

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11214

研究課題名（和文）関節リウマチに対するギャップ結合蛋白制御と運動療法による新規治療法の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic approaches for rheumatoid arthritis through regulation of gap junction proteins and exercise therapy

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：トレッドミル走行の治療効果が関節リウマチ（RA）動物モデルの病期に影響を受けるかを検討した。関節炎期に走行させた群の関節破壊は対照群および関節炎発症前の群と比較して有意に軽度であった。関節炎期において1日30分間、12m/分のトレッドミル走行が滑膜におけるギャップ結合蛋白であるコネキシン（Cx43）発現を抑制して、関節破壊の抑制効果を示した。関節滑膜内でのCx43の染色面積は関節炎期に走行させた群で有意に小さく、関節炎スコアも良好であった。関節炎期のトレッドミル走行が滑膜に機械的刺激を加え、Cx43の発現を抑制することで関節破壊を軽減させた可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らはCx43が滑膜におけるTNF- α 、IL-6、IL-1など炎症性サイトカインを介して関節破壊を誘導することを明らかにしてきた。しかしRAにおいて運動負荷におけるCx43の発現動態は不明であった。本研究でRA動物モデルにおいて一定の運動療法により滑膜内におけるCx43の産生を抑制し、TNF- α の発現を抑制した。また、関節炎期における運動療法によりcathepsin K陽性細胞は減少し、骨形態評価で骨破壊を抑制する効果も明らかにした。临床上、RA患者の関節炎を経時的に評価し運動療法の施行時期や負荷量を決定することで、Cx43の発現を制御しながら効率的な治療を施行できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We assessed the differences in the efficacy of treadmill running on rheumatoid arthritis at various phases, using rat rheumatoid arthritis models. Rats with collagen-induced arthritis were used, and the phase after immunization was divided as pre-arthritis and established phases. Histologically, the groups with forced treadmill running in the established phase had significantly inhibited joint destruction compared with the other groups. The group with forced treadmill running in only the established phase had significantly better bone morphometry and reduced expression of connexin 43 and tumor necrosis factor α in the synovial membranes compared with the no treadmill group. Furthermore, few cells were positive for cathepsin K immunostaining in the groups with forced treadmill running in the established phase. Our results suggest that the efficacy of exercise therapy may differ depending on rheumatoid arthritis disease activity.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：ギャップ結合 コネキシン 関節リウマチ 運動療法 リハビリテーション治療

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、炎症性の滑膜増殖と骨髄免疫異常により関節破壊を生じる免疫疾患である。RA 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。細胞間コミュニケーションには、細胞分泌由来のエクソソーム、サイトカイン、ギャップ結合装置などがある。中でもギャップ結合は、隣接する細胞間で物質が移動する唯一の細胞間結合装置とされる。これまで、研究代表者はギャップ結合に着目し、RA 動物モデルにおける滑膜組織においてギャップ結合タンパクの発現が異常亢進し、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 の発現を制御することで治療効果を得た。さらに、ヒト RA 滑膜組織を手術時に採取し、既存の薬剤に影響されることなく Cx43 が TNF- α の発現と連動して、高発現していること、単離したヒト RA 滑膜組織における Cx43 の発現を阻害することで、複数の炎症性サイトカインを同時に発現抑制できることを解明してきた。以上のように研究代表者は、Cx43 が細胞間コミュニケーションを制御する RA の新規治療ターゲットであることを示してきた。

一方、RA に対するトータルマネジメントとして、薬物療法、リハビリテーション治療、手術療法、およびケアを含めた基礎療法の 4 本柱が重要とされている。2002 年の RA 治療ガイドラインには薬物療法とあわせて発症早期からのリハビリテーション治療も推奨されるようになった。しかし、リハビリテーション治療を受けたことがある RA 患者の比率は 2000 年に 67.9%であったが、2005 年には 37.1%と減少傾向となり、その後の大きな増加はない。RA 病態を制御する運動療法の指標が示されていないことが原因の一つと考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者らが開発してきたギャップ結合の機能制御と運動療法の組み合わせによる新規 RA 治療法にむけた基礎データを構築し、RA 病態を制御できる適切な運動負荷の指標を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

動物は 8 週齢の Dark Agouti ラットを用いた。RA 動物モデルとして II 型コラーゲンを感作させたコラーゲン誘発性関節炎を作製した。このモデルは感作 14 日後から関節炎が増強する前関節炎期を経て 28 日以降には定常化した関節炎期となる。運動療法としてトレッドミル走行させ、条件は関節軟骨を変性させない負荷量である 1 日 30 分間、12m/分とした。感作後に自由飼育した control 群、走行期間を感作 14 日後から 14 日間とした pre-arthritis intervention short (PAS) 群、28 日間とした pre-arthritis intervention long (PAL) 群、感作 28 日後から 14 日間とした therapeutic intervention (T) 群の 4 群を作成した。

