

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：82710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09049

研究課題名(和文)変性軟骨から遊離する因子の網羅的解析による変形性関節症の滑膜病変の解明

研究課題名(英文)Exploration of possible pathogenic factors released from osteoarthritic cartilage

研究代表者

大橋 暁 (Ohashi, Satoru)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・外科系臨床研究室・医長

研究者番号：20466767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではOA関節において変性軟骨から遊離して滑膜病変を引き起こす因子を探索することが目的であった。研究においてはOA関節と対照関節から軟骨組織を採取してこれに繰り返し荷重負荷を加え、それにより遊離する因子を特定するという方法を行った。因子の解析には当初二次元電気泳動を試みたが、研究経費の制約を考慮してiTRAQを用いたプロテオーム解析を行うことに方針を変更し、OA軟骨2例と対照軟骨2例について解析を行って遊離量が有意に異なる因子を複数同定した。これと並行してLuminexによる定量的解析も行い、VEGF-AとFGF-2が対照軟骨に比してOA軟骨より有意に多量に遊離することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではOAの滑膜病変が変性軟骨に関連して生じる点に着目し、変性軟骨から遊離して滑膜病変を引き起こす因子を見出すことを目的に研究を進めた。その結果、変性軟骨から荷重負荷によって複数の因子が対照軟骨よりも有意に多量に遊離することを見出した。実際のOA関節では荷重負荷によって変性軟骨から遊離する因子がOAの病態形成に関与すると考えられるが、本研究のような方法で検討を行った報告は今までなく、本研究の結果は新規であるとともにOAの病態解明に有用な情報となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In osteoarthritis (OA), synovial pathology may be induced by the factors released from degenerated cartilage upon loading. The objective of this study was to explore the factors which were released from osteoarthritic cartilage and could be involved in the development of synovial pathology in OA. To that end, OA cartilages and control cartilages were obtained from end-stage OA knees and non-pathological knees of dissected donors, respectively, and a load of 1 MPa was applied repeatedly on each cartilage. The proteins released from the cartilages upon loading were analyzed by a proteome analysis using iTRAQ. In result, several proteins including fibronectin and type I collagen were found to be released abundantly from the degenerated OA cartilage upon loading compared to the controls. We further performed a quantitative analysis of the released proteins using a Luminex, and found that VEGF-A and FGF-2 were released more abundantly from the OA cartilage compared to the controls.

研究分野：整形外科学関節疾患

キーワード：変形性関節症 軟骨 滑膜病変 荷重

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来軟骨の変性疾患とされてきた変形性関節症(OA)であるが、多くの疫学研究の結果から、滑膜病変がOAにおいても症状、とくに痛みと疾患の進行の両方に深く関与していることが明らかになってきた。また最近では早期OAが進行期OAへと進行する場合にも滑膜病変が重要であることが報告されている(Felson DT, *Osteoarthritis Cartilage* 2016; Atukorala I, *Ann Rheum Dis* 2016)。これらの知見から、滑膜病変を改善することによってOAの症状が改善するばかりか進行も抑止できる可能性が考えられる。しかしOAで滑膜に病変が生じる機序は未だに明らかになっていない。

OAにおける滑膜病変は軟骨の変性と密接に関連する。したがって変性軟骨から何らかの因子が遊離して滑膜に病変を誘導する可能性が以前から考えられてきた。軟骨の変性産物、とくにフィブロネクチンやII型コラーゲンの変性断片が滑膜に炎症を引き起こす可能性については1980年代から報告があり、また最近では壊死細胞から放出されるDAMPsあるいはalarminsと呼ばれる一群のタンパクが滑膜病変を引き起こす可能性についても報告がある(Liu-Bryan R. *Curr Rheumatol Rep* 2013)。しかし実際のOA関節においてどのような因子がどのくらいの量で変性軟骨から遊離するのかについては検討が行われていない。本研究ではこのような背景に基づき、OA軟骨から遊離して滑膜病変を引き起こす因子を網羅的・包括的な解析によって見出すことを目的として行われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変形性関節症に罹患した膝関節において変性軟骨より遊離し、滑膜病変を引き起こす因子を見出すことであった。

