

令和元年6月5日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16678

研究課題名(和文) 関節軟骨でのIL1bによるFGFシグナルの細胞死誘導へのスイッチング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the switching mechanism for induction of cell death of FGF signal by IL1b in articular cartilage

研究代表者

片桐 洋樹 (KATAGIRI, HIROKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50795028

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)：IL1 β 、FGF2存在下で、軟骨細胞の増殖が低下し細胞死が誘導された。RNAレベルはACAN、Col2が低下し、PRG4が上昇を示した。IL1 β 添加グループではFGFr1/FGFr3のバランスが変化しFGFr1の比率が増加した。FGF2のダウンストリームターゲットはIL1 β 、FGF2添加グループで細胞増殖を抑制する蛋白質のRNAであるIrf1と細胞死を誘導する蛋白質のRNAであるE2f1が上昇した。軟骨欠損モデルの周囲軟骨にて免疫染色にて確認された。骨軟骨損傷時、損傷部よりIL1 β が分泌され、IL1 β の作用によりFGFレセプターのタイプが変化する事によりFGF2の軟骨細胞への作用が変化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々の研究ではIL1bのFGFレセプターの発現に関与する機序を解明した、シグナルまたはレセプターを個別にブロックすることによりIL1の変性を促進する役割のみを停止し変形性関節症の進行を抑制できると考えられる。また今回の研究はIL1bの直接的なシグナルによる作用ではなく、成長因子のレセプターの変化という間接的な関与を明らかにした、IL1bの作用機序のより深い解明に新たな道筋を示した。世界的に変形性膝関節症の抗IL1b薬による治験等が試みられたが有効な報告はなく、今回IL1Bの作用機序を解明したことにより、変形性関節症の新たな疾患修飾型治療薬の開発につながる研究成果であったと考える。

研究成果の概要(英文)：In defects of 0.9 mm diameter, spontaneous joint surface healing was observed but also upward advancing of the subchondral bone plate at 16 weeks. Larger 1.4 mm diameter defects were critical size, not resulting in successful healing at any time point. Importantly, the articular cartilage surrounding the defects expressed FGF2 and IL1 β , but not ACAN and Col2. Chondrocytes cultured in IL1 β and FGF2 supplemented media lost the natural fibroblast growth factor receptors - FGFr1/FGFr3 balance and showed decreased viability. A critical size osteochondral defect was defined as 1.4 mm in diameter in rat. Subchondral bone plate advancement occurred rapidly. The articular cartilage surrounding osteochondral defects showed catabolic activity with expression of IL1 β , FGF2 and a disturbed FGFr1/FGFr3 balance, potentially initiating a process of early osteoarthritic disease.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変形性膝関節症 IL1b FGFレセプター 疾患修飾型治療薬 軟骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膝関節骨軟骨損傷は末期 OA 患者と同等の痛みを有し、既存の治療法では硝子軟骨の再生は起きず、新たな骨軟骨再生治療法が研究されている。骨軟骨再生治療の研究にラットを含め種々の動物モデルが使われている。しかし、FDA によるとラットの骨軟骨損傷の自然経過を纏めた報告は無く、骨軟骨再生研究に用いるべき至適モデルは決定されていない。また、骨軟骨損傷は局所症状にとどまらず、周囲軟骨の変性を起こし、早期 OA を誘発すると報告されている。しかし、その機序は分かっていない。本研究の目的は骨軟骨再生研究のラットでの至適モデルの決定。骨軟骨損傷と周囲軟骨変性の関連を明かすことである。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨軟骨再生研究のラットでの至適モデルの決定。骨軟骨損傷と周囲軟骨変性の関連を明かすことである。

3. 研究の方法

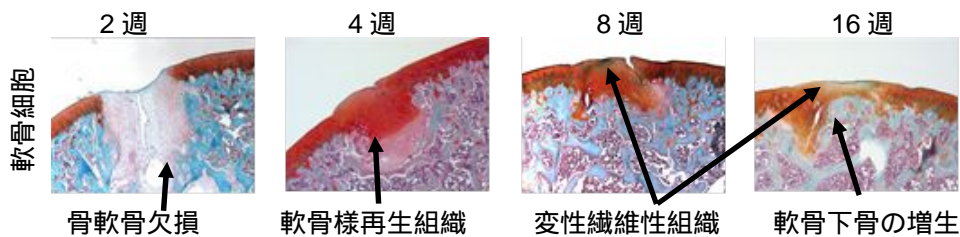
1. 直径 0.5 mm, 0.9 mm, 1.4 mm, 2.1 mm の異なるサイズのラット骨軟骨欠損の自然治癒過程を評価した。
2. 我々は直径 0.9 mm の骨軟骨欠損を作成し、周囲軟骨の RNA 発現の変化を経時的に評価した。
3. IL1 存在下での FGF2 の軟骨細胞への作用を調べた。軟骨細胞をラット正常膝より採取、単離し、培養した。IL1、FGF2 を培養液に添加し軟骨細胞への影響を検討した。

