

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24037

研究課題名(和文) M2マクロファージを介した新規変形性膝関節症疼痛惹起機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of osteoarthritic pain by M2 macrophages

研究代表者

高野 昇太郎 (Takano, Shotaro)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：10596505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：M2マクロファージ由来神経ペプチドの同定と変形性関節症(OA)疼痛への関与を検討した。滑膜マクロファージのM2誘導後、Peptide Lvの発現が上昇した。また、強い疼痛を有する変形性関節症患者の滑膜組織ではPeptide Lvの発現の低下が認められた。Peptide Lv KOマウスでは滑膜炎モデルにおけるTNF- α の発現が野生型に比べ有意に高かった。合成Peptide LvはLPSによって誘導されるTNF- α 産生を抑制した。このことからM2マクロファージ由来Peptide Lvは炎症を介した疼痛に関与し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

変形性関節症における疼痛は患者の生活の質、日常生活動作を著しく低下させるため、健康寿命の延伸には疼痛治療は極めて重要である。本研究成果は新たな疼痛治療標的を供給するものであり、新規治療薬の開発に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：We investigated role of peptide Lv in osteoarthritic pain. Bone marrow macrophages (BMM) were stimulated with vehicle, LPS, or LPS + peptide Lv, and Tnf α expression and Tnf α production were evaluated. To examine the effect of peptide Lv deficiency on macrophages and synovitis, peptide Lv-deficient mice were generated using genome editing. LPS-induced Tnf α expression and Tnf α production were evaluated in BMM isolated from wildtype and peptide Lv-deficient mice. Additionally, Tnf α expression levels were compared between wildtype and peptide Lv-deficient mice with and without synovitis. Peptide Lv suppressed the LPS-mediated elevation in Tnf α expression. LPS stimulation significantly increased Tnf α expression and Tnf α production in BMM derived from peptide Lv-deficient mice compared to wildtype mice. Synovial Tnf α expression was elevated in peptide Lv-deficient compared to wildtype mice with synovitis. Peptide Lv may be a useful therapeutic target for synovitis.

研究分野：整形外科

キーワード：神経ペプチド M2マクロファージ 疼痛

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化にともない変形性関節症(OA)患者は年々増加している。近年の大規模な疫学調査から、我が国には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た。疼痛はOA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M1マクロファージ由来炎症性メディエータによる疼痛惹起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、M1マクロファージによる炎症のみでは疼痛機序を説明できなかった。

2. 研究の目的

本研究では、OA患者より採取した滑膜組織とゲノム編集により作成した新規OAマウスを用いることで、M2マクロファージを介した疼痛制御機構の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. M2マクロファージ誘導後に発現が上昇する神経ペプチドの探索

人工関節置換術時に変形性膝関節症患者から採取したヒト滑膜検体をコラゲナーゼ処理し、有核細胞を採取した。ピオチン標識抗CD14抗体とストレプトアビジン標識磁気ビーズを用いてCD14(+)分画(マクロファージ分画)を得た7日間培養後に20ng/ml recombinant human IL4刺激し、M2aマクロファージへのpolarizationを行った後、RT-PCRを用いて神経ペプチド(Adrenomedullin, AGRP, Apelin, CGRP, NPY, NPS, 新規neuropeptide, Substance P)の発現を検討した。

3-2. ヒト滑膜組織におけるPeptide Lvの発現とOA病態との関連性の検討

ヒト滑膜検体のPeptide LvとSubstance Pの発現をRT-PCRを用いて検討し、術前の疼痛スコア(Visual Analogue scale; VAS)との関連を検討した。過去の報告に従い、VAS=6をカットオフ値とし、VAS ≥ 6 (severe pain)とVAS < 6 (mild/moderate pain)に分類した。

