

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591760  
 研究課題名 (和文) 関節水腫発症における水チャネル(アクアポリン)の発現機序解明と治療への応用  
 研究課題名 (英文) Aquaporin expression in the synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis  
 研究代表者  
 大塚 隆信 (OTSUKA TAKANOBU)  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：10185316

## 研究成果の概要：

整形外科疾患では種々の病態により関節水腫の発症をみる。日常臨床においては、関節穿刺、副腎皮質ホルモンの関節内投与、ヒアルロン酸の関節内投与、関節鏡視下滑膜切除術などの対症療法がとられることが多く、しばしば再発する。関節水腫をきたす個々の疾患たとえば関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)などの疾患解明は著しい進展しているものの、関節水腫そのもの発生機序の分子機構の解明にはあまり進展はない。そこで本研究では水チャネルのアクアポリン(APQ)を介しての関節水腫発症の分子機構を解明し、効果的治療法の開発をめざした。

RA、OAにて人工関節置換術を施行した際に得られた滑膜組織について APQ の発現を検討した。滑膜組織の mRNA を抽出し、real time PCR で解析したところ APQ-1, 3, 9 の発現を認めた。APQ-1,3 については RA, OA では発現の差は認めなかったが、APQ-9 については RA において高発現の傾向にあった。OA 滑膜では、術前水腫ありの滑膜では、水腫なしの滑膜より APQ-9 の発現が高かった。滑膜組織を抗 APQ-1,3,9 抗体にて免疫組織染色したところ、滑膜表層細胞、血管内皮細胞に APQ-1,3,9 が発現していることがわかった。

滑膜から培養した線維芽細胞様滑膜培養細胞を炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ にて刺激すると AQP-9 が誘導され、炎症による水腫発症に AQP-9 が関与していることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節水腫、関節リウマチ、変形性膝関節症、滑膜組織、アクアポリン

RT-PCR、滑膜培養細胞、TNF- $\alpha$

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科疾患では種々の病態により関節水腫の発症をみる。いわゆる“水がたまる”といった症状であるが、疼痛を伴わない場合でも、関節可動域の制限など苦痛を伴う症例がある。日常臨床においては、関節穿刺、副腎皮質ホルモンの関節内投与、関節鏡視下滑膜切除術などの対症療法がとられることが多く、しばしば再発する。関節水腫をきたす個々の疾患たとえば関節リウマチ、変形性関節症などの疾患解明は著しい進展しているものの、関節水腫そのものの発生機序の分子機構の解明にはあまり進展はない。

アクアポリン(AQP)は水を特異的に通過させるチャネルとして1990年代に発見され、腎臓尿細管における水吸収機能に関しては多くの知見が得られている。関節水腫発症においてもこの分子の関与が推定される。

## 2. 研究の目的

研究分担者の浅井らは、中枢神経におけるAQPの発現調節に関して新知見を得ており、多数の報告をしている。また我々は、関節リウマチ(RA)の発症に、グリオスタチン(GLS)(血小板由来血管内皮増殖因子と同一でthymidine phosphorylase活性をもつ)が密接に関与していることを初めて見だし、RA病態解明について継続的な研究をすすめており、滑膜細胞培養技術は完成している。そこでRAや変形性関節症(OA)由来の滑膜培養細胞を用いて、関節水腫発症機序をAQPの発現調節を通じて解明したい。

## 3. 研究の方法

(1)関節水腫をきたす疾患の滑膜組織でのAQPの発現をRT-PCRで解析する。人工膝関節置換術のさいに患者の承諾を得て採取した変形性関節症、関節リウマ

チ由来の滑膜組織からmRNAを抽出し、RT-PCR法にてAQP1-9遺伝子発現状況を疾患別、水腫の有無で検討する。

### (2)免疫組織化学染色

人工膝関節置換術のさいに患者の承諾を得て採取した滑膜組織を抗AQP-1, 3, 9抗体を用いて、免疫組織化学染色する。AQPファミリー発現細胞を同定し、疾患および病態の違いによる水チャネルの関与を検討する。

### (3)滑膜培養細胞の樹立

人工膝関節置換術のさいに患者の承諾を得て採取した滑膜を培養し、3から9代継代し形態学的に均一な線維芽細胞様滑膜培養細胞を得る。得られた滑膜培養細胞は免疫組織学的手法にて表面マーカー(5B5抗体, KP-1抗体, F8/86抗体等)を検討し、線維芽細胞様滑膜細胞であることを確認する。

(4)炎症性サイトカイン刺激による滑膜培養細胞の遺伝子レベルでの応答について。

関節水腫は炎症性関節疾患で発症することも多いことから、炎症モデルとして、炎症性サイトカインの代表であるTumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )にて滑膜培養細胞を刺激し、real time PCR法を用いて、アクアポリン遺伝子の発現の誘導あるいは抑制を観察する。