3. 研究の方法

(1) 変性軟骨より遊離する因子の探索

本研究では当初、OA 関節より採取された軟骨組織を組織培養によって維持した際に培養上清中に遊離してくる因子を解析することを予定し、研究初年度にはこの研究方法の妥当性についてまず検討を行った。その結果、軟骨組織中の遺伝子の発現は組織培養によってあまり変動しないものも多い反面、遺伝子によっては数日間の組織培養でも無視できないレベルの変動をきたすものもあることが明らかとなった。このことから本研究では研究方法を変更し、よりOAの病態に近い状態を考えて解析を軟骨組織の培養上清中の因子ではなく、軟骨組織から荷重によって遊離する因子について行うこととした。この検討のために人工関節置換が行われた末期OA膝関節10例からOA軟骨を採取し、また剖検例9例において関節疾患の病歴がない膝関節9関節から対照軟骨を採取した。対照軟骨についてはさらに肉眼的所見によりOA変化がほとんど見られない膝関節(対照軟骨)と軽度のOA変化が認められる膝関節(軽度変性対照軟骨)とに分けて解析を行った。OA軟骨については各関節において軟骨の肉眼的な変性部(OA軟骨変性部)と非変性部(OA軟骨非変性部)からそれぞれ軟骨を採取して解析した。軟骨組織に対する荷重負荷には力学試験機を用いることとし、平地歩行の際に軟骨に加わる荷重である1 MPaの荷重を繰り返して加えることで軟骨から遊離するタンパクを解析することとした。

(2) 変性軟骨から遊離する因子の同定

変性軟骨から遊離する因子を同定するために、本研究ではまず1例のOA関節から採取した軟骨の肉眼的変性部と非変性部から採取した軟骨について荷重抽出液を用意し、これを二次元電気泳動(2D-Difference Gel Electrophoresis、以下2D-DIGE)により比較解析した。この解析ではIEF-PAGE(pI 3-11, 24 cm NL)による等電点電気泳動によって一次展開を行ったのち、12.5%のcontinuous gelを用いて20 cm × 24 cmのSDS-PAGEで二次展開を行い、Cy5を用いてSaturation labelling法によって展開されたタンパクを検出した。画像をTyphoon 9400(Amersham Biosciences/GE Healthcare)で取り込み、画像解析ソフトSameSpots(Progenesis)を用いて二検体間でdensityの異なるスポットを同定した。

(3) iTRAQを用いたプロテオーム解析

本研究では2D-DIGEによる解析が経費の点で実際的でないと判断したことからそれに引き続いてiTRAQ(Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation)によるプロテオーム解析を行った。この解析は外部業者への委託解析として行われたので、解析法の原理の概略のみを述べる。軟骨組織から荷重によって遊離タンパクをトリプシンによりペプチド化したのちisobaric tagにより標識した。強陽イオン交換体カラムにより分画したのち、LC/MS/MSによるタンデム質量分析を行うことで各検体に含まれるタンパクを網羅的・半定量的に同定した。

(4) Luminexを用いた定量的解析

プロテオーム解析により見出された因子のうち、OAの滑膜病変に関与する可能性のある因子を選択し、それぞれについて軟骨組織からの遊離量をLuminexを用いて計測した。

4. 研究成果

(1) 2D-DIGEによる解析結果

末期OA関節のにくがんできな変性部(P)および非変性部(D)から採取された軟骨に繰り返し荷重負荷を加えた場合に遊離したタンパクを2D-DIGEにより解析した結果を以下に示す。合計400のスポットが同定されたが、そのうちPに比してDのdensityが2倍を超えるスポットは40、逆に1/2未満のスポットは19見いだされた(表および図1、2)。この解析ではPに比してDからの遊離量が増加しているタンパクよりも低下しているタンパクのほうが多いという結果であった。

