

学位論文

「Activation of calcitonin gene-related peptide signaling
through the prostaglandin E2-EP1/EP2/EP4 receptor
pathway in synovium of knee osteoarthritis patients」

(変形性膝関節症の滑膜組織における

COX-2/PGE2/EP1/EP2/EP4 経路を介した

カルシトニン遺伝子関連ペプチドシグナリングの制御)

指導教授名 高相 晶士

申請者氏名 南谷 淳

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

【背景】

変形性膝関節症の最も重要な症状は痛みである。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、変形性膝関節症に対する鎮痛薬として最も多く使用されている薬剤である。しかし、NSAIDs を長期に使用することにより、腎障害・消化器障害などの副作用が出現することから、より効果的で副作用の少ない鎮痛薬の開発が期待される。

変形性膝関節症の疼痛のメカニズムの研究として、近年変形性膝関節症の滑膜組織におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide : CGRP) の発現と疼痛との関連性が示唆されているが、その発現制御機構については明らかになっていない。本研究では、変形性膝関節症患者から手術時に採取した滑膜組織を用いて CGRP の発現制御機構を検討した。

【方法】

同意を得た変形性膝関節症患者 43 名から人工膝関節置換術施行時に膝関節内より滑膜組織を採取した。採取した滑膜組織の RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて CGRP および炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 と COX-2 の発現を検討し、CGRP 発現との相関について検討した。また、変形性膝関節症患者 12 名に対して、滑膜組織からコラゲナーゼ処理により有核細胞を採取し、1 週間培養した。培養した滑膜細胞を TNF- α 、

IL-1 β 、IL-6、PGE2 で刺激後、リアルタイム PCR を用いて CGRP および CGRP の受容体である RAMP1、CLR の発現を検討した。さらに、培養した滑膜細胞に PGE2 の受容体のサブタイプである EP1、EP2、EP3、EP4 アゴニストで刺激後、CGRP および RAMP1、CLR の発現を検討した。

【結果】

滑膜組織のリアルタイム PCR の結果、CGRP は COX-2 と有意な相関を示した ($R=0.529$, $P<0.001$)。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 とは明らかな相関は認められなかった。免疫組織染色の結果、滑膜表層に COX-2 と CGRP 陽性細胞の存在が認められた。in vitro 培養系において PGE2、TNF- α 、IL-1 β の刺激により CGRP の発現は有意に増加した ($P<0.05$)。一方、RAMP1 の発現は PGE2 刺激でのみ有意に増加した。CLR の発現は PGE2、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 刺激によって変化しなかった。さらに CGRP は EP4 アゴニストの刺激により有意に発現が増加し、RAMP1 は EP1、EP2 の刺激により有意に発現が増加した ($P<0.05$)。いずれの刺激に対しても CLR の発現増加は認められなかった。

【考察】

本研究では、滑膜組織において COX-2 の発現と CGRP の発現に相関が認められ、COX-2 の生成物である PGE2 の刺激により CGRP の発現が促進された。一方、in vitro 培養系において TNF- α 、IL-1 β は CGRP の発現を誘導したが、滑膜組織の PCR の結果では CGRP と TNF- α 、IL-1 β 発現の間に相関は認められなかった。近年、滑膜組織へのメカニカルス

トレスは TNF- α , IL-1 β を増加させることなく、PGE2 を増加させることが報告されている。本研究から滑膜組織における CGRP の発現増加には COX-2/PGE2 経路が関与している可能性が示唆された。

近年、変形性膝関節症の患者から分離培養された滑膜細胞が RAMP1 mRNA を発現することが報告されているが、この発現の制御機構が解明されていない。本研究でわれわれは、滑膜細胞において RAMP1 の発現を検出し、PGE2 が CGRP の発現だけでなく RAMP1 の発現も制御していることが示唆された。

PGE2 の受容体には EP1、EP2、EP3、EP4 の 4 つのサブタイプがある。われわれの研究では、滑膜組織において、EP4 アゴニストの刺激により CGRP の発現が促進され、EP1、EP2 アゴニストの刺激により RAMP1 の発現が促進された。このことから PGE2 が異なる EP 受容体を介して CGRP/EP 受容体の発現制御機構の調節を行っている可能性が示唆された。

CGRP および CGRP 受容体阻害薬は偏頭痛の治療薬として臨床研究されている。また、抗 CGRP 抗体は変形性膝関節症モデルラットに対して鎮痛作用を示すことが報告されており、変形性膝関節症患者に対する臨床試験が開始されている。本研究において、変形性膝関節症患者の疼痛と CGRP 発現レベルの関係については明らかになっていないが、PGE2、EP 受容体を介した CGRP/EP 受容体の発現調節機構は変形性膝関節症の疼痛治療において有益な情報となるかもしれない。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 試薬-----	2
2-2. 患者-----	2
2-3. 免疫組織化学染色-----	3
2-4. リアルタイムPCR-----	3
2-5. 滑膜細胞培養 -----	4
2-6. ウェスタンブロッティング法 -----	5
2-7. 統計学的検討-----	6
3. 結果	
3-1. 変形性膝関節症患者の滑膜組織における CGRP の発現と 炎症性サイトカイン、COX-2 の発現との相関-----	6
3-2. 変形性膝関節症患者の滑膜組織における COX-2 と CGRP の局在-----	7

	項
3-3. 培養滑膜細胞における炎症性サイトカイン、PGE2 の刺激による CGRP の発現-----	7
3-4. 培養滑膜細胞における EP1-4 アゴニストの刺激による CGRP と受容体の発現-----	8
4. 考察 -----	8
5. 総括 -----	11
6. 謝辞 -----	12
7. 引用文献 -----	12
8. 業績目録 -----	22
9. 図表説明 -----	28