4. 研究成果

結果 1 - ラット骨軟骨欠損モデル作成

直径 0.5 mm, 0.9 mm, 1.4 mm, 2.1 mm の異なるサイズのラット骨軟骨欠損の自然治癒過程を評価した。直径 0.9 mm 以下の骨軟骨欠損は短期的には軟骨再生を認めた。中期的には軟骨下骨の増生、再生軟骨の線維化が生じた(図 1)、直径 1.4 mm 以上の骨軟骨欠損は再生を認めなかった。

図 1 直径 0.9mm の軟骨損傷の自然経過

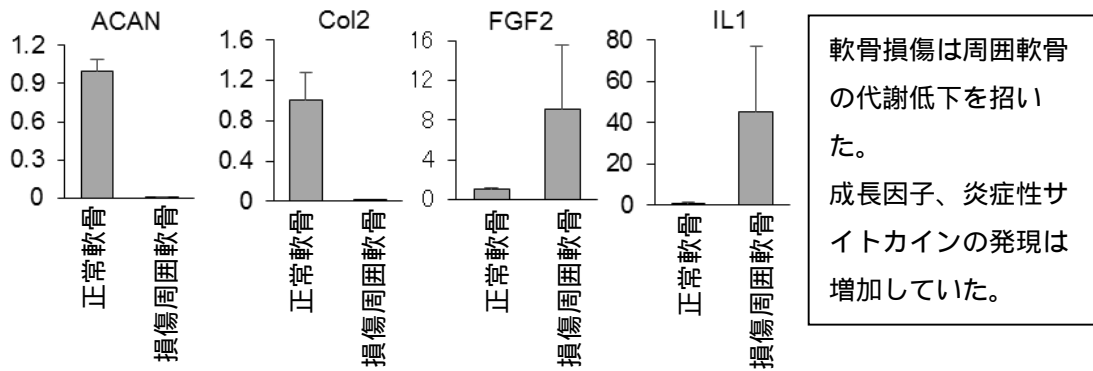


0.9mm の骨軟骨欠損は短期的に軟骨様組織で再生し、中期的に変性を起こす。

結果 2 - 骨軟骨損傷は周囲軟骨の代謝を変化させる

骨軟骨損傷後に周囲軟骨が変性し、変形性膝関節症と進行する事は知られているがその機序は明らかになっていない。そこで、我々は直径 0.9 mm の骨軟骨欠損を作成し、周囲軟骨の RNA 発現の変化を経時的に評価した。炎症性サイトカイン IL1 は軟骨損傷または変形性膝関節症にて関節内の分泌が上昇することが知られているが、我々のモデルでも欠損部位ならびに周囲軟骨で IL1 の RNA の発現レベルの上昇を認めた。軟骨の蛋白質である Aggrecan (ACAN)、Col2 の RNA の発現は周囲軟骨にて低下していた。また、FGF2 は発現が周囲軟骨にて上昇していた。

