



Title	チミジンホスホリラーゼが人工関節術後無菌性緩みの局所骨溶解に及ぼす影響に関する研究
Author(s)	松前, 元
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14982号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k14982
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/86022
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2717
File Information	MATSUMAE_Gen.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

チミジンホスホリラーゼが人工関節術後無菌性緩みの局所
骨溶解に及ぼす影響に関する研究

(Study on thymidine phosphorylase as a potential therapy for
bone loss associated with periprosthetic osteolysis)

2022年3月

北 海 道 大 学

松前 元

Gen Matsumae

学 位 論 文

チミジンホスホリラーゼが人工関節術後無菌性緩みの局所
骨溶解に及ぼす影響に関する研究

(Study on thymidine phosphorylase as a potential therapy for
bone loss associated with periprosthetic osteolysis)

2022年3月

北 海 道 大 学

松前 元

Gen Matsumae

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
方法	9 頁
結果	18 頁
考察	39 頁
総括および結論	43 頁
謝辞	44 頁
利益相反	45 頁
引用文献	46 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Gen Matsumae, Tomohiro Shimizu, Yuan Tian, Daisuke Takahashi, Taku Ebata, Hend Alhasan, Shunichi Yokota, Ken Kadoya, Mohamad Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki.

Targeting thymidine phosphorylase as a potential therapy for bone loss associated with periprosthetic osteolysis.

Bioengineering & Translational Medicine. Jun 8;6(3):e10232. (2021)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 松前 元、テルカウィ アラー、高橋 大介、濱崎 雅成、岩崎 倫政
インプラントの無菌性緩みにおける溶骨性病変とマクロファージ由来のチミジン
ホスホリラーゼとの関連について
第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年7月26日-28日、長崎県長崎市
2. 松前 元、Terkawi Alaa、高橋 大介、濱崎 雅成、岩崎 倫政
インプラントの無菌性緩みにおける溶骨性病変とマクロファージ由来のチミジン
ホスホリラーゼとの関連について
第33回日本整形外科学会基礎学術集会、2018年10月11日-12日、奈良県奈良市
3. Gen Matsumae, Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Norimasa Iwasaki.
Exploring RANKL-independent mechanisms of osteoclastogenesis and bone resorption in
aseptic loosening of joint arthroplasty.
第47回日本免疫学会学術集会、2018年12月10日-12日、福岡県福岡市
4. Gen Matsumae, Mohamad Alaa Terkawi, Yuan Tian, Masanari Hamasaki, Hend Alhasan,
Daisuke Takahashi, Ken Kadoya, Norimasa Iwasaki.
Exploring RANKL-independent mechanism of osteoclastogenesis and bone resorption in
aseptic loosening of joint arthroplasty.
Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting, February 2-5, Austin, TX

5. Gen Matsumae, Mohamad Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Taku Ebata, Norimasa Iwasaki.
Macrophage-derived thymidine phosphorylase promotes osteoclastogenesis and bone resorption in inflammatory osteolysis.
3rd Herbert Fleisch Workshop, March 17-19, 2019, Brugge, Belgium
6. Gen Matsumae, Mohamad Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Taku Ebata, Norimasa Iwasaki.
Macrophage-derived thymidine phosphorylase promotes osteoclastogenesis and bone resorption in aseptic loosening of joint arthroplasty.
13th World Immune Regulation Meeting, April 6-9, 2019, Davos, Switzerland
7. Gen Matsumae, Mohamad Alaa Terkawi, Taku Ebata, Norimasa Iwasaki.
Macrophage-derived thymidine phosphorylase promotes osteoclastogenesis and bone resorption in inflammatory osteolysis.
European Calcified Tissue Society Congress, May 11-14, 2019, Budapest, Hungary
8. Gen Matsumae, Mohamad Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki.
Macrophage-derived Thymidine Phosphorylase Promotes Osteoclastogenesis and Bone Resorption in Inflammatory Osteolysis.
The American Society for Bone and Mineral Research 2019 Annual Meeting, September 20-23, Orlando, FL
9. 松前 元、テルカウイ アラー、木田 博朗、江畑 拓、田 園、ヘンド アルハサン、清水 智弘、高橋 大介、角家 健、岩崎 倫政
人工関節術後無菌性緩みにおけるチミジンホスホリラーゼの機能と骨吸収メカニズムの解明
第35回日本整形外科学会基礎学術集会、2020年10月15日-16日、東京都新宿区
10. Gen Matsumae, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Shimizu, Taku Ebata, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki.
Oral administration of Saracatinib, a Src kinase family inhibitor, suppresses pathological bone resorption in wear debris-induced osteolysis murine model.
Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting, February 12-16, Web 開催

