

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11262

研究課題名(和文)細胞外マトリックスに着目した月経前関節痛のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism for arthralgia, one of the premenstrual syndrome symptoms, focusing on the extracellular matrix

研究代表者

柿崎 育子(Kakizaki, Ikuko)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80302024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：月経前症候群のひとつの関節痛のメカニズムを解明するために、培養滑膜線維芽細胞を月経周期において変動する性ホルモンで刺激した。この細胞モデルを用いて、関節周囲に豊富に存在する細胞外マトリックス成分のヒアルロン酸の量的および質的变化と、ヒアルロン酸代謝に関与する分子の遺伝子発現の変化を調べた。ホルモンの種類によるヒアルロン酸の量に変化はみられなかったが、ヒアルロン酸のサイズ分布に差異が観察された。また、ヒアルロン酸の合成や分解に関与するいくつかの分子の発現レベルが、性ホルモンの添加により影響を受けることが示された。痛みにつながる炎症反応とヒアルロン酸の分子量との関連についての解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られつつある情報は、月経前症候群のひとつとしての関節痛につながる炎症反応と関節周囲の細胞外マトリックス分子の中で最も豊富なヒアルロン酸の代謝との関係の解明への一歩となると期待される。今後も継続して取り組んでいくことにより、月経周期等、性ホルモンの大きな変動に伴う関節痛の緩和法の提案に関する情報も得られると期待される。ストレスや加齢による性ホルモンの変動が原因の関節周囲の疾患、性ホルモン補充療法の副作用としての関節に関する不調を対象とした研究にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of arthralgia, a symptoms of premenstrual syndrome, cultured human-fibroblast-like-synoviocytes were stimulated by two hormones which fluctuate in menstrual cycle. We examined the effect of the hormones on the amount and sizes of hyaluronan, and on gene expression levels of molecules involved in hyaluronan metabolism in this cellular model. The amount of hyaluronan was not affected, however, different patterns in hyaluronan size distribution were observed. Expression levels of some genes involved in hyaluronan synthesis and degradation were changed by hormone stimulation. We are continuing our analysis of the relationships between the inflammation leading to arthralgia and hyaluronan size distribution.

研究分野：生化学

キーワード：細胞外マトリックス 月経前症候群 関節痛 性ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ライフステージや環境ストレスによる内分泌動態の変動に伴う疾患や、疾患とまでとらえられなくても身体に痛みや不調を伴う症状は、QOL に影響する問題である。主にエストロゲンとプロゲステロンの濃度の急激な変動が原因とされる月経前症候群のひとつに関節痛、特に股関節痛がある。重度の場合には歩行困難も引き起こし、生活や仕事に影響を及ぼす。しかも、月経周期が継続する間、繰り返し痛みを襲われる。しかし、月経前関節痛の原因や分子メカニズムに関する報告は非常に少ない。本研究に関連すると考えられる先行研究として、1) 月経周期における炎症性マーカーの変動、2) 性ホルモンと痛みとの関係、3) 滑膜線維芽細胞における性ホルモン受容体の存在と性ホルモンの影響、4) 関節リウマチと性ホルモンとの関係に関するものはあるが、月経前関節痛のメカニズムを細胞外マトリックス分子に着目して説明した報告は研究開始当初に申請者が探した限り見当たらなかった。そこで、月経周期に依存したホルモンの影響が、細胞外マトリックスにどのような変化を及ぼすか、という視点から関節痛のメカニズムを明らかにしたいと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外マトリックスの変化と痛みにつながる炎症との関係を明らかにすることを目的とする。従って、痛みを評価する研究ではない。月経周期に依存した性ホルモン濃度の上昇または低下により、シグナル伝達分子としてのサイトカインや成長因子の分泌量や状態が変化し、細胞外マトリックス分子の代謝に関わる分子の発現量あるいは活性が変化した場合、細胞外マトリックスに量的、質的な変化をもたらされ、炎症、痛みへとつながるといふ仮説を立てて、関連する分子の挙動を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