1. 序論

変形性膝関節症の最も重要な症状は痛みである。非ステロイド性抗炎症薬 (Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) は、変形性膝関節症に対する鎮痛薬として最も多く使用されている薬剤である¹⁾。NSAIDsは疼痛を効果的に軽減する²⁾が、NSAIDsを長期に使用することにより、腎障害や胃潰瘍などの消化器障害などの副作用が出現する³⁾。このことから、NSAIDsの長期的な投与が必要な変形性関節症にとって、より効果的で副作用の少ない鎮痛薬の開発が期待される。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide: CGRP) は37個のアミノ酸からなる神経ペプチドであり、receptor activity-modifying protein (RAMP1)と calcitonin receptor-like receptor (CLR) のヘテロダイマーに結合して作用する⁴⁾。股関節痛や膝関節痛に CGRP が関係しているという臨床報告がある⁵⁾⁻¹⁴⁾。変形性関節症患者の滑膜組織において、免疫組織染色で CGRP 陽性細胞が確認された報告もある^{8), 11)}。変形性股関節症の患者の滑膜組織に CGRP の mRNA が観察されており¹⁰⁾、変形性関節症患者から採取され、培養された滑膜細胞から CLR と RAMP1 の mRNA と蛋白の発現が報告されている⁵⁾。さらに、変形性膝関節症モデルのラットにおいて、抗 CGRP 抗体が疼痛を軽減したことを報告している^{6), 7)}。このことから、変形性関節症の滑膜組織において、CGRP/CGRP 受容体の発現・制御機構があると考えられるが、その制御機構は明らかになってはいない。

そこで我々は、変形性膝関節症 43 膝の滑膜組織を用いて、滑膜組織における CGRP シグナリング制御機構を調査した。

2. 方法

2-1. 試薬

ヒト組み換え interleukin-6 (IL-6) と interleukin-1 β (IL-1 β) と腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) は Biolegend 社 (San Diego, CA, USA) から購入した。プロスタグランジン E2 (PGE2) および Butaprost (EP2 アゴニスト) は、Sigma 社 (セントルイス、ミズーリ州、USA) から購入した。Iloprost (EP1 アゴニスト)、Sulprostone (EP3 アゴニスト)、および CAY10598 (EP4 アゴニスト) は Cayman 社 (アナーバー、ミシガン州、USA) から購入した。

2-2. 患者

X 線画像をもとに変形性膝関節症と診断 (Kellgren Lawrence:K/L 分類が grade3 から 4) し、人工膝関節全置換術を施行した 43 名を対象とした。男性が 9 名、女性が 34 名であり、平均年齢は 73.6 \pm 8.7 歳 (50~87 歳) であった。Body mass index (BMI) は平均 26.1 \pm 3.9 kg/m² (20.3-36.7 kg/m²) であった。43 名の手術患者のうち、K/L 分類

では grade3 が 42%で、grade4 が 58%であった。滑膜組織は、人工膝関節全置換術の術中に膝関節内から採取した。採取した滑膜組織の一部は、組織学的検討のために 48 時間、4%パラホルムアルデヒドのホルマリンで固定した。残りの組織はリアルタイム PCR 分析のため、RNA 抽出に使用するまで-80℃で冷凍保存した。12 名の患者の滑膜組織は、細胞培養のために使用した。手術の前日に各患者に対して、この研究への参加のインフォームドコンセントを行った。

2-3. 免疫組織化学染色

4%パラホルムアルデヒドで固定した滑膜組織サンプルのパラフィン包埋を行った。3mm の薄切切片を作成後、CGRP および Cyclooxygenase-2 (COX-2) の局在を調査するために、免疫組織化学染色を行った。抗 COX-2 マウスモノクローナル抗体 (Abcam 社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州、USA)、抗 CGRP ウサギポリクローナル抗体 (Abcam 社) とそれぞれ 4℃で 18 時間反応後、ストレプトアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ染色法 (ヒストファイン SAB-PO キット;ニチレイ、東京、日本) を用いて、CGRP、COX-2 陽性細胞を染色した。

2-4. リアルタイム PCR

RNA 抽出液 (TRIzol Reagent, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州、

USA) を用いて滑膜組織からトータル RNA を抽出後、逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。プライマー設計ソフトウェア (Primer Blast) を用いて CGRP, RAMP1, CLR, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 のプライマー配列を決定後、北海道システムサイエンスにてプライマー合成を行った (表 1)。cDNA サンプル, プライマー, SYBR Premix Ex Taq (タカラ、京都、日本) を混合後、Real-Time PCR Detection System (CFX-96; Bio-Rad, CA, USA) を用いてリアルタイム PCR を行った。各サンプルにおける mRNA の発現はハウスキーピング遺伝子 GAPDH で補正した。

2-5. 滑膜細胞培養

CGRP/CGRP 受容体の発現制御因子を検討するために、変形性膝関節症患者 12 名から滑膜組織を採取した。採取した滑膜組織を 0.1% type I コラゲナーゼ溶液中 40ml で酵素処理を行い有核細胞を得た。有核細胞を 6 穴プレートに播種後、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む α -MEM 培地を用いて培養した。7 日間培養後、6 名の患者から採取した細胞は、ヒト組み換え IL-6 (100 ng/ml)、IL-1 β (50 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml)、PGE2 (10 μ M) にて 24 時間刺激した。残りの 6 名の患者から採取された細胞は、10 μ M の Iloprost、Butaprost、Sulprostone、CAY10598 でそれぞれ 24 時間刺激した。刺激後細胞から RNA を抽出してリアルタイム PCR にて、CGRP、RAMP1、CLR の発現を分析した。またウエスタンブロッティング法にて RAMP1 の蛋白発現を分析した。

