

平成 23 年 6 月 20 日現在

機関番号：82710

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390410

研究課題名（和文） 多数例のヒト組織の解析による変形性関節症の進行促進因子の特定

研究課題名（英文） Exploration of possible catabolic factors in osteoarthritis through the analysis of large numbers of human samples.

研究代表者 福井 尚志（FUKUI NAOSHI）

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）

病態総合研究室・部長

研究者番号：10251258

研究成果の概要（和文）：

大きな個体差を考慮して多数例のヒト膝OAの症例から関節液、軟骨、滑膜組織を採取して種々の遺伝子発現およびタンパク解析を行い、ヒトのOA組織、関節液に関してのデータベースを構築することができた。このデータベースを活用することでOAで生じる滑膜の病変の成立機序の一因と思われるものを見出すことができた。この機序が実際のOAの病態にどの程度関与しているかを明らかにすることが今後の課題と思われる。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we have obtained synovial and cartilage tissues and synovial fluid samples from a large number of knee OA patients at various disease severities, and conducted a series of gene expression and protein analyses. Through the analyses, we have constructed a data base about human OA tissues and synovial fluid, which we found highly useful in exploration of possible catabolic factors for cartilage in the disease. Utilizing this data base, we were able to identify several possible catabolic factors in OA. Through a series of analyses with the data, we have identified a possible mechanism for synovial changes in OA. Validation of the significance of these factors in the disease is a future problem which should be answered by subsequent studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学系

キーワード：変形性関節症、軟骨変性因子

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症（OA）は関節軟骨が徐々に変性・消失していく疾患であるが、どのような因子が軟骨変性をもたらすのか、その因子がどの細胞によってどのような機序によって発現されるのかについてはまだ断片的な回答しか得られていない。OAでみられる軟骨変性損傷に関する包括的な理解を得るためにはヒトから得られた組織や関節液の解析が必須である。このため今までも組織や関節液の解析が多く研究者によってなされてきた。しかし過去の研究はいずれも一種類の検体、例えば関節液なら関節液の解析の実を行うものがほとんどであり、滑膜、軟骨、関節液を相互に関連付けて解析しようとする試みは少なくとも学術論文でみる限りほとんどなされてこなかった。このような背景から本研究では多数例の膝OA症例から軟骨、滑膜、関節液を採取して遺伝子発現およびタンパク量に関する様々な解析を行い、ヒトOAに関する遺伝子発現およびタンパクに関するデータベースを構築することを目指した。また本研究では研究中とで当初予定していなかった剖検例の非OA膝関節からの組織の最終と解析を追加して行った。剖検例からの組織の解析はまだ中途であって、今後この解析が進むにつれ、OA関節からの検体の解析結果の対比によって多くの新発見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、剖検例からのOAに罹患していない膝関節とさまざまな重症度、状態にあるOA症例から軟骨、滑膜組織、関節液を採取・解析することによって、ヒトOA関節における遺伝子発現、タンパク解析データベースを構築し、それを活用することでOAにおいて軟骨変性を推し進める因子を包括的に見出すことである。

3. 研究の方法

本研究では末期のOA症例から人工関節置換術の際に軟骨、滑膜組織および関節液を採取した。より早期のOA症例の場合、組織を採取する機会は極めて少ないが、治療目的で関節液を採取することは日常の診療においてごく一般的に行われている。また剖検例からは肉眼的に正常な軟骨、滑膜組織のほか、

軽度の軟骨変性があるがOAとして症状が発現するに至らなかった関節からも組織を得ることができる。

このような背景から、本研究では以下のよう

表 1. 本研究における検体の採取

検体を得る関節	採取した検体
剖検例	
・ほぼ正常の関節	軟骨、滑膜
・軽度の軟骨変性のみられる関節	軟骨、滑膜
OA症例	
・早期、中期症例	関節液
・末期症例	軟骨、滑膜、関節液

