

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03782

研究課題名(和文)力学刺激によるPGE2/NGF/MMP産生機構に注目した変形性膝関節症の病態解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathophysiology of knee osteoarthritis with an emphasis on PGE2 / NGF / MMP production mechanism by mechanical stimulation

研究代表者

中田 研 (Nakata, Ken)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00283747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)の病態におけるメカニカルストレス(力学刺激)の関与について、複数の新知見を得た。まず、関節軟骨由来細胞の三次元培養にアテロコラーゲンゲルを用いることによる遺伝子発現および細胞挙動の変化についての知見を得た。三次元培養下のヒト関節軟骨細胞へのメカニカルストレスが、炎症メディエーターやマトリックス分解酵素、疼痛関連分子の遺伝子発現を促進し、一部のOA関連因子の遺伝子発現は、炎症性サイトカイン刺激とメカニカルストレスによって相乗的に促進されることを示した。関節内組織の変性を定量化する手法を新規に考案し、組織変性と遺伝子発現及び炎症性サイトカイン分泌の関係についての知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メカニカルストレス(力学刺激)は、変形性関節症(OA)発症・進行の重要な要素とされるが、未知な点も多い。本研究課題の研究成果の意義としては、ヒト関節軟骨細胞がメカニカルストレスを受けた場合に活性化または抑制される複数の分子経路が抽出されたことが上げられる。診断または治療のためのターゲットを選定するための活用が期待される。また、組織変性と外的刺激への反応の関係が明確に示されたことは、変性疾患の病態解明のための新たな視点を提供することになると認識している。

研究成果の概要(英文)：We have made several new findings on the involvement of mechanical stress (mechanical stimuli) in the pathogenesis of osteoarthritis (OA). First, we found that the use of atelocollagen gels for three-dimensional culture of articular cartilage-derived cells altered gene expression and cell behavior. Mechanical stress on human articular chondrocytes in three-dimensional culture promoted gene expression of inflammatory mediators, matrix-degrading enzymes, and pain-related molecules, and gene expression of some OA-related factors was shown to be synergistically promoted by inflammatory cytokine stimulation and mechanical stress. We devised a novel method for quantifying tissue degeneration in joints, and gained insight into the relationship between tissue degeneration and gene expression and inflammatory cytokine secretion.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：変形性関節症 メカニカルストレス(力学刺激) 炎症性サイトカイン 組織変性 網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)の発症・進行において、関節を構成する組織そして細胞に作用するメカニカルストレスは、重要な要素である。一定期間の膝痛などの自覚症状を有するが、単純レントゲン上の変化は軽微な状態と定義される新しい疾患概念である「早期変形性膝関節症(早期膝OA)」は、組織の構造上の変化は乏しいが、疼痛や機能的異常が生じている状態と解釈され、早期治療の可能性を広げる概念である。我々は、下肢・膝関節のバイオメカニクスに加えて、関節軟骨細胞・滑膜細胞・半月板細胞のメカノバイオロジーを研究対象として、ヒト滑膜細胞へのメカニカルストレスによって、炎症メディエーター(PGE2、IL-6、IL-8)やMMP(MMP1、MMP3)産生が促進されることを報告しており、ヒト関節軟骨細胞・半月板細胞でも同様の結果であること、ヒト軟骨細胞へのメカニカルストレスが、疼痛関連遺伝子(NGF、Tac1)の発現を促進するという結果を得たことから、メカニカルストレスが早期膝OAの疼痛に関与するとする仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

メカニカルストレスはどのように膝OAの炎症・疼痛・組織破壊に関与するのか、半月板機能に関与する分子は何か、という2点を本研究課題の核心となる「問い」とした。研究開始後に新たに得られた結果をもとに短期目標を随時設定し、以下の2つの検討を目的とした。

研究 コラーゲングルは、関節軟骨培養に頻用されるスキャフォールドであるが、構築される細胞微小環境については未知な点が多い。本研究では、三次元培養中の関節軟骨由来細胞に対して、コラーゲングルが与える影響を、細胞増殖・基質分解酵素産生・力学刺激に対する反応に関して検討した。

