

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20073

研究課題名(和文)変形性膝関節症における前十字靭帯の網羅的な遺伝子発現解析と治療への応用

研究課題名(英文)A whole-genome transcriptome analysis of anterior cruciate ligament in osteoarthritis of the knee

研究代表者

齊藤 雅彦(SAITO, Masahiko)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：30718747

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)：変形性膝関節症(膝OA)における前十字靭帯(ACL)変性の病態解明および膝OAの病態への関与を遺伝子レベルで明らかにするために、RNA-Sequencingを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。ACLの変性の程度により遺伝子発現量の差を認め、遺伝子発現解析の結果をもとにGO分析及びPathway分析を行った。変性が強いACLは炎症に関連する遺伝子群の発現及びパスウェイが活性化されており、軟骨変性同様にACLの変性にも炎症性サイトカインの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症(膝OA)はいまだに病態が解明されておらず、膝OAの治療は疼痛緩和を目的とした対症療法しかなく、新たな治療法の確立が必要である。これまで前十字靭帯(ACL)の変性が膝OAに与える影響はほとんど解明されていなかったが、本研究により膝OAにおいてACLの変性の程度により、ACL自体の遺伝子発現が異なり、変性が強いACLでより炎症に関連するパスウェイが活性化されており、膝OAの進行に関与している可能性が示唆され、膝OAの病態解明に一步近づくことができた。膝OAの原因が明らかとなれば治療法の開発につながる可能性があり、さらなる研究の成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Here we have performed RNA-seq to identify differentially expressed genes of Anterior Cruciate Ligament in osteoarthritis knee. We created a molecular profile of the OA transcriptome and performed functional enrichment analyses to elucidate perturbed molecular functions and pathways in ACL of knee OA. We identified differentially expressed genes between degenerated ACL and not degenerated ACL which indicate that the transcriptome alters during degeneration of the ACL. The pathway analysis showed upregulation of inflammation related pathway. Finally, RNA-seq is a powerful tool to identify high-resolution molecular profile of OA and elucidated a novel regulatory network of OA pathogenesis.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 前十字靭帯 RNA-Sequence

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(膝 OA)は軟骨が変性することを基盤とし、それに伴い関節の変形、疼痛、機能障害を引き起こす疾患であり、高齢者の日常活動性(ADL)と生活の質(QOL)を阻害するロコモティブシンドロームの内、最も罹患者が多い疾患のひとつである。現在、本邦において症状を有する膝 OA の患者数は約 1000 万人といわれており、その病態解明、新たな治療法の開発は国家的にも急務の課題である。

膝 OA は軟骨変性が主病態であり、年齢、機械的 ストレスなどによる軟骨の基質変性が原因であることに論を待たない。しかし、膝 OA の病態には軟骨以外にも軟骨下骨、滑膜、靭帯などの関節内構造体の変化が関与している。研究代表者は膝 OA の軟骨下骨に着目し、軟骨下骨の血管新生活性が OA の発症に関与していることを報告し、膝 OA の病態解明には軟骨以外の関節構造体に対するアプローチが重要であることを再認識した(Saito et al. Osteoarthritis Cartilage 2012)。研究代表者は、中でも膝関節の安定性に最も寄与している前十字靭帯(ACL)の変性が膝 OA の発症および進行に重要な役割を果たしていると考え、本研究を計画した。

ACL は大腿骨外側顆と脛骨顆間隆起に付着している靭帯であり、大腿骨に対する脛骨の前方制動および回旋制動の役割を担っている。ACL 損傷はスポーツ選手、若年者に多い外傷であるが、前方および回旋動揺性から不安定性を生じ、将来的に OA 発症の要因となる。また、進行期膝 OA の ACL は変性しているものが多く、ACL 変性は膝 OA の発症、進行に大きく関与していると考えられる。

このように膝 OA には関節軟骨だけでなく、ACL、軟骨下骨や滑膜など複数の構造体が関与しており、病態を解明するためには病理学的手法だけでは不十分であり、分子生物学的手法を用いた多角的な解析が必要である。膝 OA の軟骨に関しては細胞から組織まで遺伝子、生化学、病理レベルの解析によって多くの報告がある。しかしながら、ACL に関しては病理組織学的な研究が多く、分子生物学的な解析による研究は少なく、本研究では、膝 OA における ACL の transcriptomics を解析することで、ACL 変性の病態を分子レベルで解明することが重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は膝 OA における ACL 変性の病態解明および膝 OA の病態への関与を遺伝子で明らかにすることを目的としている。遺伝子レベルでの病態解明には RNA-Seq を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、発現差のある遺伝子を抽出した後、mRNA の network および pathway 解析を行うことにより、ACL 変性に関与している pathway を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究計画では、研究材料として当院において膝 OA に対して人工膝関節置換術(TKA)から得られる ACL 組織を用いて以下の研究を行った。