各組織、関節液の解析は具体的には以下のように行った。

(1) 軟骨については先行論文 (Fukui N, et al. *Arthritis Rheum* 2008) に記述した方法にしたがって軟骨を3層に分け、それぞれからRNAを抽出してcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の解析を行った。その結果着目すべき遺伝子が見出された場合にはその遺伝子の軟骨における発現をより多数の症例について laser capture microdissection (LCM) と qPCR を組み合わせた解析を行って検討した。

(2) 滑膜については滑膜組織からRNAを抽出してcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の解析を行った。その結果着目すべき遺伝子が見出された場合には軟骨と同様、その遺伝子の滑膜における発現をより多数の症例について qPCR を組み合わせた解析を行って検討した。この場合、RNAを採取する部位の肉眼所見、組織所見を同時に記録した。

(3) 関節液については種々の因子を同一検体において測定し、因子間の濃度の相関関係を解析した。このことを可能にするために、少量の検体から多数の因子を同時に高感度・高精度で測定できる suspension array technology を応用した BioPlex (BioRad) が解析に用いられた。

4. 研究成果

OA軟骨については10例の末期OA軟骨から得た軟骨について3層ごとにcDNAマイクロアレイによる解析を行い、合計30セッ

トのアレイデータを得た。また qPCR については合計 42 例の末期 OA 関節から得た関節軟骨について合計 17 個の遺伝子について発現の定量的解析を行った。

対照関節からの軟骨については、現在までに肉眼的にほぼ正常な軟骨 3 症例と軽度の軟骨変性のみられる症例 3 症例から十分な質と量の RNA を採取して軟骨の層ごとのアレイ解析を終えている。

滑膜については 32 例の末期 OA 症例から得た滑膜について cDNA マイクロアレイによる解析を行い、合計 32 セットのアレイデータを得た。また qPCR については合計 42 例の末期 OA 関節から得た関節軟骨について合計 17 個の遺伝子について発現の定量的解析を行った。

このデータベースを用いた解析は現在も継続しているが、今まで得られた成果の一つを図に示す。

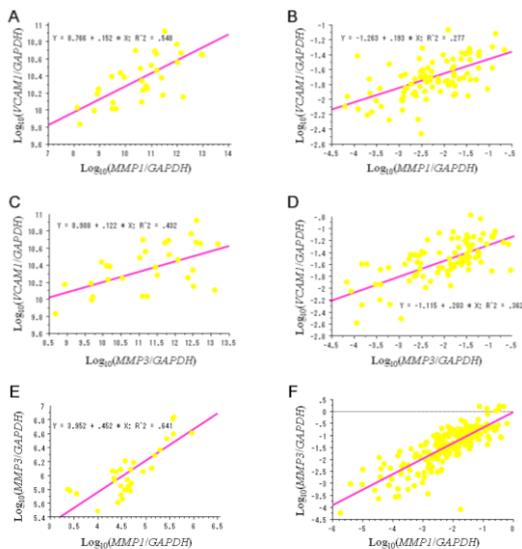


図. 滑膜における遺伝子発現の cDNA マイクロアレイと qPCR による解析の一例。A、C、E はアレイのデータにおける遺伝子のシグナル強度の相関を、B、D、F はアレイのデータにおいて見出された遺伝子の発現強度の相関関係を末期 OA 関節から採取したより多数 (n = 42-63) の滑膜検体を用いた qPCR による解析によって検証したもの。アレイデータにおける信号強度の相関から滑膜において MMP-1 と VCAM (A)、MMP-3 と VCAM (C)、MMP-1 と MMP-3 (E) の発現レベルが相関することが予想されたが、これらの相関関係はいずれも qPCR による解析結果によって確認された (それぞれ B、D、F)。この結果か

らこの手法によって滑膜において発現している各遺伝子間の相互の関係がアレイデータの解析から高い精度で推察できることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritic synovial fibroblasts via lymphotaxin β receptor. *J Rheumatol* 35:960-968, 2008.
- Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Tanaka T, Fukui N, Tsunoda T, Takahashi A, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet* 40:994-998, 2008.
- Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, Mitomi H, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S. Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 58:3843-3853, 2008.
- Fukui S, Ogawa K, Ohtsuka M, Fukui N. A randomized study assessing efficacy of communication skill training on patients' psychologic distress and coping: Nurses' communication with patients just after being diagnosed with cancer. *Cancer* 113:1462-1470, 2008.
- Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T. Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis.

