

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09487

研究課題名（和文）滑膜下結合組織の線維化機構に着眼した透析患者における手根管症候群発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Carpal Tunnel Syndrome Onset in Dialysis Patients Focusing on the Fibrosis Mechanism of the Subsynovial Connective Tissue

研究代表者

小沼 賢治（Onuma, Kenji）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80348557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：手根管症候群（CTS）は正中神経の圧迫により発症し、透析患者ではリスクが高く再発率も高いが、その原因は不明である。本研究では、透析患者の滑膜下結合組織（SSCT）における線維化メカニズムの検討を行った。透析患者（HD群）と非透析患者（非HD群）の比較では、HD群でCOL1A1、COL3A1、COL5A1の発現が有意に高いことが判明した。また、2-ミクログロブリン（B2-MG）による刺激でこれらの遺伝子の発現が増加し、p38 MAPK阻害剤がその効果を抑制することが示された。この結果、B2-MGとコラーゲン遺伝子の発現上昇がCTSの病態に寄与し、治療標的として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、透析患者における手根管症候群（CTS）の病態解明に新たな知見を提供した。特に、滑膜下結合組織（SSCT）におけるCOL1A1、COL3A1、COL5A1の発現が透析患者で有意に上昇することを示し、これがCTSの病理に寄与する可能性を示唆した。さらに、B2-ミクログロブリン（B2-MG）がこれらのコラーゲン発現を促進することを明らかにした。これにより、B2-MGおよびCOL3A1、COL5A1がCTSの治療標的として有望であることが示された。これらの知見は、CTSの予防・治療戦略の構築に貢献し、透析患者の生活の質向上に向けた新たな治療法開に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Carpal tunnel syndrome (CTS) is caused by compression of the median nerve and has a higher risk and recurrence rate in dialysis patients, though the reasons are unclear. The purpose of this study was to elucidate the fibrosis mechanisms in the subsynovial connective tissue (SSCT) of dialysis patients, focusing on the expression of collagen genes (COL1A1, COL3A1, and COL5A1). A comparison between dialysis patients (HD group) and non-dialysis patients (non-HD group) revealed significantly higher expression of COL1A1, COL3A1, and COL5A1 in the HD group. Additionally, stimulation with 2-microglobulin (B2-MG) increased the expression of these genes, and this effect was suppressed by a p38 MAPK inhibitor. These findings suggest that the increased expression of collagen genes and B2-MG contribute to the pathogenesis of CTS, indicating that they may be promising therapeutic targets.

研究分野：整形外科

キーワード：手根管症候群 滑膜下結合組織 線維化 コラーゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

手根管症候群(CTS)は手根管内を通る正中神経が圧迫されることにより、しびれ、痛みをきたす疾患であり、その有病率は4%にもものぼる。CTSは患者の生活の質、日常生活動作を著しく低下させ、社会生活、職業的機能を大きく妨げることから病態解明は極めて重要である。

透析は手根管症候群発症のリスクファクターであることや手根管開放術後の再発率が高いことが報告されている。しかし、その原因、病態は明らかになってない。近年、横手根靭帯だけでなく、滑膜下結合組織(subsynovial connective tissue, SSCT)の線維化、肥厚にともなう正中神経の圧迫がCTSの病態に関与する可能性が示唆されている。我々は、透析患者のSSCTではコラーゲン産生が亢進しているとの仮説のもと検討を行った結果、透析患者の滑膜下結合組織では非透析患者に比べI型およびIII型コラーゲン遺伝子(COL1A1、COL3A1)の発現が有意に亢進していることを見出した。しかし、コラーゲン産生が亢進する機序やCTS病態との不明であった。

