

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08606

研究課題名(和文) B細胞の活性化及びループス腎炎におけるギャップ結合蛋白Connexin43の役割

研究課題名(英文) Role of gap junction protein connexin43 in B cell activation and lupus nephritis

研究代表者

姚 建 (Yao, Jian)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：50303128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ループス腎炎(LN)の発症メカニズムには、B細胞が中心的な役割を果たしています。本研究では、B細胞の活性化およびLNの病態に深く関わる可能性が高いギャップ結合タンパク質であるコネキシン43(Cx43)に注目しました。培養試験により、Cx43がB細胞の酸化ストレス状態を調節し、抗体の産生を制御することが明らかになりました。さらに、SLEモデルマウスにおいても、Cx43が体内抗体の産生およびLN腎炎の進展に深く関与していることが示されました。したがって、本研究からCx43がSLEの病態において重要な役割を果たしていることが示され、Cx43を標的とした新たなSLE治療法の開発が期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ギャップ結合タンパクであるCx43がB細胞の抗体産生を制御すること、またはSLEモデルマウスで腎臓障害を増悪させることを初めて示しました。これらの知見は、Cx43がSLE病態形成に重要な役割を担っていることを示唆し、Cx43を標的とした新規なSLE治療法開発に貢献することが期待されます。本研究の学術的意義は、SLE病態のメカニズム解明に寄与し、Cx43を介したB細胞の抗体産生制御機構の理解を深めたことです。また、社会的意義としては、LNに関連する腎機能障害や末期腎不全の予防・治療に向けた新たな治療法の開発に貢献し、SLE患者のQOLの向上につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：B cells play a central role in the pathogenesis of lupus nephritis (LN). In this study, we focused on connexin43 (Cx43), a gap junction protein that is likely to be deeply involved in the activation of B cells and the pathophysiology of LN. Through in vitro cell experiments, it was found that Cx43 contributed to antibody production via modulating intracellular redox status. Furthermore, in a mouse model of SLE, Cx43 was shown to be deeply involved in the production of antibodies and the progression of LN. In conclusion, this study demonstrated that Cx43 plays an important role in the pathophysiology of SLE, and that targeting Cx43 could be developed as a novel therapy against LN.

研究分野：病態生理学

キーワード：connexin43 ギャップ結合 B細胞 抗体産生 ループス腎炎 酸化ストレス 腎機能 プリスタン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫性腎臓疾患は、免疫系が自分の腎臓を誤って攻撃することで引き起こされる重篤な病気です。その中でも、ループス腎炎(LN)は、全身性エリテマトーデス(SLE)という全身性の自己免疫疾患の合併症として発生するもので、腎臓の機能障害や末期腎不全を招く危険性があります。LNの治療には、免疫抑制剤やステロイドなどの薬物が用いられますが、これらは副作用が大きく、効果が不十分な場合も多いです。したがって、LNの発症メカニズムを解明し、より効果的で安全な治療法を開発することが急務です。

(2) LNの発症メカニズムには、B細胞という免疫細胞が重要な役割を果たしています。B細胞は、感染した細菌やウイルスなどの異物に対して抗体という特異的なタンパク質を産生することで、体を守る働きをします。しかし、LNでは、B細胞が自分の腎臓に対する抗体を誤って産生してしまいます。この抗体は、腎臓の構造や機能に不可欠な部位である糸球体に結合し、そこで激しい炎症や組織損傷を起こします。また、B細胞は抗体以外にも、他の免疫細胞を刺激したり、サイトカインという情報伝達物質を放出したりして、LNの進行に寄与します。B細胞を特異的に除去する治療法は、LNの改善に有効であることが報告されています。しかし、B細胞だけではなく、T細胞やマクロファージなどの他の免疫細胞もLNに深く関わっています。これらの細胞は、腎臓固有の細胞と密接に相互作用しながら、LNの発生や進行に影響を及ぼします。このようにして、免疫細胞と腎臓固有の細胞は相互作用しながらLNの病態進展に影響します。この相互作用を阻害する治療法は、LNに対する新しいアプローチとなる可能性があります。

