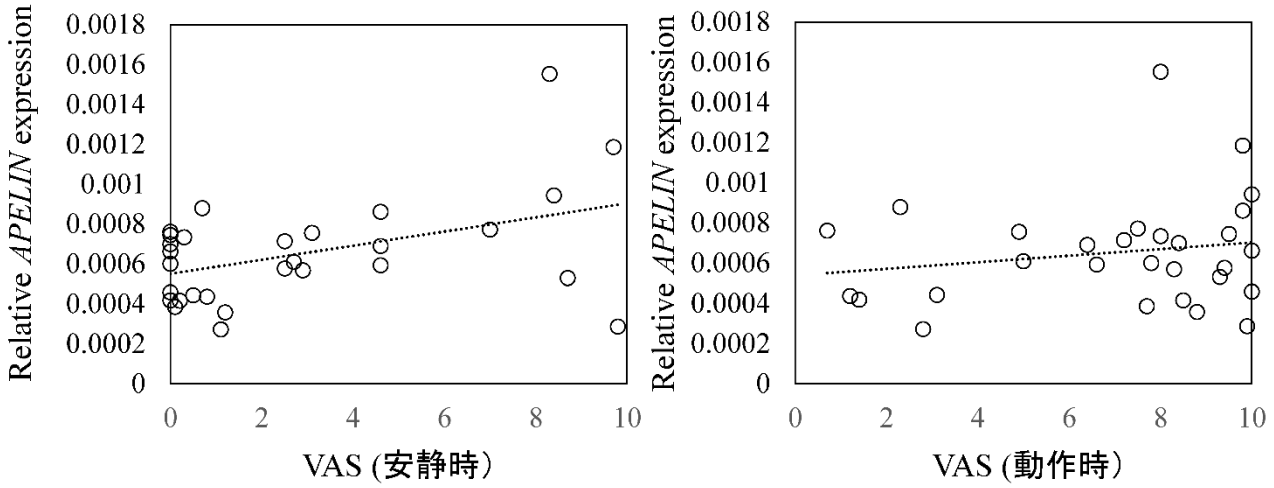
184　変形性膝関節症における炎症非依存性の疼痛機序の解明	高野　昇太郎

【目的】高齢化に伴い変形性膝関節症（OA）患者は年々増加している。これまでに炎症下での OA 疼痛機構に関しては多くの研究がなされてきた。しかし、非炎症性の OA における疼痛発生機序は未だ十分に明らかになっていない。本研究では、血管内皮増殖因子（VEGF）を介した炎症非依存性疼痛機序を解明するために、VEGF 関連神経ペプチドの同定と疼痛への関与、および Transforming growth factor-b（TGF-β）による VEGF 調節機構を検討した。

【方法】変形性膝関節症患者より採取した滑膜組織における VEGF の発現、疼痛スコア（Visual analog Scale : VAS）と VEGF の相関を検討した。滑膜細胞を VEGF で刺激後、発現が上昇する神経ペプチドおよび滑膜組織において VEGF と相関を示すペプチドを探索し、疼痛との関連を検討した。また、滑膜細胞を TGF-β および古典経路（Smad 経路）、非古典経路（MAPK 経路）阻害剤存在下で刺激後、VEGF の誘導とその経路について検討した。

【結果】滑膜組織における VEGF 発現は疼痛スコア（VAS）と正の相関を示した。VEGF 刺激により神経ペプチド Apelin mRNA、タンパクの発現が上昇した。また、Apelin の発現は安静時痛と正の相関を示した。Peptide Lv は VEGF の発現と強い相関を示した。Peptide Lv の発現は安静時痛と負の相関を示した。VEGF の発現は TGF-β によって誘導され、その発現は古典経路、非古典経路の阻害によって阻害された。本研究結果から VEGF は Apelin を介して疼痛に関与すること、その発現は TGF-β によって調節されている可能性が示唆された。本機構は VEGF を介した炎症非依存性の疼痛機構に重要な役割は果たしていると考えられる。

Apelin 発現と疼痛スコア VAS との相関



184. 変形性膝関節症における炎症非依存性の疼痛機序の解明

高野　昇太郎

北里大学 医学部 整形外科学

Key words：血管内皮増殖因子，神経ペプチド，変形性関節症，疼痛

緒　言

平成 28 年 10 月現在、我が国の 65 歳以上の高齢者人口の総人口に占める割合（高齢化率）は 27.3%となり、他の国に類をみない超高齢社会を迎えている。高齢化に伴い変形性膝関節症（OA）患者は年々増加しており、近年の大規模な疫学調査結果から、OA 患者が 2,400 万人、そのうち疼痛を有する患者が 800 万人存在することが明らかになっている。OA 患者の主な愁訴は疼痛であるが、その疼痛は患者の生活の質、日常生活動作を著しく障害するため、健康寿命の延伸には疼痛治療が極めて重要となる。これまでに炎症下での OA 疼痛機構に関しては多くの研究がなされてきた。しかし、非炎症性の OA における疼痛発生機序は未だ十分に明らかになっていない。

