

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592272

研究課題名(和文) 滑膜組織でのアクアポリン機能制御により関節水症の治療法の開発をめざす

研究課題名(英文) Aquaporins expression in fibroblast like synoviocytes from OA and RA patients

研究代表者

大塚 隆信(Otsuka, Takanobu)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10185316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節水腫は種々の病態により発症をみる。関節水腫発生機序の分子機構はいまだ解明されていない。本研究では水チャネルのアクアポリン(AQP)を介しての関節水腫発症の分子機構を解明し、効果的治療法の開発をめざした。関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)の人工関節置換術の際に得た滑膜組織についてAQPの発現を検討した。滑膜組織ではAQP-1, 3, 9のmRNAの発現を認めた。AQP-9についてはRAにおいて高発現の傾向にあった。線維芽細胞様滑膜細胞をTNF- $\alpha$ にて刺激するとAQP-9が誘導され、炎症による水腫発症にAQP-9の関与が示唆された。ヒアルロン酸によるAQP-9発現の変動はなかった。

研究成果の概要(英文)：Aquaporins (AQPs) are usually present at the plasma membrane, where they regulate the influx and outflow of water and small molecules. We screened for the expression of 12 AQP mRNAs (AQP1-AQP12) in the synovial tissues of patients with osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA), and examined the patterns of expression in those with and without hydrarthrosis. AQP1, AQP3 and AQP9 were expressed in synovial tissues from patients with OA and RA. Fibroblast-like synoviocytes (FLSs) from patients with RA and OA were cultured and stimulated with TNF- $\alpha$ . AQP9 mRNA expression was strongly induced by TNF- $\alpha$  in FLSs, whereas expression of AQP1 and AQP3 mRNAs was not influenced by TNF- $\alpha$ . Treatment of hyaluronic acid did not affected AQP9 mRNA expression induced by TNF- $\alpha$ . Although the functions of AQP1, AQP3 and AQP9 in synovial tissues remain to be elucidated, AQP9 might play a role in hydrarthrosis and inflammatory synovitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：関節水腫 関節リウマチ 変形性膝関節症 滑膜組織 線維芽細胞様滑膜細胞 アクアポリン TNF  $\alpha$  RT-PCR

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科疾患では種々の病態により関節水腫の発症をみる。いわゆる“水がたまる”といった症状であるが、疼痛を伴わない場合でも、関節可動域の制限など苦痛を伴う症例がある。日常臨床においては、関節穿刺、副腎皮質ホルモンの関節内投与、関節鏡視下滑膜切除術などの対症療法がとられることが多く、しばしば再発する。関節水腫をきたす個々の疾患たとえば関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)などのそれぞれの疾患解明は著しい進展しているものの、関節水腫そのものの発生機序の分子機構の解明にはあまり進展はない。アクアポリン(AQP)は水を特異的に通過させるチャンネルとして1990年代に発見され、腎臓尿細管における水吸収機能に関しては多くの知見が得られている。関節水腫発症においてもこの分子の関与が推定される。

## 2. 研究の目的

より効果的な関節水腫の治療をめざすため滑膜細胞でのAQP発現制御を解明する。研究分担者の浅井らは、中枢神経におけるAQPの発現調節に関して新知見を得ており、多数の報告をしている。また我々は、RAの発症にグリオスタチン(GLS)(血小板由来血管内皮増殖因子と同一でthymidine phosphorylase活性をもつ)が密接に関与していることを初めて見だし、RA病態解明について継続的な研究をすすめており、滑膜細胞培養技術は完成している。そこでRAや変形性関節症由来の滑膜培養細胞を用いて、関節水腫発症機序をAQPの発現調節を通じて解明したい。

## 3. 研究の方法

(1) 関節水腫をきたす疾患の滑膜組織でのAQPの発現をRT-PCRで解析する。人工膝関節置換術の際に患者の承諾を得て採取したOA、RA由来の滑膜組織

からmRNAを抽出し、RT-PCR法にてAQP1-9遺伝子発現状況を疾患別、水腫の有無で検討する。

### (2) 免疫組織化学染色

人工膝関節置換術のさいに患者の承諾を得て採取した滑膜組織を抗AQP-1、3、9抗体を用いて、免疫組織化学染色する。AQPファミリー発現細胞を同定し、疾患および病態の違いによる水チャンネルの関与を検討する。

