

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09066

研究課題名（和文）神経ペプチドを標的とした変形性関節症の新規治療戦略策定に向けた分子機序解明

研究課題名（英文）Therapeutic strategy for osteoarthritis by targeting neuropeptides.

研究代表者

中佐 智幸（Nakasa, Tomoyuki）

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：60467769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症（OA）での軟骨下骨の骨硬化や、半月板、靭帯等の関節構成組織の変性をきたす因子として神経ペプチドに着目した。神経ペプチドは疼痛だけではなく、骨代謝等の多様な機能を持つ。神経ペプチドとしてCGRP、VIP、substance Pについて、ヒトOA組織とOAマウスでの発現を調べたところ、これらは軟骨下骨の骨硬化とともに発現が上昇していた。OAマウスへのCGRP、VIP受容体拮抗薬、substance P受容体作動薬の腹腔内投与により、OA進行が抑制された。また、OAマウスの血清を用いてmicroRNAのRNA sequenceを行い、OAの発症に伴い変動するmicroRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのOAの病態における研究は、関節軟骨や炎症性サイトカイン、軟骨基質分解酵素等に関するものが多かった。またOAにおける神経ペプチドの研究も散見されるが、これらは疼痛に関するものであった。本研究では、神経ペプチドが疼痛だけではなく、骨代謝や炎症、血管新生等にも関わっており、治療標的となる可能性が示唆できた。現状では、OAの進行を遅らせる薬剤はない。神経ペプチド受容体拮抗薬は、偏頭痛の治療薬等で実際に臨床において使用できるものもあり、drug repositioningにより、新たなOAの治療薬に発展するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In the OA pathogenesis, cartilage degeneration due to the subchondral bone sclerosis and degenerations of the tissues such as menisci and ligament occur. Identification of factors which causes these changes will lead to develop new treatment. We focused on neuropeptides which have various functions such as bone metabolism and angiogenesis as well as pain. We showed that neuropeptides are involved in the OA pathogenesis. The expression patterns of the calcitonin gene-related peptide (CGRP)、vasoactive intestinal peptide (VIP)、substance P were examined in human OA and OA model mice. The expression of these neuropeptides increased with the sclerotic changes of the subchondral bone. Interaperitoneal administration of CGRP, VIP receptor antagonist, and substance P agonist to OA model mice could suppress the OA progression. In addition, RNA sequence of microRNA using OA model mice serum revealed some expression patterns during OA progression.

研究分野：関節外科学

キーワード：変形性関節症（OA） 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

関節破壊をきたす代表的な疾患である変形性関節症(OA)は、はかり知れない苦痛と運動機能障害を与え、患者数は1,200万人で要治療者は700万人と言われている。しかし、その原因は解明されておらず、新たな治療ターゲットを発見することは、従来にない画期的な治療法の開発につながる可能性がある。現状では、OAの発症・進行を抑制する薬剤は存在しない。その原因は、OA発症のメカニズムが完全に解明されていないことによるところが大きい。これまで、多くのOA研究は、関節軟骨を対象としており、メカニカルストレスや炎症による軟骨損傷・変性に焦点があてられてきた。しかし、これらの研究に関わらず有効な治療法への発展には至っていない。本研究では、OAの病態における神経ペプチドに着目する。関節軟骨を支える軟骨下骨は、軟骨の恒常性に重要な役割を担っており、軟骨下骨に骨硬化等の異常が起きると、軟骨の恒常性が維持できず、軟骨変性が進行することがわかっている。したがって、OAの進行を防ぐためには、軟骨下骨の状態を維持することが重要な点の一つであるといえる。神経ペプチドは、痛みの伝達物質であるだけでなく、多彩な機能を有している。その中でも、神経ペプチドが骨代謝を制御していること、OAの軟骨下骨での発現が増加することに着目し、神経ペプチドの一つであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP)が、OAマウスの軟骨下骨で骨硬化とともにその発現が増加し、さらにCGRP受容体拮抗剤が軟骨下骨の骨硬化を抑え、軟骨変性といったOA進行を抑制できることを示した(Nakasa *et al.* *J Orthop Res* 2016)。しかし、CGRPの他にも骨代謝を制御する神経ペプチドは存在する。またOAでは、関節内構造物である半月板、靭帯も変性し、関節の変形を進行させる。特に、半月板、靭帯ともに、OAが進行すれば、線維芽細胞主体の組織に、軟骨様細胞が増殖し、骨化を生じている例も散見される。この内軟骨性骨化ともいえる現象を、骨形成を誘導する神経ペプチドが引き起こしている可能性がある。軟骨は血行がなく、軟骨細胞も周囲を豊富に基質に覆われているため、薬剤は届きにくい。しかし、軟骨下骨、半月板、靭帯の神経ペプチドを標的とする、血行性に薬剤が到達でき、OA治療薬の開発につながることを期待される。実際に神経ペプチドの受容体拮抗薬は、偏頭痛の治療薬等、臨床で使用されているものも存在し、神経ペプチドがOAの病態に重要な役割を担っていることが証明されれば、こうした薬剤を投与し、OAの進行が抑制できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、神経ペプチドを標的としたOAの新規治療の開発のため、
神経ペプチドの軟骨下骨、半月板、靭帯での異常発現によりOAが進行すること
神経ペプチド受容体拮抗剤を投与とすることで、OAの進行が抑制できること
OAの早期診断のための新規診断マーカーを確立すること

