

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591448

研究課題名(和文)滑膜線維芽細胞の脂肪分化誘導における上皮間葉移行分子機序の解明

研究課題名(英文)Analyses of gene expressions related with rheumatoid arthritis and epithelial mesenchymal transition in fibroblast-like synoviocyte by adipogenesis.

研究代表者

杉山 英二(SUGIYAMA, EIJI)

広島大学・大学病院・教授

研究者番号：70179167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪分化誘導の有無で比較した遺伝子発現検索により、脂肪分化によってMMP-1、-2の発現低下を確認し、蛋白レベルでも確認した。滑膜細胞の脂肪分化誘導による、間葉系マーカーに関して、平滑筋アクチンの発現低下を確認した。新たな脂肪分化誘導の方法の検討では、プロポリス由来天然PPAR ligandであるArtepillin-Cによる脂肪分化誘導を試みたところ、有効な滑膜細胞の脂肪分化誘導が可能であり、この過程でMMP-1、MMP-2の分泌低下が確認された。Artepillin-Cによる滑膜細胞の脂肪分化誘導は、関節リウマチ治療戦略として有効であることが予想された。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively analyzed the gene expression in synoviocytes before and after adipogenesis. As a result, we found that MMP-1 and MMP-2 transcripts are down-regulated in synoviocyte after adipogenesis induction. The protein expressions of MMP-1 and MMP-2 are also determined. We expected that mesenchymal phenotype is diminished in synoviocyte by adipogenesis induction. As we expected, the mRNA and protein expressions of smooth muscle actin, one of mesenchymal markers, are reduced by adipogenesis induction. We found Artepillin-C, a natural PPAR ligand derived from propolis is a potent adipogenesis inducer. Consistent with the previous data, MMP-1 and MMP-2 are reduced in synoviocyte after adipogenesis that is induced by Artepillin-C. These findings suggested that adipogenesis induction of synoviocytes by using Artepillin-C contribute to the treatment of rheumatoid arthritis.

研究分野：リウマチ・膠原病学、骨免疫学

 キーワード：関節リウマチ 滑膜細胞 脂肪分化 間葉系幹細胞 上皮間葉移行 サイトカイン プロテアーゼ P
PAR

1. 研究開始当初の背景

分子標的生物学的製剤は関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の自己免疫異常と炎症を制御し、高い寛解誘導の達成をもたらした。一方、RA は関節固有の滑膜細胞の増殖を特徴とする滑膜炎によって病理学的定義される病態であり、その本質的解明のためには滑膜細胞の理解を要する。しかし、この理解が不十分なため RA 病変の主座である滑膜炎の根治を達成できないのが現状である。寛解の先にある「RA の治癒」の達成には分子標的薬のトライアルと平行して、継続的な滑膜細胞研究の試みは不可欠である。線維芽滑膜細胞 (fibroblast-like synovial cells: FLS) は滑膜炎組織の主要構成細胞であり、サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼの主要産生細胞である。このため、旧来よりこれを物理的に取り除くことが臨床的に行なわれ一定の効果を待てきた。

一方、Lieden 大学 Luyten らのグループは滑膜線維芽細胞が骨髄中の間葉性幹細胞と同様に、骨・軟骨・脂肪・筋肉へと分化することを報告 (Arthritis Rheum. 2001 44:1928-42.) したが、我々は滑膜線維芽細胞の脂肪分化に着目し、「滑膜細胞の脂肪細胞への分化による RA 治療」の可能性を提唱した (Clin Exp Immunol. 2002 129:379-84. Rheumatology (Oxford). 2004 43:448-52.). すなわち、

- (1) 滑膜線維芽細胞は脂肪細胞に分化する
- (2) 脂肪化滑膜線維芽細胞では IL-6 と MMP-2 の産生が低下

これらの発見は滑膜線維芽細胞の脂肪分化誘導により、RA 病態を形成する滑膜線維芽細胞の病的機能が是正可能であることを意味し、「滑膜細胞の分化誘導による RA 治療」の可能性を示唆するものである。

本研究は、生理学的、診断学的、治療学的に以下のような意義を持つと考えられる。

- (1) 生理学的意義：脂肪分化を介した関節内構造の恒常性維持という、滑膜線維芽細胞の新たな生理的機能の発見につながる。
- (2) 診断学的意義：骨、軟骨の変化に平行する脂肪組織の変化を、形態学的、分子学的に捉える事で、RA や OA の早期診断、予後推定の向上へ繋がる可能性がある。
- (3) 治療学的意義：滑膜線維芽細胞を人為的に脂肪細胞へ分化誘導することで、炎症惹起性の特性を取除き、特に RA に対してこれまでになく独創的な治療戦略のシーズを提供する。

