

学位論文要旨

氏名 高野 昇太郎



論文題目

「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」

指導教授承認印

高野 昇太郎



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

氏名 高野 昇太郎

【背景】我が国は、2010年10月に65歳以上の人口が23.1%となり、超高齢社会を迎えた。進行する高齢化社会において、介護をはじめとした社会的・経済的な負担を軽減するために、健康寿命の延伸が重要となる。高齢者の自覚症状の中で、関節の痛み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。その関節の痛み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結果から、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 患者の主な愁訴であるが、その発現機序は未だ十分に明らかにはなっていない。OA の疼痛治療には非ステロイド性消炎鎮痛剤が頻用されるが、疼痛が改善しない症例の存在に加え、消化性潰瘍や腎機能障害などの副作用が問題視されている。このことから、OA における疼痛発現機序の解明による疼痛治療法の開発が極めて重要となる。

近年、OA の疼痛には神経成長因子 (NGF) による支配感覚神経の感作が関与する可能性が示唆されており、抗 NGF モノクローナル抗体であるタネツマブの OA 疼痛に対する効果が報告されている。我々はこれまでに NGF の発現制御機構を解明すべく、OA モデルマウスを用いた研究を行ってきた。その結果、滑膜マクロファージが産生する IL-1 β および TNF- α が NGF の発現を促進していることを見出した。しかし、ヒト滑膜組織における NGF の発現制御機構は明らかになっていない。また、OA の進行や疼痛には IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 といった炎症性サイトカインが関与するとされており、我々のこれまでの研究でも、OA モデルマウスの滑膜組織、特にマクロファージにおいて、IL-1 β 、TNF- α の mRNA 発現が上昇していることが示された。これらのことから、OA 患者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が NGF を制御しているとの仮説を立てた。そこで本研究では、OA 患者の滑膜組織を用いて IL-1 β および TNF- α による NGF の発現制御機構を検討し、また OA モデルマウスを用いて滑膜組織における NGF の発現制御に対するマクロファージの関与を検討することを目的とした。

【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 (男性 4 例、女性 21 例) を対象とした。手術時平均年齢は 60~85 歳 (平均±標準偏差, 71.9±7.2 歳)、X 線学的 OA 重症度 (Kellgren/Lawrens 分類) は grade2~4、術前 visual analogue scale は 6.0±2.3cm であった。手術時に膝蓋上嚢から滑膜組織を採取し、研究に用いた。25 例を無作為にグループ A (n=5)、グループ B (n=10)、グループ C (n=10) に分け、研究を行った。

まず、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 0.1% I 型コラゲナーゼを用いて 37℃で 2 時間処理し、全有核細胞を採取した。磁気ビーズと抗 CD14 モノ

クローナル抗体を添加し、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、 α -minimum essential culture medium (MEM) を添加した。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 (グループ A)、残検体は次の実験に用いた。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 (グループ B)。

続いて、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 α -MEM に 10%ウシ胎児血清を添加した培養液で 7 日間培養した (グループ A, C)。培養後の各分画に含まれる細胞を、フローサイトメトリーを用いて確認した (グループ A)。また、各分画を IL-1 β 50ng/ml または TNF- α 10ng/ml を添加した α -MEM で刺激し (グループ C)、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、マクロファージによる NGF 発現制御の可能性を、OA モデルマウスである STR/Ort を用いて検討した。9 か月齢の雄性 STR/Ort 30 匹を対象とした。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 (n=15)、対照群には PBS を投与し (n=15)、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。

統計学的手法として、CD14 陽性分画と陰性分画との比較、クロドロン酸内包リポソーム投与群と PBS 投与群との比較には t 検定を用いた。IL-1 β 投与群、TNF- α 投与群、および対照群の比較については、一元配置分散分析 (ANOVA) と Bonferroni 法を用いた。解析は SPSS version19.0 を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】OA 患者の滑膜組織のフローサイトメトリーの結果、CD14 陽性分画には CD14 陽性 CD45 陽性細胞が $85.1 \pm 1.1\%$ (平均 \pm 標準誤差)、CD14 陰性分画には CD45 陰性 CD90 陽性の線維芽細胞が $55.5 \pm 7.3\%$ 含まれており、陰性分画に含まれる CD31 陽性 CD45 陰性の血管内皮細胞は $3.7 \pm 1.1\%$ 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の結果、CD14 陽性分画に含まれる CD14 陽性 CD45 陽性細胞は $80.5 \pm 2.1\%$ 、CD14 陰性分画に含まれる CD45 陰性 CD90 陽性の線維芽細胞は $92.9 \pm 1.0\%$ であった。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では、CD11b 陽性 F4/80 陽性細胞が 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】NGF は炎症のある膝関節において上昇し、OA の病態と関連しているとされている。本研

究結果において、IL-1 β 、TNF- α の添加により、滑膜マクロファージおよび線維芽細胞における NGF の mRNA 発現および蛋白量が有意に上昇した。このことから、滑膜マクロファージおよび線維芽細胞は NGF の産生細胞であることが示唆された。

OA では滑膜が増生し、それに反応してマクロファージが炎症性サイトカインを産生するとされており、また活性化したマクロファージが増加すると、滑膜における IL-1 β の濃度が上昇すると報告されている。本研究において、滑膜線維芽細胞と比較してマクロファージで IL-1 β 、TNF- α の mRNA 発現が有意に高く、また STR/Ort に対するクロドロン酸内包リポソームの投与により、滑膜組織における IL-1 β 、TNF- α および NGF の mRNA 発現が低下した。これらのことから、滑膜マクロファージが IL-1 β および TNF- α を介して NGF の発現を制御している可能性が示唆された。

また、NGF は OA において急性期、慢性期双方の疼痛に関与しているという報告が散見される。OA モデルラットに対する NGF の関節内注射は疼痛を惹起し、抗 NGF モノクローナル抗体であるタネツマブの投与は OA 患者に対して鎮痛効果を示すとの報告もあることから、滑膜組織における NGF 発現制御機構が OA における疼痛発生機序の重要な要素であることが示唆される。よって、本研究で明らかとなった、滑膜マクロファージによる IL-1 β および TNF- α を介した NGF 発現制御機構は、OA における疼痛治療の新たな標的となる可能性が示唆された。