

「変形性膝関節症患者の滑膜組織における
神経成長因子の発現制御機構」

DM15014 高野 昇太郎

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 高相 晶士

要 約

【背景】2010年10月に我が国における65歳以上の人口は23.1%となり、超高齢社会を迎えた。高齢化が進行する中で、医療や介護といった社会的・経済的な負担を軽減するために、健康寿命の延伸が重要である。高齢者が自覚する症状のうち、関節痛が多くを占めており、健康寿命の延伸を障害していると考えられる。その関節痛の主な原因のひとつが、変形性膝関節症(OA)である。近年の大規模な疫学調査において、我が国にはOAの患者が2400万人、そのうち疼痛を有する患者が820万人存在することが明らかになっている。疼痛はOA患者の主な症状であるが、その発生機序は未だ明らかになっていない。

近年、神経成長因子(NGF)がOAの疼痛に関与することが示唆されている。NGFはOAにおいても疼痛を制御しており、抗NGFモノクローナル抗体であるタネツマブがOAの疼痛に対して有効であったと報告されている。我々はこれまでの研究で、OAモデルマウスの滑膜組織において、マクロファージが産生する炎症性サイトカインIL-1 β 、TNF- α がNGFの発現を制御することを見出した。しかし、ヒト滑膜組織におけるNGFの制御機構については未だ十分に明らかにはなっていない。

そこで本研究では、OA患者から採取した滑膜マクロファージにおいて、IL-1 β およびTNF- α がNGFの産生を促進するかどうかを調査することを目的とした。加えて、OAモデルマウスの生体内において、マクロファージがNGFの発現の制御に関与しているかどうかについても検討する。

【方法】北里大学病院で人工膝関節全置換術を施行したOA患者25例を対象とした。手術時に膝蓋上嚢から採取した滑膜組織を研究に用いた。

最初に、OA患者の滑膜組織におけるNGF産生細胞の同定を行った。採取した滑膜組織をコラゲナーゼ処理し、全有核細胞を採取した。磁気ビーズと抗CD14抗体を添加し、細胞分離システムを用いてCD14陽性分画と陰性分画とに分離した後、それぞれの分画に含まれる細胞を、フローサイトメトリーを用いて検討した。また、各分画からRNAを抽出し、NGF、IL-1 β 、TNF- α のmRNA発現を、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)を用いて検討した。

次に、OA患者の滑膜組織における炎症性サイトカインによるNGFの発現制御を検討した。分離したそれぞれの分画を7日間培養した後、各分画の細胞集団を、フローサイトメトリーで確認した。また、各分画をIL-1 β またはTNF- α で刺激し、24時間後のNGFのmRNA発現をqPCRで、培養上清中のNGF濃度をELISAで検討した。

更に、OAモデルマウスであるSTR/Ortを用いて、マクロファージによるNGF発現制御の可能性を検討した。STR/Ortの腹腔内にクロドロン酸内包リポソームを投与してマクロファージを除去し、対照群にはPBSを投与し、投与の24時間後に屠殺して滑膜組織および脾臓を採取した。マクロファージの除去効率を確認するために、脾臓のフローサイトメトリーを行った。採取した滑膜組織については、NGF、IL-1 β 、TNF- α のmRNA発現

を qPCR で、NGF の蛋白量をウェスタン・ブロッティングで検討した。

【結果】 OA 患者の滑膜組織のフローサイトメトリーでは、CD14 陽性分画にはマクロファージが、CD14 陰性分画には線維芽細胞が主に含まれており、陰性分画に含まれる血管内皮細胞は 5%未満であった。各分画の qPCR の結果、NGF の mRNA 発現は CD14 陽性分画と陰性分画との間で有意差はなかったが、IL-1 β と TNF- α は CD14 陰性分画と比較して陽性分画で有意に高く発現していた。

培養後の各分画のフローサイトメトリーでは、培養前と同様に CD14 陽性分画にはマクロファージが、CD14 陰性分画には線維芽細胞が主に含まれていた。IL-1 β および TNF- α の刺激試験では、いずれの刺激によっても CD14 陽性分画、陰性分画ともに NGF の mRNA 発現および培養上清中の NGF 濃度が有意に上昇し、その上昇は CD14 陰性分画でより顕著に認められた。

クロドロン酸内包リポソームを投与した STR/Ort から採取した脾臓のフローサイトメトリーの結果、マクロファージが 90%以上減少したことが確認された。また、採取した滑膜組織において、クロドロン酸内包リポソームを投与した群では PBS を投与した群と比較して、NGF、IL-1 β 、TNF- α の mRNA 発現および NGF の蛋白量が有意に低下した。

【考察】 本研究において、OA 患者の膝関節滑膜から採取した CD14 陽性細胞および陰性細胞が NGF を発現していた。また、CD14 陽性細胞は IL-1 β および TNF- α をより高く発現していた。更に、CD14 陽性細胞および陰性細胞を IL-1 β 、TNF- α で刺激することにより、NGF の mRNA 発現および蛋白量が上昇した。また、OA モデルマウスに対してクロドロン酸内包リポソームを投与してマクロファージを除去することにより、滑膜組織における IL-1 β 、TNF- α および NGF の mRNA 発現が減少した。これらの結果から、マクロファージ由来 IL-1 β および TNF- α が、滑膜マクロファージにおける NGF 発現を制御しており、それが OA における疼痛発現の原因となっている可能性が示唆された。

本研究結果でマクロファージ除去が OA 膝関節における NGF を減少させたことから、将来的にマクロファージは OA 病態治療のターゲットとなることが期待された。