

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K11011
 研究課題名(和文) 滑膜の慢性炎症およびインスリン抵抗性に着目した変形性関節症の発症・進行制御

研究課題名(英文) Regulation of onset and progression of osteoarthritis via chronic inflammation and insulin resistance in synovial tissue

研究代表者
 浜田 大輔 (HAMADA, Daisuke)
 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任准教授

研究者番号：90380097
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症症例由来の滑膜線維芽細胞で炎症性サイトカイン刺激でMMP1, MMP13, ADAMTS4等の軟骨基質分解酵素の産生が亢進すること、インスリン負荷により基質分解酵素の産生が抑制されることを確認した。インスリンの作用は濃度依存性であり、高濃度であるほど基質分解酵素産生を抑制した。滑膜組織で、インスリン抵抗性を糖尿病の有無に分けて評価したところ、糖尿病コントロール不良例でインスリン付加後の滑膜組織でのシグナル伝達分子Aktのリン酸化が低下しておりインスリン抵抗性が滑膜組織にも存在し、2型糖尿病患者では滑膜のインスリン抵抗性により基質分解酵素の発現が亢進す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軟骨破壊は荷重ストレス等の機械的刺激が主体とされていたが、本研究成果から力学的な因子だけでなく、慢性炎症、インスリン抵抗性といった全身性因子の関与が示唆された。このことから肥満に伴う慢性炎症、インスリン抵抗性を改善できれば、滑膜からの軟骨基質分解酵素の産生抑制につながり、荷重ストレスの軽減とも併せて変形性関節症の発症や進行を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression and release of cartilage degrading enzymes such as MMP1, MMP13 and ADAMTS4 was induced by inflammatory cytokine stimulation and suppressed by insulin stimulation in osteoarthritic synoviocytes. The insulin effect was dose dependent and the higher concentration of insulin showed the most suppressive effect. The Akt phosphorylation in synovial tissue from patient with poorly controlled type2 diabetes mellitus was impaired compared to that of healthy patient. This result indicated that insulin resistance exist in synovial tissue. Insulin resistance in synovial tissue seems to accelerate the expression of cartilage degrading enzyme.

研究分野：関節外科

キーワード：変形性関節症 慢性炎症 糖尿病 軟骨基質分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチや、骨粗鬆症といった運動器疾患では近年分子標的治療の登場によってその治療は大きく進歩し、疾患そのものをある程度コントロールできるようになっている。一方変形性関節症(OA)は整形外科領域で最も頻度の高い疾患の一つであるが、いまだ対症療法が主体で、一定以上進行した症例では手術が必要となり、他の運動器疾患と比較してもその治療は大きく後れを取っているといわざるを得ない。

OAの主要因は荷重等の力学的因子とされていたが、高脂肪食を摂取させOA発症を誘発したマウスに運動負荷をかけた場合OAの発症、進行が抑制されており、近年力学的因子以外の全身性因子の関与が示唆されていた。研究代表者の留学先の研究では、肥満・糖尿病のモデルマウスで膝の半月板を部分切除しOA発症を誘発するとコントロール群と比較し滑膜組織の肥厚および骨棘の増生がみられたことから、肥満・糖尿病が力学的因子とは独立したOAのリスク因子であることが示唆されていた。このような全身性因子のOA発症、進行といった病態への関与が明らかになれば、その分子メカニズムを解明できれば疾患修飾性治療薬の開発にもつながり、新たな治療への糸口となることが期待されている。

2. 研究の目的

肥満・糖尿病モデルマウスではコントロール群よりもOAの発症、進行とともに進んでいたことから糖尿病、インスリン抵抗性が関節炎を惹起し、基質分解酵素の産生が亢進することにより関節破壊に関与すると仮説を立てた。本研究の目的は滑膜組織でのインスリン抵抗性が、OAの発症進行に関わるメカニズムを解明し、新規治療法の開発につなげることである

3. 研究の方法

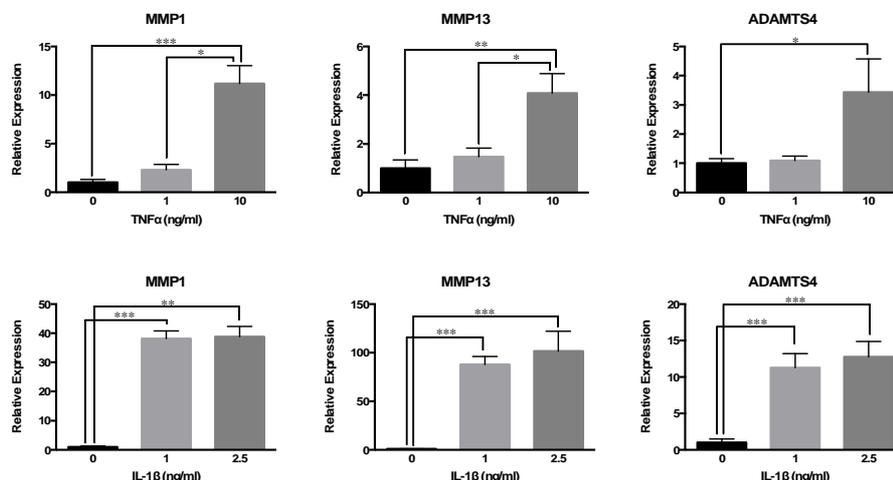
当院倫理委員会の承認を得た後、人工膝関節置換術時に切除された滑膜組織を採取し、コラゲナーゼ処理を行い、滑膜線維芽細胞を単離、培養した。