要旨

【背景と目的】

人工関節置換術は、整形外科手術における最も成功した手術法の一つであるが、その合併症として無菌性緩みが挙げられる。無菌性緩みに対する再手術は患者負担のみならず、整形外科医にとっても手技的な困難が伴うため、無菌性緩みの予防は非常に重要となる。

無菌性緩みは、人工関節摺動面から発生するポリエチレン摩耗粉（以下、摩耗粉）が原因となる。摩耗粉を貪食したマクロファージが種々のサイトカインを放出することで、破骨細胞形成が促進される。これにより骨吸収が過剰となり、人工関節の緩みに繋がる。

このような背景から、摩耗粉を貪食したマクロファージから放出されるサイトカインが無菌性緩み発症に重要な役割を担っていることが示唆される。そこで先行研究として、*in vitro* において人工的に作製したポリエチレン摩耗粉とヒトマクロファージを共培養したものに対して、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

本研究の目的は、網羅的遺伝子発現解析結果における発現上昇遺伝子から破骨細胞分化と骨吸収に関与する因子を抽出し、その分子メカニズムを解析することである。

【対象と方法】

(1. 破骨細胞分化に関与する因子の同定と *in vitro* 評価) 網羅的遺伝子発現解析で発現上昇した遺伝子に対して Gene Ontology エンリッチメント解析（以下、エンリッチメント解析）を行い、破骨細胞分化に関連する因子として 12 個に絞り込んだ。続いて 12 個の因子に対して *in vitro* でヒトマクロファージと共培養することで、最も破骨細胞分化を誘導した thymidine phosphorylase（以下、TYMP）を同定した。

(2. 活性化マクロファージとヒト滑膜における TYMP の同定) 摩耗粉で刺激したヒトマクロファージに対してウェスタンブロッティング法（以下、WB 法）を用いる事で、TYMP の上昇を確認した。また、無菌性緩み症例の関節滑膜を免疫組織化学染色し TYMP の存在を確認した。さらに、無菌性緩み症例の血清における TYMP の濃度を ELISA 法を用いて検証した。

(3. マウス頭頂骨骨吸収モデルによる *in vivo* 検証) マウス頭頂骨に TYMP を吸収させたスポンジを移植し、4 日目に qRT-PCR による遺伝子発現解析、7 日目に頭頂骨の骨吸収域・細胞浸潤・TRAP 染色域を定量的に評価した。

(4. RNA シークエンスによる TYMP の破骨細胞分化メカニズムの解析) TYMP で 8 日間刺激したヒトマクロファージから RNA を抽出し、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。発現上昇遺伝子に対してエンリッチメント解析を行った。結果の検証は、プルダウンアッセイと WB 法を用いて行った。

(5. TYMP の破骨細胞分化メカニズム抑制剤を用いた in vivo 検証) マウス頭頂骨に人工的に作製したポリエチレン摩耗粉を移植したモデルに対して、TYMP の破骨細胞分化メカニズムに關与する因子の抑制剤を用いた実験を行った。摩耗粉前日、翌日、3 日後、5 日後の計 4 回抑制剤を経口投与し、7 日目に頭頂骨を摘出した。摘出した頭頂骨に対して、骨吸収域・細胞浸潤・TRAP 染色域をそれぞれ定量評価した。

【結果】

(In vitro とヒト検体における TYMP の同定) 摩耗粉で刺激したヒトマクロファージにおいて、TYMP タンパク発現量はコントロール群と比較して有意に上昇した。また、ヒト滑膜を免疫組織化学染色したところ、TYMP が認められた。患者血清を用いた ELISA 法では、健常者群と比較して無菌性緩み症例において有意に TYMP 濃度が上昇した。

(マウス頭頂骨骨吸収モデルによる in vivo 検証) コントロール群と比較して有意に骨吸収域や頭蓋骨への細胞浸潤、TRAP 染色域が増加した。また、4 日目に摘出した頭蓋骨における遺伝子発現解析では、破骨細胞分化に關与する因子が有意に上昇した。