(5) (4)の結果をもとにWestern blot法を用いて、滑膜培養細胞のアクアポリン発現をタンパク質レベルでの確認する。

## 4. 研究成果

(1)RA, OAにて人工関節置換術を施行した際に得られた滑膜組織についてAQPの発現をreal time RT-PCRで解析した。滑膜組織を採

取した患者背景は Table1 のとおりである。その結果主に APQ-1 の発現を認め、また APQ-3, 9 の発現も認めた。APQ-1, 3 ついては RA, OA では発現の差は認めなかったが、APQ-9 については OA に比べ RA において有意に高い発現を認めた。(図 1)

Table 1. Clinical details of patients

OA (n = 32)	
Gender (female/male)	27/5
Age (yrs)	55–84 (72.6)*
Stage (III/IV)	8/24
Hydrarthrosis (positive/negative)	17/15
RA (n = 12)	
Gender (female/male)	12/0
Age (yrs)	53–84 (65.2)*
Disease duration (yrs)	1–32 (17.3)*
CRP (mg/dl)	0.48–6.07 (2.10)*
ESR (mm/h)	3–79 (39.9)*
RF (positive/negative)	11/1
Steinbrocker stage (III/IV)	5/7
Patient using DMARDs	
Methotrexate	5
Salazosulfapyridine	3
Bucillamine	3
Actarit	1
Patient using oral steroids	10

\*Presented as range (mean).

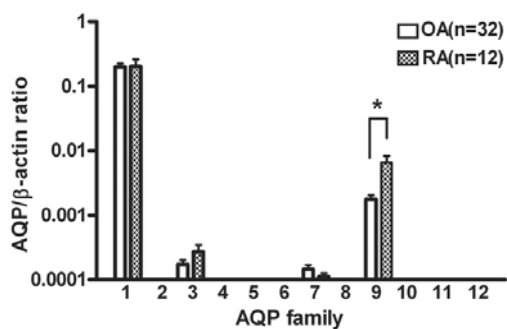


図 1

AQP-9mRNA は水腫(+)の滑膜組織で有意により強い発現を認めた。(図 2)

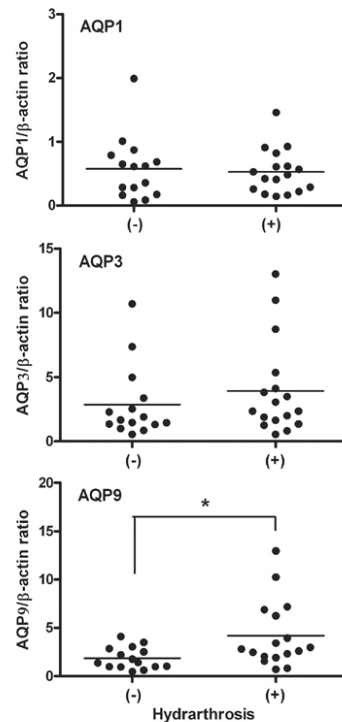


図 2

(2) 滑膜組織を抗 APQ-1, 3, 9 抗体にて免疫組織染色したところ、滑膜表層細胞、血管内皮細胞に APQ-1, 3, 9 が発現していることがわかった(図 3)。

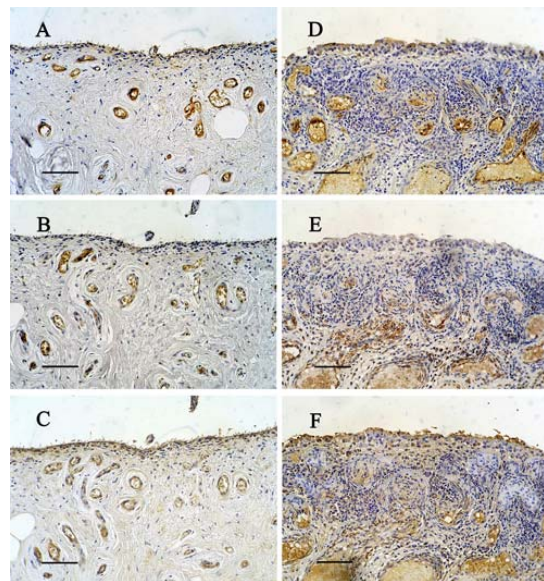


図 3

A. B. C. 変形性膝関節症由来滑膜

D. E. F. 関節リウマチ由来滑膜

A. D. 抗 AQP-1 抗体による免疫組織染色

B. E. 抗 AQP-3 抗体による免疫組織染色

C. F. 抗 AQP-9 抗体による免疫組織染色

(3) 人工膝関節置換術に際して採取した滑膜から培養した線維芽細胞様滑膜培養細胞 (FLSs) を用いて炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  にて刺激し、AQP-1, AQP-3, AQP-9 の発現を RT-PCR にて測定した。TNF $\alpha$  (0-10ng/ml) にて 8 時間 FLSs を各濃度で刺激したところ、AQP-9mRNA のみ濃度依存性に発現上昇をみた。(図 4)。