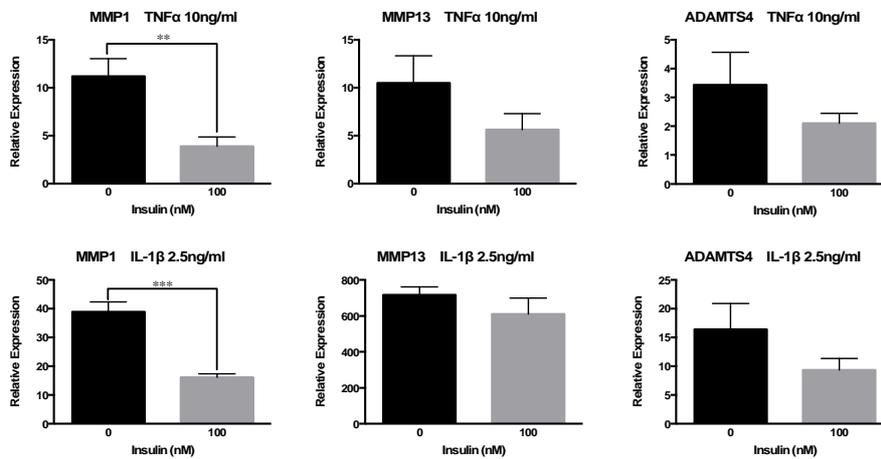
培養滑膜線維芽細胞をTNF α 、IL-1等の炎症性サイトカインで刺激し、OA関連遺伝子(MMP1, MMP13, ADAMTS4, ADAMTS5, BMP2, IL6)の発現に及ぼす影響をreal-time PCRで検討した。炎症性サイトカイン刺激で発現の亢進が見られた後、培地に異なる濃度のインスリン(1mM, 10nM, 100nM)を付加し、滑膜線維芽細胞におけるOA関連遺伝子の発現に及ぼす影響も併せて検討した。培養滑膜線維芽細胞からの基質分解酵素産生はELISAで培地中のMMP1, MMP13, ADAMTS4を定量しインスリン付加の影響を検討した。

糖尿病によるインスリン抵抗性を証明するため、手術時に採取された健常者および2型糖尿病患者の滑膜組織に異なる濃度のインスリンを付加し、インスリンのシグナル伝達に糖尿病が及ぼす影響をインスリンレセプター及びその下流のシグナル伝達因子であるAktのリン酸化を免疫沈降およびウエスタンブロットにより評価し、健常者、糖尿病患者間で比較検討した。

4. 研究成果

滑膜線維芽細胞ではTNF α 刺激によりMMP1, MMP13, ADAMTS4, BMP2, IL6の遺伝子発現が有意に亢進し、またインスリン付加により、その発現が抑制されていた。インスリンの効果は濃度依存性で、インスリン濃度が高いほど遺伝子発現は強く抑制されていた。一方ADAMTS5の遺伝子発現はTNF α 刺激の影響をあまり受けず、またインスリンによる発現抑制も見られなかった。またIL1やTNF α といった炎症性サイトカインの発現はTNF α 刺激で著明に亢進する一方、インスリン付加ではその発現は変化せず、インスリンの影響を受けていなかった。以上のことからインスリンによるOA関連遺伝子の発現調整は選択的に行われていることが示唆された。またこれらの遺伝子のTNF α 、IL-1およびインスリン刺激による発現変化は関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞でも同様の変化を呈していた。





タンパクレベルでの軟骨基質分解酵素の変化を確認するため、培養滑膜線維芽細胞を TNF で刺激した後、インスリンを付加し、24 時間後に培地を採取し、ELISA を用いて基質分解酵素の定量を行ったところ、MMP1, MMP13 の濃度はインスリン付加により抑制されており、またその抑制効果はインスリン濃度の影響を受け、高濃度のインスリン付加でより強く産生が抑制されていた。

採取直後の滑膜組織にインスリンを付加し、そのシグナル伝達が健常者、糖尿病患者間で異なるかどうかを免疫沈降およびウエスタンブロットを用いて検討したところ、インスリンレセプターサブユニット(IR)のリン酸化は健常者、糖尿病患者ともにインスリン濃度の上昇に伴い増加していた。一方その下流のシグナル伝達因子 Akt のリン酸化は健常者では濃度依存性に増加していたが糖尿病患者より採取した滑膜組織では濃度依存性の上昇は見られず、滑膜組織にもインスリン抵抗性が存在していると考えられた。

以上の結果からインスリンは炎症性サイトカイン刺激を受けた滑膜線維芽細胞からの基質分解酵素産生を抑制する作用があり、糖尿病により滑膜組織にインスリン抵抗性を生じた場合、その作用が減弱することで基質分解酵素の産生が亢進し、関節破壊が誘導される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 浜田大輔、西良浩一	4. 巻 34
2. 論文標題 Clinical topics: 滑膜の慢性炎症及びインスリン抵抗性に着目した変形性関節症の発症・進行制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 860-864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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0件

〔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	後東 知宏 (GOTO Tomohiro) (10420548)	徳島大学・病院・特任准教授 (16101)	
研究分担者	高砂 智哉 (TAKASAGO Tomoya) (40624755)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学系）・特任助教 (16101)	
研究分担者	和田 佳三 (WADA Keizo) (00771289)	徳島大学・病院・助教 (16101)	