血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor：VEGF）は血管新生に関与する成長因子の一つである。変形性関節症患者の滑膜組織において VEGF の発現が上昇することや OA の進行度と相関することが報告されている［1，2］。しかし、VEGF の制御機構や疼痛との関連性、疼痛惹起機構については十分に明らかになっていない。

Transforming growth factor-β（TGF-β）は抗炎症性サイトカインの一つであるが、血液中の TGF-β濃度と OA 患者の疼痛スコアは相関することが報告されている［3］。関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞において VEGF を制御するとの報告があることから［4］、非炎症下において TGF-β は VEGF を介して OA 疼痛に関与しているとの仮説を立てた。

本研究では、VEGF 関連神経ペプチドの同定と疼痛への関与および TGF-β による VEGF 調節機構を検討した。

方　法

1. VEGF 発現と疼痛との関連性の検討

全人工関節置換術時に変形性膝関節症患者より採取した滑膜組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて VEGF の発現を検討した。疼痛スコア（Visual analog Scale：VAS）と VEGF の相関を検討した。

2. VEGF 関連神経ペプチドの探索と疼痛との関連性の検討

in vitro 実験系を用いて VEGF が制御する神経ペプチドを探索した。滑膜線維芽細細胞を採取、培養した。10、100 ng/ml VEGF で刺激後、種々の神経ペプチドの発現をリアルタイム PCR、western blotting を用いて検討した。また、滑膜組織における VEGF の発現と相関を示す神経ペプチドを探索した。

3. VEGF 発現誘導機構の解明

ヒト滑膜組織をコラゲナーゼ処理した後、滑膜線維芽細細胞を採取、培養した。10 ng/ml の TGF-β を加え VEGF 発現および上清中の VEGF 濃度を検討した。また、TGF-β 添加と同時に ALK5 阻害剤（SB505124）、p38 阻害剤（SB203580）を添加し、VEGF 発現に及ぼす影響を検討した。また、smad2、p38 のリン酸化を western blotting を用いて検討した。

結　果

1. VEGF 発現と疼痛との関連性の検討

滑膜組織における VEGF 発現は疼痛に関与する可能性が示唆された（図 1、ρ =0.346、p<0.001）。OA の進行度と VEGF との間に相関は認められなかった。

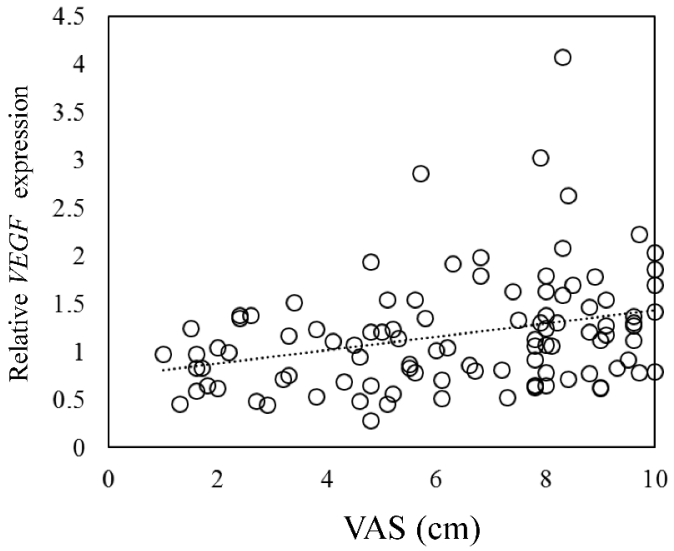


図 1. VEGF 発現と疼痛スコア VAS との相関
VEGF 発現と疼痛スコアとの相関を検討するためにをスピアマンの順位相関係数を算出した（ρ =0.346、p<0.001、Spearman's Correlation Test）。

2. VEGF 関連神経ペプチドの探索と疼痛との関連性の検討

滑膜線維芽細胞の VEGF 刺激により神経ペプチド Apelin mRNA、タンパクの発現が上昇した。Apelin の発現は患者疼痛スコア（安静時）と正の相関を認めた（図 2、ρ =0.439、p=0.017）。また、VEGF の発現と神経ペプチド peptide Lv との間に正の相関が認められた。peptide Lv と安静時痛との間に負の相関が認められた（ρ = - 0.378、p=0.048）。