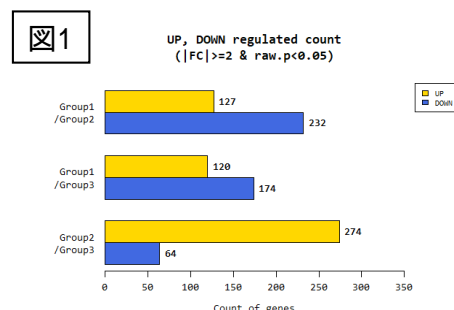
- TKA 術中に得られた ACL を用いた(n=12)。ACL の半分は病理組織学的評価、残り半分より RNA を抽出し、Quality Control を行ったのちに RNA-Sequencing を行った。抽出された RNA を用いて TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit を用いて RNA library を作製し、NovaSeq 6000 System にて RNA-sequence を行った。
- 肉眼的及び病理組織学的に ACL 検体を 3 群 (Group1 正常群:肉眼的に正常、Group2 軽度変性群:一部変性しているものの、連続性は保たれている、Group3 変性群:変性が強く、連続性がない)に分け、それぞれの群間で遺伝子発現 (Differentially Expressed Gene : DEG) 解析を行った。
- 発現差のあった遺伝子を用いて ACL の変性に強く関与している遺伝子の GO (Gene Ontology) 解析及び pathway 解析を行った。GO 解析は g:Profiler tool を用い、DEF 解析で得られた遺伝子を用いて、Biological Process(BP), Cellular component(CC), Molecular Function(MF)の 3 カテゴリーについて評価した。pathway 解析は Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database を用いて行った。

4. 研究成果

1) DEG 解析

RNA-Seq の結果、発現量に有意差 ($|fc| \geq 2$ かつ $raw.p < 0.05$) 認めた遺伝子は 769 遺伝子であった。それぞれのグループ間で発現量を比較したところ、Group1 vs Group2 は 358 遺伝子、Group1 vs Group3 は 294 遺伝子、Group2 vs Group3 は 338 遺伝子に有意な差を認めた(図 1)

- Group1 vs Group 2: 359 遺伝子
- ◆ Upregulated 127



- ◆ Downregulated 232
- Group1 vs Group 3: 294 遺伝子
 - ◆ upregulated 120
 - ◆ Downregulated 174
- Group2 vs Group 3: 338 遺伝子
 - ◆ upregulated 274
 - ◆ Downregulated 64

さらに最も変性度に差を認める Group1 vs Group3 について検討したところ、Group1 で有意に upregulated されていたのは、上位 10 遺伝子は MIR4444-1、IL11、NXPH4、SOGA3、VEGF4、POU2F3、LOC110384692、PCDHA6、PENK、SEC14L4、であり、down regulate されていたのは上位 10 遺伝子は PLIN1、FOSB、GPD1、PLIN4、F8A3、HBB、CSN1S1、CXCL1、SCUBE1、STRA6 であった。(表 1)