### 2. 研究の目的

SSCTにおけるCOL1A1、COL3A1発現上昇を介した滑膜下結合組織線維化メカニズムの解明を行う。

### 3. 研究の方法

CTSを有するHDおよび非HD患者のSSCTにおけるコラーゲン発現を調査するため、手根管解放術(CTR)中にSSCTを採取した。CTRを施行された124人の患者のうち、CTSの危険因子とされるBMIが過体重または肥満を示す、 $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ であった36人を除外した。全ての患者はCTSを診断するために、アメリカ神経筋電気診断医学学会の基準に従って、筋電図検査と神経伝導検査を含む神経生理学的検査を受けた。その後、カルテ情報に従って、外傷、末梢神経疾患、サルコイドシス、屈筋腱炎、変形性関節症、関節リウマチおよび甲状腺疾患の病歴を持つ患者をさらに除外した。最終的に、CTS患者67人(非HD群49人、HD群18人)を本研究の対象とした。この対象のうち、平均年齢 $65.1 \pm 9.0$ 歳(手術時年齢52~78歳)7人の男性と3人の女性の非HD患者から得た検体を使用して、患者におけるB2-MGの病理学的役割を調査した。さらに、平均年齢 $70.4 \pm 12.5$ 歳(手術時年齢54~90歳)の6人の男性と4人の女性の非HD患者から得た検体を使用して、CTS患者におけるB2-MGによるコラーゲン発現に対するp38 MAPK阻害剤の効果を調べた。

滑膜下結合組織細胞(SSCTC)を分離するために、SSCT検体をクロストリジウムヒストリチカム由来の0.1% I型コラーゲナーゼ溶液をもちいて37℃で24時間処理した。SSCTCは、10%ウシ胎児血清(FBS)および10 ng/ml 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)を添加した $\alpha$ -MEMで2週間培養した。2週間の培養後、フローサイトメトリーを使用して、SSCTCが造血細胞マーカーCD45に対して陰性であり、線維芽細胞マーカーCD90に対して陽性であることを確認した。培養したSSCTCのコラーゲン発現に対する10% FBSおよびFGF2の影響を低減させるため、SSCTCをPBSで3回洗浄し、その後0.5% FBSを含む $\alpha$ -MEMで培地を交換した。3時間後、SSCTCを0.5% FBSを含む $\alpha$ -MEM(コントロール)または10  $\mu\text{g/ml}$ のB2-MGで刺激した。B2-MGによるコラーゲン発現に対するp38 MAPK阻害剤の効果を評価するために、10  $\mu\text{M}$  SB203580(p38 MAPK阻害剤)の非存在下(コントロール)または存在下でSSCTCを10  $\mu\text{g/ml}$ のB2-MGで刺激した。COL1A1、COL3A1およびCOL5A1 mRNAの発現はリアルタイムPCRを用いて検討した。各コラーゲンの発現レベルは、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現レベルで正規化し、2<sup>-Ct</sup>法を使用して分析した。データが正規分布しているかを判断するために最初にShapiro-Wilk検定を行った。データが正規分布していなかったため、主な分析にはMann-Whitney U testを使用した。すべての検定においてP値0.05未満を統計的有意差ありとした。SPSSソフトウェアv.28.0(IBM Corp., Armonk, NY)を使用してデータを分析した。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 患者背景

HDおよび非HD群の患者背景を表1に示す。性別、年齢およびBMIに有意差は認めなかった(性別、 $P=0.050$ ; 年齢、 $P=0.791$ ; BMI、 $P=0.354$ )。

表1: 患者背景

	HD 群	非 HD 群	P 値
年齢	69.3 ± 6.5	70.0 ± 12.2	P=0.791
性別 (女性/男性)	7/11	33/16	P=0.050
BMI	20.9 ± 1.9	21.5 ± 2.3	P=0.354

BMI: body mass index

#### 4-2. HD および非 HD 患者の SSCT におけるコラーゲン発現

Real time PCR を使用して COL1A1、COL3A1 および COL5A1 の発現を調べた。HD 群は、非 HD 群と比較して COL1A1、COL3A1 および COL5A1 レベルの有意な上昇を示した (COL1A1, P=0.021; COL3A1, P=.0.031; COL5A1, P=0.027; 図 1A, B, C)。