研究 変形性関節症(OA)の疼痛で重要な炎症メディエーターやNGF(nerve growth factor)などの疼痛関連因子とメカニカルストレスの関係については、未知の点が多い。本研究では、ヒト関節軟骨細胞へのメカニカルストレスが、炎症メディエーターや疼痛関連因子の発現に影響するかを検討した。さらに、繰り返し圧縮刺激と炎症性サイトカイン刺激(IL-1)が、三次元培養下のヒト関節軟骨細胞へ与える影響を比較することを目的とした。また、臨床上也想定される、同時に刺激が加わった場合の細胞の反応についても検討した。

3. 研究の方法

(1)ヒト膝関節軟骨片から細胞を単離、3回の継代後にアテロコラーゲングルに懸濁した細胞をアテロコラーゲンスポンジ(MIGHTY, KOKEN)へ遠心播種する方法(ゲル(+)培養群)と細胞懸濁液を滴下播種する方法(ゲル(-)培養群)を比較した($1.5-5 \times 10^5$ cells/スポンジ)。

細胞増殖: 4ドナーについて、培養29日目まで測定した(CCK-8法)。基質分解酵素産生: 免疫染色法(anti-collagen1抗体)にて、コラーゲングルの局在を確認し、MMP1/3/9/13・MT1-MMPの発現をqPCRで評価した。培養4日目に繰り返し圧縮負荷刺激(40kPa, 0.5Hz, 1時間)を加え、培養上清中のPGE2蛋白質量をHTRFで計測した。刺激前後12時間の上清中蛋白質量の比を算出して用いた。平面培養を含めた3群間の網羅的遺伝子発現解析(DNAマイクロアレイ)で行った。インテグリン2阻害剤を用いて、経路の関与を検討した。(2)同様の手法で、三次元組織体を作成した(5×10^5 cells/スポンジ)。3日間静置培養した三次元組織体に対してCLS(40kPa, 0.5Hz, 1時間)を加え、6時間後の培養上清中のタンパク量(IL-1, TNF-, IL-6, IL-8, PGE2)をHTRFで、三次元組織体内のmRNA量(NGF, Tac1, BradykininB1, B2)をリアルタイムPCRで測定した(CLS群)。CLSを加えないサンプルをコントロール(静置群)として、両群のタンパク質量・mRNA量をt検定で比較した(有意水準: 5%)。網羅的解析をDNAマイクロアレイで行い、GO解析によって繰り返し圧縮刺激と炎症性サイトカイン刺激(IL-1)による遺伝子発現変化を検討した。

4. 研究成果

(1)結果1. コラーゲングルはヒト関節軟骨由来軟骨細胞の3次元培養において、増殖ではなく代謝活性に影響を与え、さらに細胞周期関連因子や軟骨分化マーカーの発現にも影響を与えることがわかった。

結果2. アテロコラーゲングルの存在下、複数のMMPの発現が培養初期に増加するが、時間とともに徐々に減少することが確認された。

結果3. アテロコラーゲングルは、3次元培養において、細胞膜および細胞外マトリックス関連遺伝子の発現を制御し、ITGA2およびITGA10の発現を促進させることがわかった。

結果4. 2-1インテグリン特異的阻害剤であるBTT-3033は、AC(+)群における増殖、MMP発現、細胞形状に影響を及ぼし、3次元培養における周期的圧縮荷重刺激に対する反応に影響を与えることから、この因子がアテロコラーゲングルでの3次元培養時に機能していることが示された。