表 1 .遺伝子発現解析

| Gene Symbol | Gene name | Fold Change | p-value |
|-----------------------|--|-------------|----------|
| Up-regulated | | | |
| MIR4444-1 | microRNA 4444-1 | 28.05 | 2.44E-04 |
| IL11 | interleukin 11 | 14.97 | 3.19E-02 |
| NXPH4 | neurexophilin 4 | 11.87 | 2.14E-02 |
| SOGA3 | SOGA family member 3 | 9.88 | 4.87E-04 |
| VEGFA | vascular endothelial growth factor A | 9.47 | 1.71E-02 |
| POU2F3 | POU class 2 homeobox 3 | 9.11 | 2.65E-03 |
| LOC110384692 | complement C4A (Rodgers blood group)-like | 8.21 | 1.95E-02 |
| PCDHA6 | protocadherin alpha 6 | 7.78 | 1.01E-03 |
| PENK | proenkephalin | 7.23 | 1.57E-02 |
| SEC14L4 | SEC14 like lipid binding 4 | 7.02 | 7.30E-03 |
| LOC101928841 | collagen alpha-1(II) chain-like | 6.89 | 2.19E-02 |
| LOC102724562 | macrophage stimulating 1 pseudogene | 6.55 | 5.54E-03 |
| ERFE | erythroferrone | 6.32 | 3.78E-02 |
| CDH3 | cadherin 3 | 6.05 | 2.94E-02 |
| LOC103021295 | uncharacterized LOC103021295 | 6.01 | 1.57E-03 |
| NR1D1 | nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 | 5.98 | 4.68E-04 |
| GDF6 | growth differentiation factor 6 | 5.87 | 2.35E-02 |
| KNL1 | kinetochore scaffold 1 | 5.18 | 7.35E-03 |
| MIAT | myocardial infarction associated transcript (non-protein coding) | 5.15 | 1.19E-02 |
| GCOM1 | GRINL1A complex locus 1 | 5.11 | 5.40E-03 |
| Down-Regulated | | | |
| PLIN1 | perilipin 1 | -30.98 | 3.13E-04 |
| FOSB | FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit | -21.70 | 1.07E-05 |
| GPD1 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 | -18.48 | 7.59E-04 |
| PLIN4 | perilipin 4 | -17.17 | 2.33E-03 |
| F8A3 | coagulation factor VIII-associated 3 | -16.82 | 6.06E-03 |
| HBB | hemoglobin subunit beta | -15.73 | 1.60E-06 |
| CSN1S1 | casein alpha s1 | -13.01 | 1.09E-03 |
| CXCL1 | C-X-C motif chemokine ligand 1 | -12.25 | 1.31E-04 |
| SCUBE1 | signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 1 | -12.22 | 4.43E-05 |
| STRA6 | stimulated by retinoic acid 6 | -10.38 | 5.29E-05 |
| HBA2 | hemoglobin subunit alpha 2 | -9.39 | 9.05E-07 |
| G0S2 | G0/G1 switch 2 | -8.71 | 4.92E-03 |
| C15orf48 | chromosome 15 open reading frame 48 | -8.64 | 1.15E-04 |
| HBA1 | hemoglobin subunit alpha 1 | -8.59 | 1.03E-06 |
| MMP3 | matrix metalloproteinase 3 | -8.15 | 4.30E-03 |
| CD69 | CD69 molecule | -8.01 | 3.95E-04 |
| HLA-DOA1 | major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 | -7.54 | 1.19E-03 |
| DNAJC25-GNG10 | DNAJC25-GNG10 readthrough | -7.50 | 3.06E-03 |
| LIPE | lipase E, hormone sensitive type | -6.87 | 8.89E-03 |
| FCN1 | ficoin 1 | -6.80 | 1.60E-03 |

2) GO 解析

続いて、DEF 解析で得られた遺伝子を用いて GO (Gene Ontology) 解析を行い、Biological Process(BP), Cellular component(CC), Molecular Function(MF)の3 カテゴリーについて評価した(表 2)。BP については 381 項目、CC は 46 項目、MF は 35 項目に含まれる遺伝子群の発現を認めた。

表 2 . GO 解析

| source | term_id | term_name | adjusted_p_val | term_size | query_size | intersection_size |
|--------|------------|---|----------------|-----------|------------|-------------------|
| GO:BP | GO:0002376 | immune system process | 1.1908E-06 | 3235 | 242 | 83 |
| GO:BP | GO:0048583 | regulation of response to stimulus | 1.1908E-06 | 4421 | 242 | 103 |
| GO:BP | GO:0048584 | positive regulation of response to stimulus | 1.1908E-06 | 2542 | 242 | 71 |
| GO:BP | GO:0007166 | cell surface receptor signaling pathway | 1.1908E-06 | 3197 | 242 | 83 |
| GO:BP | GO:0006952 | defense response | 1.3201E-06 | 1783 | 242 | 56 |
| GO:BP | GO:0050896 | response to stimulus | 1.4764E-06 | 9455 | 242 | 173 |
| GO:BP | GO:0006955 | immune response | 2.0704E-06 | 2294 | 242 | 65 |
| GO:BP | GO:0009605 | response to external stimulus | 2.4354E-06 | 2923 | 242 | 76 |
| GO:BP | GO:0045321 | leukocyte activation | 2.6983E-06 | 1305 | 242 | 45 |
| GO:BP | GO:0001775 | cell activation | 3.4963E-06 | 1465 | 242 | 48 |
| GO:BP | GO:0006954 | inflammatory response | 9.897E-06 | 780 | 242 | 32 |
| GO:BP | GO:0050776 | regulation of immune response | 1.7917E-05 | 1116 | 242 | 39 |
| GO:BP | GO:0007154 | cell communication | 1.9618E-05 | 6798 | 242 | 133 |
| GO:BP | GO:0023052 | signaling | 2.5538E-05 | 6772 | 242 | 132 |
| GO:BP | GO:0048518 | positive regulation of biological process | 2.5538E-05 | 6366 | 242 | 126 |
| GO:BP | GO:0002682 | regulation of immune system process | 2.5538E-05 | 1688 | 242 | 50 |
| GO:BP | GO:0007165 | signal transduction | 2.5538E-05 | 6296 | 242 | 125 |
| GO:BP | GO:0050900 | leukocyte migration | 2.5538E-05 | 498 | 242 | 24 |
| GO:BP | GO:0051716 | cellular response to stimulus | 3.9412E-05 | 7772 | 242 | 145 |
| GO:BP | GO:0051050 | positive regulation of transport | 6.7973E-05 | 1008 | 242 | 35 |

