

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592260

研究課題名(和文)変形性関節症におけるペリオスチンの役割の解明

研究課題名(英文)expression and pathological effects of periostin in osteoarthritis

研究代表者

梶座 康夫(Kunugiza, Yasuo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：60507193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト変形性関節症(OA)組織の、軟骨細胞、軟骨基質、軟骨下骨繊維変性部にペリオスチンが発現を認めた。OA軟骨と大腿骨頸部骨折骨頭軟骨においてペリオスチンのmRNA発現を比較したところ、OA軟骨において有意に発現が亢進していた。単離培養したヒト骨頭軟骨細胞においてペリオスチンにより、軟骨基質異化遺伝子として、MMP-1,3,13などが炎症関連遺伝子としてIL-6,8,NOS2が発現誘導された。NFκB阻害剤添加によりペリオスチンによる炎症性サイトカイン、MMPなどの発現上昇は抑制された。ペリオスチンはOAにおける炎症、軟骨変性のkey moleculeであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed the study to examine the expression and function of periostin in human OA. The human cartilage samples were obtained from the knees of patients undergoing total knee arthroplasty as OA samples and from the femoral bone head of patients with femoral neck fracture as control samples. The periostin mRNA was significantly higher in OA cartilage than in control cartilage. Immunohistochemical analysis of periostin showed that the main positive signal was localized in chondrocytes and their periphery matrix near the erosive area. The expression of periostin was also detected in the fibrotic cartilage and fibrotic tissue of subchondral bone. In cultured human chondrocytes, periostin induced IL-6, 8, MMP-1, 3, 13, and NOS2 in a dose- and time-dependent manner. Inflammatory signaling by periostin was suppressed by NF B inactivation in chondrocytes. Periostin was upregulated in OA cartilage, and it may amplify inflammatory events and accelerate OA pathology.

研究分野：整形外科

キーワード：ペリオスチン 変形性関節症 軟骨 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性関節症 (Osteoarthritis ; OA) は疼痛、関節の変形および機能不全を起こし、中高年者の ADL、QOL の低下に深刻な影響を及ぼす疾患である。病態の解明や新たな薬のターゲット探索を目的として、OA 軟骨の網羅的な遺伝子発現解析について度々報告されているものの、その詳細な病態メカニズムは未だ十分に解明されておらず、病態に対して根本的に有効な治療薬は未だ開発されていない。げっ歯類 OA モデル組織の遺伝子発現解析で OA との関連が示唆されているペリオスチンについて、ヒトの OA 軟骨組織における発現とその機能についてはまだ十分に解明されていない。

(2) ペリオスチンは、マウス骨芽細胞株で発見された細胞外マトリックスタンパク質で、骨、骨膜で強く発現することから骨発生に寄与する因子として考えられていた。しかし、近年では、腫瘍組織、心臓病、線維症、慢性アレルギー、皮膚修復過程など様々な組織や病態で発現することが確認され、また複数のスプライシングバリエーションが存在し細胞外、細胞質内、細胞核内にペリオスチンの局在が見られるなどその多岐にわたる発現、機能についての研究がすすめられている。ペリオスチンは組織損傷の際に先立って形成される線維性組織に多く発現し、その後の組織修復に関与することが報告されており、またペリオスチンの組織沈着が慢性炎症を生み出すことから、ペリオスチンがアトピーや喘息の原因遺伝子である可能性も報告されている。

2. 研究の目的

変形性関節症組織におけるペリオスチンの発現と機能をマウス、ラット OA モデル及びヒト軟骨細胞も用いて評価すること

3. 研究の方法

(1) ペリオスチン蛋白をヒト骨芽細胞、滑膜

細胞、マウス骨芽細胞、皮膚細胞に作用させて接着に対する効果を検討した。

(2) ペリオスチンノックアウトマウスにおいて靭帯及び半月板切除による変形性関節症モデルを作製し、評価を行った。

(3) ラット変形性関節症モデルを作製し、関節部におけるペリオスチン発現を解析した。

(4) 人工膝関節置換術施行時に患者から供試された膝 OA ヒト軟骨組織を用いて Periostin の免疫染色を試行し、関節軟骨組織における Periostin の発現の有無、局在を評価した。

(5) 膝 OA 患者軟骨及び滑膜におけるペリオスチンの遺伝子発現を解析した。人工膝関節置換術患者から提供された脛骨部軟骨と大腿骨頸部骨折患者から提供された骨頭軟骨、非 OA を用いてペリオスチンと MMP-13 の mRNA 発現を比較した。

