

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09606

研究課題名(和文) 膝蓋下脂肪体由来神経ペプチド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) Relationship between infrapatellar fat pad derived neuropeptides and osteoarthritic pain

研究代表者

相川 淳(Aikawa, Jun)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90317008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膝蓋下脂肪体(IPFP)の病態は変形性関節症(OA)の痛みの原因と関連すると考えられている。近年、種々の神経ペプチドがOAの痛みに関与する可能性が示唆されている。しかし、IPFPにおける神経ペプチドの発現や疼痛との関連性は十分に明らかになっていない。OA患者から得られたIPFPを分析した結果、IPFPにおけるApelinの発現は疼痛スコアと正の相関を示し、Peptide Lvの発現は、疼痛スコアと負の相関を示した。ゲノム編集により作製したPeptide Lv欠損マウスは炎症の表現型を示した。IPFPのApelinとPeptide Lvは、OA疼痛の治療標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では疼痛を有する変形性膝関節症患者が800万人存在することが明らかになっている。本研究で同定した疼痛関連ペプチドは疼痛治療標的となる可能性を秘めており、健康寿命の延伸に貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：The infrapatellar fat pad (IPFP) has been implicated as a possible source of osteoarthritis (OA) development and knee pain due to the production of inflammatory mediators. Neuropeptides are localized to joint tissues and has recently been implicated in the development of knee OA and OA pain. To date, however, the expression levels of neuropeptides in the IPFP of human knee OA patients have not been examined. We analyzed IPFP obtained from knee OA patients and found that the expression levels of apelin in the IPFP were positively correlated with pain score at rest. The expression levels of Peptide Lv in the IPFP were negatively correlated with pain score at rest. Peptide Lv deficient mice exhibited inflammatory phenotype. Apelin and Peptide Lv in IPFP may be a therapeutic target for OA pain

研究分野：整形外科学

キーワード：膝蓋下脂肪体 神経ペプチド 疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 28 年 10 月現在、わが国の 65 歳以上の高齢者人口の総人口に占める割合は 27.3%となり超高齢者社会を迎えている。高齢化にともない変形性関節症 (OA) 患者は年々増加しており、近年の大規模な疫学調査から疼痛を有する OA 患者が 800 万人存在することが明らかになっている。疼痛は患者の生活の質、日常生活動作を著しく障害するため、健康寿命の延伸には疼痛治療が極めて重要である。膝申請者は OA の疼痛機序を解明すべく、OA マウス、臨床検体を用いて滑膜組織における神経性ペプチドの制御機構の解明を行ってきた。他方、膝関節における主たる神経ペプチド産生組織を検討した結果、膝蓋下脂肪体は滑膜組織に比して CGRP の発現が高いことを見出した。しかし、疼痛との関連性、CGRP 以外の神経ペプチドの動態は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OA 患者より採取した膝蓋下脂肪体組織とゲノム編集により神経ペプチド制御因子をノックアウトした新規 OA マウスを用いることで、膝蓋下脂肪体由来神経ペプチドを介した疼痛発生機序の解明を行うことである。

3. 研究の方法

3-1. 膝蓋下脂肪体における神経ペプチドの発現と疼痛、メタボリックファクターとの関連性の検討

変形性膝関節症 (OA) における疼痛と膝蓋下脂肪体における神経ペプチドとの関連性を検討した。人工膝関節全置換術 (TKA) を施行した際に変形性関節症 (OA) 患者から採取した膝蓋下脂肪体から RNA を抽出し、神経ペプチド (AGRP, CGRP, Substance P, Peptide Lv, Apelin, Neuropeptide Y) の発現を検討した。また、安静時および動作時の疼痛スコア (Visual Analog Scale VAS) メタボリックファクター (コレステロール、トリグリセリド、肥満) との関連性を検討した。

3-2. 膝蓋下脂肪体における神経ペプチド発現細胞の検討

Peptide Lv, Apelin の発現と疼痛スコアとが相関することを明らかになったため、神経ペプチドの産生細胞を同定すべく、間質血管細胞群 (stromal vascular fraction, SVF) を磁気ビーズにより分画し、検討を行った。人工関節置換術時に変形性関節症患者から採取した膝蓋下脂肪体を検討に用いた。コラゲナーゼ後、遠心し、SVF を得た。ビオチン標識 CD 31 抗体とストレプトアビジン標識磁気ビーズを用いて CD 31 陽性の血管内皮細胞分画を得た。その後、陰性分画と PE 標識 CD 14 抗体を用いたマクロファージ分画と間質細胞分画とに分けた。これらの細胞から RNA を抽出後、リアルタイム PCR を用いて Peptide Lv および Apelin の発現を検討した。