の3つを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトOA組織とOAモデルマウスにおける神経ペプチドの発現解析

OAに対して人工膝関節置換術の際に廃棄される骨軟骨組織を用いた。切除した脛骨に対し、 μ CTを撮影し、切片を作製した。サフラニンO染色を行い、軟骨変性の程度からグレーディング(OARSIスコア)した。さらに連続切片を用いて、神経ペプチド(CGRP、VIP、substance P)の免疫染色を行った。同様に人工膝関節置換術の際に廃棄される後十字靭帯から切片を作製し、サフラニンO染色、神経ペプチドの免疫染色(CGRP、substance P)を行った。また、10週齢C57BL/6マウスの膝内側meniscotibial ligamentを切離し、不安定性によるOAを誘導する(DMMマウス)モデルマウスを作製した。2、7、28、56日後に屠殺し、膝関節を摘出した。 μ CT後、切片を作製し、サフラニンO染色による軟骨変性の評価と、CGRP、VIP、Substance Pの免疫染色を行い、軟骨下骨、半月板、靭帯での神経ペプチドの発現パターンを解析した。また、老化促進マウス(senescence accelerated mouse; SAM)を用いて、OA自然発症においても神経ペプチドの発現パターンを解析した。ALP染色、TRAP染色を行い、 μ CTの所見と合わせて、OA発症・進行における軟骨下骨の骨形態変化と神経ペプチドの発現パターンの解析を行った。

(2) OAにおける神経ペプチドの機能解析

骨代謝における影響：ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用い、骨分化誘導の際に、神経ペプチドの受容体拮抗薬を添加し、骨分化を評価した。

血管新生における影響：OAの病態では、軟骨下骨から軟骨層への血管侵入など、異常な血管新生もOA進行の重要な因子といわれている。血管内皮前駆細胞であるHUVEC細胞を用い、神経ペプチドの受容体拮抗薬を添加し、血管新生が抑制できるか評価した。

靭帯変性への影響：ヒト前十字靭帯から靭帯細胞を単離し、培養した。神経ペプチドの受容体拮抗薬、拮抗薬を添加し、遺伝子発現、骨分化、軟骨分化、脂肪分化における影響を評価

した。

(3) 神経ペプチドを標的とした治療効果の検討

10 週齢 C57BL/6 マウスを用いて DMM マウスを作製し、CGRP 受容体拮抗薬、VIP 受容体拮抗薬、substance P 受容体作動薬・拮抗薬を腹腔内に投与した。28, 56 日後に屠殺し、膝関節を摘出し、 μ CT による骨形態の観察と組織学的評価を行った。また、SAM マウスにも CGRP 受容体拮抗薬、substance P 受容体作動薬を腹腔内に投与し、OA の進行が抑制できるか検討した。

(4) OA の早期診断マーカーの確立

10 週齢 C57BL/6 マウスを用いて DMM マウスを作製し、2 日、7 日で採血を行い、sham マウスの血液とともに血清を採取した。これから RNA を抽出し、microRNA の RNA sequence を行い、発現プロファイリングを行った。