(6) 大腿骨頸部骨折患者から供試された大腿骨頭軟骨を使用し、酵素処理により得られた細胞を平面培養して使用した。培養軟骨細胞にペリオスチンタンパク質を異なる濃度で添加し、OA に関連する遺伝子の発現変化を定量的 RT-PCR を用いて評価した。

(7) ペリオスチンが MMP や炎症性サイトカインを発現上昇させる機序を調べるため、ヒト培養軟骨細胞に炎症性シグナルの代表的な転写因子である NFκB に対する阻害剤を用いて遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

(1) ヒト骨芽細胞、滑膜細胞、マウス骨芽細胞、皮膚細胞、いずれの場合においてもペリオスチン蛋白を作用させることにより接着阻害効果を認めた。

(2) ペリオスチンエクソン 17 ノックアウトマウスにおいて靭帯及び半月板切除 8 週後の時点でレントゲン撮影及び組織作成を施行したところ有意に骨棘形成が抑制されていた。

(3) ラット膝 OA モデル関節部において、ペリオスチンは関節軟骨層の繊維変性部および軟骨下骨の繊維変性部に発現が認められた。

(4) ヒト膝 OA 関節軟骨組織のペリオスチン免疫染色では、軟骨細胞、軟骨基質、滑膜細胞、骨棘、軟骨下骨内の骨髄細胞等に発現が認められた。

(5)人工膝関節置換術患者から提供された脛骨部軟骨と大腿骨頸部骨折患者から提供された骨頭軟骨を用いてペリオスチンの mRNA 発現を比較したところ、OA 軟骨において有意にペリオスチンと MMP-13 の発現上昇を認めた。OA 滑膜組織においては有意にペリオスチンの発現上昇を認めたが MMP-13 の発現の上昇は認めなかった。

(6) 大腿骨頸部骨折患者から供試された大腿骨頭軟骨から採取した培養軟骨細胞にペリオスチンタンパク質を添加したところ、軟骨基質異化遺伝子として、MMP-1,3,13 と炎症関連遺伝子として IL-6, IL-8, NOS2 の発現上昇を認めた。

(7)ヒト培養軟骨細胞に NFκB に対する阻害剤を用いたところ MMP-1,3,13, IL-6, IL-8, NOS2 のペリオスチンによる発現誘導は抑制された。

本研究の結果よりペリオスチンが軟骨細胞の MMP-1, -3, -13 などの基質変性因子の発現を亢進させることにより、OA 病態

の悪化に寄与することが示唆された。

関節内における過剰な力学ストレスは骨棘形成の要因として考えられるが、ペリオスチンのあるバリエーションは骨分化を促進することも知られており、ペリオスチンは軟骨破壊、それに続く骨棘形成にまで、OA への複合的な関与が考えられた。

< 引用文献 >

変形性膝関節症でのペリオスチンの発現と機能について
千々松良太他、医学書院、臨床整形外科
49 巻、2014、1084-88

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 0 件)
現在海外雑誌に論文投稿中である。

[学会発表](計 4 件)

変形性膝関節症でのペリオスチンの発現と慢性炎症への寄与
千々松良太、梶座康夫、冨田哲也
第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月

軟骨細胞でのペリオスチンの発現と変性・炎症への寄与
千々松良太、梶座康夫、谷山義明、冨田哲也、吉川秀樹
第 27 回日本日本軟骨代謝学会、京都、2014 年 3 月

Periostin expresses in Osteoarthritis cartilage and promotes pathologic progress
千々松良太、梶座康夫、谷山義明、冨田哲也、吉川秀樹
第 18 回国際血管研究会、京都、2014 年 4 月

変形性膝関節症でのペリオスチンの発現と機能について
千々松良太、梶座康夫、冨田哲也、吉川秀樹
第 58 回日本リウマチ学会、東京、2014 年 4 月

[図書](計 1 件)

変形性膝関節症でのペリオスチンの発現と機能について
千々松良太他、医学書院、臨床整形外科
2014、49

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶座康夫 (KUNUGIZA Yasuo)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員
研究者番号： 60507193

(2) 研究分担者

富田哲也 (TOMITA Tetsuya)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号： 30283766

吉川秀樹 (YOSHIKAWA Hideki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 60191558

谷山義明 (TANIYAMA Yoshiaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座・
准教授
研究者番号： 60372611

(3) 連携研究者

()

なし

研究者番号：