

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 5月22日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790311

研究課題名（和文）シクロフィリン A - CD147 シグナル系を基盤とした関節リウマチの新規病態分子機構

研究課題名（英文）Function of cyclophilin A and CD147 in rheumatoid arthritis

研究代表者

西奥 剛 (NISHIOKU TSUYOSHI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90435115

研究成果の概要（和文）：

シクロフィリン A (CypA) は、細胞質に存在するイムノフィリンファミリーのひとつであるが、炎症病態時には細胞外へ遊離される。この細胞外 Cyp A の受容体が CD147 であり、細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子として知られている。関節リウマチにおいても CypA と CD147 の発現上昇が報告されているが、病態の発症・進展におけるこれらの役割について、その詳細は不明である。我々は、関節リウマチのモデル動物であるコラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスを使用し、パンススにおける CypA と CD147 の発現と局在の変動について検討を行った。CypA と CD147 の発現は、対照群と比較して CIA マウスにおいて有意に増加していた。また発現増加した CD147 はマクロファージに局在していることが明らかとなった。さらに CIA マウスより単離した滑膜繊維芽細胞の培養上清中において CypA が検出され、CypA が増殖した滑膜繊維芽細胞から遊離されていることが判った。以上、関節リウマチ病態下で発現増加する CypA が細胞外に遊離し、マクロファージに発現増加する CD147 を介してその浸潤・遊走を誘発する過程が、関節リウマチ病態の進展・悪化に寄与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Cyclophilin A (CypA), a member of the immunophilin family, is a ubiquitously distributed intracellular protein. Recent studies have shown that CypA is secreted by cells in response to inflammatory stimuli. Elevated levels of extracellular CypA and its receptor, CD147 have been detected in the synovium of patients with RA. However, the precise process of interaction between CypA and CD147 in the development of RA remains unclear. This study aimed to investigate CypA secretion from fibroblast-like synoviocytes (FLS) isolated from mice with collagen-induced arthritis (CIA) and CypA-induced CD147 expression in mouse macrophages. Both CypA and CD147 were highly expressed in the joints of CIA mice. CD147 was expressed in the infiltrated macrophages in the synovium of CIA mice. *In vitro*, spontaneous CypA secretion from FLS was detected and this secretion was increased by stimulation with LPS. CypA markedly increased CD147 levels in macrophages. These findings suggest that an interaction in the synovial joints between extracellular CypA and CD147 expressed by macrophages forms one of the critical mechanisms underlying RA pathogenesis.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：CypA、CD147、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは関節炎を病変の主座とし、骨・軟骨破壊を必発する自己免疫疾患である。関節リウマチの治療において、生物学的製剤による分子標的治療の導入は、疾患活動性と関節破壊の制御を可能とし、治療目標を「痛みの制御」から「寛解導入」へとシフトさせ、関節リウマチ治療に新展開をもたらした。しかし、生物学的製剤は、その優れた有効性の反面、安全性や投与経路の問題ならびに高額な治療費のため寛解導入率は3割にすぎない。そのため、生物学的製剤と同等の有効性を示し、経口投与可能かつ安価な新規抗リウマチ薬の開発が重要課題となっている。

関節リウマチにおいて、滑膜は毛細血管から浸潤したマクロファージなど炎症性細胞に富んだ肉芽組織であるパンヌスを形成する。パンヌスにおいて浸潤・遊走した単球は滑膜細胞からの M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) と RANKL (NF- κ B 活性化受容体リガンド) により破骨細胞に分化し、関節局所の骨が破壊される。関節炎症の持続は早期より小関節の骨破壊をきたし、荷重関節などの大関節まで及ぶと、ADL に著しい障害をきたすようになる。本研究では、関節リウマチの炎症・骨破壊進展における CypA - CD147 シグナルの分子病態機構を明らかにすることにより、本症の治療戦略ならびに抗リウマチ薬の創薬標的に新たな活路を開く実験証拠を提示する。

2. 研究の目的

CypA はイムノフィリンファミリーのひとつで、シクロスポリン A (免疫抑制薬) の結合タンパク質である。CypA は細胞質に存在するタンパク質であるが、炎症病態時には細胞外へ遊離される。この細胞外 CypA の受容体として同定された分子が CD147 であり、EMMPRIN (細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子) としても知られ、がん細胞の浸潤転移の大役を担っている。これまでの研究により、CypA と CD147 は、マトリックスメタロプロテアーゼの誘導だけでなく、血管新生、細胞の接着や遊走など多面的機能を有することが示唆されている。関節リウマチにおいても細胞外 CypA と CD147 の発現上昇が認められ、CD147 は主に単球や好中球に発現することが報告されている。しかし、関節リウマチにおける細胞外 CypA ならびに CD147 の役割についてその詳細は不明である。本研究では、関節リウマチのモデル動物としてコラーゲン誘導関節炎マウス (CIA) マウスを使用し、パンヌスにおける CypA と CD147 の発現と局在の変動について検討を行った。さらに、ヒト滑膜血管内皮細胞 (HSMEC) を用い、細胞外 CypA による、細胞接着分子の発

