

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659731

研究課題名（和文）

関節リウマチに対する新たな治療標的としての connexin43 の可能性

研究課題名（英文）

Possibility of connexin43 as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis

研究代表者 寺内 竜 (Terauchi Ryu)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20575154

研究成果の概要（和文）：

Connexin は、組織特異的に発現し、ギャップ結合として情報を隣接細胞に直接伝達している。Cx43 の発現は、炎症性刺激に対して、さまざまな細胞や組織で増強する。Cx43 の発現は、ヒト正常滑膜でも発現しており、変形性関節症の滑膜と比較して関節リウマチ（RA）滑膜で亢進している。近年、ギャップ結合の connexin43 (Cx43) がさまざまな免疫反応を調整していること、Cx43 の発現阻害は炎症反応を抑制できることが明らかとなった。これらの報告は、滑膜における Cx43 の発現が RA の病態に関与し、Cx43 の発現阻害が RA の滑膜炎を抑制できる可能性を示している。われわれは、ラット線維芽様滑膜細胞を用いた *in vitro* およびラット関節リウマチモデルを用いた *in vivo* の実験を行い、Cx43 の発現抑制が滑膜炎抑制効果および骨破壊抑制効果を示すことを明らかにした。本研究から、connexin43 が RA に対する新たな治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

The objective of the present study was to determine whether the expression of connexin 43 (Cx43) effected on inflammatory conditions in rat fibroblast-like synoviocytes (FLS) and on rat model of rheumatoid arthritis (RA). Treatment of CIA rats with siCx43 significantly ameliorated paw swelling, and significantly reduced histological arthritis scores and radiographic scores. In histological appearance of rat ankle joints, siCx43 treatment significantly decreased the number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive (osteoclast-like) cells. These findings indicated that siCx43 had anti-inflammatory effects in rat FLS and efficiently inhibited the development of CIA. Cx43 may play an important role in the pathophysiology of RA, and may be a potential target molecule for novel RA therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：リウマチ病学

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA と略) は、難治性の関節疾患であり、炎症性滑膜増殖と骨髄免疫異常により骨破壊を生じる。tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ ,

Interleukin (IL) -6, および IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインや stroma cell-derived factor 1 (CXCL12) などのケモカインの発現が亢進することで、RA は発症および進行する。炎症性サイトカインを標的にした生物学的

製剤が、RA の治療に広く用いられている。しかし、生物学的製剤には、重篤な感染症、心不全および悪性リンパ腫などの副作用があり、高額な医療費が必要とされる。また、中和抗体の出現により効果が減弱する例もある。このため、従来と異なる機序でも、RA 病態を制御できる新たな治療薬の開発が切望されている。

ギャップ結合は、膜貫通型の細胞間結合装置の一つで、connexin (Cx) とよばれるリン酸化タンパクの 6 量体により中心孔を形成することでチャンネル機能を担う。カルシウムイオンやセカンドメッセンジャーなど分子量 1000Da 以下の物質が、チャンネルを通過することで隣接する細胞に直接情報を伝達する。現在、Cx はヒトで 21 種類のアイソフォームが確認されており、それぞれ組織特異的に発現している。Cx43 は最も普遍的に存在し、滑膜組織および滑膜線維芽細胞様細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLS) でも発現している。近年、Cx43 はさまざまな免疫反応を調整していること、Cx43 の発現阻害は炎症反応を抑制できることが明らかとなった。これらの報告は、滑膜における Cx43 の発現が RA の病態に関与し、Cx43 の発現阻害が RA の滑膜炎を抑制できる可能性を示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラットの FLS における Cx43 の発現が炎症性サイトカインやケモカインに与える影響と、Cx43 の発現阻害によるラット RA モデルの関節炎と骨破壊の抑制効果を検証した。

## 3. 研究の方法

### 1) 炎症性刺激を受けたラット FLS とラット RA モデルの滑膜における Cx43 の発現解析

8 週齢の Dark Agouti (DA) ラットの膝から FLS を単離し、平板培養した。炎症性刺激として、100ng/ml の lipopolysaccharide (LPS) を添加し、4 時間後に total RNA を抽出した。ラット RA モデルを作製するため、8 週齢の DA ラットの尾部に、type II collagen と Freund' s incomplete adjuvant を皮内注射し免疫感作した。免疫感作しなかった群を無処置群、免疫感作を行った群を CIA 群とした。免疫感作 16 日後に膝と足関節から滑膜組織を採取し、total RNA を抽出した。real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR) 法で Cx43 の遺伝子発現を解析した。

