

令和元年5月13日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15669

研究課題名(和文) connexin43を分子標的とした関節リウマチに対する創薬基盤の構築

研究課題名(英文) Connexin 43 as a therapeutic target in rheumatoid arthritis

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)活動期における運動療法がconnexin(Cx)43の発現と関節に与える影響についてラットRAモデルを用いて評価した。トレッドミル走行をさせると滑膜における炎症性サイトカインやCx43の発現が低下し、軟骨変性が抑制され、骨量が増加した。RAモデルにトレッドミル走行をさせることで滑膜へも適度な機械的刺激が負荷され、細胞間コミュニケーションを安定化させ炎症性サイトカインの発現が低下し、軟骨変性や骨破壊が抑制されることを明らかにした。本研究結果は、RAに対するトレッドミルを用いた効果的なconnexin 43制御療法の開発の礎となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動療法は安全で簡便に行えることから広く普及しており、RAに対しても運動療法は推奨されているが、適切な強度や運動時間は定まっていない。RA活動期に対する運動は関節破壊を増悪させる危険性もある。そのため、RAに対する効果的な運動療法の開発には、運動が炎症活動期の関節に及ぼす分子生物学的なメカニズムや関節破壊に与える影響を解明することが不可欠である。本研究結果から、RAに対する運動療法を軸としたこれまでにない疾患アプローチを有する細胞間コミュニケーションを制御療法の開発にむけた基礎データを構築できたと考える。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the influence of treadmill running on RA joints using CIA rat model. DA rats were randomly divided into four groups: The control group, treadmill group, CIA group, and CIA + treadmill group. Destruction of the ankle joint was evaluated by histological analyses. Morphological changes of subchondral bone were analyzed by μ -CT. CIA treatment-induced synovial membrane invasion, articular cartilage destruction, and bone erosion. Treadmill running improved these changes. The synovial membrane in CIA rats produced a large amount of TNF- and Connexin 43; production was significantly suppressed by treadmill running. On μ -CT of the talus, BV/TV was significantly decreased in the CIA group. MSV, an index of bone loss, was significantly increased. These changes were significantly improved by treadmill running. These findings indicate that treadmill running in CIA rats inhibited synovial hyperplasia and joint destruction.

研究分野：関節リウマチ，細胞間コミュニケーション

キーワード：connexin 43 synovitis rheumatoid arthritis

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 病態では、炎症性サイトカインの過剰産生、細胞と細胞外マトリックスを接着するインテグリンの機能異常、およびB細胞の抗体産生を制御しているテストステロンなどのホルモン分泌異常などにより、細胞同士のコミュニケーションが破綻する。その結果、炎症性の滑膜細胞が増殖し、破骨細胞が誘導される。これらの細胞間コミュニケーションの重要な器官の一つに細胞間接合装置がある。中でもギャップ結合は、細胞間で物質が移動する唯一の細胞間結合装置であるため、われわれは、ギャップ結合に着目して研究を推し進めてきた。RA動物モデルにおける滑膜組織で、ギャップ結合タンパクの発現が異常亢進し、中でも最も高発現しているギャップ結合タンパクは connexin 43(Cx43)であることを明らかにした。またRA動物モデルの滑膜内にCx43に対する small interfering RNA (siCx43)の導入に成功し、滑膜炎と骨破壊に対する治療効果を明らかにした。さらにヒトRA滑膜において tumor necrosis factor (TNF) - α と連動して高発現し、Cx43の発現が既存の薬剤の影響を受けずに亢進していることを明らかにした。今後は、Cx43の発現制御法を開発する必要がある。一方、運動器疾患に対する運動療法是安全で簡便に行えることから広く普及している。中でもトレッドミルを用いた運動療法是関節に対して保護的に働き、日常生活動作を向上させる。RAに対しても運動療法是推奨されているが、その適切な強度や運動時間は定まっていない。運動が炎症活動期のRA関節に及ぼす分子生物学的なメカニズム、細胞間コミュニケーションに与える影響を解明することが不可欠である。滑膜における適度な機械的刺激はCx43の発現を低下させることが知られているが、in vivoでのCx43に対する影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットRAモデルを用いて炎症活動期における運動療法的Cx43および炎症性サイトカインの発現に与える影響を解析し、関節破壊を抑制できる運動療法的の開発にむけた基礎データを構築することである。

