

平成21年 5月31日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19592175
研究課題名 (和文) RA 滑膜細胞における活性酸素種産生と細胞死に対するミトコンドリア MnSOD の効果
研究課題名 (英文) Effects of manganese superoxide dismutase (MnSOD) against mitochondrial reactive oxidative species and apoptotic cell deaths in RA synovial fibroblasts.
研究代表者 末永 重明 (SUENAGA SHIGEAKI) 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師 研究者番号：00136889

研究成果の概要：

慢性リウマチ性関節炎や変形性関節症などの関節炎の発症には、活性酸素 (ROS) や一酸化窒素 (NO) 発生が重要なイベントであることが知られている。ROS は細胞にアポトーシスなどの障害を与えるだけでなく、炎症の活動性や伝達因子として影響することが明らかとなっている。

本研究により、ミトコンドリアに局在する抗酸化酵素 (マンガンスーパーオキシドディスムターゼ) は、ミトコンドリア由来 ROS を消去する作用があり、細胞障害や炎症作用を抑制す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
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：(1) リウマチ性関節炎 (2) 活性酸素種 (3) 細胞死 (4) ミトコンドリア
(5) MnSOD (6) 滑膜線維芽細胞 (7) 定量 PCR (8) Nondenatured gel assay

1. 研究開始当初の背景

慢性リウマチ性関節炎 (RA) や変形性関節症 (OA) などの関節疾患は、加齢に伴い発症しやすく、更年期以降の女性に多くみられる。日常生活を営む上で、関節疼痛や関節の可動制限は重篤な悩みである。これら関節疾患の発症には、関節内の滑膜や軟骨細胞などから産生される活性酸素種、種々のサイトカ

イン、分解酵素などが深く関わり、現在までに様々な因子が RA の病態の進行に関与することが解明されてきた (Van der AA et al. Am J Pathol 1995, Cawston TE et al. Arthritis Rhum 1998, Lee DM. The Lancet 2002)。

我々は、これまでに RA 患者の滑膜細胞を用いた研究で、関節炎の発症の原因として活性酸素 (ROS) や一酸化窒素 (NO) 産生が

重要なメディエーターであることを報告してきた。ROSは細胞に障害を与えるだけでなく、炎症の活動性や伝達因子として広く作用していることが明らかとなっている(Hensley K. et al. Free Radic Biol Med. 2000.)。また、細胞内に障害をもたらす活性酸素(スーパーオキシド)の除去には、ミトコンドリアに局在するマンガンスーパーオキシドディスムターゼ(MnSOD)が重要な役割を果たしていることが知られている(Majima et al. J Biol Chem. 1998.)。多くの疾病(老化、発癌、放射線障害など)でMnSOD効果に関する報告がみられるが、関節疾患でROSとMnSOD活性、発現量との関連性について言及した報告は見当たらない。本研究では、(1) ROS・NO産生やアポトーシスの発現が細胞内ミトコンドリアのMnSOD活性や発現量に依存するのではないか、(2) MnSOD量がリウマチ性関節炎(RA)の病態の進行ならびに炎症の活動性と関連があるのではないかと仮説を立てた(図1)。

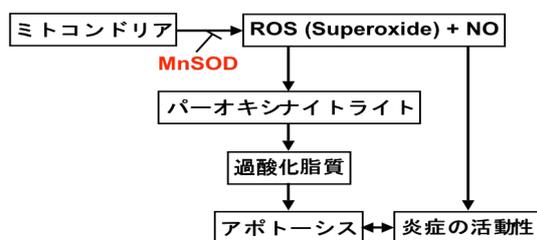


図1. RA病態とMnSODの関わり(仮説)

2. 研究の目的

本研究では、(1) MnSOD発現を抑制したRA細胞モデルを作製し、酸化ストレスによるミトコンドリア活性酸素産生の増大やアポトーシス誘導に対するMnSODの効果について解明する。(2) 得られたミトコンドリア障害に対するMnSODの効果と炎症の活動性との関わりについて評価を行い、世界に先駆けてこの仮説を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RA滑膜線維芽細胞を用い、MnSOD発現の異なる細胞モデルの確立を行った。MnSODの発現抑制については、MnSOD siRNAのコンストラクト(Ambion社)を用いて、Lipofectamine 2000により細胞内に遺伝子の導入を行った。