細胞外マトリックスの変化と関節周辺部の痛みにつながると考えられる炎症との関係を細胞レベルで明らかにするために、性ホルモンで刺激した培養滑膜線維芽細胞を月経周期を模倣した細胞モデルとして用いた。性ホルモンとしては、月経開始前の時期(黄体期)に一過性に上昇することが知られているプロゲステロンと、その比較のために月経開始以降(卵胞期)に高濃度であるエストロゲンとを使用した。このような細胞モデルを用いて、細胞外マトリックスにおける性ホルモンの応答性とその調節についての知見を得るために、以下の項目を検討した。

(1) 細胞外マトリックス分子の量的・質的变化の解析

モデルに用いた滑膜線維芽細胞が豊富に産生する細胞外マトリックス分子として、ヒアルロン酸に着目した。ヒアルロン酸の量と分子サイズに及ぼす性ホルモンの影響を調べた。ヒアルロン酸量の変化は、細胞モデルの培養上清について、ヒアルロン酸に特異的に結合するタンパク質(HABP)を用いた ELISA 様のヒアルロン酸定量法により評価した。ヒアルロン酸のサイズの分布に及ぼす性ホルモンの影響は、培養上清をゲルろ過 HPLC で分画後、分取した画分について、HABP を用いた ELISA 様のヒアルロン酸定量法により評価した。また、低分子量のヒアルロン酸(分子量数千のオリゴ糖、糖鎖長にして 20 糖以下に相当)は炎症反応と関係が深いことが多数報告されているので、オリゴ糖に着目したサイズの範囲についてさらに詳細に順相 HPLC を用いた分析法によってもヒアルロン酸の分子サイズに及ぼす性ホルモンの影響を調べた。本研究における仮説を検証するために、ヒアルロン酸のサイズ分布の変化を詳細に調べることが最も重要である。図 1 は、ゲルろ過 HPLC による本細胞モデルの培養上清に蓄積したヒアルロン酸のサイズ分布(高分子量から低分子量までの全体的なサイズ分布)の分析例、図 2 は、順相 HPLC を用いたヒアルロン酸オリゴ糖の糖鎖長の分析例である。

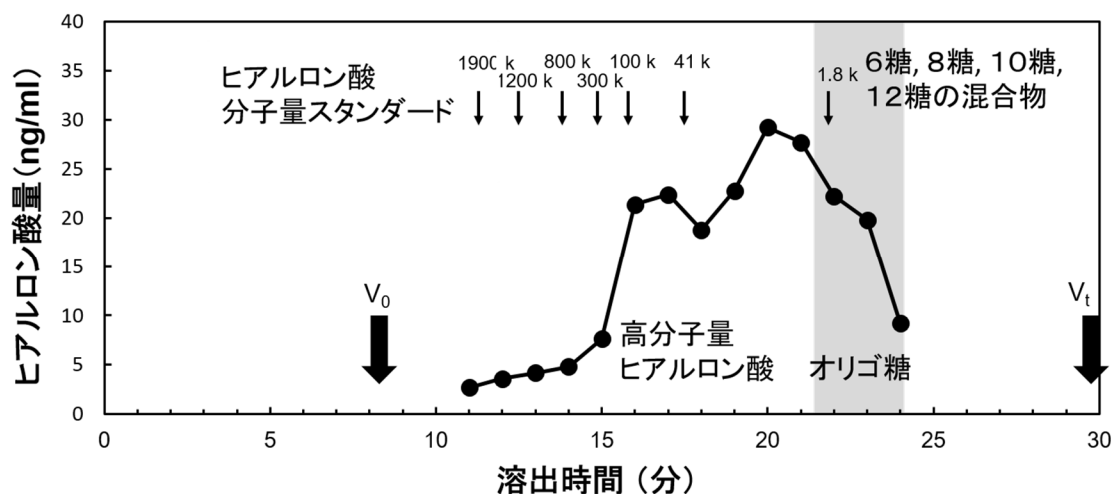


図 1. ゲルろ過 HPLC によるヒアルロン酸のサイズ分析(全体的な分子量分布の分析)