### 2) ラット FLS における Cx43 の発現阻害による炎症性サイトカインとケモカインの発現検討

平板培養した FLS に Cx43 に対する配列特異的 small interfering RNA (siCx43 と略) あるいは non-specific small interfering (siNeg と略) を 80nM 添加した。8 時間後に 100ng/ml の LPS を添加し、4 時間後に total RNA を抽出した。また、10  $\mu$ g/ml の LPS を添加し、24 時間後に上清を回収した。Cx43, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  および CXCL12 の遺伝子発現を real time RT-PCR 法で、培養上清中のタンパク量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。

### 3) ラット RA モデルにおける siCx43 の導入と遺伝子抑制効果

免疫感作 7, 10, 13, 16 日後にラットの左膝関節滑膜内に 800pmol の siCx43 あるいは siNeg をエレクトロポレーション法で導入した。免疫感作後に siCx43 を導入した群を CIA+siCx43 群、免疫感作後に siNeg を導入した群を CIA+siNeg 群とした。免疫感作 16 日後に膝と足関節から滑膜組織を採取し、total RNA を抽出した。Cx43 の遺伝子発現を real time RT-PCR 法で解析した。

### 4) ラット RA モデルに対する siCx43 の効果

免疫感作後、経時的に siRNA 導入側の足部体積を足容積測定装置で測定し、関節腫脹率を評価した。免疫感作 28 日後に、単純 X 線で左足および足関節を撮影し、骨破壊の程度を 0-3 にスコア化し X 線学的評価を行った。左足および足関節部を採取し、固定および脱灰処理後、Hematoxylin-eosin 染色、Safranin O 染色および tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行った。炎症細胞の浸潤、滑膜の肥厚、軟骨組織の損傷および骨破壊の程度をそれぞれ 0-3 にスコア化し組織学的変化を調べた。副作用として体重と生存率を経時的に測定し、心臓、腎臓および精巣の変化を組織学的に評価した。

## 4. 研究成果

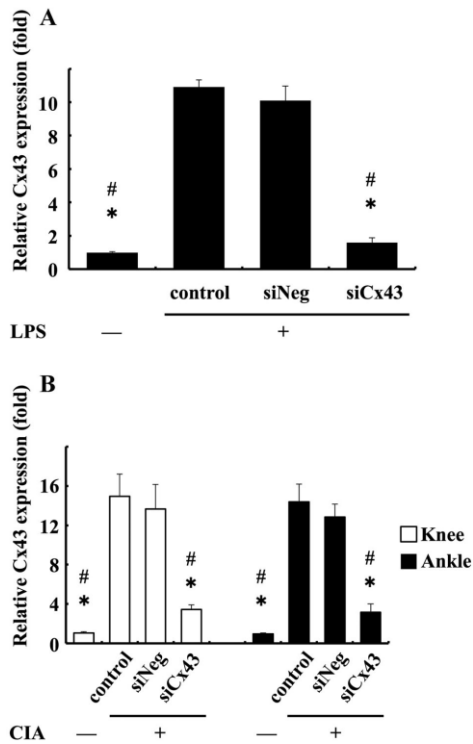
### 1) 炎症性刺激による Cx43 の発現

ラット FLS における Cx43 の発現は、LPS を添加しなかった群に比べ、LPS を添加した群で有意に亢進した。膝および足関節の滑膜における Cx43 の発現は、無処置群に比べて、CIA 群で明らかに増加した。

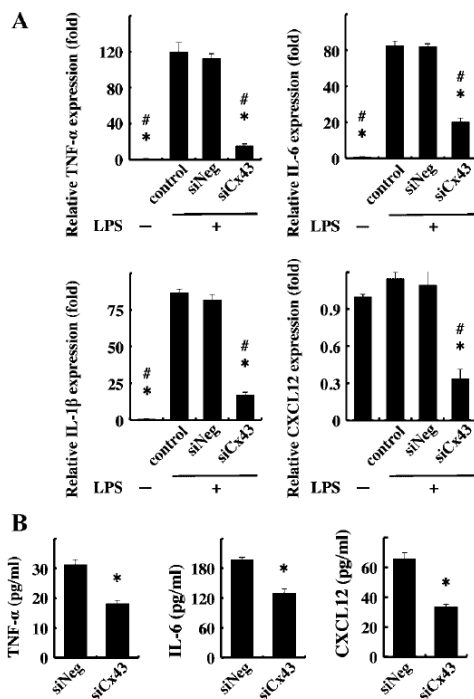
### 2) siCx43 による Cx43, 炎症性サイトカインおよびケモカインの抑制効果