3-3. Peptide Lvノックアウト(KO)マウスの作製と炎症における役割の検討

Peptide LvをコードするVSTM4遺伝子のexon2上にガイドRNAを設計し、Peptide Lvノックアウトマウスを作製した。作製後、genotyping、シーケンスにより標的配列が欠失していることを確認した(図1A,B)。また、RT-PCRを用いて骨髄マクロファージ、滑膜においてmRNAの発現が認められないことを確認した(図1C)。C57BL/6Jマウスより骨髄細胞を採取後M-CSF存在下で培養し、骨髄マクロファージ(BMM)を作製した。BMMをLPS及びLPS+Peptide Lvで刺激後、RT-PCR、ELISAにてTnfa mRNA発現及びTNF-α産生に対するPeptide Lvの影響を検討した。また、野生型C57BL/6JおよびPeptide Lv KOマウスの骨髄を採取後、BMMを作製した。LPS刺激後にRT-PCRおよびELISAを用いてTnfa mRNA発現およびTNF-α濃度を測定した。また、Wild, Peptide Lvを用いて滑膜炎モデルを作製後、Tnfaの発現を検討した。

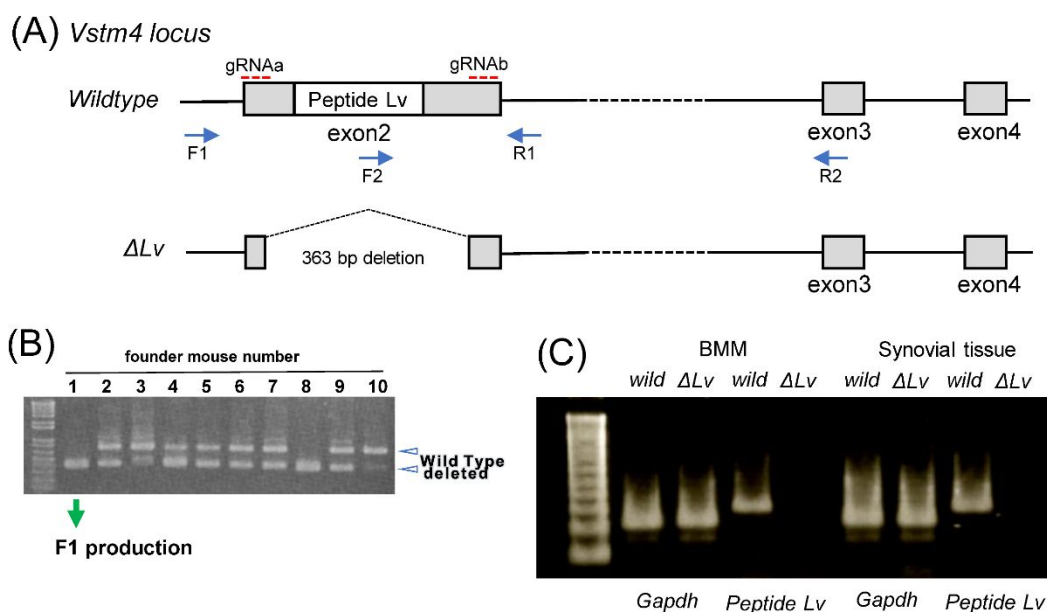


図1. Peptide Lv KO マウスの作製

4. 研究成果

BMM の IL-4 刺激により M2 マクロファージマーカー CD206 の発現は有意に増加した。また、IL4 刺激により、Peptide Lv と Substance P の発現が有意に上昇した。一方、本研究で検討した神経ペプチドの中で IL10 刺激 (M2c polarization) により増加するものは存在しなかった。OA 患者より採取した滑膜組織における Peptide Lv の発現は VAS 6 群で有意に低かった (図 2)。Substance P の発現は VAS<6 群と VAS 6 群の間に有意な差は認められなかった。一方、OA 進行度と Substance P, Peptide Lv の発現との間に有意な差は認められなかった。

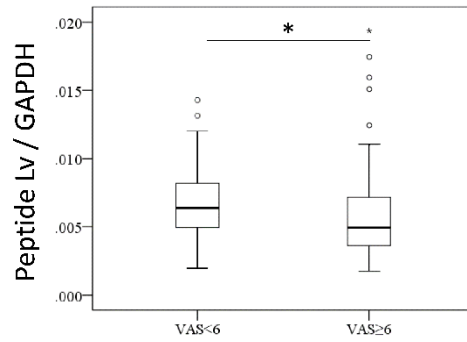


図 2. Peptide Lv の発現と疼痛との関連性

LPS 刺激により *Tnfa* mRNA 発現および培養上清中の TNF- α の産生は増加したが、その増加は Peptide Lv 存在下で有意に抑制された (図 3A, B)。また、Peptide Lv-KO マウスから採取した BMM は野生型マウスから採取した BMM に比して LPS 刺激後の *Tnfa* mRNA 発現および上清中の TNF- α 濃度が高かった。

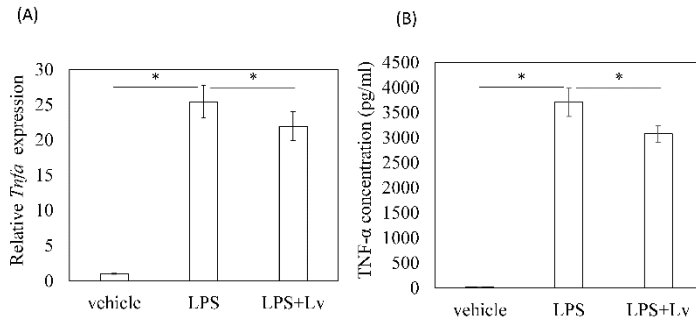


図 3. TNF- α 産生における Peptide Lv の作用

滑膜炎モデル作製前 (day 0) では野生型と Peptide Lv KO マウス間で *Tnfa* mRNA の発現に有意な差は認められなかった。しかし、モデル作製後 7 日における *Tnfa* mRNA の発現は Peptide Lv KO マウスにおいて有意に高かった (図 4)。本研究結果から M2 マクロファージによって産生される神経ペプチド Peptide Lv は炎症抑制に関与している可能性が示唆された。疼痛スコアの高い変形性関節症患者で Peptide Lv の発現が抑制されていたことから、Peptide Lv の減少による炎症の増悪が疼痛に関与している可能性がある。M2 マクロファージが産生する Peptide Lv は新規 OA 疼痛治療標的となるかもしれない。

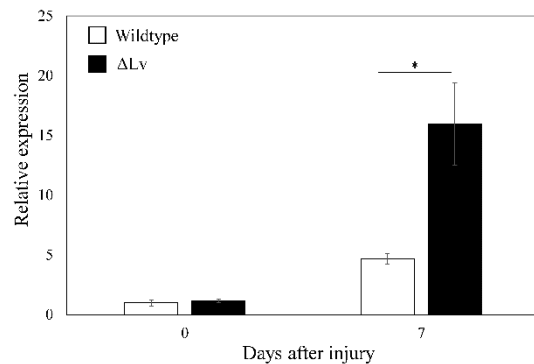


図 4. 野生型および Peptide Lv KO マウス滑膜炎モデルにおける *Tnfa* の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 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 -
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 Murata K, Uchida K, Takano S, Shoji S, Iwase D, Inoue G, Aikawa J, Yokozeki Y, Sekiguchi H, Takaso M	4. 巻 12
2. 論文標題 Osteoarthritis patients with high haemoglobin A1c have increased Toll-like receptor 4 and matrix metalloprotease-13 expression in the synovium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Metab Syndr Obes	6. 最初と最後の頁 1151-1159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/DMSO.S209677	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野昇太郎、内田健太郎、相川淳、岩瀬大、迎学、宮城正行、井上玄、関口裕之、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 変形性膝関節症の滑膜組織においてTGF- によって誘導される神経ペプチドの探索
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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