D/P ratio	No of Spots
> 3.0	8
> 2.0	40
> 1.5	109
< 0.67	50
< 0.5	19
< 0.33	6

表. 同定された400のスポットのうち、Pに対するDの比が1.5を超えるもの、あるいは0.67未満のものスポットの個数を示した。

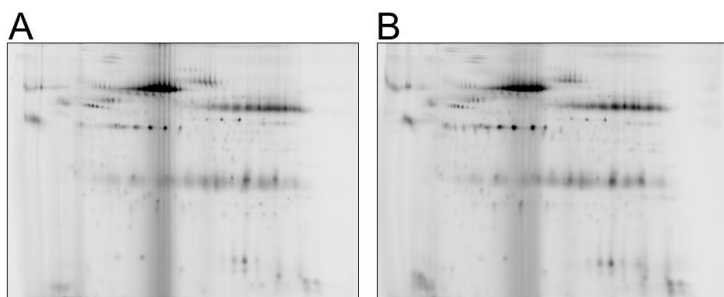


図1.肉眼的な非変性部(A)及び変性部(B)からの遊離タンパクを二次元電気泳動によって展開した結果を示す。

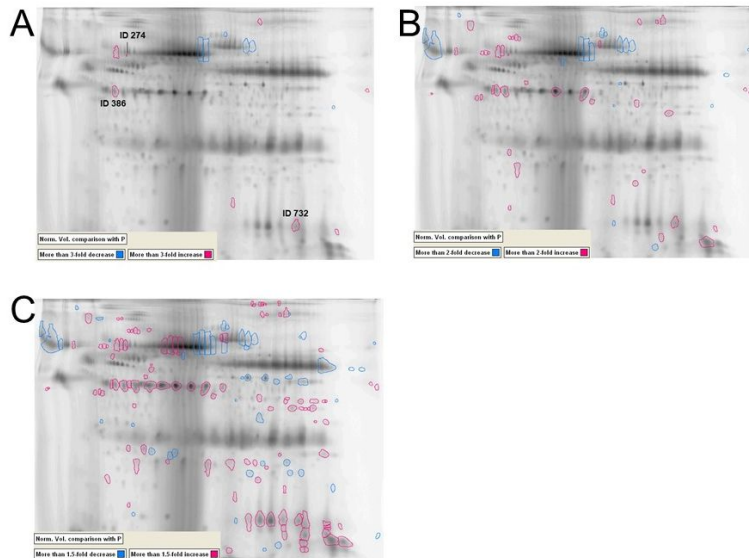


図2. 2D-DIGEの解析結果。軟骨変性部より遊離したタンパクを展開したものに、非変性部との比較で3倍(A)、2倍(B)、1.5倍以上(C)スポットのdensityに差があったものを示した。赤線で囲まれたスポットは非変性部からの遊離量に比して変性部からの遊離量が増加しているもの、青線で囲まれたスポットは低下しているものをそれぞれ示す。

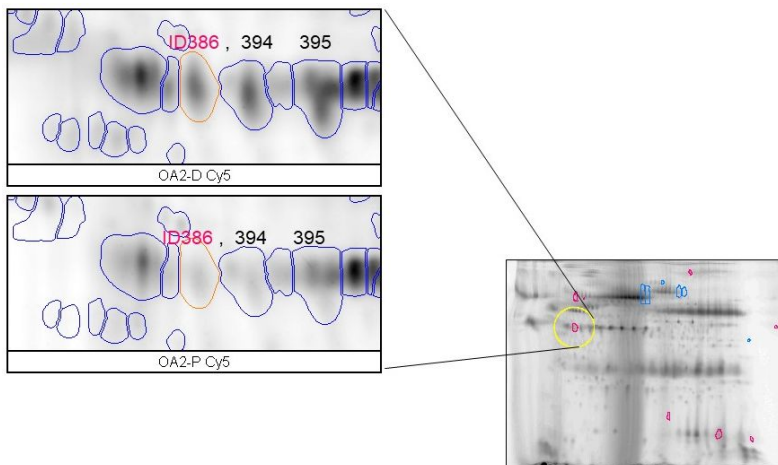


図3. Pに比してDからの遊離量が多かったスポットの例。ここに示す3つのスポット(ID386、394、395)はいずれもPからに比してDから遊離量が多く、スポットのdensityの比の値はそれぞれ3.404、2.886、1.729であった。