現変化ならびに単球の接着について検討した。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン誘導関節炎 (CIA)

CIA は、II 型コラーゲンと完全フロイントアジュバントを 1:1 に混ぜ安定なエマルジョンとし、その 0.1mL をマウスの尾の付け根に皮内注射した。II 型コラーゲンを免疫しないマウスを対照群として使用した。II 型コラーゲン免疫後 21 日目から 2 日おきに四肢の関節炎症を評価した。関節炎症は 0 から 4 の 5 段階でスコア化し、四肢の関節炎スコアを合計したトータル関節炎スコアで評価した。

(2) 免疫染色

CIA マウスを 4%パラホルムアルデヒドで全身を灌流固定した。凍結矢状切片 (厚さ 6 μ m) はクリオスタットで作製し、スライドガラスに貼付した。試料切片を乾燥後、1 次抗体 (抗 CypA 抗体, 抗 CD147 抗体, 抗 CD11b 抗体,) を 4°C で一晩処理した。1 次抗体処理後、2 次抗体を室温で 1 時間処理した。

(3) マウス滑膜線維芽細胞

CIA マウスをペントバルビタール麻酔下、断頭することで安楽死させ、肢関節を遠位脛骨の関節と足根中足関節に離断した。この関節組織を DNase、4 型コラーゲナーゼを含む DMEM で、37°C、2 時間振とうし、細胞を分散させ、培養した。3 回以上 9 回未満継代を行った細胞を実験に使用した。

(4) マウス骨髄由来マクロファージ

C57BL マウスをペントバルビタール麻酔下、断頭することで安楽死させ、大腿骨と脛骨から骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は M-CSF (20ng/mL) を含む培養液で 5 日間培養し、実験に使用した。

(5) ウェスタンブロッティング

サンプルは、還元条件化にて SDS-PAGE を行なった。泳動後、分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写した後、ブロッキングし、1 次抗体 (抗 CypA 抗体, 抗 CD147 抗体, 抗 GAPDH 抗体, 抗 ICAM-1 抗体, 抗 VCAM-1 抗体) を処理した。ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体処理後、ECL 法により可視化した。

(6) 単球の滑膜血管内皮細胞への接着

ヒト滑膜血管内皮細胞 (HSMEC) (DS PHARMA BIOMEDICAL より購入) を培養プレートに播種し、2 日間単層になるまで培養した。その上にカルセイン AM で蛍光標識したヒト単球 (THP-1) (DS PHARMA BIOMEDICAL より購入)、

を播種し、24 時間後に蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) CIA マウスの肢関節における CypA ならびに CD147 の発現変化

CIA マウスを作製し、その肢関節における CypA と CD147 の発現変化をウェスタンブロッティングならびに免疫染色にて検討した。CypA と CD147 の発現は、対照群と比較して CIA マウスにおいて著明に増加していた (図 1)。