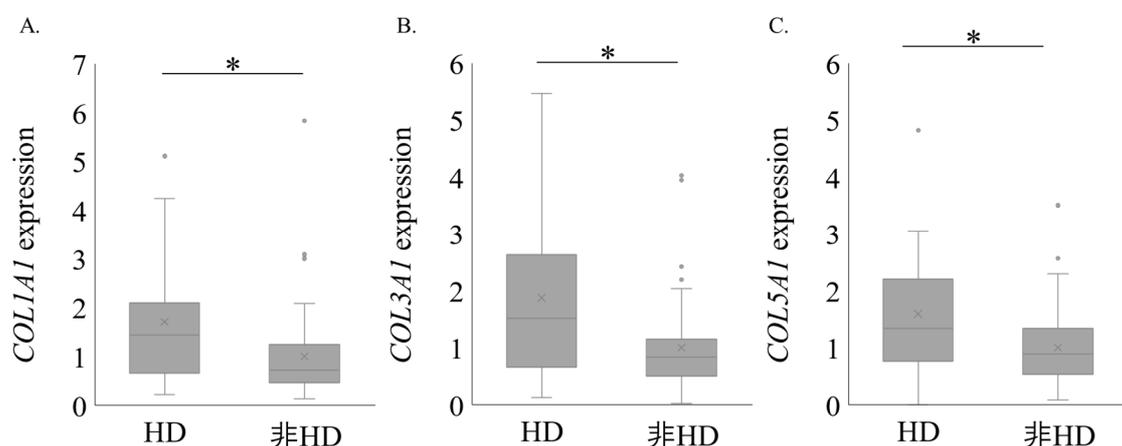


図 1 : HD および非 HD 患者の SSCT におけるコラーゲン遺伝子発現

手根管症候群の血液透析 (HD) および非血液透析 (非 HD) 患者の滑膜下結合組織 (SSCT) におけるコラーゲン遺伝子発現

A : COL1A1、B : COL3A1、C : COL5A1

\*p<0.05

#### 4-3. SSCTC における B2-MG によるコラーゲン発現の変化

コントロールと比較して COL3A1 および COL5A1 発現レベルが上昇した (COL1A1, P=0.055; COL3A1, P < 0.001; COL5A1, P=0.013; 図 2A, B, C)。

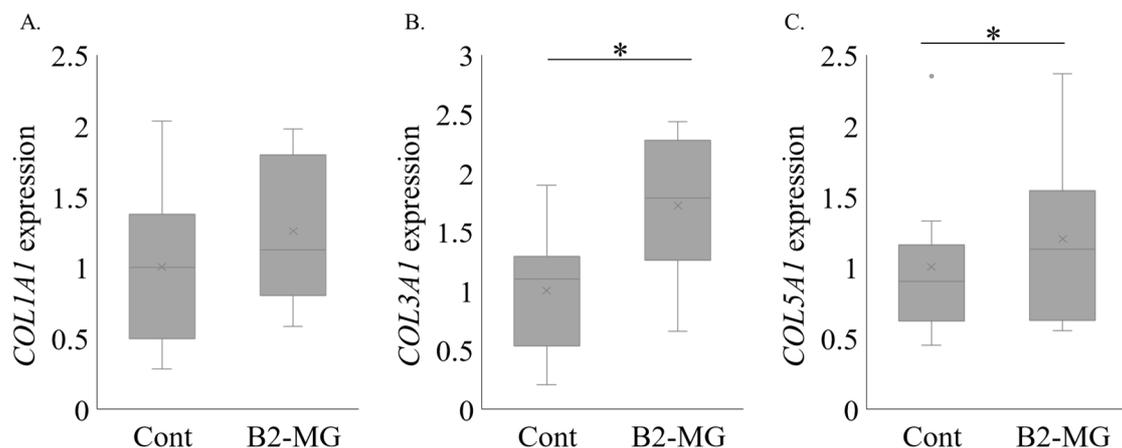


図 2 : SSCTC における B2-MG によるコラーゲン遺伝子発現の調節

0 (コントロール) または 10  $\mu\text{g/ml}$  の B2-MG による 24 時間刺激後の滑膜下結合組織細胞におけるコラーゲン遺伝子発現

A : COL1A1、 B : COL3A1、 C : COL5A1 \* $p < 0.05$

4-4. p38 MAPK 阻害剤存在下における SSCTC に対する B2-MG によるコラーゲン発現の変化

SSCTC における COL1A1、 COL3A1 および COL5A1 発現は B2-MG 単独での刺激と比較して p38 MAPK 阻害剤下で有意に減少した (COL1A1,  $P=0.037$ ; COL3A1,  $P=0.001$ ; COL5A1,  $P=0.025$ ; 図 3A, B, C)。