(3) 私たちは、この相互作用に関与する分子メカニズムの一つとして connexin43(Cx43)というタンパク質に着目しています。Cx43は gap junction(GJ)というチャンネルを形成するタンパク質であり、隣接する細胞間で物質や情報を直接交換することができます。Cx43はほぼすべての細胞に広く存在し、多くの生理的・病理的な過程に関与しています。私たちはこれまでにCx43が腎臓において重要な役割を果たすことを示しました。Cx43は免疫反応やレドックス調節に関与しています。Cx43は様々な免疫細胞や腎臓固有の細胞に発現し、その機能や活性化を制御します。Cx43はNF- κ Bやインフラマソームといった重要なシグナル伝達経路に影響を与えます。Cx43はNOやLPSなどの多くの炎症性物質によって活性化されます。Cx43はNADPHオキシダーゼやTXNIPといったレドックス関連タンパク質も調節します。これらのタンパク質はB細胞活性化や抗体産生に必要です。Cx43は細胞間相互作用や組織障害に関与しています。Cx43チャンネルは隣接する細胞間で物質や情報を交換することで、局所的な免疫反応や組織障害を増強します。Cx43チャンネルの欠損や阻害はこの過程を抑制します。Cx43はストレス応答や細胞死に関与しています。私たちはCx43が足細胞や尿管上皮細胞でストレス刺激に対する細胞死か生存かを定める要因であることを示しました。Cx43はB細胞活性化やIgG産生に影響しています。私たちの予備的な結果では、Cx43がマウス脾臓から分離したB細胞からIgG産生量に影響することを示しました。

(4) 以上から、Cx43はB細胞活性化やLN発生・進展に関連する多くの過程に関与しており、LN治療法開発の新規ターゲット候補である可能性が高いと考えられます。

2. 研究の目的

Cx43は、B細胞活性化に必要なケモカインやサイトカインの産生や分泌を制御することで、LNの病因に関係する多様な細胞レベルと分子レベルのメカニズムに影響を与えることが示唆されている。Cx43は、LNの発症や進展において重要な役割を果たし、LNの治療戦略における有望な標的候補である可能性が高い。本研究では、Cx43がB細胞活性化をどのように調節し、B細胞介在性自己免疫性腎臓疾患の発症や増悪にどのように関与するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

この研究では、Bリンパ球における connexin 43 (Cx43) の発現、分布、機能およびそのB細胞活性化と抗体産生への役割を明らかにすることを目的とした。さらに、ループス腎炎(LN)におけるCx43の関与も検証した。以下の方法で実験を行った。

(1) 動物実験：プリスタン誘導全身性エリテマトーデス(SLE)モデルを作成するために、10週齢のCx43野生型(Cx43^{+/+})マウスとCx43ヘテロマウス(Cx43^{+/-})マウスにプリスタンを腹腔内注射した。3ヶ月後と6ヶ月後にマウスの血清、尿および腎臓組織を採取し、病理的な変化を検討した。

(2) 脾臓細胞の培養：マウスから脾臓細胞を単離し、10% fetal bovine serum (FBS) を含むRPMI1640培地で37℃、5%CO₂で培養した。

(3) IgG 測定: 培養細胞やマウス血清中の IgG レベルは Western blot 法や Easy-Titer IgG assay kit で測定した。また、LN や腎組織中の IgG 沈着物は蛍光免疫染色法で観察した。

(4) 培養脾臓細胞における Cx43 の局在と機能: 培養細胞を固定し、抗 Cx43 抗体と Alexa Fluor 488 標識された二次抗体で染色して、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。また、Cx43 ヘミチャネルが開いているかどうかは、エチジウムブロマイド (EtBr) を用いた流動実験で評価した。

(5) 細胞増殖: 培養細胞を 96 ウェルプレートに播種し、24 時間後に Cell Counting Kit-8 assay kit で増殖率を測定した。

(6) HE 染色: LN の腎組織はパラフィン包埋し、4 μ m 厚さに切片して HE 染色法で染色した。染色された組織切片は光学顕微鏡で観察し、病理的な変化を評価した。

4. 研究成果

(1) SLE の病態に深く関与している抗体の産生における Cx43 の役割を明らかにするために、Cx43^{+/+}および Cx43^{+/-}マウスを用いて、血清中の抗体レベルと Cx43 の発現量の相関を検討しました。Cx43^{+/+}マウスでは、Cx43^{+/-}マウスに比べて、血清中の IgG レベルが有意に高くなることが分かりました。