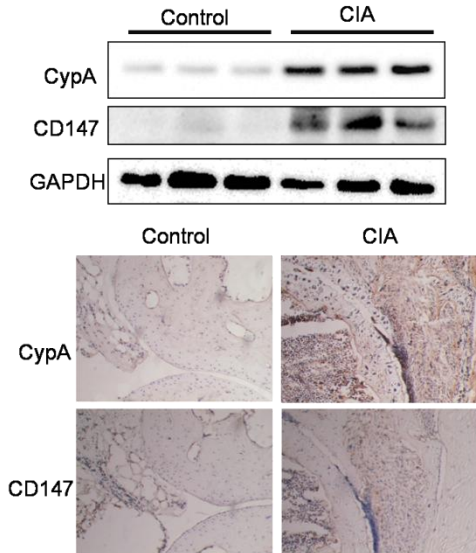


図1 CIAマウスの滑膜組織における CypAならびにCD147の発現増加

また発現増加した CD147 はマクロファージ (CD11b 陽性細胞) に局在していることが明らかとなった (図 2)。

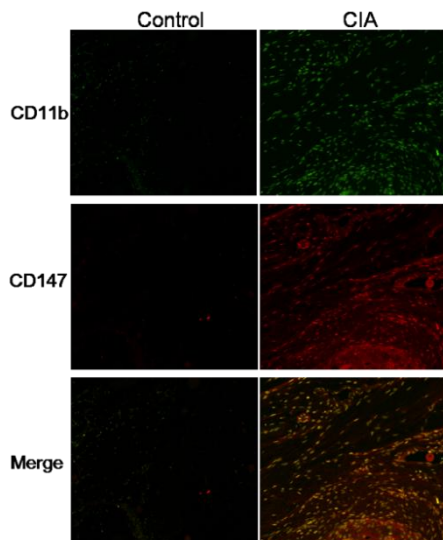


図2 CIAマウスの滑膜組織におけるCD147の局在

(2) 滑膜線維芽細胞から CypA の遊離

CIA マウスより滑膜線維芽細胞を単離、培養し、その培養上清を用いて CypA の細胞外遊離について検討した。CIA マウスより単離した滑膜線維芽細胞の培養上清中において CypA が検出され、CypA が増殖した滑膜線維芽細胞から遊離されていることが判った。また、この滑膜線維芽細胞からの CypA の遊離は LPS 刺激により有意に増加した (図 3)。

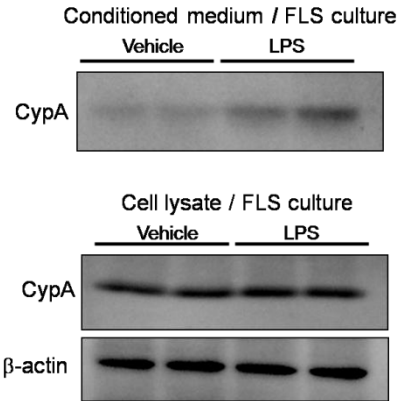


図3 LPS刺激は滑膜線維芽細胞からの CypA遊離を増大させる

(3) 単球の滑膜血管内皮細胞への接着における CypA の影響

HSMEC を用い、細胞外 CypA による細胞接着分子 (ICAM-1 ならびに VCAM-1) の発現変化について検討した。HSMEC における ICAM-1 と VCAM-1 の発現は CypA 刺激により増加した。また、CypA 刺激により HSMEC へのヒト単球 (THP-1) の接着が増加した。この CypA による ICAM-1 と VCAM-1 の発現増加ならびに THP-1 の血管内皮細胞への接着増加はシクロスポリン A (CsA) により抑制された。さらに、抗 CD147 抗体により HSMEC の CD147 を刺激したところ、ICAM-1 ならびに VCAM-1 の発現は増加し、THP-1 の HSMEC への接着も増加した (図 4, 5)。細胞外 CypA は、滑膜血管内皮細胞の CD147 に作用し、ICAM-1 ならびに VCAM-1 の発現を増大させ単球やマクロファージの接着・浸潤を誘発することが示唆された。

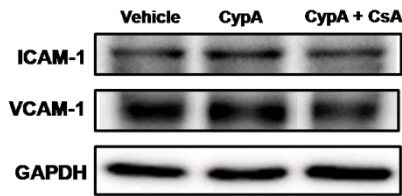


図4 HSMECのICAM-1とVCAM-1の発現におけるCypAの影響

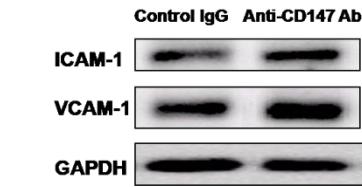


図4 HSMECのICAM-1とVCAM-1の発現におけるCypAの影響

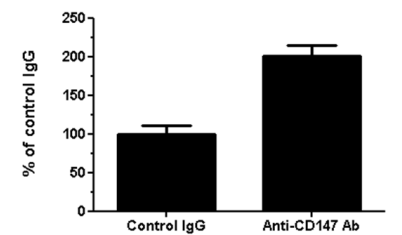
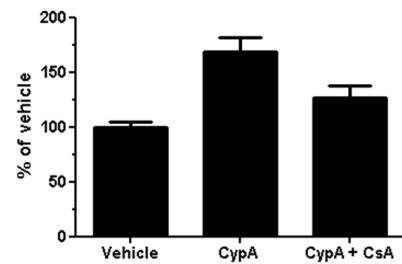


図5 HSMECへの単球接着におけるCypAの影響

(4) CypAによるマクロファージのCD147発現増加

C57BL マウスの骨髄由来マクロファージを用いて、細胞外 CypA による CD147 の発現変化について検討した。CypA 刺激によりマクロファージにおける CD147 の発現が有意に増加した (図 6)。