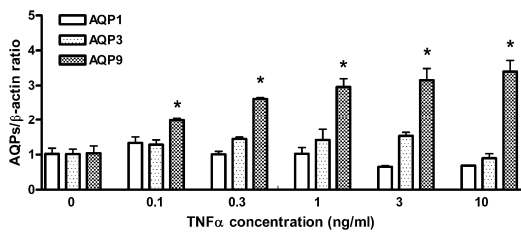


図 4

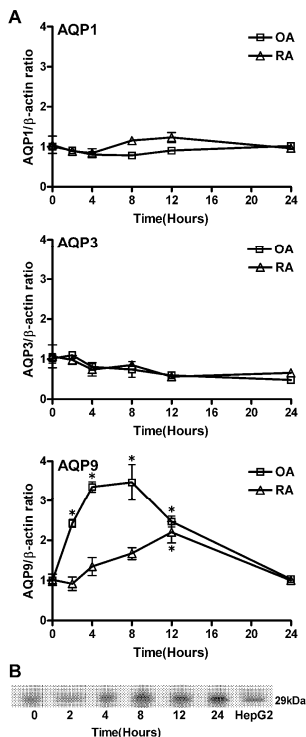


図 5

次に TNF $\alpha$  (1ng/ml) にて FLSs を刺激したところ、AQP-9mRNA のみ刺激後 8 から 12 時間をピークに誘導が認められ(図 5A)、Western blot 法にてタンパクレベルでも AQP-9 の発現誘導が確認された(図 5B)。

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 6 件)

- ① Waguri-Nagaya Y, Yamagami T, Tsuchiya A, Nozaki M, Goto H, Kobayashi M, Aoyama M, T. Tada T, Otsuka T. Silicone-induced foreign-body reaction after first metatarsophalangeal joint arthroplasty for Jaccoud's arthropathy. Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations) (in press) (査読 有)
- ② Morishima T, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate H, Arima H, Fujita Y, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H, Asai K, Sobue K. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. Neuroscience Research 61:18-26, 2008 (査読 有).
- ③ Sekiya I, Kobayashi M, Okamoto H, Iguchi H, Waguri-Nagaya Y, Goto H, Nozaki M, Tsuchiya A, Otsuka T. Arthroscopic synovectomy of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints. Tech Hand Up Extrem Surg 12:221-225, 2008 (査読 有).
- ④ Waguri-Nagaya Y, Kobayashi M, Goto H, Hisazaki S, Tsuchiya A, Otsuka T. Septic arthritis of the right ankle caused by Staphylococcus aureus infection in a rheumatoid arthritis patient treated with

etanercept. Mod Rheumatol 17:338-340, 2007 (査読 有).

⑤ Itoh Y, Hayashi H, Xu J, Takii T, Miyazawa K, Ariga H, Akahoshi T, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Okamoto T, Onozaki K. Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor alpha induced interleukin-1alpha mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells. Biol Pharm Bull 30:1140-1143, 2007 (査読 有).

⑥ Tanikawa T, Waguri-Nagaya Y, Kusabe T, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Gliostatin/thymidine phosphorylase-regulated vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes. Rheumatol Int 27:553-559, 2007 (査読 有).

[学会発表] (計 4件)

① 長原正静, 永谷祐子, 山上貴也, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. 変形性関節症および関節リウマチの滑膜組織におけるアクアポリンの発現. 第 52 回日本リウマチ学会総会 2008/4/23 札幌.

②長原正静, 永谷祐子, 山上貴也, 青山峰芳, 浅井清文, 多田豊曠, 大塚隆信. 関節水症におけるアクアポリン発現の検討. 第 23 回日本整形外科基礎学術集会 2008/10/24 京都.

③ 山上貴也, 永谷祐子, 長原正静, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. FK506 はリウマチ由来線維芽細胞様滑膜細胞において gliostatin 産生を抑制する. 第 23 回日本整形外科基礎学術集会 2008/10/24 京都.

④長原正静, 永谷祐子, 山上貴也, 青山峰芳, 浅井清文, 多田豊曠, 大塚隆信. 関節リウマチ、変形性膝関節症の滑膜組織におけるアクアポリン発現. 第 59 回名古屋市立大学医学会総会 2008/12/7 名古屋.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 隆信 (OTSUKA TAKANOBU)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 10185316

### (2) 研究分担者

永谷 祐子 (NAGAYA YUKO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 90291583

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 70212462

### (3) 連携研究者

なし