(2) Cx43^{+/+}および Cx43^{+/-}マウスから分離した B 細胞を培養し、細胞内および細胞外の IgG レベルを測定しました。Western blot、Easy-Titer IgG Assay Kits、および免疫染色法を用いて、Cx43^{+/+}マウス由来の B 細胞が、無刺激および LPS 刺激下で、Cx43^{+/-}マウス由来の B 細胞よりも多量の IgG を産生していることが確認されました。これらの結果は、Cx43 が B 細胞における抗体産生に重要な役割を果たしていることを示しています。

(3) 次に、抗体産生における Cx43 の分子メカニズムを解析しました。LPS 刺激後、Cx43^{+/+}マウス由来の B 細胞では、培養液中の IgG レベルが Cx43^{+/-}マウス由来の B 細胞よりも有意に高まりました。また、酸化ストレス応答と関連する分子である NOX2、TXNIP、P38、およびタンパク質カルボニルの発現量も Cx43^{+/+}マウス由来の B 細胞で上昇しました。

(4) さらに、LPS 刺激による B 細胞での IgG 産生は、NOX2 阻害剤やギャップ結合阻害剤の添加によって抑制されました。一方、スーパーオキシドドナーの添加によって、IgG 産生が促進されました。これらの結果から、Cx43 は NOX2 を介した ROS 産生と酸化ストレス応答を制御し、それによって B 細胞での IgG 産生を調節することが示唆されました。

(5) また、LPS 刺激による B 細胞での ATP 放出や蛍光分子の取り込みを測定しましたが、両者ともに Cx43^{+/+}マウスと Cx43^{+/-}マウスで差異は見られませんでした。したがって、Cx43 ヘミチャネルは本研究で観察された現象には関与していない可能性が高いと考えられます。

(6) 最後に、プリスタン注射によって SLE モデルマウスを作成し、Cx43 の発現量と SLE 病態との関係を調べました。その結果、プリスタン注射後の血清中の IgG レベルや腎臓への IgG 沈着量が Cx43^{+/+}マウスで有意に高くなりました。また、腎臓組織学的変化や腎機能障害も Cx43^{+/+}マウスで重度であることが分かりました。

以上の結果から、本研究では初めて、Cx43 が B 細胞内で酸化ストレス応答を介して抗体産生を制御することを明らかにしました。また、Cx43 は SLE モデルマウスで腎臓障害を増悪させることも示しました。これらの知見は、Cx43 が SLE 病態形成に重要な役割を担っていることを示唆し、Cx43 を標的とした新規な SLE 治療法開発への貢献が期待されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Qiaojing Yan, Zhimin Mao, Jingru Hong, Kun Gao, Manabu Niimi, Takahiko Mitsui, Jian Yao	4. 巻 10/7
2. 論文標題 Tanshinone IIA stimulates cystathionine γ -lyase expression and protects endothelial cells from oxidative injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10071007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zhimin Mao, Yanru Huang, Bingqian Li, Kazutoshi Tomoya, Hideyuki Shinmori, Xuhui Zeng, Zhifeng Gu, Jian Yao	4. 巻 229
2. 論文標題 Hydrogen sulfide as a potent scavenger of toxicant acrolein.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 113111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ecoenv.2021.113111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Xiawen Yang, Zhimin Mao, Yanru Huang, Haizhao Yan, Qiaojing Yan, Jingru Hong, Jianglin Fan, Jian Yao	4. 巻 41
2. 論文標題 Reductively modified albumin attenuates DSS-Induced mouse colitis through rebalancing systemic redox state	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biol	6. 最初と最後の頁 101881-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2021.101881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Xiling Zhang, Zhimin Mao, Yanru Huang, Zhen Zhang, Jian Yao	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Gap junctions amplify TRPV4 activation-initiated cell injury via modification of intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent regulation of TXNIP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Channels	6. 最初と最後の頁 246-256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336950.2020.1803552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jingru Hong, Jian Yao	4. 巻 21(12)
2. 論文標題 Connexin Hemichannels Contribute to the Activation of cAMP Signaling Pathway and Renin Production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 4462-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 洪 静茹
2. 発表標題 培養腎尿管上皮細胞に対するアスコルビン酸と銅の併用の有害な影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巖 巧セイ
2. 発表標題 TNBS誘発マウス大腸炎におけるギャップ結合タンパク質コネキシン43の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学 教員情報検索
<http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/322/0032110/profile.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------