### (3) 滑膜培養細胞の樹立

人工膝関節置換術の際に患者の承諾を得て採取した滑膜を培養し、3から9代継代し形態学的に均一な線維芽細胞様滑膜培養細胞を得る。得られた滑膜培養細胞は免疫組織学的手法にて表面マーカーを検討し、線維芽細胞様滑膜細胞であることを確認する。

### (4) 炎症性サイトカイン刺激による滑膜培養細胞の遺伝子レベルでの応答

関節水腫は炎症性関節疾患で発症することも多いことから、炎症モデルとして、炎症性サイトカインの代表であるTumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )にて滑膜培養細胞を刺激し、RT-PCR法を用いて、AQP遺伝子の発現の誘導あるいは抑制を観察する。

### (5) 線維芽細胞様滑膜細胞において高分子ヒアルロン酸によるAQP遺伝子の発現解析

### (6) JAK阻害剤によるAQP遺伝子の発現解析

## 4. 研究成果

(1) RA、OA患者人工関節置換術を施行した際に得られた滑膜組織についてAQPの

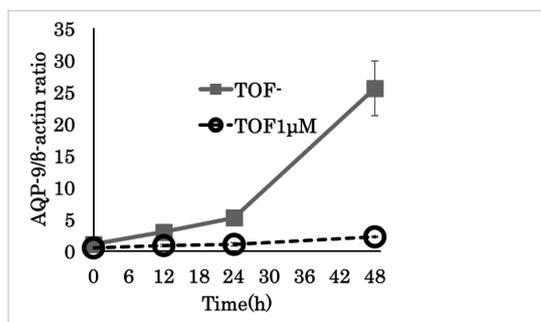
発現をRT-PCRで解析した。その結果AQP-1の発現を認め、またAQP-3、9の発現も認めた。AQP-1、3についてはRA、OAでは発現の差は認めなかったが、AQP-9についてはOAに比べRAにおいて有意に高い発現を認めた。

(2) 滑膜組織を抗AQP-1、3、9抗体にて免疫組織染色したところ、滑膜表層細胞、血管内皮細胞にAQP-1、3、9が発現していた。

(3) 人工膝関節置換術に際して採取した滑膜から培養した線維芽細胞様滑膜培養細胞(FLSs)を用いて炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ にて刺激し、AQP-1、AQP-3、AQP-9の発現をRT-PCRにて測定した。TNF $\alpha$ (0-10ng/ml)にて8時間FLSsを各濃度で刺激したところ、AQP-9mRNAのみ濃度依存性に発現上昇をみた。

(4) 線維芽細胞様滑膜細胞において高分子ヒアルロン酸によるAQP遺伝子の発現変動を用いて解析した。AQP-9mRNAの発現には高分子ヒアルロン酸は影響を及ぼさなかった。

(5) TNF $\alpha$  1ng/mlにてAQP-9mRNAの発現を経時的に観察した。時間とともに発現が増強し、この発現はJAK阻害剤であるtofacitinib (TOF) 1 $\mu$ Mにて著明な抑制をみた。これは線維芽細胞様滑膜細胞におけるJAK阻害剤の新規作用機序である。



## 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 12 件)

1. Matsumoto Y, Ikeya M, Hino K, Horigome K, Fukuta M, Watanabe M, Nagata S, Yamamoto T, Otsuka T, Toguchida J. New protocol to optimize iPS cells for genome analysis of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Stem Cells*. 2015 Mar 13. doi: 10.1002/stem.1981. [査読あり]
2. Yoshida M, Goto H, Nozaki M, Nishimori Y, Takenaga T, Murase A, Nagaya Y, Iguchi H, Kobayashi M, Sugimoto K, Otsuka T. Postoperative evaluation of drill holes for arthroscopic Bankart repair with suture anchors by the use of computed tomography. *J Orthop Sci*. 2015 Mar 7. doi: 10.1007/s00776-015-0703-y. (in press) [査読あり]
3. Yamamoto N, Otsuka T, Kuroyanagi G, Kondo A, Kainuma S, Nakakami A, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Resveratrol reduces prostaglandin E1-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: Suppression of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015 ;116-117:57-63. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.01.003. [査読あり]
4. Yamamoto N, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Kozawa O, Tokuda H. Rac limits TGF- $\beta$ -induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;405:35-41. doi: 10.1016/j.mce.2015.02.002. [査読あり]
5. Iida Y, Doi T, Tokuda H,