ラット FLS における Cx43 の発現は、LPS を添加した群と比べて、siCx43 を導入した群で 89%低下していた。TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  および CXCL12 の遺伝子およびタンパクの発現は、siNeg を導入した群に比べて、siCx43 を導入した群で有意に抑制された。ただし、

IL-1 $\beta$  のタンパク発現は検出限界以下であった。



図：siCx43によるCx43発現抑制効果



図：siCx43による、炎症性サイトカインおよびケモカインの抑制効果

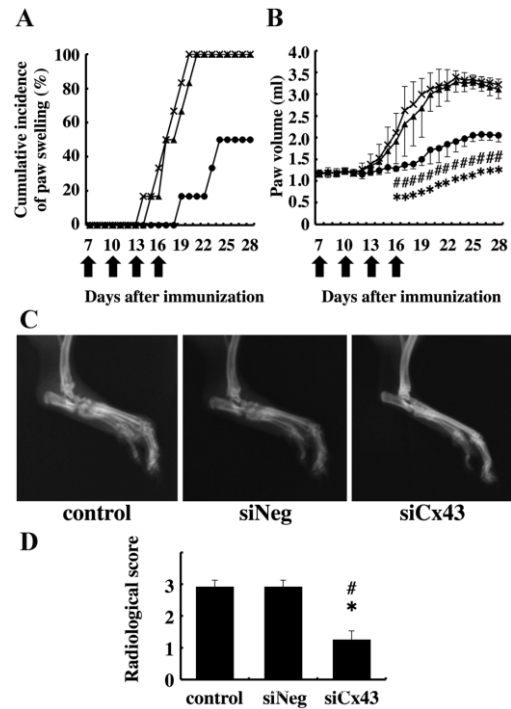
3) Cx43によるラットRAモデルでのCx43の発現抑制効果

ラットRAモデルにおける膝および足関節のCx43の発現は、CIA群およびCIA+siNeg群

と比較して、CIA+siCx43群で約30%まで減少した。

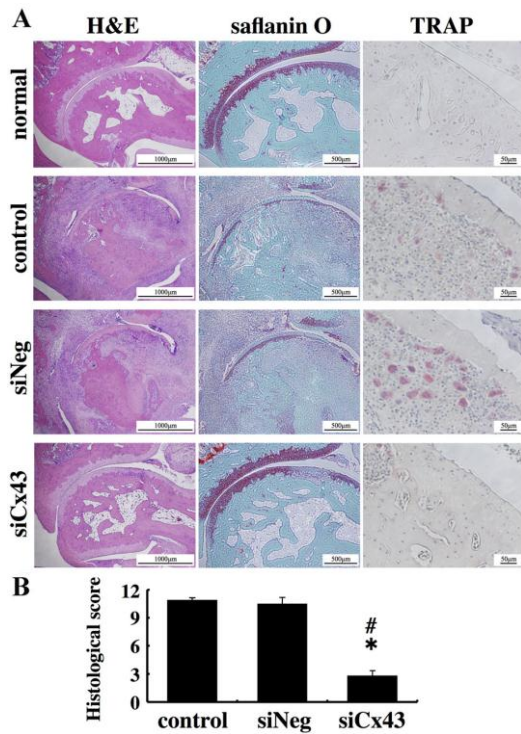
4) siCx43による関節炎および骨破壊に対する治療効果

足部体積の増加は、免疫感作16日後から28日後まで、CIA+siNeg群に比べて、CIA+siCx43群で有意に抑制された。関節腫脹率はCIA+siCx43群で著明に低かった。単純X線像においてCIA+siNeg群で認めた骨破壊は、CIA+siCx43群でほとんど認めず、X線学的スコアも明らかに低かった。