(TYMP の破骨細胞分化メカニズムの解析) コントロール群と比較して 94 個の遺伝子が発現上昇した。エンリッチメント解析を行ったところ、”Osteoclast differentiation” タームが有意に上昇し、その中に FYN が含まれていた。FYN の発現は、TYMP で刺激したヒトマクロファージを使用し WB 法で確認した。また、同じく TYMP で刺激したヒトマクロファージを用いてプルダウンアッセイにより FYN の結合因子として ITG β 1 を同定した。続いて、TYMP 刺激によりマクロファージ内の NF κ B 経路と MAPK 経路の上昇を WB 法で確認した。

(FYN の抑制剤を用いた in vivo 検証) FYN の抑制剤の一種である Saracatinib を、人工摩耗粉を移植したマウスに経口投与した所、骨吸収域・TRAP 染色域の有意な低下を認めた。

【考察】

本研究では、人工関節置換術後の無菌性緩みに TYMP が關与することをはじめて示した。TYMP は同じく局所的な骨吸収を起こす疾患である関節リウマチや悪性腫瘍の骨転移でその關与が過去報告されており、このことから先行研究におけるエンリッチメント解析で TYMP が捕捉できたと考ええる。実際、無菌性緩み症例の滑膜で TYMP が存在し、健常者と比較して無菌性緩み症例では血中濃度が上昇していた。

TYMP はチミジンの可逆的リン酸化を触媒するものとして同定された。現在では、上述の局所性骨吸収疾患や、ミトコンドリア病の原因遺伝子としても認知されている。TYMP による破骨細胞分化について、本研究では FYN と ITG β 1 が關与している事を明らかにした。FYN は Src ファミリーキナーゼの一種であり、過去に破骨細胞分化に關連する報告がある。FYN と ITG β 1 の組み合わせについては希突起膠細胞の分化・成熟に關与する報告があるものの、破骨細胞分化に關してはこれまで不明であった。

以上の知見を基に、in vivo の検証により TYMP が骨吸収を増加させること、及び FYN の抑制剤である Saracatinib が摩耗粉による骨吸収を抑制することをそれぞれ示した。これは TYMP や FYN の作用機序の解明のみならず、将来的な臨床応用にも繋がる可能性がある。

【結論】

本研究から、人工関節置換術後の無菌性緩みに TYMP が関与することが明らかとなった。また、TYMP による破骨細胞分化のメディエーターである FYN を抑制することで、骨吸収が抑制されることが判明した。これは、将来的に無菌性緩みに対する治療や予防方法の確立に繋がる可能性がある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CD	Cluster of differentiation
CT	Computed tomography
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
FYN	FYN Proto-Oncogene
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
H&E	Hematoxylin and Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukin
ITGβ1	Integrin Subunit Beta 1
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCSF	Macrophage colony stimulating factor
MEM	Minimum Essential Medium
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
OPG	Osteoprotegerin
pFYN	phosphorylated FYN Proto-Oncogene
PBS	Phosphate buffered saline
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RNA-seq	RNA-sequencing
SFK	Src family kinase
siRNA	small interfering RNA
TNF	Tumor necrosis factor
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TYMP	Thymidine phosphorylase
RANKL	Receptor activator of NF-κappa B ligand
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight-polyethylene

緒言

人工関節置換術は関節破壊や末期関節症などの不可逆的な関節疾患に対する最も確立された治療方法であり、罹患関節の除痛のみならず関節可動域も温存することができる。このことから、人工関節置換術は整形外科手術における最も成功した一例といえる。一方、人工関節置換術後の代表的な合併症として、無菌性緩みが挙げられる。無菌性緩みは人工関節インプラント周囲の過剰な骨吸収により起こるとされており、その発症率は術後 10-70%である。加えて、全人工関節置換術のうち 25%以上が再手術(人工関節再置換術)が必要になるとの報告もある (Wooley and Schwarz, 2004)。無菌性緩みに対する治療法は、人工関節の再置換術しか存在せず、これは患者に身体的・精神的・金銭的負担を与えるのみならず、手術手技的に整形外科医にとっても未だに挑戦的なものである。