| source | term_id | term_name | adjusted_p_val | term_size | query_size | intersection_size |
|--------|------------|--|-------------------|-----------|------------|-------------------|
| GO:MF | GO:0000977 | RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding | 0.00119164 | 810 | 237 | 27 |
| GO:MF | GO:0000976 | transcription regulatory region sequence-specific DNA binding | 0.00119164 | 861 | 237 | 28 |
| GO:MF | GO:0001067 | regulatory region nucleic acid binding | 0.00119164 | 973 | 237 | 31 |
| GO:MF | GO:0044212 | transcription regulatory region DNA binding | 0.00119164 | 972 | 237 | 31 |
| GO:MF | GO:0035326 | cis-regulatory region binding | 0.00119164 | 639 | 237 | 23 |
| GO:MF | GO:0000987 | cis-regulatory region sequence-specific DNA binding | 0.00119164 | 633 | 237 | 23 |
| GO:MF | GO:0001012 | RNA polymerase II regulatory region DNA binding | 0.00119164 | 817 | 237 | 27 |
| GO:MF | GO:0000978 | RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding | 0.0014643 | 607 | 237 | 22 |
| GO:MF | GO:1990837 | sequence-specific double-stranded DNA binding | 0.00171074 | 906 | 237 | 28 |
| GO:MF | GO:0003690 | double-stranded DNA binding | 0.00334301 | 998 | 237 | 29 |
| GO:MF | GO:0005102 | signaling receptor binding | 0.00431148 | 1638 | 237 | 40 |
| GO:MF | GO:0000981 | DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific | 0.00431148 | 1036 | 237 | 29 |
| GO:MF | GO:0030545 | receptor regulator activity | 0.00431148 | 535 | 237 | 19 |
| GO:MF | GO:0048018 | receptor ligand activity | 0.00431148 | 486 | 237 | 18 |
| GO:MF | GO:0030546 | signaling receptor activator activity | 0.00431148 | 492 | 237 | 18 |
| GO:MF | GO:0032395 | MHC class II receptor activity | 0.00775143 | 9 | 237 | 3 |
| GO:MF | GO:0001228 | DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific | 0.00833228 | 434 | 237 | 16 |
| GO:MF | GO:0001216 | DNA-binding transcription activator activity | 0.00850392 | 437 | 237 | 16 |
| GO:MF | GO:0031720 | haptoglobin binding | 0.00923506 | 10 | 237 | 3 |
| GO:MF | GO:0140375 | immune receptor activity | 0.01170401 | 131 | 237 | 8 |