1) 感作直後から 42 日後まで体重、足部体積、および clinical score を測定し、感作 42 日後に両側の足関節を摘出した。

2) HE 染色とサフラニン O 染色で組織学的に検討した。

3) tumor necrosis factor (TNF と略) - α 、connexin 43 (Cx43 と略) の免疫組織化学染色を右側に行った。

4) 左側には μ -CT 撮影を行い、距骨全体を関心領域として骨形態を解析した。骨量、骨梁幅、海綿骨の粗鬆化を表す marrow star volume (MSV と略) を測定した。

5) bone erosion への影響を μ -CT を用いて評価した。また骨代謝への影響を評価するために、破骨細胞マーカーの一つである cathepsin K の免疫染色を行い、組織学的に評価した。また骨破壊の指標である骨吸収面積率を測定した。

4. 研究成果

1) 全観察期間において、全身状態の評価である体重および局所の評価である足部体積に各群間で差はなかった。(図 1)

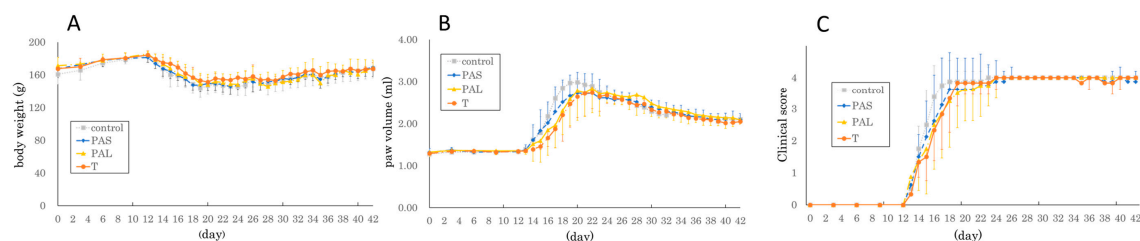


図1 (A) 体重, (B) 足部体積, (C) clinical scoreを示す. control 群, PAS 群, PAL 群, T 群間に有意差はなかった.

2) control 群と PAS 群では炎症細胞の関節腔内への浸潤, 増生した滑膜のパンヌス形成を認めた. 炎症細胞の関節腔内への浸潤や増生滑膜の骨内への浸潤は control 群および PAS 群と比較して PAL 群および T 群で軽度であった. また, control 群, PAS 群における safranin O の染色性は T 群, PAL 群と比較して低かった. T 群と PAL 群の histological score は control 群, PAS 群と比較して有意に低値であった. control 群と PAS 群間には差がなかった. (図2)