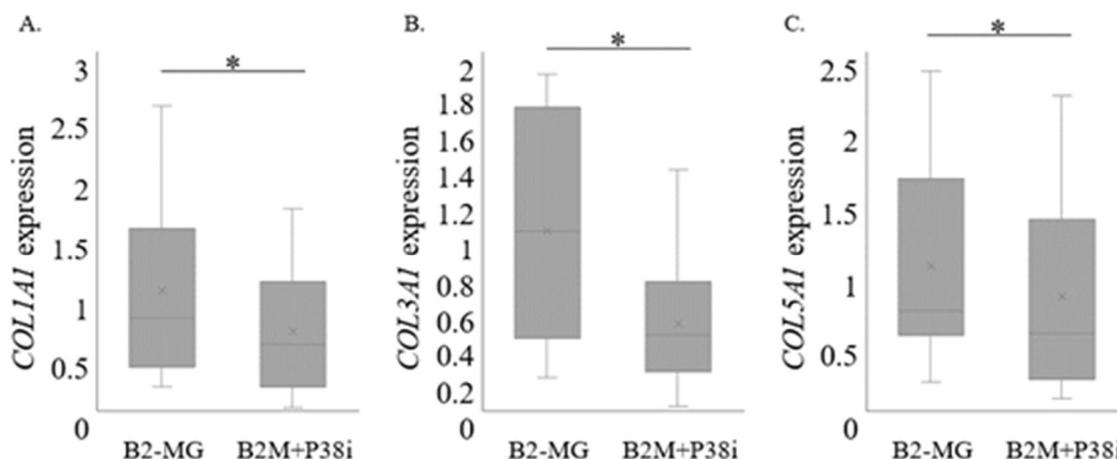


図 3 : SSCTC における p38 MAPK 阻害剤によるコラーゲン遺伝子発現の調節

p38 MAPK 阻害剤 (p38i) 存在下および非存在下での 10  $\mu\text{g/ml}$  B2-MG による 24 時間刺激後の SSCTC におけるコラーゲン遺伝子発現レベル

A : COL1A1、 B : COL3A1、 C : COL5A1

\* $p < 0.05$

HD 患者は、CTS を有する非 HD 患者よりも COL1A1、 COL3A1 および COL5A1 の発現レベルが高いことを示した。さらに、SSCTC を B2-MG で刺激すると COL3A1 および COL5A1 の発現が増加した。このことから、B2-MG が HD 患者の CTS 発症に寄与する可能性が示唆された。

CTS 患者の SSCT は、腱鞘の肥厚を伴う増殖、線維化、血管壁の肥厚、内膜過形成、血管増殖および血栓症を含む血管病変などのさまざまな病理を示す可能性がある。このような病理学的変化は、細胞がコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分と相互作用するときには発生する。以前の研究では、特発性 CTS 患者の SSCT における型および型コラーゲンなどの線維化因子の発現レベルの上昇が報告されている。さらに、免疫組織化学的研究では、対照群と比較して、CTS 患者の型コラーゲン線維の染色が有意に強いことが報告されており、さらに CTS 患者の SSCT に位置する型コラーゲン陽性細胞は、健常対照者よりも有意に大きいことが報告されている。また、線維性疾患において COL5A1 レベルの増加が報告されており、COL5A1 の mRNA 発現の上昇と型コラーゲンの沈着の障害は、全身性硬化症における肺組織の線維化と機能の悪化に関連が示されている。さらに、アテローム性動脈硬化症の症例では、型および型コラーゲンに比べて型コラーゲンの増加が多いことがヒト大動脈で認められている。本研究では、COL1A1、COL3A1 および COL5A1 発現レベルが HD 患者で上昇していることを示し、COL1A1、COL3A1 および COL5A1 の増加が HD 患者の CTS 病理に寄与する可能性があることを示唆した。