2-6. ウェスタンブロッティング法

RAMP1 のタンパク質の発現を調べるために、5 人の患者から採取した細胞を $10 \mu\text{M}$ の PGE₂、Iloprost、Butaprost、Sulprostone、CAY10598 でそれぞれ 24 時間刺激した。続いて滑膜細胞をプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche, インディアナポリス, USA) を含む RIPA 緩衝液 (Wako, 東京, 日本) に溶解させて、各組織抽出物のためのタンパク質濃度は、BCA アッセイキット (Pierce、ロックフォード、イリノイ州、USA) を用いて決定した。タンパク質抽出溶液 ($10 \mu\text{g}$ /レーン) を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。電気泳動後、PVDF ブロッキング試薬 (東洋紡、大阪、日本) で 1 時間ブロックした PVDF 膜に転写した。転写後、シグナルソリューション 1 (東洋紡) で 1000 倍に希釈した抗 RAMP1 ウサギモノクローナル一次抗体 (Abcam 社) と 4°C で一晩反応させた。PBS-T で 2 度洗浄後、信号溶液 2 (東洋紡社製) にて 1000 分の 1 に希釈した二次抗体 (ペルオキシターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体, GE Healthcare 社、NJ、USA) と室温で一時間反応させた。ImmunoStar LD 試薬 (和光、東京、日本) を用いた化学発光により検出し、LAS-5000 システム (富士フィルム、東京、日本) を使用して画像化した。

2-7. 統計学的検討

ピアソンの相関係数を用いて、CGRP とサイトカイン、COX-2 との間の相関関係を評価した。P<0.01 を統計学的に有意差ありとした。滑膜細胞を各種サイトカイン、PGE₂、EP アゴニストで刺激した際の mRNA 発現量の相違は、一元配置分散分析後にフィッシャーの最小有意差検定を用いて比較した。P<0.05 を統計学的に有意差ありとした。線形回帰係数の分析に影響を与える可能性のある統計外れ値を識別するために、クックの距離を検討した。全ての統計は統計分析ソフト SPSS (v. 19.0; SPSS、シカゴ、IL、USA) を用いて行った。

3. 結果

3-1. 変形性膝関節症患者の滑膜組織における CGRP の発現と炎症性サイトカイン、COX-2 の発現との相関

滑膜組織のサンプルは、統計学的に7つの外れ値 (IL-6 が2つ、IL-1 β が5つ) が含まれていたため除外した。始めに CGRP の mRNA の発現といくつかの炎症性因子の mRNA の発現との相関を調査した。滑膜組織において CGRP の発現は COX-2 の発現と有意な相関を示したが、IL-6、IL-1 β 、TNF- α とは明らかな相関は認められなかった (図 1)。

3-2. 変形性膝関節症患者の滑膜組織における COX-2 と CGRP の局在

リアルタイム PCR 分析は、CGRP と COX-2 の mRNA 発現の間の相関を検出するように、免疫組織化学的分析は、CGRP および COX-2 の局在を調べるために行った。免疫組織化学染色では、COX-2 及び CGRP のタンパク質は両方とも滑膜組織の表層細胞層 (図 2) に局在することが明らかになった。

3-3. 培養滑膜細胞における炎症性サイトカイン、PGE2 の刺激による CGRP の発現

次に変形性膝関節症患者の滑膜組織において、炎症性サイトカイン、PGE2 の刺激による CGRP と CGRP 受容体の発現への影響について調査した。In vitro の実験において、いくつかの細胞では、TNF- α や IL-1 β の刺激で CGRP の発現が上昇すると報告されており^{15), 16)}、これらの炎症性サイトカインはポジティブコントロールとして使用した。リアルタイム PCR 分析では、滑膜細胞において TNF- α 、IL-1 β 、PGE2 の刺激により CGRP の発現が未処理のコントロールの細胞と比較して有意に増加したが、IL-6 では有意な増加は認められなかった (図 3A)。RAMP1 の発現は PGE2 の刺激により増加したが、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の刺激では有意な増加は認めなかった (図 3B)。CLR の発現はいずれの刺激においても有意な増加は認めなかった (図 3C)。

3-4. 培養滑膜細胞における EP1-4 アゴニストの刺激による CGRP と受容体の発現

PGE2 は 4 つの異なるサブタイプの受容体を介して作用する。続いて、EP による CGRP および RAMP1 の調節を EP1-4 のアゴニストを用いて調査した。リアルタイム PCR 分析では、滑膜細胞において EP4 アゴニストの刺激により、未処理の細胞と比較して有意に CGRP の発現の増加を認めた。(図 4A)。EP1、EP2、EP3 アゴニストのそれぞれの刺激では、CGRP の発現の有意な増加は認められなかった(図 4A)。さらに、RAMP1 の mRNA の発現と蛋白レベルはそれぞれ、EP1 と EP2 アゴニストの刺激により、未処理の細胞と比較して有意に増加したが、EP3 と EP4 アゴニストの刺激では有意な増加は認めなかった(図 4B、5)。CLR の発現は、どの刺激に対しても有意な増加は認められなかった(図 4C)。

4. 考察

本研究において、変形性膝関節症患者の滑膜組織において、CGRP の制御機構を検討した結果、CGRP と COX-2 の発現に相関を認め、両方ともに滑膜表層の細胞層に局在することが示された。また、滑膜線維芽細胞培養において PGE2 と EP4 アゴニスト刺激により CGRP の発現が上昇した。また、PGE2 と EP1、EP2 アゴニスト刺激により RAMP1 の発現が上昇した。このことから、滑膜組織において PGE2/EP 経路が CGRP/CGRP 受容体の発現を制御している可能性が示唆された。