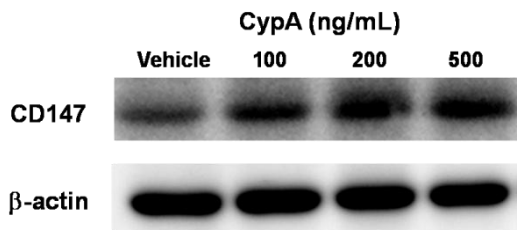


図6 マクロファージのCD147発現におけるCypAの影響

以上、関節リウマチ病態下において発現増加する CypA は、増殖した滑膜線維芽細胞から遊離され、TLR-4 刺激によりその遊離が増大することが示唆された。細胞外に遊離された CypA は、滑膜血管内皮細胞の CD147 に作用し、ICAM-1 ならびに VCAM-1 の発現を増大させ単球やマクロファージの接着・浸潤を誘発することが示された。また浸潤したマクロファージの CD147 発現は、細胞外 CypA により増大することが明らかになった。現在、骨破壊における CypA-CD147 シグナルの役割について検討中である。以上、関節リウマチの炎症・骨破壊進展における CypA - CD147 シグナルの分子病態機構を明らかにすることにより、本症の治療戦略ならびに抗リウマチ薬の開発に寄与できるものと期待している。

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 7 件)

(1) Cyclophilin A secreted from fibroblast-like synoviocytes is involved in the induction of CD147 expression in macrophages of mice with collagen-induced arthritis.

Nishioku T, Dohgu S, Koga M, Machida T, Watanabe T, Miura T, Tsumagari K, Terasawa M, Yamauchi A, Kataoka Y.

J Inflamm (Lond), 20;9(1):44. 2012.

DOI: 10.1186/1476-9255-9-44. 査読有

(2) Atorvastatin stimulates neuroblastoma cells to induce neurite outgrowth by increasing cellular prion protein expression.

Watanaba T, Yasutaka Y, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y.

Neurosci Lett, 531(2):114-9. 2012.

DOI: 10.1016/j.neulet.2012.10.032. 査読有

(3) Lipopolysaccharide-activated microglia lower P-glycoprotein function in brain microvascular endothelial cells.

Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Sumi N, Machida T, Takahashi H, Yamauchi A, Kataoka Y.

Neurosci Lett, 524(1):45-8. 2012.

DOI: 10.1016/j.neulet.2012.07.004. 査読有

(4) Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro.

Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Takahashi H, Machida T, Wakigawa T, Harada E,

Miyaji H, Koga M, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y.

J Neuroinflammation, 8:106. 2011.

DOI: 10.1186/1742-2094-8-106. 査読有

- (5) A role for hypothalamic AMP-activated protein kinase in the mediation of hyperphagia and weight gain induced by chronic treatment with olanzapine in female rats.

Sejima E, Yamauchi A, Nishioku T, Koga M, Nakagama K, Dohgu S, Futagami K, Kataoka Y.

Cell Mol Neurobiol., 31(7):985-9. 2011.

DOI: 10.1007/s10571-011-9663-8. 査読有

- (6) Potential role for S100A4 in the disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice, an animal model of rheumatoid arthritis.

Neuroscience, 189:286-92. 2011.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.044.

査読有

- (7) Involvement of the cellular prion protein in the migration of brain microvascular endothelial cells.

Watanabe T, Yasutaka Y, Nishioku T, Kusakabe S, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y.

Neurosci Lett., 496(2):121-4. 2011.

DOI: 10.1016/j.neulet.2011.03.096. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① BMP4による糖尿病併発動脈硬化巣の増悪とマクロファージの酸化LDL取り込み促進
金岡祐輝、古賀允久、地下隆介、塚本安那、手島奈央、久保尚加、大城戸友麻、西奥剛、山内淳史、片岡泰文
第 86 回日本薬理学会年会，2013 年 3 月 22 日，福岡
- ② 糖尿病病態下の動脈硬化巣における BMP4 の役割
古賀允久、金岡祐輝、地下隆介、西奥剛、山内淳史、片岡泰文
第 65 回日本薬理学会西南部会，2012 年 11 月 23 日，熊本
- ③ クプリゾン誘発脱髄動物モデルの脳白質における CD147 の発現変動
津曲康輔、西奥剛、寺澤真理子、片岡泰文
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウ

ム 2012，2012 年 9 月 1 日，神戸

- ④ S100A4 is a causative factor for disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice

西奥剛、山内淳史、片岡泰文

第 85 回日本薬理学会年会，2012 年 3 月 14 日，京都

- ⑤ コラーゲン誘導関節炎マウスの滑膜における Cyclophilin A と CD147 の発現増加とその局在

寺澤真理子、西奥剛、三浦哲平、津曲康輔、山内淳史、片岡泰文

第 64 回日本薬理学会西南部会，2011 年 11 月 20 日，福岡

- ⑥ 関節リウマチの炎症性細胞浸潤機構におけるシクロフィリン A の役割

大石裕晃、西奥剛、片岡泰文

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011 年 8 月 31 日，東京

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西奥 剛 (NISHIOKU TSUYOSHI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90435115

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし