

令和 6 年 10 月 4 日現在

機関番号：33916
 研究種目：若手研究
 研究期間：2020～2023
 課題番号：20K18078
 研究課題名（和文）手指変形性関節症のバイオマーカーに関する研究

研究課題名（英文）Study of biomarkers for hand osteoarthritis

研究代表者

黒岩 宇（Kuroiwa, Takashi）

藤田医科大学・医学部整形外科学講座・講師

研究者番号：10870363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、手指変形性関節症（HOA）を対象に、変形性関節症のバイオマーカーを検索することである。手指の痛みで当院を受診したHOA患者と、手指の痛みがない健常ボランティアの血液を採取し、HOA3例とコントロール3例でDNAメチル化アレイ解析を行なったところ、735026プローブ中8942の領域で有意差を認めた。このうちP値の小さい上位100領域を選択し、過去にOAとの報告があるPLOD2, ICOS, CSF1R, BMP7, MCF2Lについてパイロシーケンス法を用いた検証実験を行なった。その結果、BMP7のみHOAでDNAメチル化が有意に高値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手指変形性関節症（HOA）は罹患頻度が高く、手指の機能低下や痛みはADLやQOLに大きな影響を及ぼす。現在、変形性関節症に対し、臨床応用されているバイオマーカーは存在しない。本研究ではDNAメチル化アレイ解析を行い、BMP7においてコントロールと比べHOAで有意にメチル化が増加していた。このことから、BMP7のメチル化がHOAに大きく関係しており、HOAの診断や治療、進行予防に役立つバイオマーカーと可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to search for biomarkers of osteoarthritis in hand osteoarthritis (HOA). Blood samples were collected from HOA patients presenting to our hospital with hand pain and from healthy volunteers without hand pain, and DNA methylation array analysis was performed in three HOA cases and three controls. The results showed significant differences in 8942 out of 735026 probes. The top 100 regions with the smallest P-values were selected and validated by pyrosequencing for PLOD2, ICOS, CSF1R, BMP7, and MCF2L, which have been reported to be associated with OA in the past. The results showed that only BMP7 showed significantly higher DNA methylation in HOA.

研究分野：手指変形性関節症

キーワード：手指変形性関節症 hand osteoarthritis バイオマーカー エピジェネティクス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は関節軟骨の変性、破壊、軟骨下骨の変化、骨増殖性変化を特徴とし、中高年の多くが罹患するいわゆる common disease である。日本における大規模コホート研究の Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD) study in 2005 によると、60 才以上の 2,282 人のうちの 61.9% に X 線上の変形性膝関節症があり、膝痛の有症者は全体の 32.8% とされる。また 2010 年の統計では、世界に 250/100,000 人の割合で OA に罹患しているといわれている。変形性関節症の発症のリスクには、全身的要因として遺伝的素因、食事、高齢、性別、エストロゲンの使用、骨密度などがあり、局所的要因として肥満、筋力低下、関節不安定症、関節外傷、関節の変形、関節への過度の力学的ストレスなどが挙げられる。しかし、OA の病理学的メカニズムは未だ完全には解明されていない。OA は軟骨に初発するとされる疾患であるが、その病態には更に二次性滑膜炎や骨、軟骨の増殖性変化が加わる。軟骨マトリックスの変性、低分子化の直接のメディエーターは、軟骨細胞自らが産生する活性酸素種、プロテアーゼなどである。プロテアーゼのなかでも以前は matrix metalloproteinase が重視されていたが、現在では関節軟骨の主たる成分であるアグリカン分解する酵素である aggrecanase の役割が大きいことが関節液中アグリカン切断端の解析で明かにされている。これらのプロテアーゼの軟骨細胞による産生を調節しているのは、同じく軟骨細胞から産生される各種のインターロイキン (IL) -1 や IL-6、tumor necrosis factor α などのサイトカインや transforming growth factor β 、basic fibroblast growth factor などの成長因子である。

バイオマーカーは関節構成体の代謝や機能を反映しており、いわば real time で軟骨、骨、滑膜などの関節構成体の病態を評価することが可能と期待されている。これらのバイオマーカーは単に OA の診断、評価だけでなく、未発症例からの新たな発症や既発症例の病変進行の予知、さらには OA の治療薬の有効性を評価することへの応用が始まっている。以上のように、血液や尿を用いたバイオマーカー測定は関節構成体の代謝を測定し OA を評価するため、従来の画像では得られない情報を得られるという利点がある。OA のバイオマーカーについては一般に臨床応用されているものはなく、新規バイオマーカー候補について、プロテオミクスを用いた研究や、血液・尿・関節液を用いた研究が報告されている。OA の有力なバイオマーカー候補として、軟骨オリゴマー基質タンパク質 (Cartilage oligomeric matrix protein)、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid)、尿中 II 型コラーゲン C 末端テロペプチド (C-terminal crosslinked telopeptide of type II collagen)、血清ケラタン硫酸 (keratin sulfate) などが挙げられる。従来の OA のバイオマーカー研究は膝関節や股関節症などの下肢の関節に着目されてきたが、これらの関節は荷重関節であり体重や体形などのメカニカルストレスの影響は大きく、更に外傷歴を伴う場合もあり交絡因子は多い。それに対して、手指関節は荷重関節ではなく、変形性関節症の発症も他の関節に比べ早期に顕在化することから、OA 早期発見のためのバイオマーカー検索するにあたって適していると思われる。

2. 研究の目的

手指変形性関節症 (hand osteoarthritis, HOA) は、ヘバーデン結節、ブシャール結節、母指手根中手 (CM) 関節症などを含む関節炎の総称であり、HOA による手の機能低下や痛みは、ADL や QOL に大きな影響を及ぼす。本邦における一般住民コホート研究において、有病率は 91.5% と高率で、重症例は 39.8% とされている。現在、変形性膝関節症や変形性股関節症に対し、プロテオミクスやタンパクアレイを用いた研究が報告されているものの、まだ臨床応用されているバイオマーカーは存在しない。HOA に対しこれらの手法を行っても大関節の影響を大きく受けると考え、異なる手法として近年種々の疾患で報告されている DNA の塩基配列を変化させずに遺伝子発現を制御伝達するエピジェネティクスに着目した。エピジェネティクスの一つである DNA メチル化が OA に関与している可能性が報告されており、当施設のエピジェネティクスの専門家と協議し、網羅的な DNA メチル化アレイ解析を行なった。本研究の目的は、HOA を対象に OA のバイオマーカーを検索することである。

3. 研究の方法

手指の痛みを主訴に当院を受診し、当研究に同意された患者を対象とした。下記 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria を満たす HOA 患者で、外傷や腱鞘炎および関節リウマチ等の関節炎の症例は除外した。また、コントロールとして、手指の痛みがない健常ボランティア (50 代女性) のサンプルを採取した。対象者の一般身体データ (年齢、身長、体重、BMI 等)、X 線 (手指、全脊椎、下肢全長) 採血、アンケート等を収集し、血液の一部は当院のバイオバンクに保存した。HOA とコントロールの血液を用いて、DNA メチル化アレイ解析を行い、検証実験として症例を増やしてパイロシークエンス法を行った。

ACR classification criteria)

前月のほとんどで痛み、疼きもしくはこわばりを認め、下記の4つのうち3つ以上を満たす。10関節は両側の示指・中指のDIP・PIP関節、母指CM関節とする(Kloppenburg M et al., Ann Rheum Dis 66:1157-1161, 2007)。

- ・10関節のうち2つ以上の硬性腫脹
- ・MP関節の腫脹が2つ以内
- ・2つ以上のDIP関節で硬性腫脹
- ・10関節のうち1つ以上の変形

DNA メチル化アレイ解析)

- ・利用機器：Illumina iScan (Rhelixa 社)
- ・利用アレイ：Illumina Infinium MethylationEPIC array (Rhelixa 社)

パイロシークエンス法)

- ・PyroMarkTM システム (QIAGEN)