4. 研究成果

(1) OA モデルマウスにおける神経ペプチドの発現解析

ヒト OA 組織では、CGRP、VIP は、OA が進行すると軟骨下骨の骨硬化とともに軟骨下骨で発現が増加していた。特に、関節軟骨と軟骨下骨との境界部において、血管とともに関節軟骨層へと侵入していた。マウスでも同様に OA の進行に伴い、軟骨下骨において発現が増加していた。Substance P は、正常関節軟骨においてもっとも発現が多く、OA の進行に伴い発現が減少していた。軟骨下骨においても、OA の進行に伴い発現が減少していた。ヒトの後十字靭帯では、靭帯変性が進行していくにつれて、靭帯内の軟骨様細胞に CGRP、substance P が発現し、その数は増加していた。CGRP、substance P の発現は、sox9 の発現と一致していた。靭帯変性がさらに進行するとこれらの発現は減少していた。DMM マウス、SAM マウスにおいても同様の発現パターンを示していた。

(2) OA における神経ペプチドの機能解析

神経ペプチド受容体作動薬を MSC に添加し、骨分化誘導培地を用いて培養したところ、骨分化が促進されていた。HUVEC による血管新生の評価では、VIP 受容体作動薬を添加したところ、血管新生は有意に促進された。ヒト前十字靭帯細胞に CGRP 受容体作動薬を添加して、骨分化誘導、脂肪分化誘導、軟骨分化誘導を行ったところ、CGRP によって骨分化と軟骨分化が促進されていた。軟骨分化においては、CGRP の添加により、軟骨ペレットが大きくなっていた。また、CGRP 受容体作動薬の添加により、Sox9 や Runx2 といった内軟骨性骨化に関わる転写因子、靭帯変性に関わる MMP13 の発現増加が PCR により明らかとなった。

(3) 神経ペプチドを標的とした治療効果の検討

DMM マウス作製時に VIP 受容体拮抗薬を腹腔内に投与したところ、28 日、56 日で、対照群と比較し、VIP 受容体拮抗薬投与群では、軟骨下骨の骨硬化が抑制され、OARSI スコアも有意に低値であった。Substance P では、受容体作動薬と拮抗薬を DMM マウス作製時に腹腔内に投与した。受容体作動薬を投与した群では、対照群、拮抗薬投与群と比較し、有意に OARSI スコアが低値であった。軟骨基質分解酵素である MMP13、ADAMTS5 の関節軟骨での発現も、受容体作動薬を投与した群で少なくなっていた。受容体作動薬を SAM マウスに 1 週間毎に連続投与したところ、膝の脛骨内側における軟骨下骨の骨硬化を抑制していた。先行研究にて、CGRP 受容体拮抗薬を DMM マウス作製時に腹腔内投与したところ、OA 変化が抑制されていたが、56 日になると軟骨下骨の骨硬化をきたしていたことから、今回は、1 週間毎に CGRP 受容体拮抗薬を腹腔内投与した。その結果、受容体拮抗薬を投与した群では 56 日においても軟骨下骨の骨硬化をきたすことなく、OA の進行を抑制できていた。

(4) OA の早期診断マーカーの確立

RNA sequence の結果により、いくつか経時的に発現が変動する microRNA があり、これらの microRNA について、DMM マウスの 2, 4, 14, 28 日の血清を用いて PCR を行った。現在、さらに数を増やして、解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanemitsu Munekazu, Nakasa Tomoyuki, Shirakawa Yoshiko, Ishikawa Masakazu, Miyaki Shigeru, Adachi Nobuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Role of vasoactive intestinal peptide in the progression of osteoarthritis through bone sclerosis and angiogenesis in subchondral bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 897 ~ 906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2019.11.010	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白川圭子、中佐智幸、金光宗一、石川正和、眞田洋平、味八木茂、安達伸生
2. 発表標題 変形性膝関節症におけるsubstance Pの治療効果の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川圭子、中佐智幸、金光宗一、石川正和、味八木茂、安達伸生
2. 発表標題 変形性膝関節症におけるsubstance Pの軟骨・半月板での発現
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金光宗一、中佐智幸、白川圭子、石川正和、味八木茂、安達伸生
2. 発表標題 半月板変性におけるvasoactive intestinal peptide(VIP)の関連
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
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	安達 伸生 (Adachi Nobuo) (30294383)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
研究分担者	石川 正和 (Ishikawa Masakazu) (60372158)	広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座准教授 (15401)	

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
---------	---------