

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09119

研究課題名（和文）神経ペプチドを介した血管内皮増殖因子による炎症非依存性疼痛惹起メカニズムの解明

研究課題名（英文）Inflammatory-independent pain mechanism via to VEGF/neuropeptide axis

研究代表者

高相 晶士（Takaso, Masashi）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90439117

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）：血管内皮増殖因子（VEGF）を介した変形性関節症疼痛機序を解明するために、VEGF関連神経ペプチドの同定と疼痛への関与、および TGF- β による VEGF 調節機構を検討した。滑膜組織における VEGF 発現は疼痛スコア（VAS）と正の相関を示した。VEGF 刺激により Apelin の発現が上昇した。また、Apelin の発現は安静時痛と正の相関を示した。VEGF の発現は TGF- β によって誘導され、その発現は古典、非古典経路の阻害によって阻害された。本研究結果から VEGF は Apelin を介して疼痛に関与すること、その発現は TGF- β によって調節されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛の慢性化による我が国の経済損失は3,700億円と推定されており、疼痛治療メカニズムの解明および疼痛治療法の開発は、社会的、経済的基盤の改善に極めて重要な意義を持っている。本研究成果は、血管内皮増殖因子（VEGF）の上流ならびに下流を標的とした変形性関節症患者の疼痛治療の新たな治療標的を供給するものである。

研究成果の概要（英文）：Research suggests that vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in the synovial fluid of knee osteoarthritis (KOA) patients are positively correlated with KOA severity. The relationship between synovial VEGF levels and pain in human KOA patients is not fully understood, and the role of VEGF in the pain pathway remains unclear. We investigated the role of VEGF in the osteoarthritic pain pathway. Expression levels of VEGF were positively correlated with pain score, VAS. VEGF-positive cells were identified in the lining of the synovium. Expression of apelin mRNA and protein were significantly elevated in synovial cells treated with exogenous VEGF. Synovial apelin expression levels correlate with VAS. TGF- β regulated VEGF expression through the canonical and non-canonical pathway. TGF- β /VEGF/Apelin axis play an important role for inflammation-independent pain in patients with osteoarthritis.

研究分野：整形外科

キーワード：血管内皮増殖因子 疼痛 神経ペプチド Apelin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 28 年 10 月現在、わが国の 65 歳以上の高齢者人口の 総人口に占める割合 (高齢化率) は 27.3% となり他の国に類をみない超高齢者社会を迎えている。高齢化にともない変形性関節症患者は年々増加しており、近年の大規模な疫学調査結果から、OA 患者が 2400 万人、そのうち疼痛を有する患者が 800 万人存在することが明らかになっている。OA の主な愁訴は疼痛であるが、その疼痛は患者の生活の質、日常生活動作を著しく障害するため、健康寿命の延伸には疼痛治療が極めて重要である。申請者は OA の疼痛機序を解明すべく、OA マウス、臨床検体を用いて炎症性メディエータによる神経ペプチド制御機構の解明を行ってきた。しかし、患者疼痛スコアと炎症との関連性を検討した結果、炎症経路のみでは疼痛機序を説明できない可能性が示唆された。他方、滑膜組織における血管内皮増殖因子(VEGF)は炎症性メディエータ非依存性に疼痛を惹起している可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、VEGF を介した炎症非依存性の疼痛発生機序の解明と新規疼痛治療シーズの探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. VEGF 発現と疼痛との関連性の検討

全人工関節置換術時に変形性膝関節症患者より採取した滑膜組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて VEGF の発現を検討した。疼痛スコア (Visual analog Scale, VAS)、OA 進行度 (Kellgren-Lawrence 分類) と VEGF の相関を検討した。