| source | term_id | term_name | adjusted_p_val | term_size | query_size | intersection_size |
|--------|------------|--|-------------------|-----------|------------|-------------------|
| GO:CC | GO:0005576 | extracellular region | 1.6334E-06 | 4548 | 250 | 102 |
| GO:CC | GO:0005615 | extracellular space | 3.7478E-06 | 3543 | 250 | 84 |
| GO:CC | GO:0009986 | cell surface | 9.5241E-06 | 918 | 250 | 34 |
| GO:CC | GO:0030141 | secretory granule | 0.0001954 | 839 | 250 | 29 |
| GO:CC | GO:0098552 | side of membrane | 0.0001954 | 603 | 250 | 24 |
| GO:CC | GO:0009897 | external side of plasma membrane | 0.0001954 | 405 | 250 | 19 |
| GO:CC | GO:0031983 | vesicle lumen | 0.00040492 | 325 | 250 | 16 |
| GO:CC | GO:0034774 | secretory granule lumen | 0.00040492 | 319 | 250 | 16 |
| GO:CC | GO:0060205 | cytoplasmic vesicle lumen | 0.00040492 | 323 | 250 | 16 |
| GO:CC | GO:0005788 | endoplasmic reticulum lumen | 0.0007701 | 307 | 250 | 15 |
| GO:CC | GO:0031982 | vesicle | 0.0008109 | 3914 | 250 | 80 |
| GO:CC | GO:0071944 | cell periphery | 0.0008109 | 5732 | 250 | 107 |
| GO:CC | GO:0005886 | plasma membrane | 0.00081381 | 5604 | 250 | 105 |
| GO:CC | GO:0012505 | endomembrane system | 0.00088552 | 4539 | 250 | 89 |
| GO:CC | GO:0031012 | extracellular matrix | 0.0009325 | 534 | 250 | 20 |
| GO:CC | GO:0062023 | collagen-containing extracellular matrix | 0.0009325 | 407 | 250 | 17 |
| GO:CC | GO:0099503 | secretory vesicle | 0.0009325 | 1009 | 250 | 30 |
| GO:CC | GO:0031410 | cytoplasmic vesicle | 0.00111434 | 2372 | 250 | 54 |
| GO:CC | GO:0097708 | intracellular vesicle | 0.00111434 | 2375 | 250 | 54 |
| GO:CC | GO:0031226 | intrinsic component of plasma membrane | 0.00144006 | 1700 | 250 | 42 |

3) パスウェイ解析

遺伝子発現量解析の結果より、有意なパスウェイは 89 個同定され、炎症に関連するパスウェイの活性化を上位に認められた(表 3)。

表 3. パスウェイ解析

| MapID | MapName | Number of Sig | PValue | Bonferroni | FDR |
|-------|---|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 05323 | Rheumatoid arthritis | 13 | 5.93E-13 | 1.34E-10 | 1.34E-10 |
| 05150 | Staphylococcus aureus infection | 11 | 3.73E-10 | 8.42E-08 | 3.09E-08 |
| 04640 | Hematopoietic cell lineage | 11 | 4.92E-10 | 1.11E-07 | 3.09E-08 |
| 05166 | Human T-cell leukemia virus 1 infection | 14 | 5.46E-10 | 1.23E-07 | 3.09E-08 |
| 05140 | Leishmaniasis | 10 | 1.15E-09 | 2.59E-07 | 4.80E-08 |
| 04612 | Antigen processing and presentation | 10 | 1.27E-09 | 2.88E-07 | 4.80E-08 |
| 05322 | Systemic lupus erythematosus | 11 | 7.04E-09 | 1.59E-06 | 2.27E-07 |
| 05152 | Tuberculosis | 12 | 9.29E-09 | 2.10E-06 | 2.62E-07 |
| 05145 | Toxoplasmosis | 10 | 2.40E-08 | 5.42E-06 | 6.02E-07 |
| 04658 | Th1 and Th2 cell differentiation | 9 | 8.39E-08 | 1.90E-05 | 1.90E-06 |
| 04657 | IL-17 signaling pathway | 9 | 9.80E-08 | 2.21E-05 | 2.01E-06 |
| 05321 | Inflammatory bowel disease (IBD) | 8 | 1.45E-07 | 3.27E-05 | 2.60E-06 |
| 05330 | Allograft rejection | 7 | 1.49E-07 | 3.38E-05 | 2.60E-06 |
| 05332 | Graft-versus-host disease | 7 | 2.24E-07 | 5.07E-05 | 3.62E-06 |
| 04659 | Th17 cell differentiation | 9 | 2.49E-07 | 5.63E-05 | 3.75E-06 |
| 04940 | Type 1 diabetes mellitus | 7 | 2.89E-07 | 6.54E-05 | 4.09E-06 |
| 05310 | Asthma | 6 | 1.56E-06 | 3.52E-04 | 2.07E-05 |
| 05416 | Viral myocarditis | 7 | 1.74E-06 | 3.93E-04 | 2.19E-05 |
| 04061 | Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor | 8 | 2.18E-06 | 4.93E-04 | 2.59E-05 |
| 04668 | TNF signaling pathway | 8 | 4.44E-06 | 1.00E-03 | 4.83E-05 |

本研究結果より膝 OA における ACL は変性度により靭帯自体の遺伝子発現が異なることが確認できた。より変性が強い ACL は炎症に関連する遺伝子発現及びパスウェイが活性化されており、軟骨変性同様に ACL の変性にも炎症性サイトカインの関与が示唆された。今後より詳細な検討を要するが、RNA-Sequencing を用いた網羅的な遺伝子解析が膝 OA の病態解明の一助となり得ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|