近年の研究で、CGRP/CGRP 受容体は神経細胞^{15), 17)}、上皮細胞¹⁶⁾、免疫細胞¹⁸⁾⁻²⁰⁾において、炎症性サイトカインや成長因子、PGE2 によって制御されていると報告されている。三叉神経においては IL-1 β と TNF- α が CGRP の発現を誘導し^{15), 16)}、IL-1 β が COX-2 と PGE2 の産生をさらに誘導することで IL-1 β による CGRP の発現が段階的に上昇すると言われている¹⁷⁾。Liu らは、ヒト肺胞 2 型上皮細胞においては IL-1 β は CGRP の発現を促進すると報告している¹⁶⁾。本研究において、滑膜組織における COX-2 の発現と CGRP の発現は有意に相関した。また、COX-2 からの代謝物である PGE2 の刺激により CGRP の発現が上昇した。一方、変形性膝関節症患者の in vitro の滑膜細胞培養では TNF- α と IL-1 β の刺激により CGRP の発現は有意に上昇したが、滑膜組織においては TNF- α と IL-1 β の発現と CGRP の発現に明らかな相関は認められなかった。最近の研究で中田らは²¹⁾、人の滑膜線維芽細胞の 3 次元培養組織への圧縮負荷は TNF- α や IL-1 β の非刺激下で、PGE2 と COX-2 を増加させると報告している。これらの結果から、変形性膝関節症患者の滑膜において、CGRP の発現は IL-1 β や TNF- α には依存しないで、PGE2 によって発現制御されているかもしれないことが示唆される。

RAMP1 は、CLR の細胞表面への移行に必要であり、リガンドの結合と CGRP 受容体シグナルに重要な役割を果たす^{22), 23)}。これらの特性から、RAMP1 の過剰発現は CGRP によって血管平滑筋細胞および三叉神経に感作する。近年の研究で、変形性膝関節症患者から採取された滑膜培養細胞において RAMP1 の mRNA の発現が検出されている⁵⁾が、

この発現制御機構は解明されていなかった。本研究で我々は、滑膜培養細胞において RAMP1 の発現を検出し、PGE2 が CGRP の発現だけではなく RAMP1 の発現も制御していることが明らかになった。

PGE2 は主要な炎症性のプロスタノイドで、侵害受容性疼痛に関与しており、異なる 4 つの G 蛋白共役受容体 EP1、EP2、EP3、EP4 を介して作用する^{24), 25)}。EP1 受容体は脊髄レベルでの機械的感作に関与している。カラギーナン誘発炎症性疼痛に対する選択的 EP1 アンタゴニストの ONO-8711 の髄腔内投与や、術後疼痛モデルに対する ONO-8711 の経口投与により、機械的痛覚過敏を改善することが報告されている^{26), 27)}。EP2 受容体もまた炎症性疼痛期において、脊髄性の疼痛に関与している^{28), 29)}。さらに、ラット感覚後根神経節 (DRG) において PGE2 の上昇が EP4 受容体の発現を上昇させている³⁰⁾。Southal ら³³⁾は、感覚神経の感作は主に EP4 受容体を介して行われており、EP3 受容体を介しては行われないと報告している。本研究で、滑膜培養細胞において EP4 アゴニストの刺激により CGRP の発現が増加し、EP1、EP2 アゴニストの刺激により RAMP1 の発現が増加することが示唆された。以前の研究報告と本研究の結果から、変形性膝関節症患者の膝滑膜において PGE2 が異なった EP 受容体を介して CGRP/CGRP 受容体の発現制御機構の調節を行っていることが示唆された。

偏頭痛に対して有効な抗 CGRP 薬や CGRP 受容体阻害薬の臨床研究が多く認められている³¹⁾⁻³⁴⁾。さらに、ヒト抗 CGRP 抗体 (LY295174) はラットの変形性関節症モデルに

対して疼痛を緩和しており^{6),7)}、変形性膝関節症患者に対する臨床研究は現在進行中である³⁵⁾。本研究は、CGRP の発現と変形性膝関節症患者の疼痛のレベルの間の関係は明らかになっていないが、滑膜組織においての CGRP と CGRP 受容体の関係が判明されたことで、将来的に変形性膝関節症の疼痛に対する治療法の発展に寄与するものと思われる。

本研究にはいくつかの制限を認める。第 1 に、変形性膝関節症ではないコントロールがなく、変形性膝関節症患者とそうではない人との滑膜組織における CGRP レベルの比較が必要であることである。第 2 に、CGRP の上昇と変形性膝関節症患者の疼痛との関係が解明されていないことである。第 3 に、CGRP の mRNA の発現と CGRP の局在はリアルタイム PCR と免疫化学組織染色で検討したが、CGRP の蛋白濃度は滑膜組織や細胞培養の上清中においては検討していないことである。最後に、滑膜細胞における CGRP の作用を検討していないことである。

5. 総括

変形性膝関節症患者の滑膜組織において、CGRP/CGRP 受容体の発現は PGE2 と PGE2 受容体によって制御されていることが示唆された。本研究の結果が、変形性膝関節症患者の疼痛に対する治療法への発展に寄与するものと考えられる。

6. 謝辞

本研究には、北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄先生、内田健太郎先生のご指導および多大なる貢献があったことを特記し、心から感謝を申し上げます。また、北里大学大学院整形外科学研究室の皆様、北里大学医学部整形外科学医局員の各先生からのご協力を賜って本研究を終えたことを深謝し心から感謝申し上げます。

7. 引用文献

1. Jozwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm.* 2014;71:11-23.
2. Towheed TE, Maxwell L, Judd MG, Catton M, Hochberg MC, Wells G. Acetaminophen for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; CD004257.
3. Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant

data from randomised trials. *Lancet*. 2013;382:769-79.

4. Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:476-483.
5. Uzan B, Ea HK, Launay JM, Garel JM, Champy R, Cressent M, Liote F. A critical role for adrenomedullin-calcitonin receptor-like receptor in regulating rheumatoid fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *J Immunol*. 2006;176:5548-58.
6. Puttfarcken PS, Han P, Joshi SK, Neelands TR, Gauvin DM, Baker SJ, Lewis LG, et al. A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydro naphthalen-2-ol], a novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain*. 2010;150:319-26.

7. Benschop RJ, Collins EC, Darling RJ, Allan BW, Leung D, Conner EM, et al. Development of a novel antibody to calcitonin gene-related peptide for the treatment of osteoarthritis-related pain. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22:578-85.

8. Saito T, Koshino T. Distribution of neuropeptides in synovium of the knee with osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;172-82.

9. Ashraf S, Wibberley H, Mapp PI, Hill R, Wilson D, Walsh DA. Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:523-9.

