



Title	変形性関節症の病態解明に向けた軟骨破片に対するマクロファージ炎症反応の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	濱崎, 雅成
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14089号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/78295
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2555
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Masanari_Hamasaki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 濱崎 雅成

学位論文題名

変形性関節症の病態解明に向けた軟骨破片に対するマクロファージ炎症反応の解析
(The analysis of macrophage stimulated with cartilage fragments: toward exploring the mechanism of osteoarthritis)

【背景と目的】

変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) は関節軟骨の変性を主体とした滑膜炎、軟骨下骨の硬化および骨棘の形成を伴う疾患である。OA の発端は主に機械的ストレスにより起こると言われているが、関節軟骨、滑膜を含む関節全体におけるカタボリックファクターの増大および免疫システムの活性化が、滑膜炎をはじめとした関節組織全体の炎症を起こし、さらなる軟骨組織の破壊につながる。変形性関節症 (OA) において変性した軟骨組織から生じた軟骨破片は滑膜の免疫細胞と炎症反応を引き起こし、軟骨の変性に寄与する滑膜炎を起こすと言われているが、その詳細なメカニズムが未だ解明されていない。そこで我々は、軟骨破片によって惹起される炎症反応の機序の解明が、OA に対する新規治療の開発につながると考えた。

我々は、滑膜組織の主要な細胞であるマクロファージと軟骨破片が起こす炎症反応が軟骨変性を進行させるという仮説を検証した。またその過程で、軟骨破片、軟骨細胞、マクロファージを使用した共培養モデルを作製し、RNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析にてそのメカニズムを検証した。本研究の目的は、マクロファージの軟骨破片に対する反応の分子的メカニズム解明および軟骨細胞へどのように関与するか調査することである。

実験①：軟骨破片の作製および骨髄由来マクロファージとの反応評価

【対象と方法】野生型マウスより採取した軟骨を、組織破砕機を用いて粉碎して軟骨破片を作成した。作製された軟骨破片の形状および大きさを電子顕微鏡で観察し、粒度分布計を用いて計測した。マウスから単離した骨髄由来マクロファージを播種し軟骨破片を添加、24時間後に評価を行った。24時間培養後に培養液上清を採取し炎症性メディエーターの定量及び細胞の形態の観察を透過型顕微鏡で行った。

【結果】作成した軟骨破片を走査型電子顕微鏡および、粒度分布計で計測した結果、軟骨破片は走査型電子顕微鏡の観察では不整で、多数の小穴を持つ表面形状であった。粒度分布計の計測で直径は0.54～55 μm (平均3.11 μm) であった。これらの形状・大きさはOA患者における過去の関節内から取り出された関節破片の報告とおおむね遜色ないものであった。透過型電子顕微鏡による解析では軟骨破片を添加したマクロファージは不規則な形態かつ拡大したファゴリソームを伴う活性貪食の形態を呈していた。

実験②：軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞共培養モデルの作製

【対象と方法】骨髄由来マクロファージと軟骨細胞をマウスから採取しtranswell insert を使用し実験①と同様の方法で作成した軟骨破片との共培養を行った。qPCR 法を用いてマクロファージにおけるMMP-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6 と、軟骨細胞におけるMMP-13, ADAMTS5, iNOS, IL-6 の mRNA 発現量を評価した

【結果】マクロファージに関して炎症性メディエーターであるTNF- α , IL-6, および MMP-9に関してコントロール群に比べて遺伝子発現の有意な上昇がみられた。軟骨細胞に関してのmRNA発現

の定量では、カタボリックファクターであるMMP-13が24時間48時間ともに、iNOSは48時間後、IL-6が添加後24時間において、コントロール群と比べ有意に高い発現を認めた

実験③：軟骨破片に対するマクロファージ炎症反応の網羅的遺伝子発現解析

【対象と方法】実験①と同様の方法で骨髄由来マクロファージ、軟骨破片を作成した。マクロファージを軟骨破片に添加し24時間培養。そこからRNAを採取しRNA sequenceを行った。データをマッピングし遺伝子発現量の定量化を行った。有意に変化が見られた遺伝子群をGene ontology解析及び遺伝子エンリッチメント解析を行った。

【結果】RNA-Seqによる解析ではTest群はControl群と比較し153の有意な遺伝子発現上昇および100の発現遺伝子低下がみられた。GO解析では細胞内構成要素に関しては11、分子機能に関しては7、生物プロセスは11の用語が抽出され、主に extracellular exosome, scavenger receptor activityに関連するものであった。Pathway解析ではTNF- α シグナリングをはじめ8種類の経路が当てはまった。転写因子解析ではATF2、STAT3、NFKB1が抽出された。

実験④：軟骨破片マクロファージ刺激モデルにおける中和抗体におけるブロッキング実験

【対象と方法】実験①の方法と同様に骨髄由来マクロファージおよび軟骨破片を作成した。マクロファージに対して軟骨破片を添加し24時間培養した。それぞれ軟骨破片添加する30分前に抗TLR2 (Toll like receptor2) 抗体, 抗MARCO (Macrophage receptor with collagenous structure) 抗体、抗ITG α 5 (Integrin alpha 5) 抗体を添加した。軟骨破片添加後24時間に上清を採取しELISAでのTNF- α 量を定量した。

【結果】抗MARCO中和抗体では有意なTNF- α の産生抑制を認めなかったが抗TLR2抗体および抗ITGA5抗体によるブロッキングによりTNF- α の産生は有意に抑制された

【考察】

本研究ではマクロファージと軟骨破片は炎症反応を惹起し、炎症性サイトカインが放出されたがこれは軟骨破片が損傷した組織が免疫細胞とするリガンドとして作用する概念であるDAMPs (Damage associated molecular patterns) として作用したことが原因として考えられた。本研究では軟骨破片によるマクロファージを介する軟骨細胞への影響を解析するために、マクロファージ共培養モデルを作成したが、本モデルにおいて軟骨破片はマクロファージを介する炎症反応を惹起し、軟骨細胞のcatabolic factorを増加させており、関節内を模擬するモデルが作成できたと考えられた。軟骨破片と反応したマクロファージの遺伝子発現変化に対する網羅的遺伝子発現解析からは、TNF- α 、Toll like受容体、NF- κ β などの炎症反応に関する遺伝子発現が主に見られており、さらに軟骨破片との反応では細胞表面分子が重要であることが示唆された。抗体を使用したブロッキング実験ではこれらのうちTLR2とITG α 5が重要な働きをしていることを示した。OAにおいて関節内に発生する軟骨破片は、細胞表面受容体を介してマクロファージ炎症反応を引き起こし、OAの増悪に関与する可能性が示唆された。

【結論】

本研究結果は軟骨破片がマクロファージと炎症反応を起こし変形性関節症の病態に深く関与していることを示した。軟骨破片とマクロファージの炎症反応にはTLR2, スカベンジャー受容体およびTNFシグナリングが重要な役割を担っていることが明らかとなった。これらのメカニズムの解明には関するさらなる詳細な研究が必要であるが、OAに対する新しい治療戦略となりうるものと期待される。