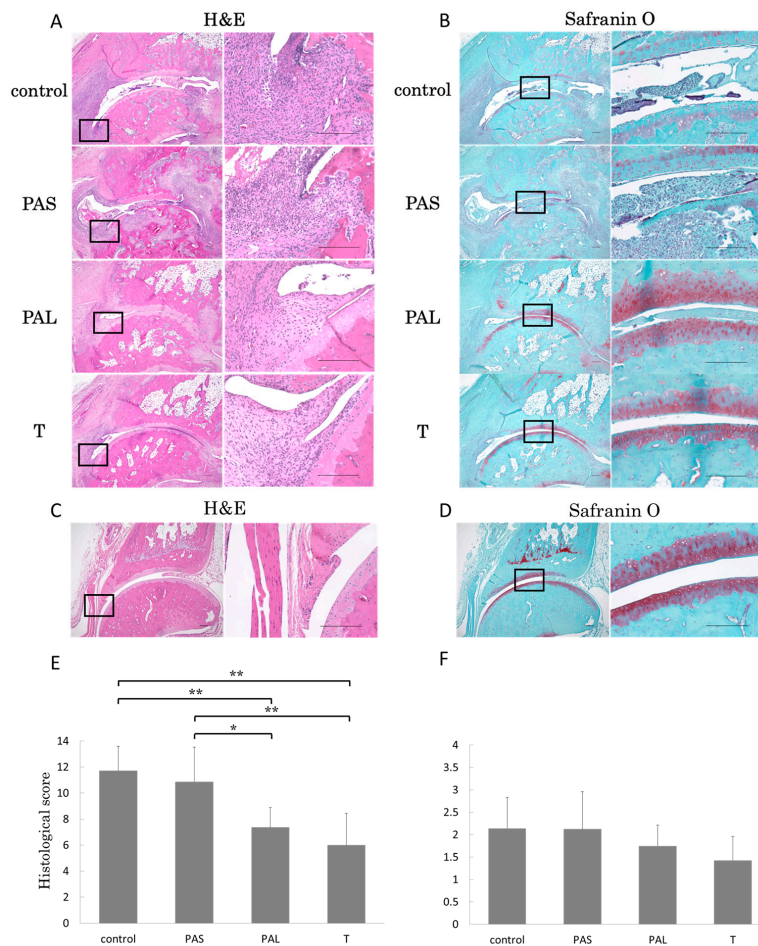


図2 足関節組織学的所見と組織学的スコア (A) H&E 染色, (B) サフラニンO 染色, (C) 運動含めた無治療のラット足関節 H&E 染色, (D) 運動含めた無治療のラット足関節 サフラニンO 染色, (E) 組織学的スコア, (F) 軟骨の評価のみを対照群と PAS 群の組織学的スコアに基づいてスコア化 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) PAL 群と T 群において関節破壊が抑制されていた.

3) 免疫組織化学染色では, T 群における $TNF-\alpha$ の染色面積は対照群と比較して小さく, Cx43 の染色面積は対照群および PAS 群より小さかった. (図3)

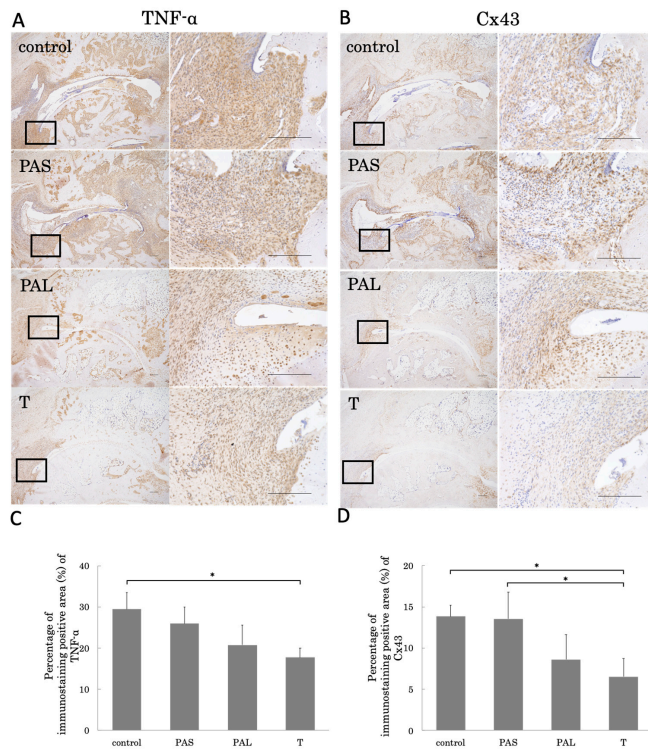


図3 足関節部の組織学的所見と染色面積 (A) TNF- α 免疫染色, (B) Cx43の免疫染色, (C) TNF- α の染色領域に対する ImageJ を用いた半定量的評価, (D) Cx43の染色領域に対する ImageJ を用いた半定量的評価 (* $p < 0.05$) TNF- α の発現は滑膜全体で亢進し, T 群の染色性は CIA 群と比較し低かった. Cx43 では T 群の染色性は CIA 群, PAS 群と比較して有意に低かった.

4) μ -CT による骨形態評価では, T 群の BV / TV, Tb.Th および BMC/TV は control 群と比較して高かった. また, MSV は T 群で control 群と比較して有意に低値を示した. (図4)

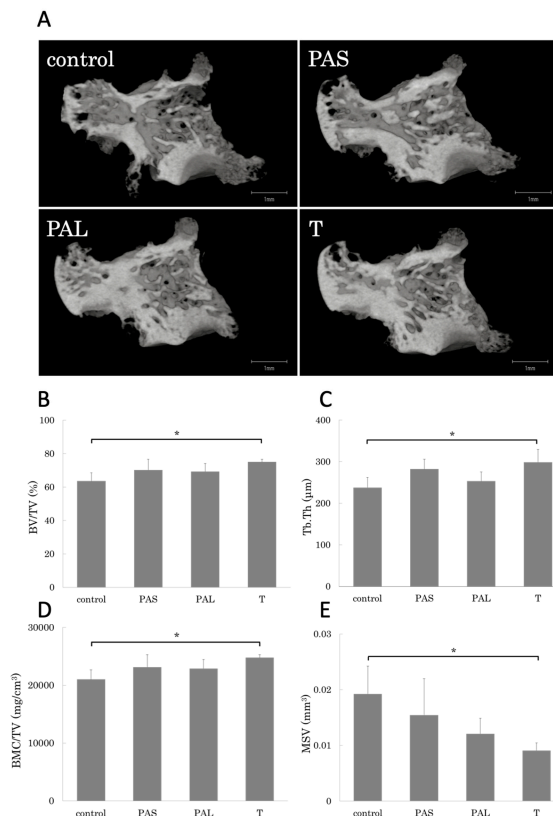


図4 (A) 距骨矢状断面の代表的な3次元再構築像, (B) 骨体積率(BV/TV), (C) 海綿骨の厚さ(Tb. Th), (D)組織体積あたりの骨塩量(BMC/TV), (E) 海綿骨の粗鬆化を表すmarrow star volume(MSV) (* $p < 0.05$) T群の骨量および骨梁幅はcontrol群と比較して高値であった.