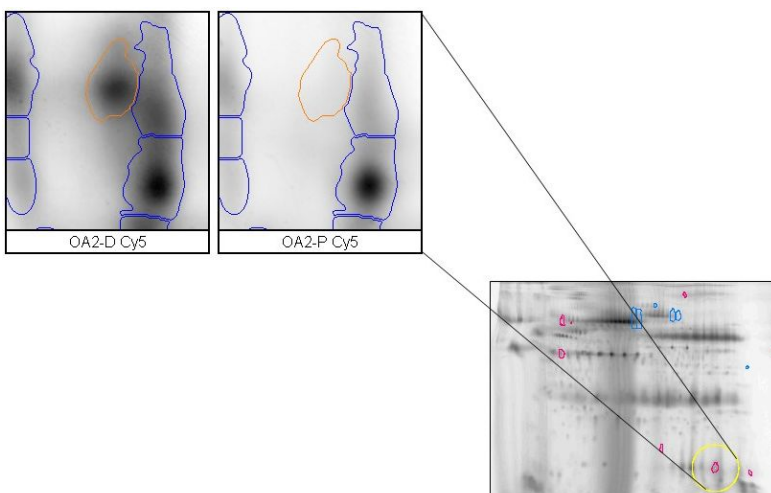


図4 . Pに比してDからの遊離量の比が最も高かったスポット。ここに示すスポットはPに比してDのスポットのdensityの比が最も高く、比の値は5.398であった。

(2) iTRAQによる解析の結果

2D-DIGEの解析ではPとDの間で遊離量の異なるタンパクに対応するスポットは同定できても、それがどのようなタンパクであるのかは新たに解析を行う必要がある。これに対してiTRAQは2検体間で濃度に差のあるタンパクを網羅的・定量的に見出したうえ因子の特定も同時に行える優れた方法である。このため本研究では上記の2D-DIGEによる解析を途中で中止し、iTRAQによる解析を行った。その結果の詳細は現在作成中の論文において公表を予定しているため本報告書で示すことができないが、この解析ではPに比してDからの遊離量が2倍以上多かったタンパクが合計18見出すことができ、その中にはCartilage oligomeric matrix protein (COMP)、Fibronectin、Lumican、Fibromodulin、Biglycan、I型コラーゲンなど対照軟骨に比してOA軟骨において遺伝子発現が亢進していることが報告されている因子が含まれていた。このことは本解析の妥当性を示すものと考えられた。一方、この解析ではサイトカインや成長因子はまったく検出されず、iTRACと質量分析による解析はマトリクスの構成要素のように比較的多量に存在するタンパクを見出すうえでは有用であるが、サイトカインや成長因子のように強い生理活性をもつものの少量しか存在しないタンパクは検出しにくいという解析の限界も明らかになった。この結果に基づき、本年度の後半には主にLuminexを用いてOAの滑膜病変に関与する可能性があると考えられる種々の生理活性因子について個別に荷重抽出液の解析を行うこととした。

(3) Luminexによる定量的解析

OA滑膜では血管新生が亢進していることについては複数の報告がある (Mappi and Walsh, Nat Rev Rheumatol 2012, 総説)。研究代表者らは変性軟骨から血管新生を誘導する因子が遊離している可能性を考え、血管新生を誘導する作用があるVEGF-AとFGF-2について荷重抽出液中の濃度を計測した。その結果、この2つの因子はいずれも荷重によってOA軟骨から対照軟骨に比べて有意に多量に遊離することが明らかとなった (図5)。