① MnSODの遺伝子レベルでの発現量は、ABI PRISM 7000装置を用いTaqMan probeによる定量PCR法で検討した。

② 蛋白レベルでのMnSOD活性については、Nondenatured gel assay法で定量的に評価を行った。

(2) MnSOD発現を抑制したRA細胞におけるMnSOD活性および発現量の程度をControl siRNA細胞ならびに親株細胞と比較した。

(3) MnSOD発現を抑制したRA細胞を用いて、サイトカイン刺激(IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ)および無刺激下で培養を行った。

(4) 培養生細胞の活性酸素の分布についてはHPF(Hydroxyphenyl Fluorescein, 第一化学薬品)蛍光測定試薬、NOの分布はDAF(Diaminofluorescein, 第一化学薬品)蛍光測定試薬を用いて、レーザー共焦点顕微鏡(波長488nm)で観察を行った。また、蛍光度測定用のソフトウェア(IPLab Spvtrium version 3.0 Scanalytics)を用い、ROSやNOの発現量を半定量的に解析した。また、ミトコンドリアの局在を確認するため、滑膜線維芽細胞をMitoTracker Red CMXRos(Invitrogen, Carlsbad, VA, U.S.A.)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡(レーザー光波長488nm)で画像を作成した。さらにHPF画像とMitoTracker画像の重ね合わせを行った。

(5) 細胞を固定後、過酸化脂質を検出するHNEモノクローナル抗体を用い免疫染色を行い、過酸化脂質の産生をレーザー共焦点顕微鏡(波長488nm)で観察し、半定量的に解析した。

(6) Hoechst 33342染色法により核染色体の断片化を観察し、アポトーシスの頻度を調べた。3個以上の核の断片化を有するものをアポトーシスとみなした。

(7) RA滑膜細胞における炎症の活動性については、IL-1 β 抗体を用いて、レーザー共焦点顕微鏡(波長488nm)による蛍光免疫染色法で解析した。

以上より、滑膜細胞内のMnSOD活性および発現量とROS・NO産生、アポトーシスとの関連性、さらに炎症の活動性との関連について検討した。

4. 研究成果

(1) siRNAによるMnSODの発現抑制

① siRNAによるMnSOD mRNAの発現については、トランスフェクト3日後で最も抑制された。Control siRNAを行った細胞や

トランスフェクションを行っていない細胞(親株細胞)に比較して、MnSOD mRNA は20%程度まで発現抑制がみられた。② Nondenatured gel assayによるMnSOD活性の結果については、トランスフェクション5日後で最も抑制され、Control siRNAを行った細胞や親株細胞に比べて、約60%にまで発現抑制が認められた(図2)。

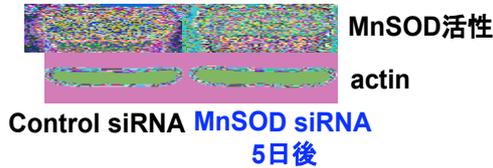


図2. Nondenatured gel assayによるMnSOD活性

(2) MnSOD siRNAによるROSとNOの変化

MnSOD遺伝子のsiRNAを導入した群では、Control siRNAを行った群に比較して、サイトカイン刺激によりROS量が有意に増加した(表1)。また、細胞から発生するROSは、Mito Trackerとの重ね合わせによりミトコンドリア由来であることが示された(図3)。

表1. MnSOD発現抑制細胞におけるミトコンドリアROSの検出

siRNA	fluorescent intensity (ROS)	
	cytokines (-)	cytokines (+)
control siRNA	30.15 ± 0.46	33.29 ± 0.55
MnSOD siRNA	31.51 ± 0.50	36.57 ± 0.62