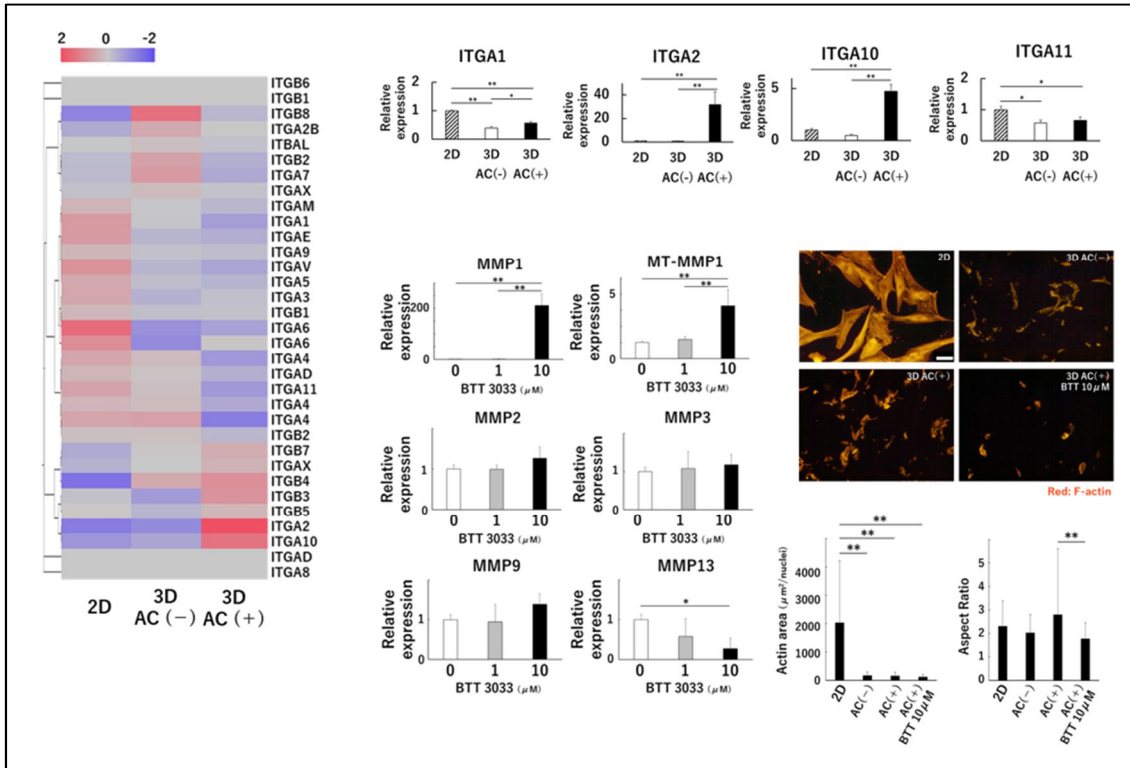


図 1. ヒト関節軟骨由来軟骨細胞に対するアテロコラーゲンゲルが与える影響の検討（遺伝子発現・細胞形態）: 平面培養と三次元培養時の比較 マイクロアレイ、及び qPCR の結果から、アテロコラーゲン存在下では、インテグリン 1 をコードする ITGA2 及び ITGA10 の発現が促進されることがわかった。また、基質分解に重要なマトリックスメタロプロテアーゼの発現パターンも大きく変化しており、細胞形態にも影響を認めた。

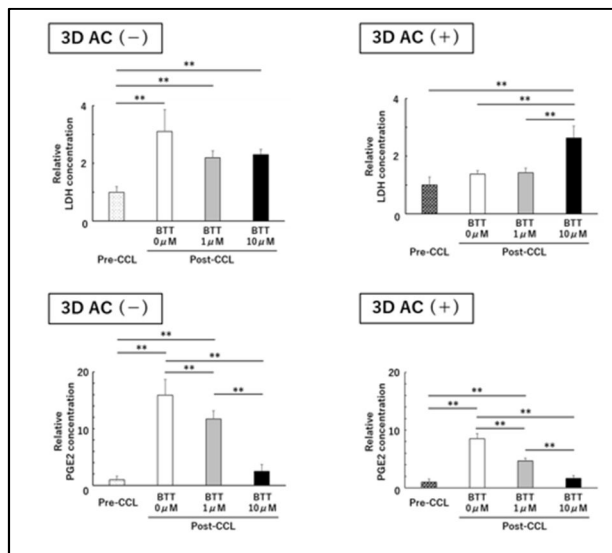


図 2. 三次元培養下のヒト関節軟骨由来軟骨細胞に対する繰り返し圧縮刺激の作用：インテグリン 2 阻害剤(BTT)の影響 繰り返し圧縮刺激によって、炎症メディエーターPGE2 の産生が促進されるが、阻害剤によってその作用は抑制された。

以上、「関節軟骨由来細胞の三次元培養において、コラーゲンゲルは細胞増殖・基質分解酵素産生・力学刺激への反応に関与する」という結果を学術論文として報告した。

(2)結果 5. 繰り返し圧縮刺激によって、変形性関節症関連因子 (COX-2、NGF、MMP-1、MMP-3、TIMP-1 など) の転写が促進された。
 結果 6. 一部の因子は、繰り返し圧縮刺激と炎症性サイトカイン刺激 (IL-1) によって、相乗的に転写が促進された。
 結果 7. 網羅的遺伝子発現解析の結果、二種の刺激によって生じる遺伝子発現変化は質的に大きく異なることが示された。