3-3. ゲノム編集を用いた神経ペプチド KO マウスの作製

Peptide Lv をコードする領域を欠失するために、Vstm4 遺伝子のエクソン 2 の塩基配列における 2 箇所を標的とした 2 種類のガイド RNA (gRNAa: 5'-CTGTGGTGCTCTCAATGTCA-3'、および gRNAb: 5'-ACCTCTCATTTCCGTCGCCG-3') を設計した。この 2 種類の gRNA とともに、Cas9 タンパク質を C57BL / 6J マウスの受精卵にエレクトロポレーション法により導入した。2 細胞期まで培養し、生存していた胚を偽妊娠雌の ICR マウスの卵管に移植し、産仔を得

た。Genotyping により欠失を確認後、Peptide Lv の欠失が炎症性サイトカイン TNF-a 産生に及ぼす影響を検討した。

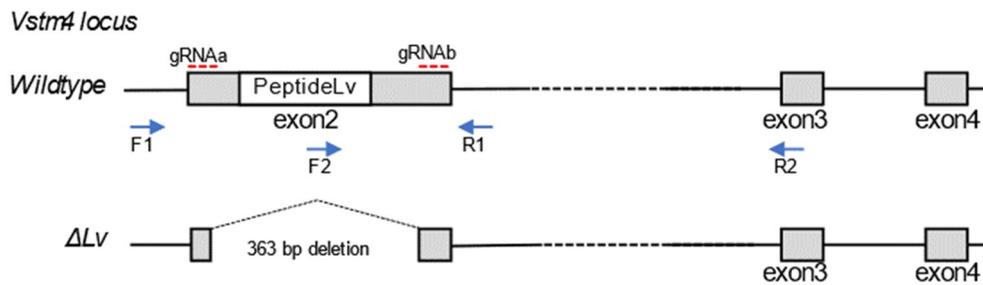


図 1. Peptide Lv の作製

4. 研究成果

4-1. 膝蓋下脂肪体における神経ペプチドの発現と疼痛、メタボリックファクターと相関

Peptide Lv と安静時 VAS に有意な負の相関を認めた (図 2, $P=-0.043$)。Apelin と安静時 VAS に有意な正の相関を認めた (図 2, $P=0.017$)。一方、AGRP, CGRP, Substance P, Neuropeptide Y と安静時 VAS (AGRP, $P=0.094$; CGRP= 0.076 ; Substance P, $P=0.740$; Neuropeptide Y, $P=0.469$)、動作時 VAS (AGRP, $P=0.703$; CGRP= 0.701 ; Substance P, $P=0.912$; Apelin, $P=0.651$; Neuropeptide Y, $P=0.738$) との間に相関は認められなかった。Neuropeptide Y の発現は トリグリセリド濃度と相関を示した ($r=0.263$, $P=0.014$)。Neuropeptide Y はトリグリセリドの代謝に関与することが報告されており、膝蓋下脂肪体での Neuropeptide の発現は OA 病態ではなくトリグリセリド代謝に関与しているものと考えられた。他方、その他の神経ペプチドとコレステロール、トリグリセリド、肥満との間に有意な相関は認められなかった。

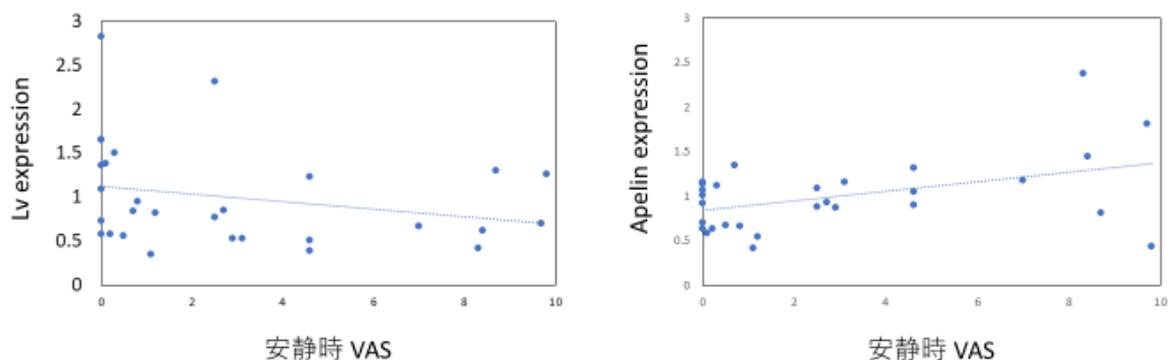


図 2. IPFP における Peptide Lv, Apelin の発現と安静時痛の相関

3-1. 神経ペプチド発現細胞の検討

Apelin の発現はマクロファージ分画で高く、Peptide Lv の発現は間質細胞分画で高かった。これらの結果から、マクロファージおよび間質細胞によって産生される神経ペプチドによって疼痛が制御されている可能性が示唆された。