無菌性緩みの原因であるインプラント周囲の骨吸収は、関節摺動面から発生するインプラント摩耗粉 (以下、摩耗粉)に起因する炎症反応が原因とされている。持続的な摩耗粉の発生と炎症反応の継続により、体内で唯一骨吸収を司る細胞である破骨細胞が過剰に発現し、結果的にインプラント周囲の骨吸収を引き起こす (Cobelli et al., 2011; Kandahari et al., 2016; Werner et al., 2018)。現在、関節リウマチや悪性腫瘍の骨転移、骨粗鬆症などで炎症反応のサイトカインと標的とした生物学的製剤や、破骨細胞形成に必須とされる receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)を阻害する製剤が開発・臨床応用されているが、どれも無菌性緩みには使用されていない。これは、過剰な免疫反応の抑制や薬剤自体による副作用が原因となっている (Chen et al., 2012; Huang et al., 2013; Kandahari et al., 2016; Zhou et al., 2010)。そこで、無菌性緩みを制御する効果的な治療方法の開発が求められている。

人工関節摺動面に使用されるポリエチレンライナーには ultra-high-molecular-weight-polyethylene (UHMWPE)が使用されることが多い。これは関節摺動面における摩耗耐性に優れるとされているが、術後長期的にみた場合摩耗粉の発生源となることで無菌性緩み発症の決定的な原因となっている (Cobelli et al., 2011; Werner et al., 2018)。事実、インプラント周囲に 0.15mm/年の割合で摩耗粉が蓄積することが、無菌性緩み発症のリスク因子であるとの報告がある (Werner et al., 2018)。サイズ径が 0.1-2.0 μ m の摩耗粉がインプラント周囲には最も同定されるが、この内 2.0 μ m 径の摩耗粉が局所的な炎症反応と、それに続く破骨細胞の過剰発現、骨吸収に関与するとされる (Kandahari et al., 2016)。

摩耗粉に対する生体反応にまず関与する細胞はマクロファージである。人工関節や骨周囲の組織常在マクロファージは、摩耗粉を認識・貪食することで様々な炎症性サイトカインを放出する。これらサイトカインは炎症性細胞や骨関連細胞の遊走、成熟、

増殖、分化を促す。また、マクロファージはこうした炎症反応の発現のみならず、破骨細胞形成因子を放出することで、破骨細胞の形成も促す (Ingham and Fisher, 2005; Nich et al., 2013)。事実、マクロファージから放出されるサイトカインである TNF- α や IL-1、IL-6、TNFSF15 は RANKL の発現を介して破骨細胞形成を促すことが知られている (Garrigues et al., 2005; Ingham and Fisher, 2005; Kitaura et al., 2013; Ritchlin et al., 2003; Terkawi et al., 2018)。我々が行った最近の研究からは、UHMWPE で刺激したマクロファージから放出されるサイトカインは、関節リウマチにおけるサイトカインや炎症反応、破骨細胞形成などの点において類似性がある事が判明した(Terkawi et al., 2018)。特に炎症反応と病的な骨吸収反応に特徴づけられる炎症性骨吸収は、無菌性緩みと関節リウマチに共通の病態である (Mbalaviele et al., 2017)。両疾患では、マクロファージが炎症反応の拡大と関節破壊において中心的な役割を果たす (Gu et al., 2017; Mbalaviele et al., 2017; Udalova et al., 2016)。従って、人工関節周囲の炎症性マクロファージと破骨細胞との相互関係が明らかとなれば、無菌性緩みにおける新たなメカニズムの解明のみならず、無菌性緩みを制御する薬剤開発に繋がる可能性がある。

本研究では、摩耗粉に刺激されたマクロファージから放出される因子が無菌性緩みにおける治療ターゲットになり得ることを踏まえ、無菌性緩みにおける破骨細胞形成に関与するマクロファージ由来因子を同定し、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

方法

1. 倫理審査の承認

本研究で使用したヒトサンプルは全て、北海道大学病院における IRB の承認を受けた後に取得し使用した (承認番号 : 016-0002)。また本研究における動物実験は、全て北海道大学大学院医学研究院における動物実験委員会の承認を受けて行った (承認番号 : 17-0085)。