- J Rheumatol* 35:2316-2324, 2008.
6. Nakajima K, Kakihana W, Nakagawa T, Mitomi H, Hikita A, Suzuki R, Akai M, Iwaya T, Nakamura K, Fukui N. Addition of an arch support improves the biomechanical effect of a laterally wedged insole. *Gait and Posture* 29:208-213, 2009.
 7. Fukui S, Ogawa K, Ohtsuka M, Fukui N. Effect of communication skills training on nurses' detection of patient distress and related factors after cancer diagnosis: A randomized study. *Psycho-Oncology* 18:1156-1164, 2009.
 8. Ishida, S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology* 128(1 Suppl):e315-24, 2009.
 9. Hikita A, Tanaka N, Yamane S, Ikeda Y, Furukawa H, Tohma S, Suzuki R, Tanaka S, Mitomi H, Fukui N. Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- α . *Biochem Cell Biol* 87: 581-593, 2009.
 10. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, Yao T. Aberrant p16^{INK4a} methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 136:323-331, 2010.
 11. Fukui S, Ogawa K, Fukui N. Communication skills training on how to break bad news for Japanese nurses in oncology: effects of training on nurses' confidence and perceived effectiveness. *J Cancer Educ* 25:116-119, 2010.
 12. Nakajima M, Takahashi A, Kou I, Rodriguez-Fontenla C, Gomez-Reino JJ, Furuichi T, Dai J, Sudo A, Uchida A, Fukui N, Kubo M, Kamatani N, Tsunoda T, Malizos KN, Tsezou A, Gonzalez A, Nakamura Y, Ikegawa S. New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One* 5:e9723, 2010.
 13. Katsuragawa Y, Saitoh K, Tanaka N, Wake M, Ikeda Y, Furukawa H, Tohma S, Sawabe M, Ishiyama M, Yagishita S, Suzuki R, Mitomi H, Fukui N. Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage* 18:1133-1143, 2010.
 14. Fukui N, Yamane S, Ishida S, Tanaka K, Masuda R, Tanaka N, Katsuragawa Y, Fukui S. Relationship between radiographic changes and symptoms or physical examination findings in subjects with symptomatic medial knee osteoarthritis: a three-year prospective study. *BMC Musculoskelet Disord* 11:269-, 2010.
- [学会発表] (計 26 件)
- 国際学会
1. Nakajima K, Kakihana W, Nakagawa T, Mitomi H, Hikita A, Suzuki R, Akai M, Iwaya T, Nakamura K, Fukui N. Addition of an arch support improves the biomechanical effect of a laterally wedged insole. 2008 World Congress on Osteoarthritis. 2008.9.18-21, Roma, Italy
 2. Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, Mitomi H, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S. Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritis cartilage. 2008 World Congress on Osteoarthritis. 2008.9.18-21. Roma, Italy.
 3. Fukui N. Altered chondrocyte metabolism in osteoarthritic cartilage. Can it be normalized?. 13th Congress on the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology. 2008.9.23-27, Yokohama.
 4. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N, Wake M, Ohmori M, Yamaguchi T, Furukawa H,

Touma S, Miyamoto Y, Tashiro T, Katsuragawa Y. Exploration of possible catabolic factors for cartilage matrix in osteoarthritic synovial fluid. 2010 World Congress on Osteoarthritis. 2010. 9. 23-26, Brussels, Belgium.

5. Fukui N. Dedifferentiation of monolayer cultured chondrocytes could be promoted by $\alpha v \beta 5$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. Osteoarthritis Research Society International, 2010 China Forum. 2010. 9. 23-26, Nanjing, China.