- Matsushima-Nishiwaki R, Tsujimoto M, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Enomoto Y, Tanabe K, Otsuka T, Iwama T, Ogura S, Kozawa O, Iida H. Rho-kinase regulates human platelet activation induced by thromboxane A2 independently of p38 MAP kinase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;94:73-81. doi: 10.1016/j.plefa.2014.11.006. [査読あり]
6. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. *PLoS One*. 2014;9:e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291. [査読あり]
7. Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Nakakami A, Mizutani J, Kozawa O, Tokuda H. Down-regulation by resveratrol of basic fibroblast growth factor-stimulated osteoprotegerin synthesis through suppression of Akt in osteoblasts. *Int J Mol Sci*. 2014;15:17886-900. doi: 10.3390/ijms151017886. [査読あり]
8. Matsumoto Y, Hayashi Y, Schlieve CR, Ikeya M, Kim H, Nguyen TD, Sami S, Baba S, Barruet E, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Yamanaka S, Conklin BR, Toguchida J, Hsiao EC. Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:190. doi: 10.1186/1750-1172-8-190. [査読あり]
9. Kuroyanagi G, Yamada K, Imaizumi T, Mizutani J, Wada I, Kozawa O, Tokuda H, Otsuka T. Leg lymphedema caused by iliopsoas bursitis associated with destruction of a rheumatoid hip joint: A case report. *Exp Ther Med*. 2013;6:887-890. doi: 10.3892/etm.2013.1243. [査読あり]
10. Adachi M, Okamoto S, Chujyo S, Arakawa T, Yokoyama M, Yamada K, Hayashi A, Akita K, Takeno M, Itoh S, Takii T, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Hayakawa K, Miyazawa K, Onozaki K. Cigarette smoke condensate extracts induce IL-1-beta production from rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes, but not osteoarthritis patient-derived synoviocytes, through aryl hydrocarbon receptor-dependent NF-kappa-B activation and novel NF-kappa-B sites. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33:297-307. doi: 10.1089/jir.2012.0107. [査読あり]
11. Kondo A, Otsuka T, Kato K, Natsume H, Kuroyanagi G, Mizutani J, Ito Y, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. AMP-activated protein kinase inhibitor decreases prostaglandin F2 $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis through p38 MAP kinase in osteoblasts. *Int J Mol Med*. 2012 ;30:1487-92. doi: 10.3892/ijmm.2012.1159. [査読あり]
12. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Kikuchi K, Yamagami T, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The Sp1 transcription factor is essential for the expression of gliostatin/thymidine phosphorylase in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2012 ;14:R87. doi: 10.1186/ar3811. [査読あり]

1. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y,  
Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H,  
Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K,  
Otsuka T. The inhibitory effect of synthetic  
disease-modifying anti-rheumatic drugs  
and steroids on gliostatin/platelet-derived  
endothelial cell growth factor production in  
human fibroblast-like synoviocytes.  
Annual European Congress of  
Rheumatology, 2015.6.10-13, Roma (Italy)
2. Ikuta K, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y,  
Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H,  
Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. A  
Role For P38 Mitogen-Activated Protein  
Kinase (Mapk) In Gliostatin Production In  
Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes.  
Annual European Congress of  
Rheumatology, 2015.6.10-13, Roma (Italy)
3. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N,  
Kawaguchi Y, Kobayashi M, Aoyama M,  
Asai K, Otsuka T. The importance of  
gliostatin as an indicator of disease activity  
in patients with rheumatoid arthritis.  
Annual European Congress of  
Rheumatology, 2014.6.11-14, Paris  
(France)
4. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Terazawa M,  
Aoyama M, Asai K, Kobayashi M, Otsuka  
T. The Sp1 transcription factor is essential  
for the expression of gliostatin/thymidine  
phosphorylase in rheumatoid  
fibroblast-like synoviocytes. Annual  
European Congress of Rheumatology,  
2013.6.12-15, Madrid (Spain).
5. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y,  
Nagahara M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K,  
Otsuka T. Aquaporin expression in the  
synovial tissues of patients with  
osteoarthritis and rheumatoid arthritis.  
Annual European Congress of

Rheumatology, 2013.6.12-15, Madrid  
(Spain).

〔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  
大塚 隆信 (OTSUKA TAKANOBU)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10185316

(2)研究分担者  
永谷 祐子 (NAGAYA YUKO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90291583

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70212462

(3)連携研究者  
なし