図：siCx43による関節腫脹率の低下および骨破壊の抑制効果

組織学的には、CIA群やCIA+siNeg群で、関節腔への炎症性細胞の浸潤、滑膜の肥厚および軟骨下骨へのパンヌスによる侵食像と軟骨破壊を認めたが、CIA+siCx43群では、これらの変化はほとんどなく、無処置群と同様であった。CIA群やCIA+siNeg群のTRAP染色陽性の多核巨細胞は、骨を侵食しているパンヌスに一致して認め、破骨様細胞として矛盾なかった。この破骨様細胞は、CIA+siCx43群と無処置群でほとんどなかった。組織学的スコアは、CIA群やCIA+siNeg群に比べて、CIA+siCx43群は有意に低かった。生存率は、すべての群で100%であった。体重は各群において有意差はなく、心臓、腎臓および精巣の組織学的変化はなかった。



図：Cx43 投与による組織学的影響

滑膜に発現している Cx は Cx26, 32, 43 である。Cx43 は、ヒト正常滑膜で高発現している。Cx43 の発現は、炎症性刺激に対して、さまざまな細胞や組織で増強する。Cx43 の発現は、変形性関節症の滑膜と比較して RA 滑膜で亢進している。本研究で、ラット FLS における Cx43 の mRNA は、LPS による炎症性刺激で増加した (Fig 1)。Cx43 は、ラット RA モデルの膝および足関節の滑膜でも高い発現を認めた。Cx43 の発現は、RA における滑膜炎の病態において重要な役割を担っている可能性がある。

炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IL-6 および IL-1 $\beta$  は、ヒト RA と同様にラット RA モデルの滑膜炎と骨破壊形成に主要な働きを示す。ラット FLS において、siCx43 は LPS 刺激で誘導したこれらの炎症性サイトカインの遺伝子およびタンパク発現を複数、同時に抑制した。Cx43 の発現抑制は、ラット RA モデルにおける関節炎と骨破壊を減少させた。滑膜における Cx43 の発現阻害が、ラット RA モデルにおける複数の炎症性サイトカインの発現を抑制し、滑膜炎を制御したと考えた。

破骨細胞をはじめとする TRAP 染色陽性の多核巨細胞は、RA における骨破壊を促す。Cx43 は、ヒトの骨髄前駆細胞を巨大にし、多核化することで破骨細胞へと分化誘導する。本研究においても、TRAP 染色陽性の多核巨細胞である破骨様細胞が、ラット RA モデルのパンヌス内で増殖していた。ラット RA モデ

ルにおける破骨様細胞の数は、siCx43 の導入により減少したことから、Cx43 は、ラット RA モデルの破骨細胞分化を少なくとも部分的には誘導していると考えた。

Cx43 は、骨芽細胞の転写因子である CXCL12 などのケモカインの発現を調整し、骨形成を促進させる。CXCL12 は、RA におけるパンヌス内の破骨細胞も活性化する。本研究で、ラットの FLS における CXCL12 の遺伝子およびタンパク発現は、siCx43 の導入により減少することを明らかにした。Cx43 の発現阻害は、RA 滑膜内の CXCL12 の発現抑制することで破骨細胞分化を調整できる可能性がある。

エレクトロポレーション法は、ラット膝および足関節の滑膜へ siRNA の導入を可能にする安全かつ有用な方法である。本研究でも、siCx43 をエレクトロポレーション法で導入したことによる全身への副作用はなかった。siCx43 は、複数の炎症性サイトカインやケモカインの発現を同時に減少させることで、ラット RA モデルにおける滑膜炎と骨破壊を抑制したと考えた。以上から、Cx43 は RA の新たな治療標的となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Tsuchida S, Arai Y, Kishida T, Takahashi KA, Honjo K, Terauchi R, Inoue H, Oda R, Mazda O, Kubo T. Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis.

Journal of Orthopaedic Research, Apr;31(4):525-30. 2013 (査読有)

〔学会発表〕 (計 1 件)

土田真嗣, 新井祐志, 寺内 竜, 本城邦晃, 井上裕章, 小田 良, 徳永大作, 久保俊一  
Regulation of osteoclastogenesis by connexin 43 in vitro and in vivo.  
第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会  
2012 年 04 月 26 日 京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kpu-m.ac.jp/k/orthoped/about/clinic.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺内 竜 (TERAUCHI RYU)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20575154

(2) 研究分担者

新井 祐志 (ARAI YUJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50347449