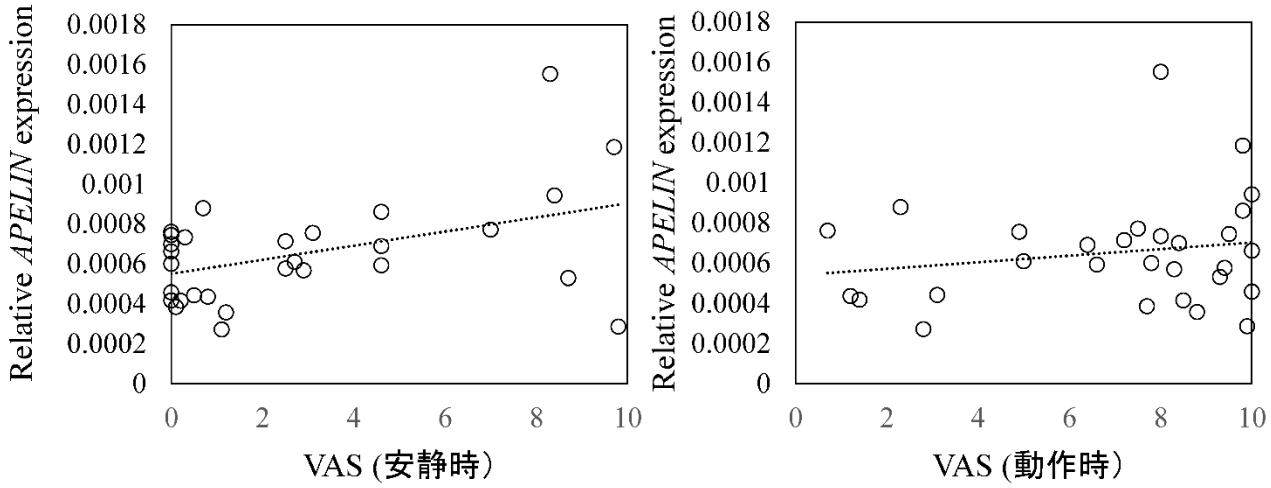


図 2. Apelin 発現と疼痛スコア VAS との相関
Apelin 発現と疼痛スコア VAS（安静時）との間に正の相関を認めた（スピアマンの順位相関係数 ρ =0.439、p=0.017、Spearman's Correlation Test）。

3. VEGF 発現誘導機構の解明

TGF-βによって VEGF mRNA の発現および上清中の VEGF タンパク濃度は有意に増加した（VEGF mRNA：p＝0.002、VEGF protein：p＝0.001、Bonferroni の多重比較）。この上昇は ALK5 阻害剤によって完全に抑制され（VEGF mRNA：p＝0.001、VEGF protein：p＝0.001、Bonferroni の多重比較）、p38 阻害剤によって部分的に阻害された（VEGF mRNA：p＜0.001、VEGF protein, p＝0.020、Bonferroni の多重比較）。ALK5 阻害剤により Smad2 のリン酸化が抑制された。ALK5 阻害剤、TAK1 阻害剤ともに p38 のリン酸化が低下した（図 3）。

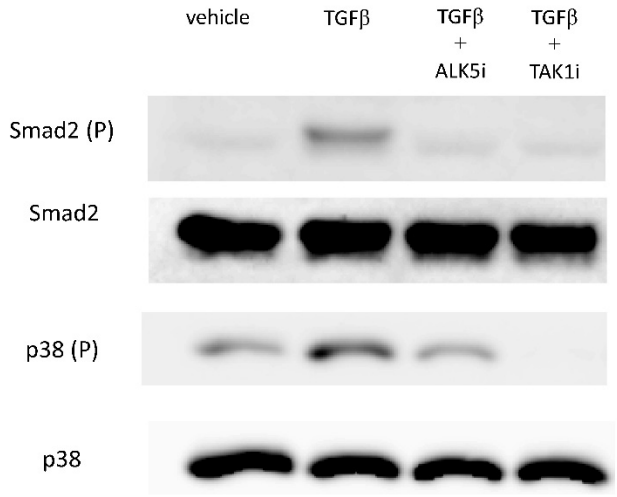


図 3. TGF-βによる smad2、p38 のリン酸化に対する ALK5 阻害剤、TAK1 阻害剤の影響
Western blotting を用いて TGF-βによる smad2、p38 のリン酸化に対する ALK5 阻害剤（ALK5i）、TAK1 阻害剤（TAK1i）の影響を検討した。Smad2 (P)：リン酸化 Smad2、p38 (P)：リン酸化 p38。