B2-MG は、有核細胞の MHC クラス に結合する小さな膜状タンパク質である。B2-MG は通常では近位尿細管による再吸収および糸球体濾過によって除去される。しかし、慢性腎臓病患者では、B2-MG 異化作用が著しく低下している。これは血漿中の B2-MG 濃度の増加につながり、長期間に及ぶことで B2-MG が組織へ沈着する。マイクロアレイを使用して実施された先行研究では、変形性膝関節症患者から採取された軟骨細胞において B2-MG で刺激することによって COL3A1 発現が促進されることが示されている。本研究では同様に、B2-MG による SSCTC への刺激が COL3A1 および COL5A1 発現を促進することを示した。したがって、HD 患者の SSCTC における B2-MG の蓄積は、COL3A1 及び COL5A1 発現を促進することで CTS 発症を誘発する可能性を示唆した。

これまでの研究で、p38 MAPK がコラーゲン遺伝子発現を調節することが報告されている。p38 MAPK は、ラット肝星状細胞株で Col1a1 発現を調節し、SB203580 は、ヒト気管支線維芽細胞における TGF- $\beta$  を介した COL1A1 発現を阻害した。さらに、IL-17 を介した COL5A1 の発現は、ヒト小気道上皮細胞の p38 MAPK シグナル伝達経路の阻害剤によってブロックされた。本研究でも、これまでの報告と一致して、p38 MAPK 阻害剤が SSCTC の COL3A1 および COL5A1 発現を減少させることを示した。したがって、p38 経路の阻害は、HD に関連する SSCT の線維化を抑制するための薬理的戦略である可能性を示唆した。

HD 患者の SSCT でコラーゲン発現レベルを調べ、SSCTC での B2-MG による制御を研究した。HD を伴う CTS 患者の SSCT では COL3A1 および COL5A1 が上昇しており、さらに COL3A1 および COL5A1 は B2-MG 刺激で増加し、p38 MAPK 阻害剤への曝露により減少した。したがって、COL3A1 および COL5A1 発現の上昇は、CTS の発生の根底にあるメカニズムの一端を担う可能性あり、B2-MG は、HD 患者における COL3A1 及び COL5A1 発現の促進に寄与する可能性を示唆した。これらのことから、COL3A1、COL5A1 および B2-MG は、HD を伴う CTS に対する治療標的であると考えられる。

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 Muneshige K, Onuma K, Sukegawa K, Otake Y, Inoue G, Takaso M, Uchida K	4. 巻 14
2. 論文標題 2-Microglobulin Elevates COL5A1 mRNA in the Subsynovial Connective Tissue of Patients Receiving Hemodialysis With Carpal Tunnel Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e32423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.32423	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 Otake Y, Sukegawa K, Onuma K, Machida S, Iida R, Takaso M	4. 巻 8
2. 論文標題 Displaced isolated coronal shearing fracture of the trapezoid: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports Plast Surg Hand Surg	6. 最初と最後の頁 50-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23320885.2021.1894941.	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 Minato S, Sukegawa K, Onuma K, Otake Y, Iida R, Takaso M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Polymicrobial Extensor Tenosynovitis Including Mycobacterium chelonae Caused by a Dog Bite: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JBJS Case Connect	6. 最初と最後の頁 e20.00608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2106/JBJS.CC.20.00608.	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 宗重 響子, 内田 健太郎, 高野 昇太郎, 迎 学, 高田 研, 関口 裕之, 大貫 裕子, 相川 淳, 岩瀬 大, 井上 玄, 高相 晶士
2. 発表標題 透析患者の滑膜下結合組織におけるコラーゲン発現上昇と 2-microglobulinによる発現制御の検討
3. 学会等名 第37回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横関雄司、内田健太郎、中脇充章、小沼賢治、助川浩士、見目智紀、大貫裕子、井上玄、高相晶士
2. 発表標題 手根管症候群患者の滑膜下結合組織におけるHIF-1 発現と線維化関連因子との関連性の検討
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

〔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	助川 浩士  (Sukegawa Koji)  (60458809)	北里大学・医学部・准教授   (32607)	
研究分担者	松本 俊英  (Matsumoto Toshihide)  (10623184)	北里大学・医学部・講師   (32607)	
研究分担者	佐藤 雅  (Satoh Masashi)  (40611843)	北里大学・医学部・講師   (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
---------	---------