mean ± SE

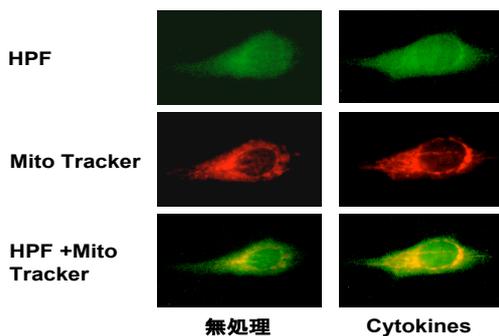


図3. ミトコンドリア由来ROSの同定

一方、MnSOD遺伝子のsiRNAを導入した群では、NO産生に対してサイトカイン刺激の効果は認められなかった(表2)。

表2. MnSOD発現抑制細胞におけるNOの検出

siRNA	fluorescent intensity (NO)	
	cytokines (-)	cytokines (+)
control siRNA	33.58 ± 0.69	38.60 ± 0.89
MnSOD siRNA	33.46 ± 0.67	38.08 ± 0.86

mean ± SE

(3) MnSOD siRNAによる過酸化脂質産生とアポトーシス発現の変化

MnSOD siRNAにより、過酸化脂質産生やアポトーシスはサイトカイン刺激で有意に増加が認められた(表3, 4)。

表3. MnSOD発現抑制細胞における過酸化脂質の検出

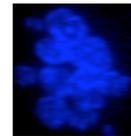
siRNA	fluorescent intensity (HNE)	
	cytokines (-)	cytokines (+)
control siRNA	32.14 ± 0.80	36.69 ± 0.91
MnSOD siRNA	35.15 ± 1.04	39.43 ± 0.99

mean ± SE

表4. MnSOD発現抑制細胞におけるアポトーシスの発現

siRNA	apoptotic index (%)	
	cytokines (-)	cytokines (+)
control siRNA	0.44 ± 0.07	1.64 ± 0.18
MnSOD siRNA	0.73 ± 0.13	2.82 ± 0.14

mean ± SE



Hoechst 33342によるアポトーシスの検出
核の断片化

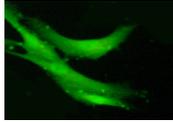
(4) RA滑膜細胞のMnSOD発現抑制と炎症活動性との関連

MnSOD発現が抑制された細胞は、Control siRNAを行った細胞に比較して、サイトカイン刺激により細胞内とくに核内のIL-1β量は有意に上昇した(表5)。

表5. MnSOD発現抑制とIL-1β発現との関係

siRNA	fluorescent intensity (IL-1β)	
	cytokines (-)	cytokines (+)
control siRNA	42.57 ± 0.54	45.17 ± 0.64
MnSOD siRNA	44.57 ± 0.58	48.70 ± 0.80

mean ± SE



細胞内 (とくに核内)
のIL-1 β の発現

(5) 本研究では、MnSOD 発現抑制細胞を用いることにより、RA 滑膜細胞内のミトコンドリア由来 ROS 量の増大が、アポトーシス発現や炎症の活動性と関連することが示唆され、本研究の仮説が実証された。

また、新しい蛍光試薬 HPF によって観察された ROS の分布は細胞核周囲の細胞質内に多く認められた。このことは、ミトコンドリア由来 ROS が細胞内の ROS 産生の主体であり、このミトコンドリア由来 ROS が RA におけるアポトーシスや炎症活動を誘導する初期ステップであることを示唆している。

これらの研究成果は、国内外を通じて報告はなく、初めての研究である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 末永重明、犬童寛子、佐藤強志、永山邦宏、宮脇正一、中村康典、中村典史、馬嶋秀行、咀嚼筋障害 (浮腫性変化) に対する Magnetization Transfer contrast 法の応用、
日本歯科放射線学会第 49 回学術大会、
2008 年 5 月 17 日- 18 日、名古屋
- ② 末永重明、犬童寛子、富田和男、佐藤強志、馬嶋秀行、関節炎症性病変アポトーシスにおけるミトコンドリア発生活性酸素種の役割、第 61 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2007 年 4 月 19 日- 20 日、神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

末永 重明 (SUENAGA SHIGEAKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00136889

(2)研究分担者

富田 和男 (TOMITA KAZUO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：60347094

犬童 寛子 (INDO HIROKO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00301391

馬嶋 秀行 (MAJIMA HIDEYUKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60165701

(3)連携研究者

該当者なし