5) T群のEs/RpsはCIA群と比較して有意に低値であった. cathepsin K陽性細胞はcontrol群, PAS群のパンヌス部に多数みられた. T群, PAL群のcathepsin K陽性細胞はcontrol群, PAS群と比較して少なかった. (図5)

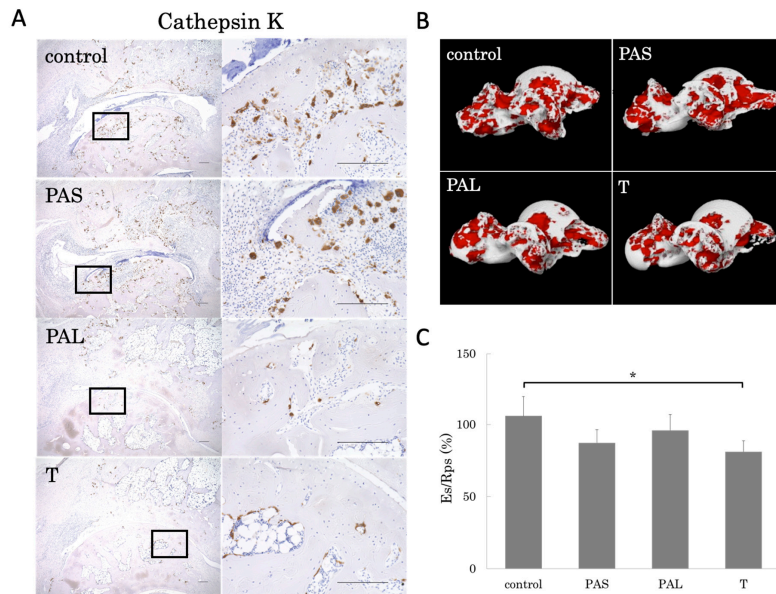


図5 (A) カテプシンK免疫染色の組織学的所見, (B) 距骨全体の骨破壊領域を示す3D再構成図, 赤い部分が骨破壊領域, (C) 骨破壊された骨表面(Es)と修復骨表面(Rps)の比率(* $p < 0.05$) Es/Rpsはcontrol群に比べT群で有意に低かった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Fujii Y, Kishida T, Shin-Ya M, Ichimaru S, Tsuchida S, Mazda O, Kubo T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Hypoxia promotes differentiation of pure cartilage from human induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2022.12745.	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 Seiji Shimomura, Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Yuta Fujii, Tsunao Kishida, Masaharu Shin-Ya, Shohei Ichimaru, Shinji Tsuchida, Osam Mazda, Kenji Takahashi	4. 巻 71
2. 論文標題 Mechanical stimulation of chondrocytes regulates HIF-1 under hypoxic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Cell .	6. 最初と最後の頁 101574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2021.101574.	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 Yuta Fujii, Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Seiji Shimomura, Shuji Nakagawa, Tsunao Kishida, Shinji Tsuchida, Yoichiro Kamada, Kenta Kaihara, Toshiharu Shirai, Ryu Terauchi, Shogo Toyama, Kazuya Ikoma, Osam Mazda, Yasuo Mikami	4. 巻 20
2. 論文標題 Treadmill Running in Established Phase Arthritis Inhibits Joint Destruction in Rat Rheumatoid Arthritis Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 5100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20205100.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Fujii Y, Inoue H, Arai Y, Shimomura S, Nakagawa S, Tsuchida S, Kamada Y, Kaihara K, Mazda O, Mikami Y
2. 発表標題 Treadmill running suppressed joint destruction in a rheumatoid arthritis rat model
3. 学会等名 Transaction of 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaihara K, Nakagawa S, Arai Y, Fujii Y, Inoue H, Tsuchida S, Kamada Y, Mazda O, Mikami Y
2. 発表標題 Effect of hif-1 stabilization by deferoxamine on chondrocyte and articular cartilage
3. 学会等名 Transaction of 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kamada Y, Inoue H, Arai Y, Shimomura S, Nakagawa S, Tsuchida S, Fujii Y, Kaihara K, Mazda O, Mikami Y
2. 発表標題 Analysis of reaction to tensile stress in chondrocytes in hypoxic environment
3. 学会等名 Transaction of 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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