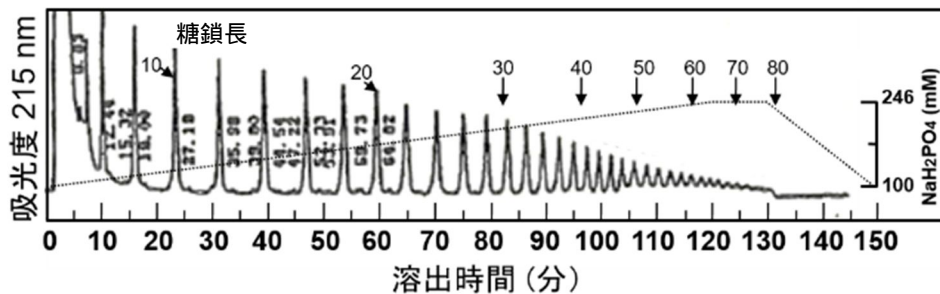


図2．順相 HPLC によるヒアルロン酸のサイズ分析
(ヒアルロン酸の分解生成物である低分子量のオリゴ糖の分析)

(2) ヒアルロン酸の代謝に関わる分子の発現レベルの解析

性ホルモンが細胞モデルにおけるヒアルロン酸の量的および質的な変化をもたらす原因を調べるために、ヒアルロン酸の代謝関連分子(合成酵素、分解酵素、分解に必須のヒアルロン酸結合タンパク質等)の変動を定量的リアルタイム PCR 法で分析し、性ホルモンに対する応答性を評価した。HAS1~3、HYAL1、HYAL2、HYAL3、TMEM2 の発現を中心に調べた。

(3) 細胞外マトリックス分子の代謝の調節や炎症に関わるシグナル伝達分子の解析

細胞外マトリックス分子、特に、ヒアルロン酸の代謝関連分子の発現を制御する可能性のあるシグナル伝達分子の発現変動を定量的リアルタイム PCR 法で分析した。IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、TGF- β 等の分析を行った。

4. 研究成果

本研究を遂行するための実験系の準備として、細胞バンクから入手した細胞に対し、細胞バンクが推奨する培地に含まれるホルモン様の物質が細胞モデルに及ぼす影響を避けるために、まず、ホルモン様の作用を示す物質を含まない培地を独自に調製し、上記の項目の実験に最適な培養条件を検討した。その結果、推奨されている培地よりも細胞の増殖速度は緩やかではあるが、ホルモンの添加実験に影響を及ぼさない安定した条件を見出すことができた。

用いる性ホルモンの受容体が、本研究で使用する細胞モデルで実際に発現しているかどうかを、リアルタイム PCR 法にて調べた。その結果、プロゲステロン、エストロゲンのそれぞれに対する受容体の発現が確認された。

また、用いた細胞のランダムカルチャーについて、ヒアルロン酸の合成系、分解系に関与する酵素や結合分子の発現をリアルタイム PCR 法にて調べた結果、ヒアルロン酸合成酵素の分子種および分解系の酵素や関連分子の複数の遺伝子の発現レベルが知られた。

ヒアルロン酸の量的、質的变化の解析を行うために、分析系の検討を行った。これまでに長年使用してきた信頼性の高いヒアルロン酸定量キットが現在では入手できないことから、これと同等の検出能をもつキットを見つけるために、糖鎖長と濃度が知られたヒアルロン酸オリゴ糖を調製し、それらと細胞モデルの培養上清を検体として数社のキットで試した。その結果、感度および検出できるヒアルロン酸の糖鎖長に関して、計画の実施に使用可能なキットを選定することができた。同時に、ヒアルロン酸の量やサイズに影響を与えるヒアルロン酸分解酵素の活性検出法の検討も行い、試料の状態に応じた複数の分析系を確立した。ヒアルロン酸以外の細胞外マトリックス成分として、コラーゲンとプロテオグリカン分析対象の候補としているが、これらの量的変化をもたらすタンパク分解酵素の活性検出系の検討を行い、細胞モデルから調製した試料の分析に使用できる系を見出した。また、プロテオグリカンの構造に特徴的なグリコサミノグリカン糖鎖の分析に必要な培養試料の量も決定した。