考　察

VEGF は末梢神経障害モデルにおいてアロデニアに関与することが報告されている［5］。また、VEGF 阻害剤によりアロデニアが軽減することが報告されている［6］。本研究結果から VEGF は変形性関節症の疼痛に関与する可能性が示唆された。

Apelin は 末梢および中枢神経に発現し、疼痛に関与することが報告されている［7, 8］。また、OA 患者では非 OA 患者に比べ関節液中の Apelin が上昇することが報告されている［9］。本研究において、Apelin は VEGF によって誘導された。また、Apelin の発現は疼痛スコアと相関したことから、VEGF は Apelin を介して疼痛を惹起している可能性が示唆された。近年、神経ペプチド Peptide Lv は VEGF 受容体に結合する可能性が示唆されている［10］。VEGF が疼痛スコアと正の相関したのに際し、Peptide Lv は負の相関を示した。このことから、Peptide Lv は VEGF シグナリングに対して抑制的に働いている可能性がある。現在、ゲノム編集技術を用いて作製した Peptide Lv ノックアウトを用いて機能を解析中である。

TGF-βは関節リウマチ患者由来の線維芽細胞における VEGF の発現を調節することが報告されていた［4］。しかし、その調節機構や変形性関節症患者から採取した滑膜細胞に対する作用は不明であった。TGF-βシグナル伝達経路には古典経路（Smad 経路）と非古典経路（MAPK 経路）が存在する。本研究結果から、TGF-βは古典経路および非古典経路を介して VEGF を調節している可能性が示唆された。

本研究結果から VEGF は Apelin を介して疼痛に関与すること、その発現は TGF-βによって調節されている可能性が示唆された。本機構は VEGF を介した炎症非依存性の疼痛機構に重要な役割は果たしていると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北里大学医学部整形外科学研究室の内田健太郎、高相晶士、北里大学医学部実験動物学研究室の大久保直である。

文　献

1) Mabey T, Honsawek S, Saetan N, Poovorawan Y, Tanavalee A, Yuktanandana P. Angiogenic cytokine expression profiles in plasma and synovial fluid of primary knee osteoarthritis. Int Orthop. 2014 Sep;38(9):1885-92. doi:10.1007/s00264-014-2406-y. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24966080.

2) Saetan N, Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Meknavin S, Ngarmukos S, Tanpowpong T, Parkpian V. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. Int Orthop. 2014 May;38(5):1099-104. doi:10.1007/s00264-013-2192-y. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24297611; PMCID: PMC3997768.

3) Kapetanakis S, Drygiannakis I, Kazakos K, Papanas N, Kolios G, Kouroumalis E, Verettas DA. Serum TGF-beta2 and TGF-beta3 are increased and positively correlated to pain, functionality, and radiographic staging in osteoarthritis. Orthopedics. 2010 Aug 11;33(8). doi: 10.3928/01477447-20100625-09. PMID: 20704110.

4) Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, Fava RA. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. Clin Exp Immunol. 1999 Jan;115(1):176-82. doi: 10.1046/j.1365-2249.1999.00775.x. PMID: 9933439; PMCID: PMC1905193.

5) Lin J, Li G, Den X, Xu C, Liu S, Gao Y, Liu H, Zhang J, Li X, Liang S. VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by $P2X_2(/)_3$ receptor of primary sensory neurons. Brain Res Bull. 2010 Oct 30;83(5):284-91. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.08.002. Epub 2010 Aug 10. Erratum in: Brain Res Bull. 2020 Oct;163:194-196. PMID: 20705122.

6) Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S. Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. J Neurochem. 2014 Apr;129(1):169-78. doi:10.1111/jnc.12614. Epub 2013 Dec 4. PMID: 24304382.

7) Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. Biochim Biophys Acta. 2001 Apr 23;1538(2-3):162-71. doi: 10.1016/s0167-4889(00)00143-9. PMID: 11336787.

8) Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. J Neurochem. 2003 Mar;84(5):1162-72. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x. PMID: 12603839.

9) Hu PF, Tang JL, Chen WP, Bao JP, Wu LD. Increased apelin serum levels and expression in human chondrocytes in osteoarthritic patients. Int Orthop. 2011 Sep;35(9):1421-6. doi: 10.1007/s00264-010-1100-y. Epub 2010 Jul 22. PMID:20652246; PMCID: PMC3167451.

10) Shi L, Ko S, Ko ML, Kim AJ, Ko GY. Peptide Lv augments L-type voltage-gated calcium channels through vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) signaling. Biochim Biophys Acta. 2015 May;1853(5):1154-64. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.02.007. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25698653; PMCID: PMC4382007.