3-2. VEGF 関連神経ペプチドの探索と疼痛との関連性の検討

in vitro 実験系を用いて VEGF が制御する神経ペプチドを探索した。滑膜線維芽細胞を採取、培養した。10, 100 ng/ml VEGF で刺激後、種々の神経ペプチド (Apelin, CGRP, Substance P, NPY, NPY, NPY) の発現をリアルタイム PCR, western を検討した。また、滑膜組織における VEGF の発現と相関を示す神経ペプチドを探索した。

3-3. VEGF 発現誘導機構の検討

ヒト滑膜組織をコラゲナーゼ処理した後、滑膜線維芽細胞を採取、培養した。1, 10 ng/ml の TGF- β を加え VEGF 発現および上清中の VEGF 濃度を検討した。また、TGF- β 添加と同時に ALK5 阻害剤 (SB505124), p38 阻害剤 (SB203580) を添加し、VEGF 発現に及ぼす影響を検討した。また、smad2, p38 のリン酸化を western blotting を用いて検討した。

4. 研究成果

4-1 VEGF 発現と疼痛との関連性

滑膜組織における VEGF 発現は疼痛に関与する可能性が示唆された (図 1A, $\rho = 0.346$, $p < 0.001$)。OA の進行度と VEGF との間に相関は認められなかった (図 1B)。

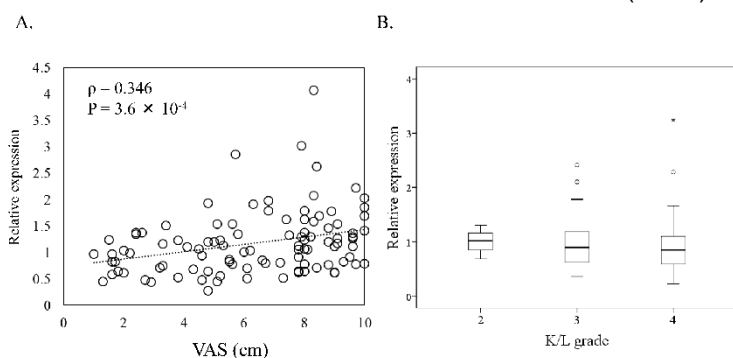


図 1. VEGF の発現と疼痛 (VAS), OA グレード (K/L grade)

4-2. VEGF 関連神経ペプチドの探索と疼痛との関連性の検討

滑膜線維芽細胞の VEGF 刺激により神経ペプチド Apelin mRNA, タンパクの発現が有意に上昇した。CGRP, Substance P, NPY, NPY, NPY の発現に有意な差は認められなかった。また、Apelin の発現は患者疼痛スコア (安静時) と正の相関を認めた ($\rho = 0.439$, $p = 0.017$)。

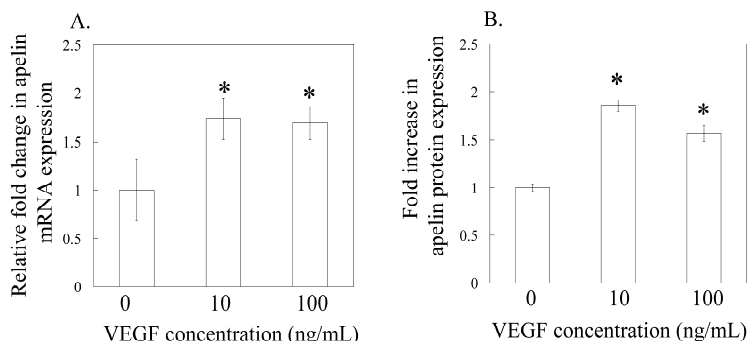


図 2. VEGF 刺激後の APELIN mRNA, apelin タンパク質の発現

4-3. TGF- β による VEGF 発現誘導機構

TGF- β 刺激によって VEGF mRNA の発現および上清中の VEGF タンパク濃度は有意に増加し、この上昇は ALK5 阻害剤によって完全に抑制された (図 3)。また、p38 阻害剤によって部分的に阻害された。ALK5 阻害剤により Smad2 のリン酸化が抑制された。ALK5 阻害剤、TAK1 阻害剤ともに p38 のリン酸化が低下した。