*国内学会

1. 福井尚志, 池田泰子, 疋田温彦, 三富弘之, 十字琢夫, 森俊仁, 桂川陽三, 宮本恵成, 山本精三, 鈴木隆二. インテグリンの活性抑制は変形性関節症罹患軟骨における病的コラーゲンの発現を軽減し, 培養軟骨細胞の脱分化を抑制する. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008. 10. 22-23, 京都.
2. 福井尚志, 宮本恵成, 中島正弘, 池田泰子, 疋田温彦, 三富弘之, 森俊仁, 鈴木隆二, 桂川陽三, 山本精三, 池川志郎. 変形性関節症罹患軟骨における軟骨細胞の代謝活性の検討 - マイクロアレイによる軟骨各層の遺伝子発現の解析結果から -. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008. 10. 22-23, 京都.
3. 福井尚志. 変形性関節症における軟骨細胞の基質産生の変化 - 軟骨細胞の基質産生の正常化は可能か? -. 第26回日本骨代謝学会学術集会. 2008. 10. 29-31, 大阪.
4. 福井尚志, 山根昌治, 田中信帆, 増田理亜子, 増田公男, 田中こなき, 東成一, 十字琢夫, 森俊仁, 桂川陽三. 内側型膝OAの進行過程 - 保存的治療例におけるレントゲン, 愁訴, 臨床所見の経時的変化 -. 第1回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 2009. 6. 25-27, 札幌.
5. 福井尚志, 池田泰子, 田中信帆, 石田 暁, 鈴木隆二, 宮本恵成, 田代俊之, 桂川陽三. ヒト変形性関節症罹患軟骨におけるanabolic factorの発現の検討. - 変性部における軟骨基質発現低下の機序解明の試み -. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 2009. 11. 5-6, 横浜.
6. 福井尚志, 池田泰子, 田中信帆, 和気昌弘, 古川 宏, 當間重人, 鈴木隆二, 宮本恵成, 田代俊之, 桂川陽三. 変形性関節症における関節液中の軟骨変性因子の探索. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 2009. 11. 5-6, 横浜.
7. 福井尚志. 変形性関節症の病態 - 最近の知見と滑膜病変に関する我々の検討結果 -. 第27回日本骨代謝学会. 2009. 7. 23-25, 大阪市.
8. 福井尚志, 田中信帆, 和気昌弘, 池田泰子, 山口鉄生, 宮本恵成, 沢辺元司, 田代俊之, 桂川陽三. 変形性関節症では滑膜細胞によって関節液中にMMP-1, 2, 3が供給される. 第23回日本軟骨代謝学会. 2010. 4. 2-3, 鹿児島.
9. 福井尚志, 田中信帆, 和気昌弘, 池田泰子, 山口鉄生, 宮本恵成, 沢辺元司, 田代俊之, 桂川陽三. 変形性関節症では関節液中のMMP-1, 2, 3も軟骨の変性・喪失に関与する. 第23回日本軟骨代謝学会. 2010. 4. 2-3, 鹿児島.
10. 福井尚志, 山根昌治, 田中信帆, 増田理亜子, 田中こなき, 東成一, 十字琢夫, 桂川陽三, 森俊仁. 内側型変形性膝関節症の進行過程 - X-pと愁訴, 臨床所見の関連の検討 -. 第83回日本整形外科学会学術総会. 2010. 5. 27-30, 東京.
11. 福井尚志, 山根昌治, 田中信帆, 増田理亜子, 田中こなき, 十字琢夫, 森俊仁, 桂川陽三. 内側型変形性膝関節症の進行過程 - 保存療法例におけるレントゲン, 愁訴, 臨床所見の関連 -. 第二回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会学術集会. 2010. 7. 2-4, 那覇市.
12. 山口鉄生, 田中信帆, 和気昌弘, 池田泰子, 宮本恵成, 沢辺元司, 田代俊之, 桂川陽三, 福井尚志. 変形性関節症では滑膜細胞によって関節液中にMMP-1, 2, 3が供給される. 第二回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会学術集会. 2010. 7. 2-4, 那覇市.
13. 福井尚志, 田中信帆, 大森舞子, 和気昌弘, 池田泰子, 宮本恵成 1), 田代俊之 2), 桂川陽三 3). 単層培養された関節軟骨では $\alpha v \beta 5$ integrin によって軟骨基質の発現低下と細胞の形状の変化がもたらされる. 第42回日本結合組織学会・第57回マトリクス研究会. 2010. 8. 19-20, 秋田市.
14. 田中信帆, 石田 暁, 大森舞子, 和気昌弘, 池田泰子, 山口鉄生, 宮本恵成,