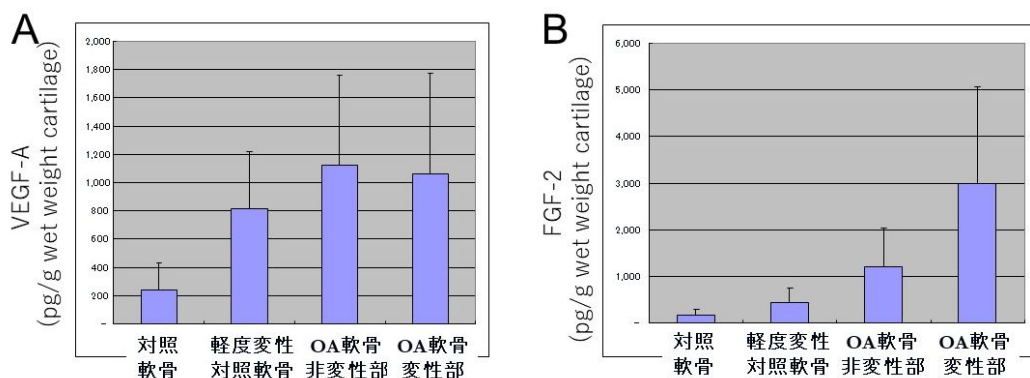


図5. 荷重によって軟骨組織から遊離したVEGF-A (A) およびFGF-2 (B)。軟骨の湿重量で補正した値を示した。

本研究では以上の解析を行ったが、当初の研究目的を十分達成するには至っていない。現在、iTRAQを用いたプロテオーム解析の結果についてさらに検討を行っており、またLuminexによる解析でも上記のVEGF-AとFGF-2以外の因子について定量的な解析を進めている。今までに得られた成果から、軟骨から荷重によって遊離する因子を解析するという我々の研究方法は、新規ではあるが有用性の高いアプローチと考えられる。今後さらに研究費を獲得して本アプローチを発展させ、OAの病態解明に貢献することを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinoda Y, Kobayashi H, Kaneko M, Ohashi S, Bessho M, Hayashi N, Oka H, Imanishi J, Sawada R, Ogura K, Tanaka S, Haga N, Kawano H.	4. 巻 24(6)
2. 論文標題 Prediction of the pathological fracture risk during stance and fall-loading configurations for metastases in the proximal femur, using a computed tomography-based finite element method.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci.	6. 最初と最後の頁 1074-1080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2019.08.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka N, Tashiro T, Katsuragawa Y, Sawabe M, Furukawa H, Fukui N.	4. 巻 18;20(1)
2. 論文標題 Expression of Minor Cartilage Collagens and Small Leucine Rich Proteoglycans May Be Relatively Reduced in Osteoarthritic Cartilage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord.	6. 最初と最後の頁 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2596-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahata Y, Nakamura E, Hata K, Wakabayashi M, Murakami T, Wakamori K, Yoshikawa H, Matsuda A, Fukui N, Nishimura R.	4. 巻 33(1)
2. 論文標題 Sox4 Is Involved in Osteoarthritic Cartilage Deterioration Through Induction of ADAMTS4 and ADAMTS5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 619-630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201800259R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lyman S, Omori G, Nakamura N, Takahashi T, Tohyama H, Fukui N, Ikeda H, Sasho T, Saito T, Hayashi Y, Deie M.	4. 巻 24(3)
2. 論文標題 Development and Validation of a Culturally Relevant Japanese KOOS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci.	6. 最初と最後の頁 514-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2018.11.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T Doi , S Hirai , M Kaneko , S Ohashi , K Nakajima , F Oguchi , S Kato , Y Taniguchi , Y Matsubayashi , N Hayashi , S Tanaka , Y Oshima	4. 巻 31(4)
2. 論文標題 Bone Strength of the Proximal Femur in Healthy Subjects With Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoporos Int .	6. 最初と最後の頁 757-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-019-05253-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nobuho Tanaka , Hirotaka Tsuno , Satoru Ohashi , Mitsuyasu Iwasawa , Hiroshi Furukawa , Tomohiro Kato , Naoshi Fukui	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 The attenuation of insulin-like growth factor signaling may be responsible for relative reduction in matrix synthesis in degenerated areas of osteoarthritic cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord .	6. 最初と最後の頁 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-021-04096-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono K, Ohashi S, Oka H, Kadono Y, Yasui T, Matsumoto T, Omata Y, Tanaka S.	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Evaluations of daily teriparatide using finite-element analysis over 12 months in rheumatoid arthritis patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab .	6. 最初と最後の頁 270-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01146-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内尾 明博、岩澤 三康、大橋 暁