3-2. Peptide Lv KO マウスの表現型解析

6 時間および 24 時間 Vehicle 刺激を行った野生型マウス由来細胞と peptide Lv 欠失マウス由来

細胞で *Tnfa* の発現に有意差は認めなかった。一方、LPS 刺激後の *Tnfa* 発現は、野生型マウスと比較して、peptide Lv 欠失マウス由来細胞で有意に増加した。qRT-PCR の結果と一致して、TNF- α 濃度は、野生型マウスと比較して、peptide Lv 欠失マウス由来細胞で有意に増加した。

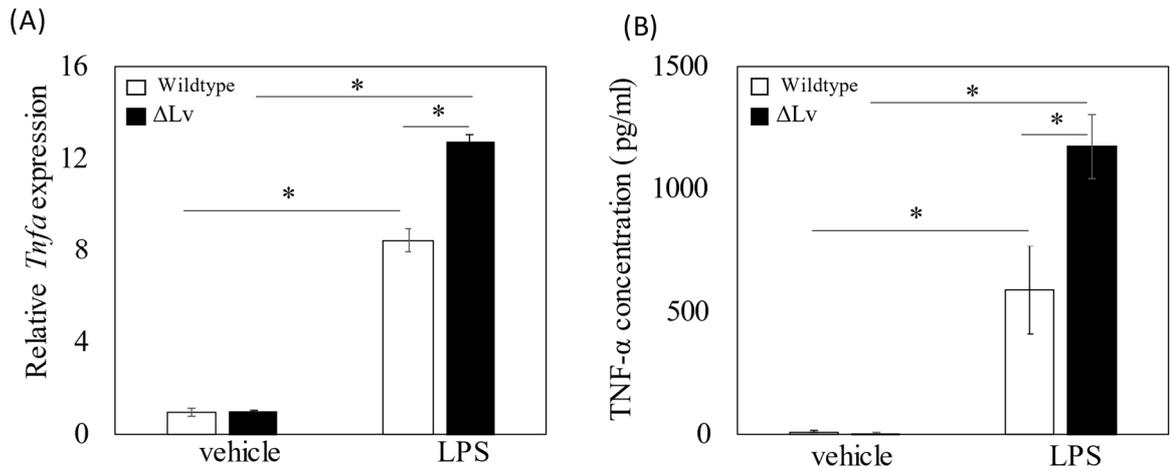


図 3. Peptide Lv 欠失が *Tnfa* 発現 (A) および TNF- α 産生 (B) に及ぼす影響

本研究結果から Peptide Lv の発現は安静時痛と関連すること、Peptide Lv の欠失は TNF- α の産生を向上させることが明らかになった。これらの結果から、Peptide Lv は痛みに対して抑制的に働いているものと考えられた。一方、Apelin の発現は安静時と正の相関を示した。我々は過去に滑膜組織における血管内皮成長因子の発現上昇が Apelin を誘導し、疼痛に關与する可能性を報告してきた。本研究結果から、膝蓋下脂肪体における Apelin 上昇も OA 疼痛に關与している可能性が示唆された。

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 Shoji S, Uchida K, Inoue G, Takata K, Mukai M, Aikawa J, Iwase D, Takano S, Sekiguchi H, Takaso M	4. 巻 -
2. 論文標題 Increase in CD5L expression in the synovial membrane of knee osteoarthritis patients with obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cent Eur J Immunol	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） なし	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, 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄司真太郎、内田健太郎、井上玄、高田研、迎学、相川淳、岩瀬大、高野昇太郎、関口裕之、高相晶士
2. 発表標題 肥満を伴う変形性膝関節症患者の滑膜組織ではCD5Lが増加する
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田幸佑、内田健太郎、高野昇太郎、相川淳、岩瀬大、井上玄、関口裕之、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 HbA1c高値の変形性膝関節症患者の滑膜組織ではToll-like receptor-4とMMP-13が亢進している。
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
研究 分担者	内田 健太郎 (Uchida Kentaro) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究 分担者	大久保 直 (Okubo Tadashi) (10450719)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

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