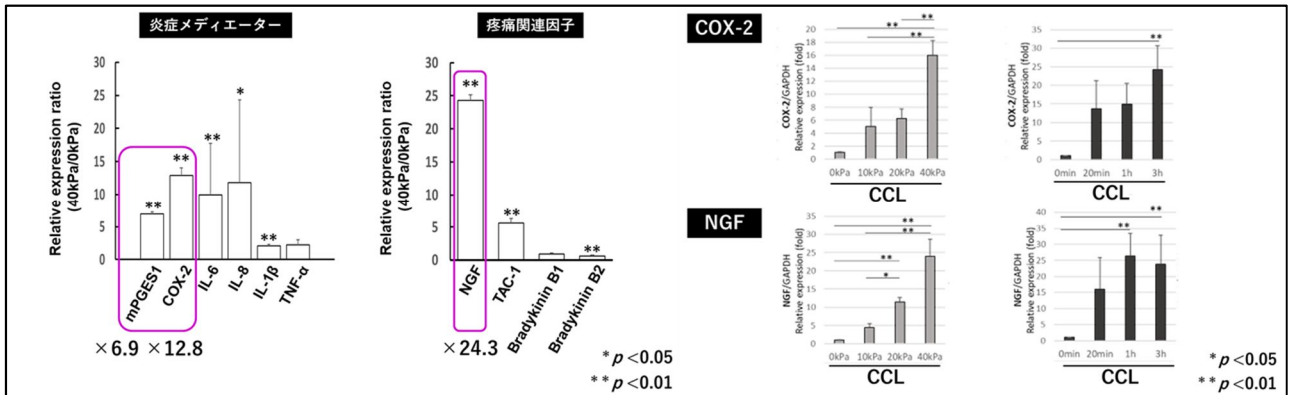


図 3. 繰り返し圧縮刺激による変形性関節症関連因子の遺伝子発現の促進 炎症メディエーター (mPGES1、COX-2) 及び NGF の転写が、繰り返し圧縮刺激 (CCL: cyclic compression loading) によって促進された。