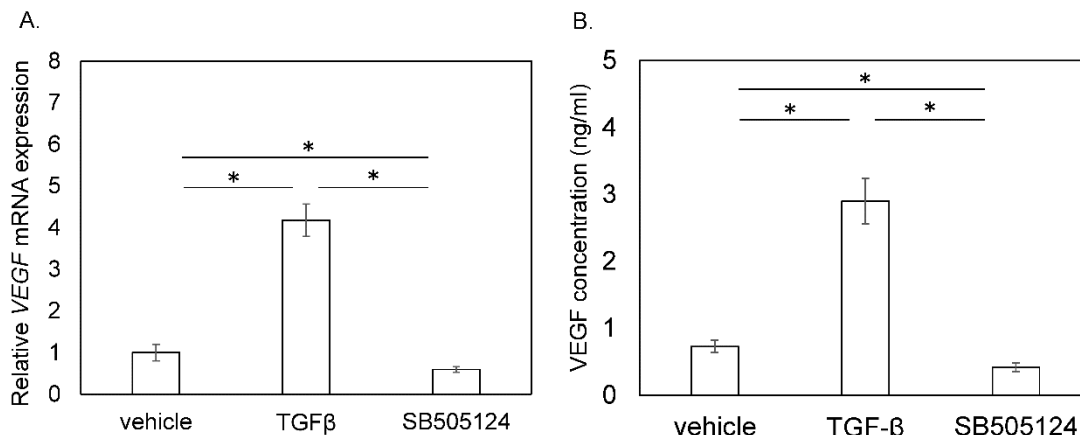


図 3. TGF- β による VEGF 発現誘導における ALK-5 阻害剤 (SB505124) の影響

A. VEGF mRNA の発現 B. 培養上清中の VEGF 濃度

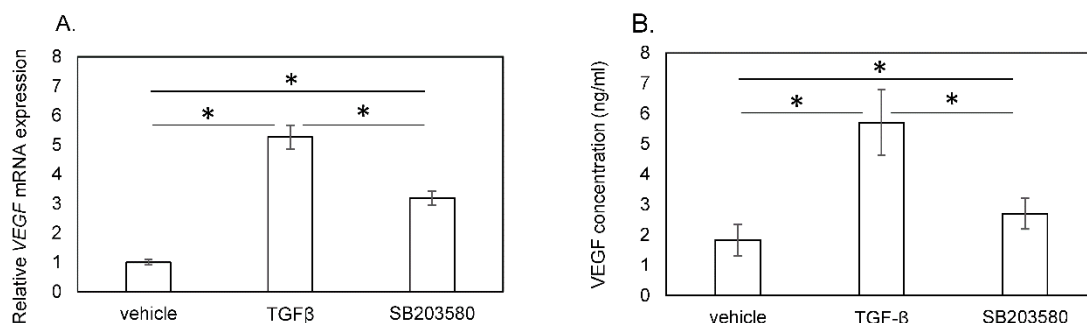


図 3. TGF- β による VEGF 発現誘導における p38 阻害剤 (SB203580) の影響

A. VEGF mRNA の発現 B. 培養上清中の VEGF 濃度

VEGF は末梢神経障害モデルにおいてアロデニアに関与することが報告されている。また、VEGF 阻害剤によりアロデニアが軽減することが報告されている。本研究結果から VEGF は変形性関節症の疼痛に関与する可能性が示唆された。Apelin は末梢および中枢神経に発現し、疼痛に関与することが報告されている。また、OA 患者の関節液中では非 OA 患者に比べ関節液中の Apelin が上昇することが報告されている。本研究において、Apelin は VEGF によって誘導された。また、Apelin の発現は疼痛スコアと関連したことから、VEGF は Apelin を介して疼痛を惹起している可能性が示唆された。