10. Wang H, Zhang X, He JY, Zheng XF, Li D, Li Z, Zhu JF, et al. Increasing expression of substance P and calcitonin gene-related peptide in synovial tissue and fluid contribute to the progress of arthritis in developmental dysplasia of the hip. *Arthritis Res Ther*.

2015;17:4.

11.Saxler G, Loer F, Skumavc M, Pfortner J, Hanesch U. Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur J Pain.* 2007;11:67-74.

12.Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Inoue G, Eguchi Y, et al. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:134.

13.Fernihough J, Gentry C, Bevan S, Winter J. Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci Lett.* 2005; 388:75-80.

14.Ahmed AS, Li J, Erlandsson-Harris H, Stark A, Bakalkin G, Ahmed

M. Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. *Pain*.

2012;153:18-26.

15.Bowen EJ, Schmidt TW, Firm CS, Russo AF, Durham PL. Tumor

necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons. *J*

Neurochem. 2006;96:65-77.

16.Li W, Hou L, Hua Z, Wang X. Interleukin-1beta induces

beta-calcitonin gene-related peptide secretion in human type II

alveolar epithelial cells. *FASEB J*. 2004;18:1603-5.

17.Neeb L, Hellen P, Boehnke C, Hoffmann J, Schuh-Hofer S, Dirnagl

U, et al. IL-1beta stimulates COX-2 dependent PGE(2) synthesis

and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. *PLoS One*.

2011;6:e17360.

18. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Buanne P, Finn A, Stenfors C, Vigneti E,

Theodorsson E, et al. NGF modulates CGRP synthesis in human

B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? *J*

Neuroimmunol. 2002;123:58-65.

19. Ma W, Dumont Y, Vercauteren F, Quirion R. Lipopolysaccharide

induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264.7

macrophage cell line. *Immunology.* 2010;130:399-409.

20. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Caroleo MC, Buanne P, Costa N, Starace

G, Lundeberg T. Endogenous NGF regulates CGRP expression in

human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and

IL-10 production. *Blood.* 2005;106:3507-14.

21. Shimomura K, Kanamoto T, Kita K, Akamine Y, Nakamura N, Mae

T, et al. Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1beta and TNF-alpha. Bone Joint Res. 2014;3:280-8.

22. Qi T, Hay DL. Structure-function relationships of the N-terminus of receptor activity-modifying proteins. Br J Pharmacol. 2010;159:1059-68.

23. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature. 1998;393:333-9.

24. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiol Rev. 1999;79:1193-226.

25. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties,

distribution, and structure of the receptors and their subtypes.

Pharmacol Rev. 1994;46:205-29.

26.Kawahara H, Sakamoto A, Takeda S, Onodera H, Imaki J, Ogawa R.

A prostaglandin E2 receptor subtype EP1 receptor antagonist

(ONO-8711) reduces hyperalgesia, allodynia, and c-fos gene

expression in rats with chronic nerve constriction. Anesth Analg.

2001;93:1012-7.

27.Nakayama Y, Omote K, Namiki A. Role of prostaglandin receptor

EP1 in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory

pain. Anesthesiology. 2002;97:1254-62.

28.Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H,

et al. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated

inflammatory pain sensitization. Science. 2004;304:884-7.

29.Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M,et al.

Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E
receptors of the EP2 subtype. J Clin Invest. 2005;115:673-9.

30.Lin CR, Amaya F, Barrett L, Wang H, Takada J, Samad TA, et al. .

Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain
hypersensitivity. J Pharmacol Exp Ther. 2006;319:1096-103.

31.Bigal ME, Walter S, Rapoport AM. Therapeutic antibodies against

CGRP or its receptor. Br J Clin Pharmacol. 2015;79:886-95.

32.Hewitt DJ, Aurora SK, Dodick DW, Goadsby PJ, Ge YJ, Bachman R,

et al. Randomized controlled trial of the CGRP receptor antagonist
MK-3207 in the acute treatment of migraine. Cephalalgia.

2011;31:712-22.

33.Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, et al.

Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet*. 2008;372:2115-23.

34.Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med*. 2004;350:1104-10.

35.Walsh DA, Mapp PI, Kelly S. Calcitonin gene-related peptide in the joint: contributions to pain and inflammation. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80:965-78.

8.業績目録

(I) 原 著

1. Minatani A, Uchida K, Inoue G, Takano S, Aikawa J, Miyagi M, Fujimaki H, Iwase D, Onuma K, Matsumoto T, Takaso M : Activation of calcitonin gene-related peptide signaling through the prostaglandin E2-EP1/EP2/EP4 receptor pathway in synovium of knee osteoarthritis patients. J Orthop Surg Res, 2016 Oct 17;11(1):117..
2. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Fujimaki H, Aikawa J, Iwase D, Minatani A, Iwabuchi K, Takaso M : Nerve Growth Factor Regulation by TNF- α and IL-1 β in Synovial Macrophages and Fibroblasts in Osteoarthritic Mice. Journal of Immunology Research. 2016 Aug.
3. 岩瀬 大、松尾 隆、松尾 篤、橋本 裕美子、江端 一博、相川 淳、藤巻 寿子、内田 健太郎、東山 礼治、南谷 淳、高相 晶士 : 3次元測定を用いた股関節モーションの定量評価への挑戦、日本脳性麻痺の外科研究会誌、26 : 141-144、2016
4. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Aikawa J, Fujimaki H, Minatani A, Sato M, Iwabuchi K, Takaso M : Synovial macrophage-derived IL-1 β regulates the calcitonin receptor in osteoarthritic mice. Clinical and Experimental Immunology J Neurosurg. 2015 183:143-149.