- 田代俊之、桂川陽三、福井尚志。変形性関節症では軟骨変性部において IGF シグナルの低下によって基質産生が低下している。第 42 回日本結合組織学会・第 57 回マトリクス研究会。2010. 8. 19-20. 秋田市。
15. Naoshi Fukui, Shoji Yamane, Nobuho Tanaka, Riako Masuda, Konagi Tanaka, Sei-ichi Azuma, Kimio Masuda, Takuo Juji, Toshihito Mori, Yozo Katsuragawa. Progression of symptomatic medial knee osteoarthritis. Relationship between radiographic changes and symptoms over a 3-year period. 第 2 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (2nd JOSKAS) / 第 2 回 JOSKAS セミナー / 第 7 回アジア・オセアニア整形外科学会 (7th APOSSM) 2010. 7. 2-4、沖縄市。
16. 福井尚志、田中信帆、大森舞子、和気昌弘、池田泰子、山口鉄生、沢辺元司、宮本恵成、田代俊之、桂川陽三。変形性関節症では変性軟骨から荷重によって VEGF が放出され、関節水腫を引き起こす。第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会。2010. 10. 14-15、京都。
17. 山口鉄生、田中信帆、大森舞子、和気昌弘、池田泰子、宮本恵成、田代俊之、桂川陽三、沢辺元司、福井尚志。変形性関節症における軟骨変性には局所的な TIMP の発現低下が関与する。第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会。2010. 10. 14-15、京都。
18. 福井尚志。レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクションのヒト軟骨組織への応用。ー変形性関節症の病態解明への試みー。第 31 回日本レーザー医学会総会。2010. 11. 13-14、名古屋。
19. 福井尚志。Synovium - another culprit in OA? 第 2 4 回日本軟骨代謝学会。2011. 3. 4-5、福岡。
20. 田中信帆、石田 暁、大森舞子、和気昌弘、池田泰子、山口鉄生、宮本恵成、田代俊之、桂川陽三、福井尚志。変形性関節症では軟骨変性部で IGF シグナルの低下によって基質産生が低下している。第 2 4 回日本軟骨代謝学会。2011. 3. 4-5、福岡。
21. 山口鉄生、田中信帆、大森舞子、和気昌弘、池田泰子、宮本恵成、田代俊之、

桂川陽三、沢辺元司、福井尚志。変形性関節症における軟骨変性には局所的な TIMP の発現低下が関与する。第 2 4 回日本軟骨代謝学会。2011. 3. 4-5、福岡。

〔図書〕 (計 1 件)

Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N. The use of laser capture microdissection on adult human articular cartilage for gene expression analysis. *In*: Laser capture microdissection: methods and applications. 2nd Ed. Murray GI, editor. London: Springer-Verlag (in press).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hosp.go.jp/~sagami/rinken/crc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 尚志 (FUKUI NAOSHI)
独立行政法人国立病院機構
(相模原病院臨床研究センター)
病態総合研究部・部長
研究者番号：10251258

(2) 研究分担者

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)
独立行政法人国立病院機構
(相模原病院臨床研究センター)
診断・治療研究室・室長
研究者番号：70373470

(3) 研究分担者

三富 弘之 (MITOMI HIROYUKI)
独立行政法人国立病院機構
(相模原病院臨床研究センター)
病態総合研究部・研究員
研究者番号：90181940