2. ポリエチレン摩耗粉の作製

摩耗粉は、UHMWPE からなるポリエチレンライナーから作製した (Terkawi et al., 2019)。具体的にはまず、GUR1020 パウダー (Celanese Japan, Tokyo, Japan) を 95kGy で照射し、135°C 以下で焼き戻しすることにより (Quadrant Polypenco Japan, Tokyo, Japan)、UHMWPE を作製した。次に固体である UHMWPE を Multi Beads Shocker (Yasui Kikai, Osaka, Japan) を用いて、3,500rpm のスピードで粉碎した。径が 0.1~10µm のサイズを持つ粉碎された UHMWPE は、EOG sterilizer (Eogelk-SA-H160, Osaka, Japan) を用いて滅菌され、100µl の PBS で懸濁した。その後、作製したサンプルにおけるエンドトキシン濃度の測定のため、ToxinSensor Single Test kit (Genscript, Piscataway, NJ) の LAL 試験用水と混和した。エンドトキシン濃度の測定では、1 時間 37°C でサンプルを湯煎後に、強固なゲルが形成された場合、エンドトキシン陽性の判定となる。本研究のために作製した摩耗粉に対してこのテストを行ったところ、強固なゲルは認められず、これは試料中のエンドトキシン濃度が 0.015 EU/ml 以下である事を意味する。以上の様にして作製した滅菌フリーエンドトキシン摩耗粉は、実際に使用する前に 1.5ml の Eppendorf tube 1 本中に 6mg の容量で保存した。

3. 破骨細胞分化アッセイと骨吸収アッセイ

3-1. ヒト単球の取得と破骨細胞分化アッセイによるスクリーニング

健常なアジア成人男性 3 名 (30-45 歳) から採血を行い、密度勾配遠心分離法によりヒト単球を単離した。具体的には、得られた血液を遠心後 (2500rpm、15 分、4°C)、Buffy Coat のみを抽出し 5ml 程の phosphate buffered saline (PBS ; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と混合し 50ml 遠沈管に移した。次に、あらかじめ 15ml の遠沈管に入れておいた 5ml の媒体 (Ficoll-Paque™ PLUS: GE Healthcare, Waukesha, WI) 上に 10ml の Buffy Coat+PBS を滴下した。その後、再度遠心 (800G、30 分、22~25°C) を行うことで、血清、単球+リンパ球成分、その他の血球成分に分離した。分離後、単球+リンパ球成分領域のみをピペットで抽出し、遠心を行った (2000rpm、5 分、4°C)。遠心後上清を破棄し、PBS 10ml を加え洗浄を行った。この操作を 2 回行った後、混入し

た血球成分を除去するために Red Blood Cell lysis buffer (Biolegend) 10ml を添加した後、遠心を行った (2000rpm、5 分、4°C)。続いて先程と同様に PBS で 2 回細胞を洗浄した。その後、細胞成分から単球のみを単離するために、磁気ビーズを用いた (MACS Pan monocyte isolation kit : Miltenyi Biotec, Auburn, CA)。得られた単球は同様の手順で PBS で 2 回洗浄した。次に単球をメディウム (Minimum Essential Medium (MEM) + 10% Fetal bovine serum (FBS) + 5% L-glutamine + penicillin/streptomycin) と混和し、75cm² フラスコに 15ml ずつ入れ、インキュベーター (37°C, 5% CO₂) で 3 時間培養した。3 時間経過後、メディウムを破棄し新たなメディウム (MEM + 10% FBS + 5% L-glutamine + penicillin/streptomycin + 25ng/ml の Macrophage colony stimulating factor (MCSF ; Peprotech, Japan) 12ml を加え、3 日間さらに培養した。この時、フラスコ底面に付着した細胞が Cluster of differentiation (CD) 14+単球となる。3 日後、各フラスコ内の上清を破棄し、PBS で 3 回洗浄した後、1% トリプシン-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 (GE Healthcare) を用いて細胞を剥離した。剥離した細胞は PBS で 2 回洗浄後、細胞とメディウム (MEM + 10% FBS + 5% L-glutamine + penicillin/streptomycin) を混和し、96 ウェルプレートの 1 ウェルに 1.0×10^4 個の細胞が播種されるように分配した。この時播種された細胞が M0 型マクロファージとなる。また、破骨細胞形成を促し得る因子をそれぞれ 50ng/ml の濃度でメディウムに混和し、各因子のグループはそれぞれ 3 ウェルずつ用意した。各因子として、RANKL (ポジティブコントロール : Peprotech)、Tumor necrosis factor (TNF) superfamily 9 (TNFSF9 ; Peprotech)、TNF superfamily member 14 (TNFSF14 ; Peprotech)、TNF superfamily member 15 (TNFSF15 ; Peprotech)、Oncostatin M (OSM ; Peprotech)、Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1 ; Peprotech)、Epiregulin (EREG ; Peprotech)、Vascular endothelial growth factor A (VEGFA ; Aviva systems biology, San Diego, CA)、Thymidine phosphorylase (TYMP ; Aviva systems biology)、Gremlin 1 (GREM1 ; BioVision, Inc., Milpitas, CA)、Cardiotrophin like cytokine factor 1 (CLCF1 ; Aviscera Bioscience, Inc., CA)、Inhibin Subunit Beta A (INHBA ; Novoprotein) をそれぞれ用意した。ネガティブコントロールは MCSF 単独投与群である。各メディウムは培養開始から 3 日ごとに交換を行った。培養 8 日目に Leukocyte acid phosphate TRAP kit (Sigma) を用いて細胞を Tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色した。TRAP 染色陽性であり、細胞質内に核を 3 つ以上有する細胞を破骨細胞と判定した。破骨細胞数の計測は、各ウェル毎に全数計測を行い、3 ウェルの平均破骨細胞数をそれぞれの因子で比較した。このスクリーニング実験により、ポジティブコントロールである RANKL の次に、TYMP が破骨細胞を誘導することが明らかとなった。このため、以後の実験は TYMP に着目して行うこととした。TYMP が RANKL 非依存的な破骨細胞形成を示すかを検証するため、RANKL のデコイ受容体である Osteoprotegerin (OPG ; Peprotech)