TGF- β は関節リウマチ患者由来の線維芽細胞における VEGF の発現を調節することが報告されていた。しかし、その調節機構や変形性関節症患者から採取した滑膜細胞に対する作用は不明であった。TGF- β シグナル伝達経路には古典経路 (Smad 経路) と非古典経路 (MAPK 経路) が存在する。本研究結果から、TGF- β は古典経路および非古典経路を介して VEGF を調節している可能性が示唆された。

本研究結果から VEGF は Apelin を介して疼痛に関与すること、その発現は TGF- β によって調節されている可能性が示唆された。本機構は VEGF を介した炎症非依存性の疼痛機構に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究成果は BMC Musculoskeletal Disorders, Biomed Research International に採択された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takano S, Uchida K, Shoji S, Itakura M, Iwase D, Aikawa J, Mukai M, Sekiguchi H, Inoue G, Takaso M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor is regulated by the canonical and non-canonical transforming growth factor- pathway in synovial fibroblasts derived from osteoarthritis patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 6959056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/6959056	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 Takano S, Uchida K, Inoue G, Matsumoto T, Aikawa J, Iwase D, Mukai M, Miyagi M, Takaso M	4. 巻 19
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor expression and their action in the synovial membranes of patients with painful knee osteoarthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord	6. 最初と最後の頁 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-018-2127-2	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 Aikawa J, Uchida K, Takano S, Inoue G, Iwase D, Miyagi M, Mukai M, Shoji S, Sekiguchi H, Takaso M	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of calcitonin gene-related peptide expression through the COX-2/mPGES-1/PGE2 pathway in the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipid in health and disease	6. 最初と最後の頁 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12944-018-0864-8	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 Mukai M, Uchida K, Takano S, Iwase D, Aikawa J, Inoue G, Miyagi M, Takaso M	4. 巻 17
2. 論文標題 Down-regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients with hypercholesterolemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipid in health and disease	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12944-018-0792-7	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高野昇太郎、内田健太郎、庄司真太郎、相川淳、岩瀬大、迎学、宮城正行、関口裕之、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 滑膜線維芽細胞における古典経路と非古典経路のクロストークを介したTGF- β によるVEGF制御機構
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 Kawakubo A, Uchida K, Takano S, Aikawa J, Iwase D, Miyagi M, Nakawaki M, Sekiguchi H, Inoue G, Takaso M.
2. 発表標題 Transforming Growth Factor-beta Stimulates Nerve Growth Factor Production Via The Tak1/p38 Pathway In Osteoarthritic Synovium.
3. 学会等名 ORS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田健太郎、高野昇太郎、岩瀬大、相川淳、迎学、井上玄、宮城正行、小沼賢治、齋藤 亘、高相晶士.
2. 発表標題 肥満を有する変形性膝関節症患者の滑膜組織におけるMast cellの増加
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 森谷光俊、内田健太郎、高野昇太郎、岩瀬大、井上玄、宮城正行、田澤諒、中脇充章、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 ヒト滑膜組織におけるC型レクチン受容体 macrophage inducible C-type lectin の発現とその制御機構の検討
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 迎 学、内田健太郎、高野昇太郎、相川淳、岩瀬大、宮城正行、東山礼治、井上 玄、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 HbA1c高値の変形性膝関節症患者の膝蓋下脂肪体ではTNF-alpha, IL-8が亢進している
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 高野昇太郎、内田健太郎、迎 学、岩瀬 大、相川 淳、村田幸佑、宮城正行、井上 玄、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 血管内皮増殖因子は変形性膝関節症患者の非炎症性疼痛に関与する
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	内田 健太郎 (Uchida Kentaro) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	大久保 直 (Okubo Tadashi) (10450719)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	
研究分担者	岩瀬 大 (Iwase Dai) (30406946)	北里大学・医学部・助教 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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	井上 玄 (Inoue Gen) (80594209)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

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