5. 東山 礼治、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、関口 裕之、占部 憲、高相 晶士：自家ハムストリングス腱を用いた足関節鏡視下前距腓靭帯、踵腓靭帯再建術の経験、日本足の外科学会雑誌、36(1)：189-194、2015
6. 南谷 淳、平川 紀子、塗山 正宏、内野 正隆、占部 憲：人工膝関節全置換術における術前の骨粗鬆症評価の重要性。関東整形災害外科学会雑誌、46(1)：36-38、2015
7. 相川 淳、岩瀬 大、東山 礼治、南谷 淳、峯岸 洋次郎、高野 昇太郎、成瀬 康治、峰原 宏昌、占部 憲、高相 晶士：人工膝関節全置換術（TKA）患者における膝蓋腱再建術後の感染に対する Salvage 手術、日本関節病学会誌、33(2):189-194、2014
8. 平川 紀子、南谷 淳、塗山 正宏、宮島 玄陽、内野 正隆、占部 憲：人工膝関節全置換術前後の非ステロイド性抗炎症薬が腎機能に与える影響、東日本整形災害外科学会雑誌、26(2)：183-185、2014
9. 名倉 直重、岩瀬 大、東山 礼治、成瀬 康治、南谷 淳、藤巻 寿子、高相 晶士：先天性筋緊張性ジストロフィーに伴う内反足に対して Evans 手術を用いた 1 例、関東整災外外科学会雑誌、45(2)：113-118、2014
10. 岩瀬 大、相川 淳、東山 礼治、南谷 淳、占部 憲、松尾 隆、菅野 徹夫、

松尾 篤、高相 晶士：脳性麻痺に伴う股関節脱臼・亜脱臼に対する大腿骨減捻内反骨切り術の治療成績と家族の満足度、日本小児整形外科学科誌、22（1）：150-155、

2013

11. 岩瀬 大、相川 淳、東山 礼治、南谷 淳、占部 憲、藤田 護、高相 晶士：関節リウマチに伴う前足部変形に対する外科的治療成績、日本関節病学会誌、32（1）：33-37、2013

12. 岩瀬 大、相川 淳、成瀬 康治、東山 礼治、南谷 淳、占部 憲、高相 晶士：広範囲骨欠損を伴った初回人工膝関節置換術での同種骨移植術併用の短期成績、日本人工関節学会誌、42：363-364、2012

13. 岩瀬 大、相川 淳、南谷 淳、高相 晶士、占部 憲、菅野 徹夫、松尾 篤、松尾 隆：

三次元測定による人の移動能力および股関節に働く総筋力の定量評価、日本脳性麻痺外科研究会誌、22：29-30、2012

14. Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Toyama M, Ueno M, Fukushima K, Saito W, Minatani A, Miyajima G, Fukuda M, Takahira N, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Okamoto H, Okutomi T, Okamoto M, Masaki T : Two-year results for scoliosis secondary to Duchenne muscular dystrophy fused to lumbar 5 with segmental pedicle screw instrumentation. J Orthop Sci. 2010

Mar;15(2):171-7.

15. Nakazawa T, Takaso M, Imura T, Adachi K, Fukushima K, Saito W, Miyajima G, Minatani A, Shinntani R, Itoman M, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Sasaki A : Autogenous iliac crest bone graft versus banked allograft bone in scoliosis surgery in patients with Duchenne muscular dystrophy. Int Orthop. 2010 Aug;34(6):855-61.

16. 南谷 淳, 藤田 護, 内山 勝文, 糸満 盛憲 : 骨折を伴った関節リウマチ肘関節に半拘束型人工肘関節全置換術を施行した 3 例、日本人工関節学会誌、38:660-661、2008

(II) 著 書

南谷 淳 : 第 4 章 合併症とその対策・感染、パーフェクト 人工膝関節置換術 金芳堂、184-189、2016

(III) 総説・講座

なし

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 貞升 彩、東山 礼治、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、関口 裕之、高相 晶士：両側足関節外側不安定症に対し両側同時に自家薄筋腱による関節鏡下 ATFL 再建術を施行した 1 例、日本足の外科学会雑誌、36(1)：345-348、2015
2. 庄司真太郎、東山 礼治、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、関口 裕之、成瀬 康治、占部 憲、高相 晶士：両側に発生した腓骨筋癒性扁平足に対し Accessory Anterolateral Talar Facet の鏡視下切除術が著効した 1 例、日本足の外科研究会雑誌、36(1)：329-333、2015
3. 東山 礼治、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、関口 裕之、高野 昇太郎、成瀬 康治、占部 憲、高相 晶士：薄筋腱を用いて関節鏡視下 ATFL 再建術を施行した 1 例、日本足の外科学会雑誌、35 (1)：313-316、2014
4. 関口 裕之、東山 礼治、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、高野 昇太郎、渡邊 裕之、成瀬 康治、占部 憲、高相 晶士：足関節外側靭帯損傷に対し同種骨付き膝蓋腱を用いて再建術を行った 2 例、日本足の外科学会雑誌、35 (1)：308-312、2014
5. 東山 礼治、高森 尉之、平山 博久、杉原 隆之、渡邊英一郎、木島 丈博、宮本 周一、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、高相 晶士：外側動揺を主訴とする陳旧性 ACL 損傷と変形性膝関節症の合併例に対して高位脛骨骨切り術と ACL 再建術を同時に施行した 1 例、JOSKAS (日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌)、

38 (3) : 611-615、2013

6. 関口 裕之、東山 礼治、相川 淳、岩瀬 大、南谷 淳、鈴木良和、高相 晶
士：陳旧性足関節靭帯損傷に対し、手術施行後 interference screw の脱転を来した 1
例、神奈川県整形災害外科医会雑誌、25 (5) : 189-192、2013

7. 高野 昇太郎、相川 淳、占部 憲、岩瀬 大、南谷 淳、東山 礼治、峰原 宏
昌、成瀬 康治、糸満盛憲、高相 晶士：脛骨近位端巨細胞腫切除後の骨軟骨欠損に
対して凍結保存同種骨軟骨移植を行った 1 例、日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学
会雑誌、37 (3) : 568-573、2012