3. 研究の方法

動物として8週齢のDark Agoutiラットを用いた。RAモデルとしてII型コラーゲンを感作させたコラーゲン誘発性関節炎 (collagen induced arthritis: CIA)を用いた。トレッドミル走行の設定を1日30分間、12m/分とし、免疫感作14日後から28日間施行した。正常ラットを自由飼育した対照群とトレッドミル走行をさせたトレッドミル群、RAモデルを自由飼育したCIA群とトレッドミル走行をさせたCIA+トレッドミル群の4群を作成した。免疫感作42日後に両足関節を摘出した。右側で組織学的検討として Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、サフラニンO染色、TNF- α とCx43の免疫組織化学染色を行った。HE染色とサフラニンO染色の結果を関節炎スコアで評価した。左側では μ -CT撮影を行い、距骨全体を関心領域として骨形態を評価した。骨量、骨梁間隙および海綿骨の粗鬆化を表す marrow star volume (MSV)を、骨破壊評価として骨破壊体積量を測定した。破骨細胞と骨新生組織の評価として酒石酸耐性酸性フォスファターゼ/アルカリフォスファターゼ共染色を施行した。

4. 研究成果

HE染色とサフラニンO染色では、CIA+トレッドミル群における関節破壊はCIA群より軽度であり、関節炎スコアは良好であった。対照群とトレッドミル群の間では差はなかった。(図1, 2)

図1 トレッドミル走行による組織学的影響

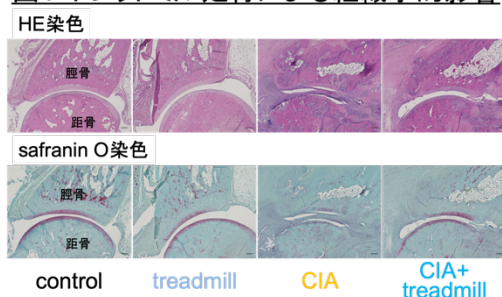
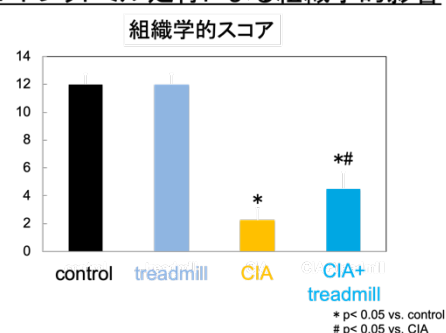


図2 トレッドミル走行による組織学的影響



免疫組織化学染色では、CIA+トレッドミル群とCIA群のTNF- α とCx43の産生量は対照群と比較して多く、CIA+トレッドミル群でのこれらの産生量はCIA群より少なかった。(図3, 4)

図3 関節滑膜に対する組織学的影響

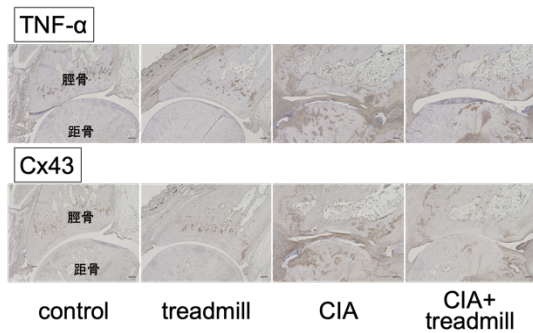
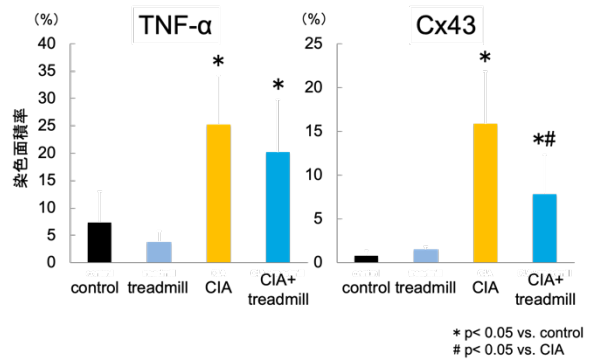
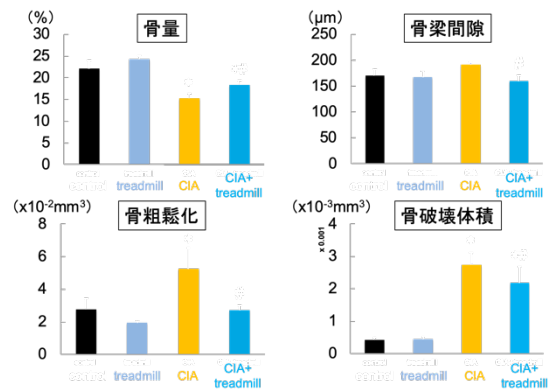
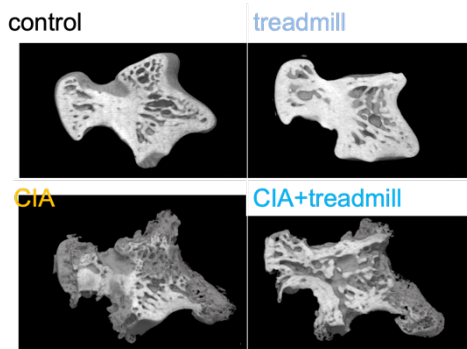