2. 研究の目的

FLS の脂肪分化に関する生理学的意義、診断学的意義、治療学的意義に関する情報を深めることで、新たなアプローチで関節リウマチを捉える基盤となり得る。この目的のために、FLS の脂肪分化あるいはサイトカイン刺激環境下での、FLS の脂肪分化あるいは脂肪分化抑制における分子発現の挙動を把握する

こと、また各種 PPAR ligand, agonist により、サイトカイン環境下における脂肪分化抑制を凌駕して FLS を脂肪分化へ導く試みを行うことでより臨床へ貢献できる研究へと発展させ、FLS をターゲットとした治療実用化への検討を行うことが目的である。

3. 研究の方法

FLS を用いて、各種合成 PPAR ligand (Tro-, Pio-, Rosi- glitazones) あるいは近年その PPAR 刺激作用が明らかになった telmisartan、天然のコンパウンドを用いて FLS の脂肪分化誘導を行なった。特に中部大学との共同研究により、脂肪分化誘導の方法の検討では、天然に存在する PPAR 刺激作用分子で、脂肪分化誘導能力を有しているコンパウンドとして Artepillin-C と Magnolol を入手し、これらによる FLS の脂肪分化誘導とその効果を検証した。さらにこの際の PPAR、fabp4、lpl 遺伝子発現制御パターンを検討し、これらの合成 PPAR 作動薬の遺伝子発現のプロファイルを同定し、いずれの薬剤が RA の病態緩和に寄与する可能性が高いのか検証する。さらに、この系におけるサイトカインおよびプレテアーゼ賛成に対する影響を検討した。

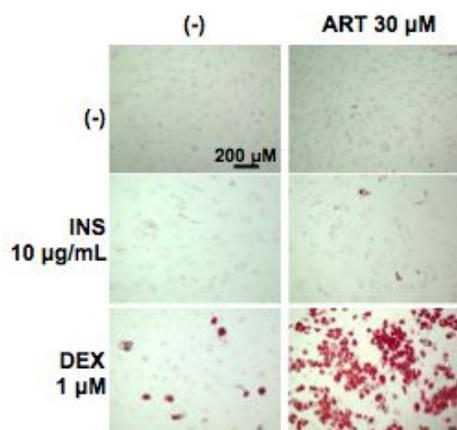
滑膜細胞の脂肪分化誘導による機能変換を捉える方法として、間葉細胞移行に関する研究を行った。具体的には間葉系マーカーとされている smooth muscle actin, cadherin などの発現を転レベルで解析した。

4. 研究成果

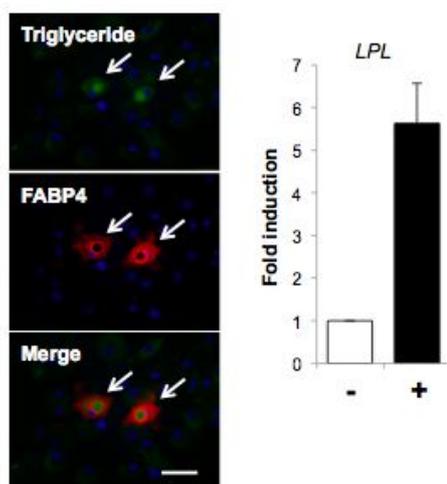
滑膜細胞の活性化に関しては、脂肪分化誘導有無で比較した DNA array を用いた遺伝子発現検索により、脂肪分化によって IL-6、MMP-1、-2、接着因子 ICAM-1 の発現低下を見出していた。IL-6、MMP-1、-2 に関しては蛋白レベルでの低下も確認できたが、ICAM-1 に関しては、リンパ球を用いた接着アッセイにおいて有意差は得られなかった。また、脂肪分化誘導の方法が異なると、その遺伝子発現パターンも少しずつ異なり、脂肪分化といっても一概にその機能変換の一定したパターンを予測できるものではないことも判明した。滑膜細胞の脂肪分化誘導による上皮間葉移行に関しては、間葉系マーカーとされている smooth muscle actin の発現低下は明らかであったが、cadherin に関しては元々の発現が低いこともあり、その発現に関しては明らかな変化は指摘し得なかった。