実験系を確立した後、関節周囲の細胞外マトリックスの中心的な成分であるヒアルロン酸の代謝が、月経周期の異なる時期(黄体期と卵胞期)にそれぞれ上昇する性ホルモン、プロゲステロンとエストロゲン、によって影響を受ける可能性を検証するために、まず、この細胞モデルの培養上清に蓄積するヒアルロン酸の量とサイズの分析を行った。高分子量から低分子量までの全体のサイズ分布の分析の他に、低分子量のヒアルロン酸オリゴ糖に着目して、分析原理の異なるカラムを用いて HPLC による低分子オリゴ糖の分析を行った。性ホルモンで刺激してからの時間と性ホルモンの濃度の効果を検証した結果、変化を観察するのに最適な条件を見出した。性ホルモンの種類によって培養上清に蓄積するヒアルロン酸量に変化はみられなかったが、ヒアルロン酸の分子量分布には差異が観察された。また、ヒアルロン酸のサイズ分布に変化を及ぼすと考えられるヒアルロン酸代謝に関与する分子の発現レベルとこれらの発現に影響を及ぼす可能性のある分子の発現レベルが、性ホルモンの添加によって影響を受けることが示された。本研究課題の申請時と同様に、これまでに得られた情報は国内外で報告されていない。論文にまとめるために引き続き、詳細な解析を行っている。

その他、本研究を進める過程で、月経周期における炎症を抑えるという将来的な展望に基づき、コラーゲンやプロテオグリカンの代謝に関わるタンパク分解酵素およびヒアルロン酸分解酵素

の活性を阻害する可能性のある分子をデザイン、調製し、阻害効果を確認した。このうちの一部については、国内学会および国際学会で成果を報告した。これらの分子のなかで、阻害活性をもつ複合タンパク質の、阻害活性に重要な糖鎖構造に関しては論文発表を行った。さらに、ヒアルロン酸の分解に関与する酵素の活性を阻害する糖鎖分子の、阻害に重要な最小構造について、英文誌に論文発表を行った。現在、月経周期に伴う関節痛のメカニズムの解明とその緩和法の提案を目指し、本研究の成果を発展させるべく継続して研究に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Seigo, Kakizaki Ikuko, Tanaka Kanji, Kodama Tomoe, Ito-Fukuyama Asami, Suto Shinichiro, Takahashi Ryoki, Yokoyama Yoshihito	4. 巻 7
2. 論文標題 Development of new therapeutic agents for preterm birth by glycosaminoglycan chain remodeling of urinary trypsin inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research in Pregnancy	6. 最初と最後の頁 27～35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14390/jssshp.HRP2018-011	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 Kakizaki Ikuko, Koizumi Hideyo, Kobayashi Takashi, Nakamura Toshiya, Majima Mitsuo	4. 巻 483
2. 論文標題 Dermatan sulfate oligosaccharides having reducing end 2, 5-anhydro-d-talose inhibit bovine testicular hyaluronidase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 107754～107754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carres.2019.107754	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 Teshigahara Yu, Kakizaki Ikuko, Hirao Wataru, Tanaka Kanji, Takahashi Ryoki	4. 巻 -
2. 論文標題 A Chondroitin Sulfate Chain of Urinary Trypsin Inhibitor Enhances Protease Inhibitory Activity of the Core Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	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） 10.5458/jag.jag.JAG-2019_0021	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kakizaki, I., Koizumi, H., Majima, M.
2. 発表標題 Inhibitory effect of oligosaccharides derived from dermatan sulfate on bovine testicular hyaluronidase
3. 学会等名 11th International Conference on Hyaluronan (HA2017)（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柿崎 育子, 小泉 英誉, 真嶋 光雄
2. 発表標題 ウシ精巢性ヒアルロニダーゼの活性に及ぼすデルマタン硫酸オリゴ糖の阻害効果
3. 学会等名 一般社団法人日本応用糖質科学会平成29年度大会(第66回)
4. 発表年 2017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	田中 幹二 (Tanaka Kanji) (20311540)	弘前大学・医学部附属病院・准教授 (11101)	