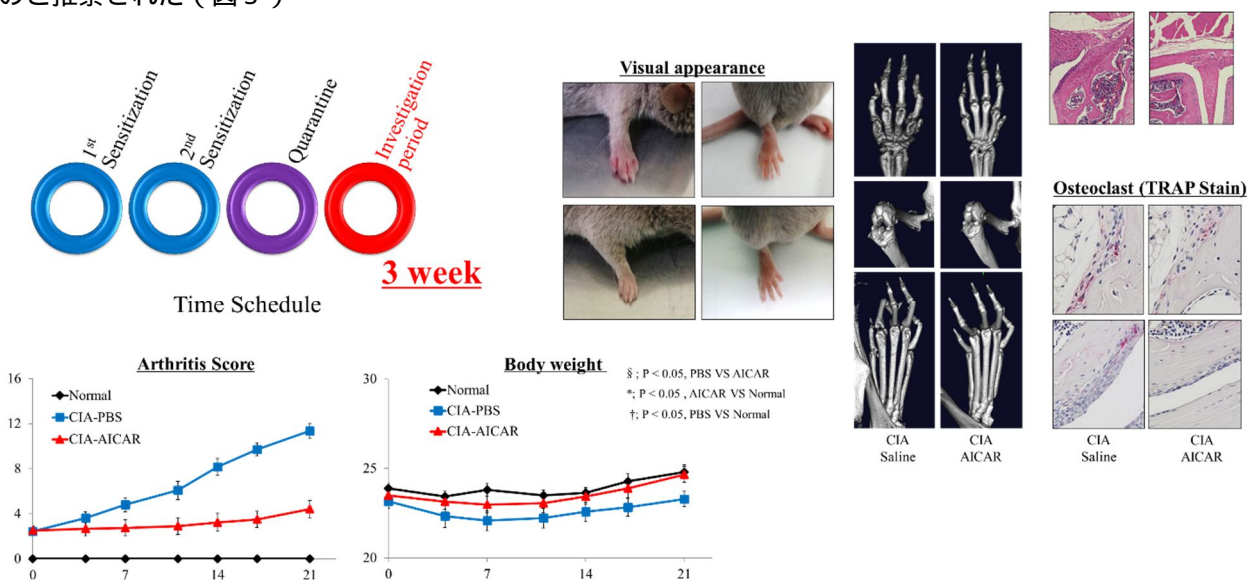


図5 CIAモデルマウスに対する、AICARの関節炎、関節破壊に対する影響(左下段:関節炎スコアと、体重の変化、中央:CIAモデルマウスの関節炎の肉眼的写真、右段:3D-CTと組織学的検討)

以上より、RA滑膜細胞におけるミトコンドリア生合成能の増加やミトコンドリア量の増加はRA滑膜細胞の増殖を抑制し、骨破壊、軟骨破壊のマーカーを低下させた。またCIAモデルマウスによるin vivoの実験においても、関節炎を抑制し、関節破壊を抑制することが判明した。RAの治療ターゲットとしてミトコンドリア機能、量に注目した治療薬の可能性について、今後さらなる検討を行う必要があると考えられた。

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 Takeshi Ueha, Yoshitada Sakai, Kohjin Suzuki, Koji Fukuda, Toshihisa Maeda, Hanako Nishimoto, Shinya Hayashi, Yasushi Miura, RyosukeKuroda and Akira Hashiramoto
2. 発表標題 Bik Plays an Important Role of Cell Proliferation Caused By Nitric Oxide in Rheumatoid Arthritis Synovium
3. 学会等名 2017 ACR/ARHP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----