8. 南谷 淳 占部 憲 相川 淳 藤田 護 岩瀬 大 高相 晶士：大腿骨に関
節外変形を有する変形性膝関節症に対して人工膝関節全置換術を施行した 3 例の検
討、日本人工関節学会誌、
41 : 426-427、2011

9. 南谷 淳、福島 健介、内山 勝文、高平 尚伸、塗山 正宏、糸満 盛憲：高
齢女性に生じた股関節滑膜性軟骨腫症の 1 例、関東整形災害外科学会雑誌、41 (6) :
374-377、2010

10. 峯岸 洋次郎、内山 勝文、福島 健介、高平 尚伸、南谷 淳、糸満 盛憲：
尋常性乾癬患者に生じた股関節症に対して人工股関節置換術を施行した 1 例、関東
整形災害外科学会雑誌、41 (4) : 171-176、2010

9.図表・解説

Table 1. 本研究で使したプライマー配列

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
CGRP-F	TTGCCCAGAAGAGAGCCTGTG	91
CGRP-R	TTGTTCTTCACCACACCCCCTG	
Cox-2-F	TGGCTGAGGGAACACAACAG	74
Cox-2-R	AACAAGTCTCATCACCCCA	
IL-8-F	ACACTGCGCCAACACAGAAA	89
IL-8-R	CAACCCTCTGCACCCAGTTT	
IL-6-F	GAGGAGACTTGCCTGGTGAAA	199
IL-6-R	TGGCATTGTGGTTGGGTCA	
IL-1 β -F	GTACCTGTCCTGCGTGTTGA	153
IL-1 β -R	GGGAAGTGGGCAGACTCAAA	
NGF-F	CCCATCCCATCTTCCACAGG	74
NGF-R	GGTGGTCTTATCCCAACCC	
TNF- α -F	CTTCTGCCTGCTGCACTTTG	118
TNF- α -R	GTCACTCGGGGTTGAGAAG	
RAMP1-F	GGCCTCTGGCTGCTCCTG	172
RAMP1-R	GCTCCCTGTAGCTCCTGATG	
CLR-F	TGCAAGACCCATTCAACAAG	70
CLR-R	TTCCAGCAGAGCCATCCATC	
GAPDH-F	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	202
GAPDH-R	CTCCACGACGTACTCAGCG	

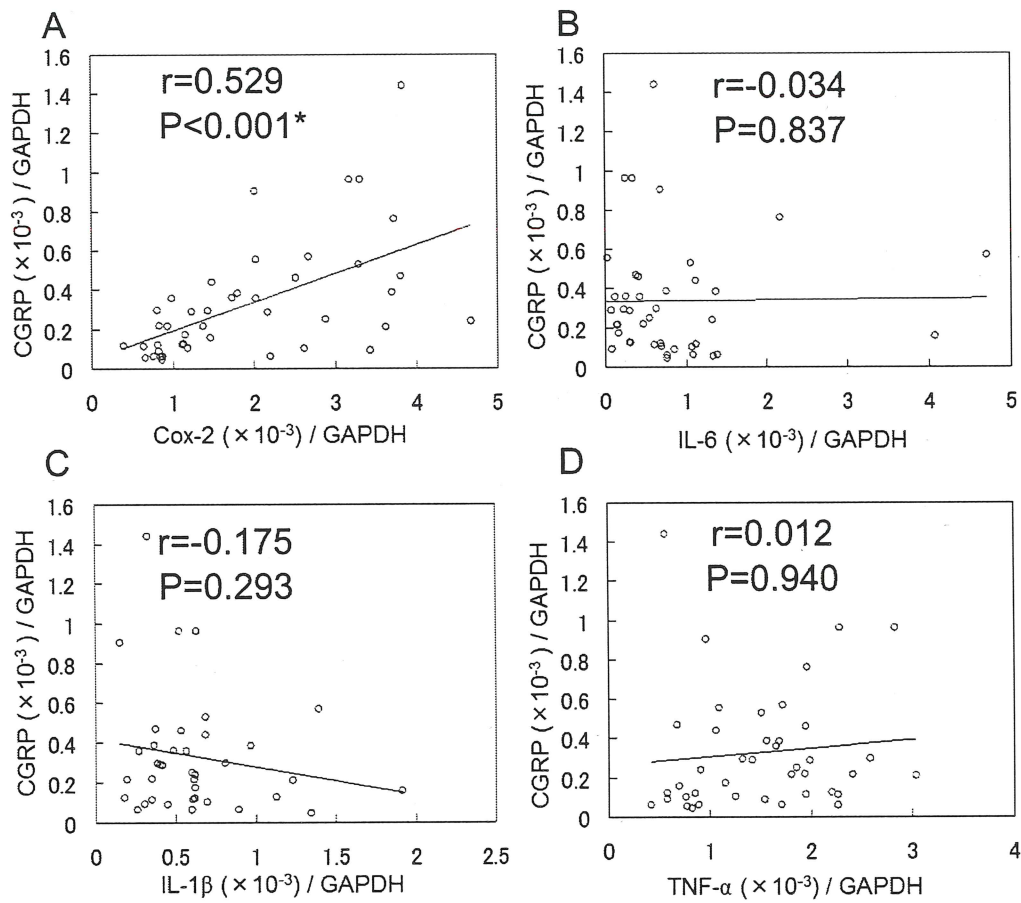


図1. 滑膜組織における CGRP の mRNA 発現レベルと炎症性サイトカイン、COX-2 の発現

レベルとの相関。変形性膝関節症 43 膝から採取した滑膜組織における CGRP の mRNA の発現レベルと COX-2(A)、IL-6(B)、IL-1 β (C)、TNF- α (D)のそれぞれの mRNA の発現との相関をグラフに示す。P<0.001 を統計学的有意とした。