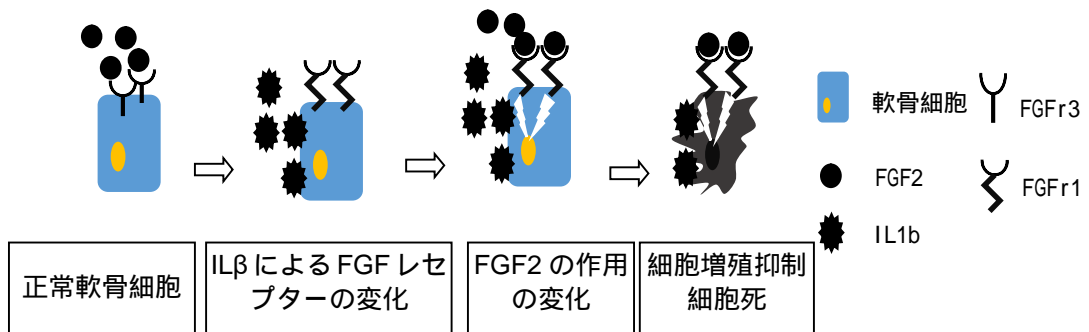
図2 軟骨損傷後の周囲軟骨のRNA発現の量



結果3 IL1 存在下でFGF2の軟骨細胞への作用は変化する。

IL1 存在下でのFGF2の軟骨細胞への作用を調べた。軟骨細胞をラット正常膝より採取、単離し、培養した。IL1、FGF2を培養液に添加し軟骨細胞への影響を検討した。IL1、FGF2添加グループで、軟骨細胞の増殖が低下し細胞死が誘導された。続いてそれらの細胞を用いRNAの発現を調べた。IL1、FGF2添加グループではACAN, Col2が低下し、PRG4が上昇し軟骨損傷モデルと同様の变化を示した。IL1 添加グループではFGFr1/FGFr3のバランスに変化を認め、FGFr1の比率が増加していた。続いて、FGF2のダウストリームターゲットを調べた。細胞増殖を抑制する蛋白質のRNAであるIrf1と細胞死を誘導する蛋白質のRNAであるE2f1の上昇をIL1、FGF2添加グループで認めた。また、この結果は軟骨欠損モデルの周囲軟骨にて免疫染色にて確認された。骨軟骨損傷時、損傷部よりIL1 が分泌され、IL1 の作用によりFGFレセプターのタイプが変化する事によりFGF2の軟骨細胞への作用が変化した(図3)。

図3 IL1 は FGF レセプターを変化し FGF の働きを変えた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13件)

1. Inomata K, Tsuji K, Onuma H, Hoshino T, Udo M, Akiyama M, Nakagawa Y, Katagiri H, Miyatake K, Sekiya I, Muneta T, Koga H. Time course analyses of structural changes in the infrapatellar fat pad and synovial membrane during inflammation-induced persistent pain development in rat knee joint. BMC musculoskeletal disorders 20(1): 8, 2019 査読有
2. Katakura M, Horie M, Watanabe T, Katagiri H, Otabe K, Ohara T, Nakamura K, Katagiri K, Ueki H, Zaffagnini S, Sekiya I, Muneta T, Koga H. Effect of meniscus repair on pivot-shift during anterior cruciate ligament reconstruction: Objective evaluation using triaxial accelerometer. The Knee 26(1): 124, 2019 査読有
3. Katagiri H, Mendes LF, Luyten FP. Reduction of BMP6-induced bone formation by calcium phosphate in wild-type compared with nude mice. J Tissue Eng Regen Med 13(5): 846, 2019 査読有

4. Minami T, Muneta T, Sekiya I, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, [Katagiri H](#), Otabe K, Ohara T, Katakura M, Koga H. Lateral meniscus posterior root tear contributes to anterolateral rotational instability and meniscus extrusion in anterior cruciate ligament-injured patients. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 26(4): 1174, 2018 査読有
5. Hasegawa S, Horie M, [Katagiri H](#), Tsuji K, Muneta T, Koga H. Bilateral Hypoplasia of Both Medial and Lateral Menisci Partially Fused With the Cartilage Surface of the Tibial Plateau. *Orthopedics* 41(6): e884, 2018 査読有
6. Hoshino T, Tsuji K, Onuma H, Udo M, Ueki H, Akiyama M, Abula K, [Katagiri H](#), Miyatake K, Watanabe T, Sekiya I, Koga H, Muneta T. Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone. *BMC musculoskeletal disorders* 19(1): 291, 2018 査読有
7. Ueki H, Nakagawa Y, Ohara T, Watanabe T, Horie M, [Katagiri H](#), Otabe K, Katagiri K, Hiyama K, Katakura M, Hoshino T, Inomata K, Araya N, Sekiya I, Muneta T, Koga H. Risk factors for residual pivot shift after anterior cruciate ligament reconstruction: data from the MAKS group. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 26(12): 3724, 2018 査読有
8. Minami T, Koga H, Sekiya I, Watanabe T, Horie M, [Katagiri H](#), Otabe K, Ohara T, Katakura M, Muneta T. Posteriorly inserted anterior cruciate ligament in knees with discoid lateral meniscus corresponding to bony morphological characteristics of femoral lateral condyle. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 23(2): 350, 2018 査読有
9. Mendes LF, [Katagiri H](#), Tam WL, Chai YC, Geris L, Roberts SJ, Luyten FP. Advancing osteochondral tissue engineering: bone morphogenetic protein, transforming growth factor, and fibroblast growth factor signaling drive ordered differentiation of periosteal cells resulting in stable cartilage and bone formation in vivo. *Stem Cell Res Ther* 9(1): 42, 2018 査読有
10. Koga H, Watanabe T, Horie M, [Katagiri H](#), Otabe K, Ohara T, Katakura M, Sekiya I, Muneta T. Augmentation of the Pullout Repair of a Medial Meniscus Posterior Root Tear by Arthroscopic Centralization. *Arthrosc Tech* 6(4): e1335, 2017 査読有
11. Watanabe T, Koga H, Horie M, [Katagiri H](#), Sekiya I, Muneta T. Post-Cam Design and Contact Stress on Tibial Posts in Posterior-Stabilized Total Knee Prostheses: Comparison Between a Rounded and a Squared Design. *J Arthroplasty* 32(12): 3757, 2017 査読有
12. [Katagiri H](#), Mendes LF, Luyten FP. Definition of a Critical Size Osteochondral Knee Defect and its Negative Effect on the Surrounding Articular Cartilage in the Rat. *Osteoarthritis Cartilage* 25(9): 1531, 2017 査読有
13. 松村 恵津子、渡邊 敏文、小田邊浩二、宮武 和正、片桐 洋樹、堀江 雅史、古賀 英之、関矢 一郎、宗田 大. ジルコニアセラミック大腿骨コンポーネントを用いた日本人向け後方安定型人工膝関節の 2 年成績 : 他種との比較 *日本関節病学会誌*. 2017.12; 36 (4): 査読無し