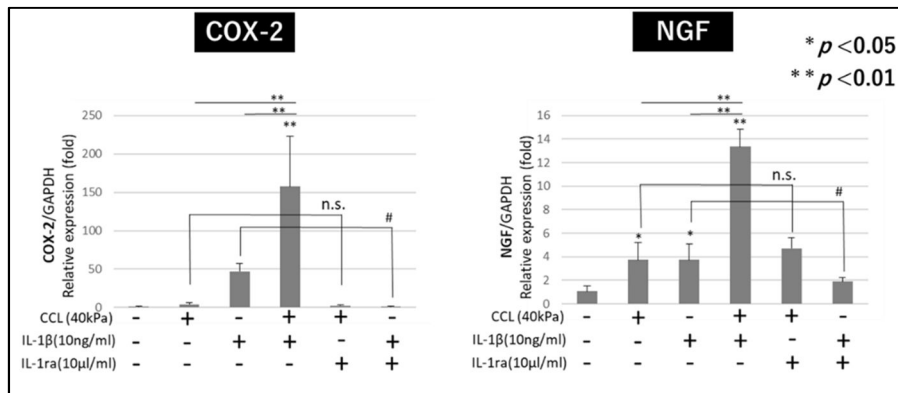


図4. 繰り返し圧縮刺激及び炎症性サイトカイン刺激 (IL-1) による作用の検討

COX-2 と NGF (いずれも変形性関節症の病態に関与することが既知) は、二種の刺激によって、相乗的に転写が促進された。

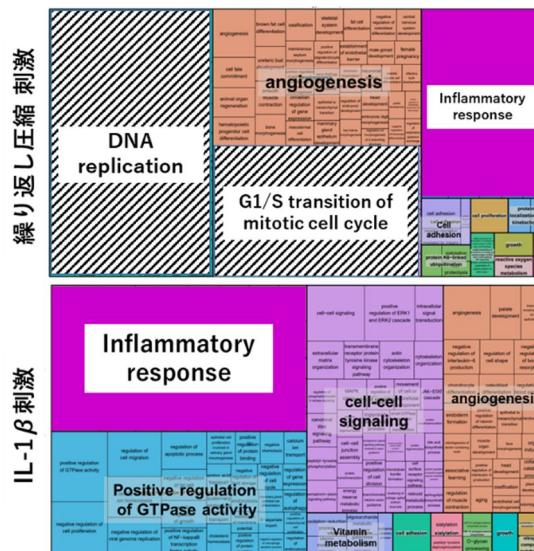


図5. 繰り返し圧縮刺激及び炎症性サイトカイン刺激 (IL-1) による作用の検討

網羅的遺伝子発現解析の結果、二種の刺激によって生じる遺伝子発現変化は質的に大きく異なることが明らかとなった。

以上、「三次元培養下の関節軟骨由来細胞に対する繰り返し圧縮刺激と炎症性サイトカイン刺激 (IL-1) の作用は質的に異なり、一部の変形性関節症関連因子の転写を相乗的に促進する」という内容での学術論文報告を準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Takashi Kanamoto, Minami Hikida, Seira Sato, Shohei Oyama, Yoshihito Tachi, Sanae Kuroda, Takeo Mazuka, Kosuke Ebina, Tsuyoshi Nakai, Ken Nakata	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Integrin 2 1 plays an important role in the interaction between human articular cartilage-derived chondrocytes and atelocollagen gel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1757-1757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81378-2.	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 Kanamoto Takashi, Mae Tatsuo, Yokoyama Teruki, Tanaka Hiroyuki, Ebina Kosuke, Nakata Ken	4. 巻 5
2. 論文標題 Significance and definition of early knee osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Joint	6. 最初と最後の頁 4-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/aoj.2019.09.02	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 金本 隆司, 辻井 聡, 前 達雄, 中田 研	4. 巻 64(5)
2. 論文標題 骨・軟骨・細胞 繰り返し圧縮刺激による関節内組織の生物学的応答	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 651-658
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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金本 隆司, 中田 研
2. 発表標題 関節軟骨由来細胞の三次元培養において、コラーゲンの存在は細胞増殖・MMP産生・力学刺激への反応に影響する
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金本 隆司, 疋田 光波, 佐藤 世羅, 中田 研
2. 発表標題 関節軟骨へのメカニカルストレスは、炎症メディエーターおよび疼痛関連因子の産生に關与する
3. 学会等名 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 Takashi Kanamoto; Minami Hikida; Ken Nakata
2. 発表標題 Collagen-based Three-dimensional Culture Environment Regulated Human Articular Chondrocyte Morphology, Proliferation And Responses To Mechanical Stimulation
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 疋田 光波, 金本 隆司, 中野 宏祐, 中田 研, 中嶋 正博
2. 発表標題 メカニカルストレスはヒト関節軟骨細胞において疼痛関連因子の発現を上昇させる
3. 学会等名 日本顎関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金本 隆司, 中田 研
2. 発表標題 コラーゲンゲルが三次元培養細胞に与える影響の検討
3. 学会等名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金本 隆司、 疋田 光波、 佐藤 世羅、 尾山 翔平、 Wen Shi、 宮崎 亮、 大谷 俊哉、 山川 学志、 眞塚 健夫、 中井 毅、 蛭名 耕介、 前 達雄、 中田 研
2. 発表標題 繰り返し圧縮刺激に対する 関節内組織の生物学的応答
3. 学会等名 第47回 日本臨床バイオメカニクス学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 疋田 光波、 金本 隆司、 施 ブン、 大谷 俊哉、 宮崎 亮、 尾山 翔平、 佐藤 世羅、 中田 研
2. 発表標題 三次元培養下のヒト関節軟骨由来細胞における力学刺激と炎症性サイトカイン刺激の関係の検討
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾山 翔平、 金本 隆司、 蛭名 耕介、 中田 研
2. 発表標題 アテロコラーゲン半月板修復材による半月板修復メカニズムのin vitro解析
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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	前 達雄 (Mae Tatsuo) (10569734)	大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤) (14401)	

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	金本 隆司 (Kanamoto Takashi) (20512049)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	辻井 聡 (Tsuji Akira) (70898014)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	下村 和範 (Shimomura Kazunori) (40755998)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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