2. 発表標題 関節リウマチの不安定肘に対する人工肘関節全置換術で安定性を得る工夫
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋 暁、岩澤 三康、内尾 明博、大野 久美子、大橋 俊郎、谷 知久、松井 利浩、田中 栄、當間 重人、岡 敬之
2. 発表標題 NinJa2018における口コモ25と患者背景・状態の関連性についての検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井 尚志、田中 信帆、津野 宏隆、大橋 暁、岩澤 三康、古川 宏
2. 発表標題 変形性関節症における滑膜病変
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 信帆、津野 宏隆、大橋 暁、岩澤 三康、福井 尚志
2. 発表標題 タンパク分解酵素の活性化に着目した変形性膝関節症における軟骨の変性機序の検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆、田中 信帆、大橋 暁、岩澤 三康、松井 利浩、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症および関節リウマチに罹患した軟骨から荷重によって遊離する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆、田中 信帆、大橋 暁、岩澤 三康、松井 利浩、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症に罹患した軟骨によって遊離する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第74回国立病院総合医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井尚志、田中信帆、津野宏隆、大橋 暁、岩澤三康
2. 発表標題 変形性関節症の病態に関する最近の理解－痛みと疾患進行のメカニズムを中心に－
3. 学会等名 第35回 日本整形外科基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 信帆、大橋 暁、田代 俊之、桂川 陽三、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症に置ける軟骨の変性機序の検討
3. 学会等名 第12回 JOSKAS - 第46回 JOSSM
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋 暁、田中 信帆、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症と関節リウマチ患者に置けるTKA術前後の患者立脚型評価スコア（KOOS・ロコモ25）の変化
3. 学会等名 第12回 JOSKAS - 第46回 JOSSM
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoshi Fukui, Nobuho Tanaka, Ohashi Satoru, Toshiyuki Tashiro, Yozo Katsuragawa
2. 発表標題 Synovial Changes in Early Knee OA
3. 学会等名 第12回 JOSKAS - 第46回 JOSSM (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩澤三康、田平敬彦、大橋暁
2. 発表標題 工藤式人工肘関節(K-elbow)の歴史と機種デザインから考える人工肘関節のゆるみ
3. 学会等名 第33回日本肘関節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 信帆、津野 宏隆、大橋 暁、岩澤 三康、田代 俊之、桂川 陽三、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症における軟骨の変性・消失にはプラスミンが関与している可能性がある
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆、田中 信帆、大橋 暁、岩澤 三康、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症に罹患した軟骨より荷重によって遊離する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆、田中 信帆、大橋 暁、岩澤 三康、松井 利浩、福井 尚志
2. 発表標題 関節リウマチ (RA) と変形性関節症 (OA) における疼痛に関与しうるmiRNAの検討-関節液中のexosomeに含まれるmiRNAの解析結果から-
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 信帆、大橋 暁、高群 浩司、田代 俊之、桂川 陽三、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症では変性軟骨から遊離した活性型TGF 1によって滑膜においてウロキナーゼの発現が誘導されている
3. 学会等名 第11回JOSKAS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukui N, Tanaka N, Ohashi S
2. 発表標題 Significance of Synovitis in Early Osteoarthritis
3. 学会等名 第11回JOSKAS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋 暁、福井 尚志、高群 浩司、田中 信帆
2. 発表標題 Ehlers-Danlos症候群に伴う高度外反不安定膝に対してPS型人工関節置換術を施行した一例
3. 学会等名 第11回JOSKAS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内尾明博、大橋暁、岩澤三康、霜村耕太、田平敬彦
2. 発表標題 若年性特発性関節炎後の両強直股に対して前後方同時進入法を用いた両THAを行い良好な短期成績を得た1例
3. 学会等名 第50回日本人工関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 尚志, 田中 信帆, 大橋 暁, 岩澤 三康, 増田 公男, 古川 宏
2. 発表標題 変形性関節症における滑膜病変
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 信帆, 大橋 暁, 高群 浩司, 増田 公男, 田代 俊之, 桂川 陽三, 福井 尚志,
2. 発表標題 変形性関節症では変性軟骨からMIFが遊離して滑膜病変に関与する可能性がある
3. 学会等名 第10回JOSKAS
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋 暁
2. 発表標題 変形性関節症における疼痛マネジメント
3. 学会等名 第3回神奈川脊椎・関節疾患カンファレンス
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担 者	福井 尚志 (Fukui Naoshi) (10251258)	独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・政策医療企画部・特別研究員 (82710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------