1. 片桐洋樹、古賀英之. スポーツ選手における外側半月板損傷の諸問題. 第 17 回 東京スポーツ整形外科研究会 2019.04.13
2. 片桐洋樹, 小田邊浩二, 中川裕介, 大原敏之, 塩田幹夫, 河野佑二, 星野傑, 関矢一郎, 古賀英之. 高度変形性膝関節症における圧痛点の関節内疼痛評価としての有用性. 第 49 回 日本人工関節学会 2019.02.16 東京
3. 片桐洋樹、小田邊浩二、中川裕介、大原敏行、塩田幹夫、河野佑二、星野傑、関矢一郎、古賀英之. 半月板 centralization を併用した高位脛骨骨切り術の関節裂隙開大の効果と 2 年成績. 第 5 回 関東 KneeOsteotomy 研究会 2019.01.26 東京
4. 片桐洋樹, 小田邊浩二, 中川裕介, 大原敏行, 塩田幹夫, 河野佑二, 星野傑, 関矢一郎, 古賀英之. 前十字靭帯損傷に伴う半月板損傷・縫合術後の半月板逸脱は軟骨変性を助長する. 第 29 回 日本臨床スポーツ医学会学術集会 2018.11.02 札幌
5. 片桐洋樹. 変形性膝関節症に対する外科的治療 update ー半月板損傷・逸脱の視点からー. 第 18 回 膝と歩む会 2018.07.03
6. 片桐洋樹、古賀英之、渡邊敏文、堀江雅史、小田邊浩二、大原敏行、片桐健太、宮武和正、関矢一郎、大川淳、宗田大. 移植腱張力変化にて大腿骨孔作製位置を決定した内側膝蓋大腿靭帯再建術と触診法の術後成績の比較. 第 10 回 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2018.06.14
7. 片桐洋樹、古賀英之、渡邊敏文、堀江雅史、小田邊浩二、大原敏行、片桐健太、川田和正、関矢一郎、大川淳、宗田大. 前十字靭帯損傷に伴う内側半月板損傷、半月板縫合術と半月板逸脱の関係. 第 10 回 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2018.06.14
8. 片桐洋樹、中村香織、辻邦和、関矢一郎、古賀英之、宮武和正、大川淳、宗田大. 膝前十字靭帯再建術後の顆粒球の関節液浸潤と鎮痛作用. 第 32 回日本整形外科学基礎学会学術集会 2017.10.26
9. 片桐洋樹、古賀英之、渡邊敏文、堀江雅史、中村智祐、小田邊浩二、大原敏之、片倉麻衣、関矢一郎、宗田大. 移植腱張力変化と解剖所見に基づいた内側膝蓋大腿靭帯再建術の術後成績. 第 9 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2017.06.22
10. 片桐洋樹、中村香織、片倉麻衣、大原敏之、小田邊浩二、中村智祐、堀江雅史、渡邊敏文、関矢一郎、宗田大、古賀英之. 術中 pivot shift 現象の定量評価に基づき移植腱初期張力を決定した 2 重束前十字靭帯再建術の術後成績. 第 9 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2017.06.22
11. Hiroki Katagiri, Mendes LF, Luyten FP. Definition of a Critical Size Osteochondral Knee Defect and its Negative Effect on the Surrounding Articular Cartilage in the Rat. 5th BSTE 2017.05.04 Belgium
12. 渡邊敏文、宗田大、古賀英之、堀江雅史、片桐洋樹、小田邊浩二、大原敏之、片倉麻衣、関矢一郎. 人工関節置換術膝の生体内キネマティクスと可動域. ICJR 2017.04.14

〔図書〕(計 2 件)

1. 片桐洋樹, 堀江雅史, 古賀英之. 【変形性膝関節症の病態と治療-半月板逸脱-】 変形性膝関節症に伴う半月板逸脱に対する外科的治療 運動器リハビリテーション. 2018.05; 29 (1): 24-30.
2. 片桐洋樹、宗田大、渡邊敏文、堀江雅史、宮武和正、古賀英之. 伸展位から深屈曲位までの移植腱張力変化に基づいた内側膝蓋大腿靭帯再建術の術後成績. 別冊整形外科. 2018.04; (73): 164-168.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。