4. 研究成果

当初の予定より少ないが約70名のHOA患者と5名のコントロールの一般身体データを取得し、採血、手指X線と下肢・脊椎X線撮影を行なった。このうちがんの既往、整形外科インプラントの挿入例、ステロイド使用例、手指以外の明らかなOAの存在例を除外し、さらに男性、CM関節症のみ、ヘバーデン、ブシャー、CM関節症の合併例を除外し、ヘバーデン結節のみの女性3例が最終的なDNAメチル化アレイの対象となった。DNAメチル化アレイ解析はHOA3例、コントロール3例の血液を用いて行なった。その結果、735026プローブ中8942の領域で有意差を認めた。その中でP値の小さい上位100領域を選択し、メチル化が増加している27遺伝子と、減少している37遺伝子を抽出した。P値の小さいtop5に含まれるSBF2 Antisense RNA 1 (SBF2-AS1) と過去にOAとの複数の報告があるProcollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2 (PLOD2)、Inducible T Cell Costimulator (ICOS)、Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R)、Bone morphogenetic protein-7 (BMP7)、MCF.2 Cell Line Derived Transforming Sequence Like (MCF2L) について検証実験を行ない、HOA 16名とnon HOA 9名 (Control + HOAの基準を満たさない症例、メチル化アレイの症例含む)を対象にパイロシークエンス法を行った。その結果、BMP7のみDNAメチル化がHOAで有意に高値を示した。このことは年齢、BMIで調整した値においても同様であった。

BMP7は、正常軟骨に見られる成長因子で、TGF-βスーパーファミリーのリガンドとしてTGF-β受容体に結合し、Smadファミリー転写因子の活性化により、細胞外マトリックスに作用し同化作用、いわゆる関節保護に作用するとする。本研究において、HOAでBMP7のメチル化が増加しており、BMP7の機能が抑制され、細胞外マトリックスの同化が抑制され、HOAの進行されるのではないかと考える。

研究結果の一部は、第95回、第97回日本整形外科学会学術総会、第65回、第66回日本手外科学会学術集会で発表した。

5. 主な発表論文

T Kuroiwa, Y Tsuboi, T Michikawa, K Tajima, Y Uraya, A Maeda, K Shizu, K Suzuki, K Suzuki, Y Kawano, N Fujita. DNA methylation of bone morphogenetic protein 7 in leukocytes as a possible biomarker for hand osteoarthritis: A pilot study. J Orthop Res. 2024 Aug 25. doi: 10.1002/jor.25963. Epub ahead of print. PMID: 39182186.

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 1件）

1 . 著者名 Kuroiwa Takashi、Tsuboi Yoshiki、Michikawa Takehiro、Tajima Kaori、Uraya Yuki、Maeda Atsushi、Shizu Kanae、Suzuki Katsuji、Suzuki Koji、Kawano Yusuke、Fujita Nobuyuki	4 . 巻 -
2 . 論文標題 DNA methylation of bone morphogenetic protein 7 in leukocytes as a possible biomarker for hand osteoarthritis: A pilot study	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	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） 10.1002/jor.25963	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 黒岩宇，河野友祐，船橋拓哉，前田篤志，志津香苗， 藤田順之， 鈴木克侍
2 . 発表標題 症候性手指変形性関節症の単純X線および採血における特徴
3 . 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 黒岩宇，河野友祐，船橋拓哉，前田篤志，志津香苗， 藤田順之， 鈴木克侍
2 . 発表標題 症候性手指変形性関節症の単純X線における特徴
3 . 学会等名 95回日本整形外科学会学術総会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 黒岩宇、河野友祐、浦屋有紀、前田篤志、船橋拓哉、志津香苗、鈴木克侍、藤田順之
2 . 発表標題 手指変形性関節症に対するDNAメチル化アレイ
3 . 学会等名 第67回日本手外科学会学術集会
4 . 発表年 2024年

1．発表者名 黒岩宇、河野友祐、船橋拓哉、浦屋有紀、前田篤志、志津香苗、鈴木克侍、藤田順之
2．発表標題 手指変形性関節症に対するDNAメチル化アレイ解析
3．学会等名 第66回日本手外科学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 黒岩宇、河野友祐、浦屋有紀、前田篤志、船橋拓哉、志津香苗、鈴木克侍、藤田順之
2．発表標題 症候性手指変形性関節症の単純X線および採血所見
3．学会等名 97回日本整形外科学会学術総会
4．発表年 2024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
---------	---------