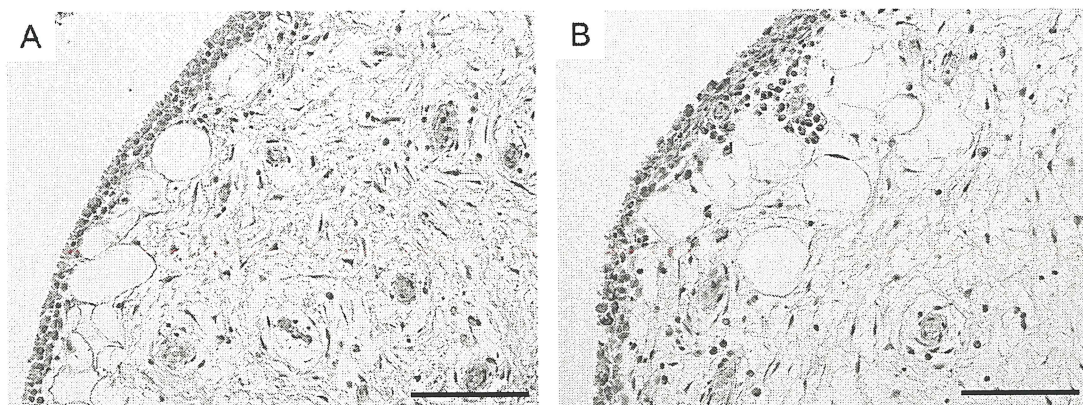


図 2. 滑膜組織における CGRP(A)と COX-2(B)の免疫組織学的局在

スケールバーは 100 μ m である。

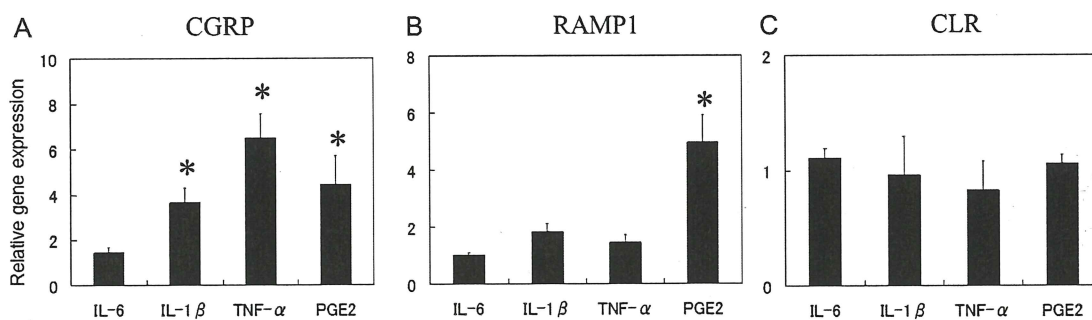


図 3. 滑膜培養細胞における炎症性サイトカインと PGE2 の CGRP および CGRP 受容体の発現に対する影響をグラフに示す。リアルタイム PCR によって CGRP (A)、RAMP1 (B)、CLR (C) の遺伝子発現を分析した。滑膜細胞をヒト組み換え IL-6(100ng/ml)、IL-1 β (50ng/ml)、TNF- α (10ng/ml)、PGE2(10 μ M) でそれぞれ刺激して、24 時間後に mRNA を抽出して分析した。全てのデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=6) で表示している。未処理の対象群と比較して p<0.05 を統計学的有意とした。

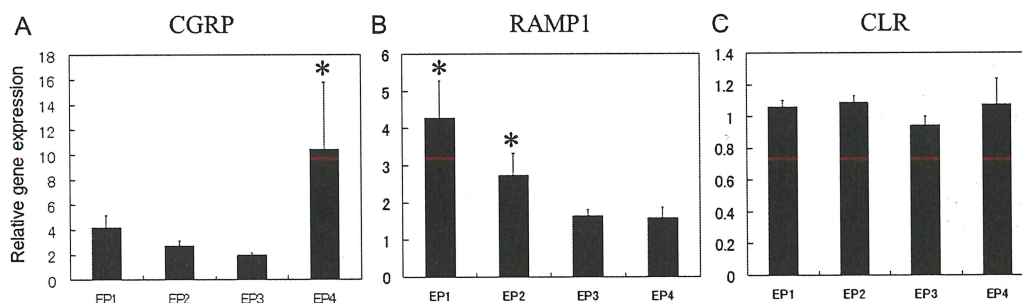


図4. 滑膜培養細胞におけるEPアゴニストのCGRPおよびCGRP受容体の発現に対する影響をグラフに示す。リアルタイムPCRによってCGRP(A)、RAMP1(B)、CLR(C)の遺伝子発現を分析した。滑膜細胞は10 μ MのIloprost(EP1)、Butaprost(EP2)、Sulprostone(EP3)、CAY10598(EP4)でそれぞれ刺激を行い、24時間後にmRNAを抽出して分析した。全てのデータは平均値±標準偏差(n=6)で表示している。未処理の対象群と比較してp<0.05を統計学的有意とした。

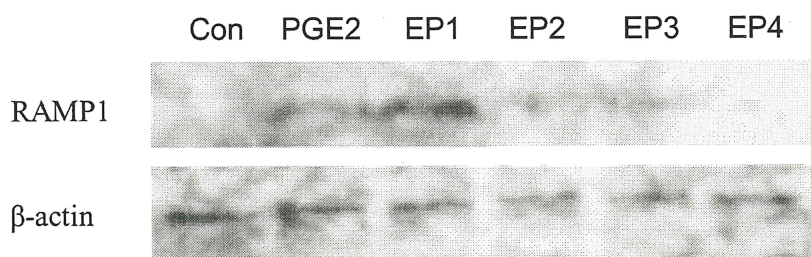


図5. 滑膜培養細胞におけるPGE2とEPアゴニストのRAMP1蛋白の発現に対する影響。RAMP1をウエスタンブロッティング法にて分析した。滑膜細胞は10 μ MのPGE2とIloprost(EP1)、Butaprost(EP2)、Sulprostone(EP3)、CAY10598(EP4)でそれぞれ刺激を行い、24時間後に蛋白を抽出してRAMP1の発現を分析した。