図4 関節滑膜に対する組織学的影響



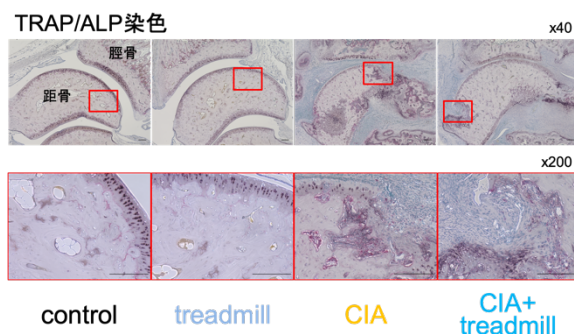
μ -CTによる骨形態評価では、CIA+トレッドミル群とCIA群の海綿骨量は対照群と比較し低値であり、CIA+トレッドミル群の海綿骨量はCIA群と比較し高値であった。CIA+トレッドミル群の骨梁間隙はCIA群よりも狭小化していた。CIA群のMSVは対照群より重度であったが、CIA+トレッドミル群のMSVは対照群と同等であり、CIA群より軽度であった。

図5 骨に与える形態学的影響



CIA+トレッドミル群とCIA群の骨破壊体積量は対照群と比較して増加し、CIA+トレッドミル群の骨破壊体積はCIA群よりも減少していた。酒石酸耐性酸性フォスファターゼ/アルカリフォスファターゼ共染色において、CIA+トレッドミル群ではCIA群と比較し、パンスス周囲の破骨細胞数が少なく、骨新生組織が多かった。(図6)

図6 骨破壊に与える影響



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Fujii Y, Kishida T, Ichimaru S, Tsuchida S, Shirai T, Ikoma K, Mazda O, Kubo T. Treadmill Running Ameliorates Destruction of Articular Cartilage and Subchondral Bone, Not Only Synovitis, in a Rheumatoid Arthritis Rat Model. Int J Mol Sci. (査読あり) 19(6). pii: E1653. 2018 DOI: 10.3390/ijms19061653.

- ② Matsuki T, Arai Y, Tsuchida S, Terauchi R, Oda R, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T.
Expression of Connexin 43 in Synovial Tissue of Patients With Rheumatoid Arthritis.
Arch Rheumatol. eCollection 2016.
DOI: 10.5606/ArchRheumatol.2016.5597.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 土田真嗣, 小田 良, 新井祐志, 遠山将吾, 下村征史, 徳永大作, 久保俊一
関節リウマチ動物モデルにおけるトレッドミル走行の効果
第 21 回比叡 RA フォーラム, 2018
- ② 藤井雄太, 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 土田真嗣, 下村征史, 松田 修, 久保俊一
トレッドミル走行がラット関節炎モデルの膝関節に与える組織学的評価
第 33 回日本整形外科基礎学術集会, 2018
- ③ Fujii Y, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Shimomura S, Mazda O, Kubo T
Histological evaluation of treadmill running on knee joint of rat arthritis model
26th Annual Meeting of European Orthopaedic Reserch Society, 2018
- ④ Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Ichimaru S, Fujii Y, Mazda O, Kubo T
The effects of treadmill exercise at a single time on knee articular cartilage in vivo
26th Annual Meeting of European Orthopaedic Reserch Society, 2018
- ⑤ Shimomura S, Tsuchida S, Arai Y, Nakagawa S, Inoue H, Ichimaru S, Mazda O, Kubo T
Analysis of the expression of connexin 43 in synovial tissue of patients with arthritis
63th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2017
- ⑥ Shimomura S, Tsuchida S, Arai Y, Nakagawa S, Inoue H, Ichimaru S, Fujii Y, Mazda O, Kubo T
Regulation of inflammatory cytokine expression and osteoclastgenesis by gap junctional protein in vitro and in vivo
The 5th annual meeting of the international cytokine and interferon society, 2017

[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>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：新井 祐志

ローマ字氏名：(ARAI Yuji)

研究協力者氏名：中川 周士

ローマ字氏名：(NAKAGAWA Shuji)

研究協力者氏名：井上 裕章

ローマ字氏名：(INOUE Hiroaki)

研究協力者氏名：寺内 竜

ローマ字氏名：(TERAUCHI Ryu)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。