脂肪分化誘導の方法の検討では、天然に存在する脂肪分化誘導能力を有しているコンパウンドとして Artepillin-C と Magnolol による脂肪分化誘導とその効果を検証した。これらのコンパウンドはこれまでの方法と同様に滑膜細胞の脂肪分化誘導をもたらすが、Magnolol は脂肪分化誘導濃度と細胞障害濃度が狭いため、我々の目的には Artepillin-C が適していると判断した (図 1)。

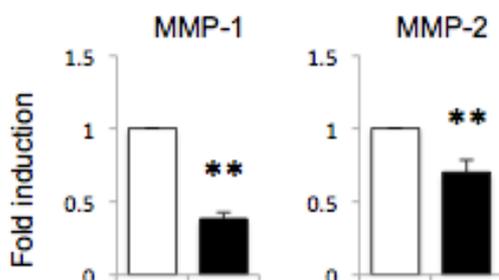
(図1)Artepillin-Cはプロポリスから抽出された天然の PPAR ligand である。デキサメサゾン (DEX) を要するものの、FLS の分化誘導作用を有している。赤色は細胞内脂肪的を染色する Oil red O 染色を示す。



(図2)Artepillin-Cによる脂肪分化誘導を行なった滑膜細胞は中性脂肪 (Triglyceride) を合成し、脂肪細胞マーカーである FABP4 (fatty acid binding protein 4) 蛋白を発現し、LPL (Lipoprotein lipase) の mRNA を発現していることがわかった。



(図3)Artepillin-Cによる滑膜細胞の脂肪分化誘導によって、MMP-1, MMP-2 の mRNA 発現低下が確認された。



これらのデータにより、Artepillin-C により FLS は脂肪分化するのみならず、その機能転換が可能であることが判明し、そのポテンシャルに関しては関節リウマチ治療薬として有効であることが予想されるため、特許申請を行った。

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 8 件)

1. Mokuda S, Murata Y, Sawada N, Matoba K, Yamada A, Onishi M, Okuda Y, Jouyama K, Sugiyama E, Takasugi K. Tocilizumab induced acquired factor XIII deficiency in patients with rheumatoid arthritis. PLoS One. ,8, e69944, 2013, 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0069944.

2. Okada A, Yamasaki S, Koga T, Kawashiri SY, Tamai M, Origuchi T, Nakamura H, Eguchi K, Kawakami A. Adipogenesis of the mesenchymal stromal cells and bone oedema in rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. ,30, 332-7, 2012, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325242>

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Satoshi Yamasaki, Fibroblast-Like Synoviocytes Inhibit WNT Signaling Pathway by Secreting Dickkopf-1, 80th American College of Rheumatology, 14-19 November 2014, Boston (USA)

2. 山崎聡士, Artepillin-CとMagnololによる滑膜細胞脂肪分化誘導, 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2014.4.24-26, グランドプリンス新高輪 国際館パミール(東京都港区)

3. 山崎聡士, 天然PPAR リガントによる滑膜細胞の脂肪分化誘導と関節リウマチ治療への応用, 第42回日本臨床免疫学会総会, 2014.9.25-27, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

4. Satoshi Yamasaki, Changes in MMPs in Fibroblast-Like Synoviocytes Following Adipogenesis. 79th American College of

Rheumatology , 25-30 October 2013 , San Diego (USA)

5. 山崎聡士 , 脂肪分化誘導による滑膜細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制 , 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 ,2013.4.18-20 ,国立京都国際会館(京都府京都市左京区)

6. 山崎聡士 , 脂肪分化誘導による滑膜細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制 , 第 41 回日本臨床免疫学会総会 , 2013.11.27 ,海峡メッセ下関(山口県下関市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 1 件)

名称 : 関節リウマチの処置薬
発明者 : 山崎聡士、杉山英二、禹 濟泰、
車 炳允
権利者 : 広島大学
種類 : 特許
番号 : 特願 2014-190312
出願年月日 : 2014 年 9 月 18 日
国内外の別 : 国内

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/hrheuma/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 英二 (SUGIYAMA Eiji)
広島大学・大学病院・教授
研究者番号 : 70179167

(2) 研究分担者

山崎 聡士 (YAMASAKI Satoshi)
広島大学・大学病院・病院助教
研究者番号 : 30367388