



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 [全文の要約]
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/2115/78297
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2555
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Masanari_Hamasaki_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文（要約）

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)

2020年 3月

北海道大学

濱崎雅成

Hamasaki Masanari

学位論文要約

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)

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。

マクロファージは滑膜組織に存在する主要な免疫細胞であり、OAにおける滑膜炎において重要な働きを担うことが報告されている。関節内局所に存在するマクロファージは軟骨破片と最初に遭遇する免疫細胞であり、比較的小さい軟骨破片を貪食し、大きい軟骨破片は多核巨細胞の形成に作用する。また、マクロファージは破片を分解するための酵素を産生し、その酵素は軟骨の変性や、持続する炎症を引き起こす原因となりうる。さらに、活性化したマクロファージはほかの免疫細胞の導入を促す炎症性メディエーターを放出することでOA進行に寄与すると考えられている。しかし、軟骨破片がマクロファージを介して炎症をおこす詳細なメカニズムは未だ明らかとなっていない。そのため我々は、マクロファージを介した軟骨破片の役割を解析することでOAにおいて重要な要素である滑膜炎の制御が可能となるのではないかと着想した

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砕して軟骨破片を作成した。作製された軟骨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①において軟骨破片の添加によりマクロファージの活性化及び炎症性メディエーターの放出が確認されたので、これらの軟骨細胞への影響を評価するために、関節内での軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞の関係を模擬する軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞を使用した共培養モデル作成へ実験を進めた。

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②において共培養モデルにおいて軟骨破片を添加することでマクロファージの炎症反応に関する遺伝子発現の上昇および軟骨細胞のカタボリックファクターに関する遺伝子発現が増加することが明らかとなった。そのためより詳細なメカニズム解明のため同モデルを用いて軟骨破片に対するマクロファージの反応に関してRNA-Seq(RNA sequencing)を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

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③の結果からマクロファージと軟骨破片との炎症反応に重要な可能性を持つ表面反応分子を同定し、これらに対し中和抗体によるブロック実験を行った。

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ク実験

【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。