500ng/ml を添加した上で、同様の方法で TRAP 染色を行い、誘導された破骨細胞数を計測した。

3-2. 破骨細胞のアクチン染色

ネガティブコントロールである MCSF 単独投与群、ポジティブコントロールである RANKL 投与群、及び TYMP が誘導した細胞に対して、それぞれ Actin 染色を行った。まず、3-1.と同様の方法でヒト単球の単離から、破骨細胞の誘導を行う。次に、得られた細胞を 4%パラホルムアルデヒド (Wako)を 20 分間用いて固定する。その後、PBS で細胞を洗浄した後、0.1%トライトン x100 (Sigma) を 3 分間使用することにより透過処理した。再度 PBS で細胞を洗浄した後、Alexa Fluor 633 phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA)と、DAPI (Dojindo Molecular Technologies)を用いて、細胞周囲のアクチン染色と細胞核の染色をそれぞれ行った (44)。

3-3. 骨吸収アッセイによる誘導破骨細胞の骨吸収能評価

TYMP で誘導された破骨細胞が実際に骨吸収能をもつかどうかを検証するために、象牙質切片を用いた骨吸収アッセイを行った。まず、3-1.と同様の方法で、ヒトマクロファージを得る。次に、96 ウェルプレートに象牙質切片 (ivory dentine slice : Wako, Osaka, Japan)を敷き、その上に細胞数が 3.0×10^4 となるようにヒトマクロファージを播種した。使用したメディウムは 3-1.と同様のものである。メディウムは 3 日ごとに取り替えて、計 21 日間培養を行った。培養後、それぞれの象牙質切片を 20 mg/ml の peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin (Sigma) と 3,3'-diaminobenzidine (0.52 mg/ml in PBS containing 0.1% H₂O₂)で染色した。染色後象牙質切片上の骨吸収窩を、共焦点顕微鏡を用いて撮影し、画像データを ImageJ (National Institutes of Health)に取り込んだ上で定量評価した。

3-4. In vitro におけるマクロファージの分化

TYMP が、マクロファージのどのサブタイプ由来かを検証するために、in vitro においてマクロファージを M1 型、M2 型にそれぞれ分化させた。3-1.と同様の方法でヒトマクロファージを単離し、同様のメディウム+MCSF 25 ng/ml で 6 日間共培養した。その後、M1 型作製のために Lipopolysaccharide (Sigma) 100 ng/ml + Interferon gamma 100 ng/ml で 48 時間共培養した。また、M2 型作製のために、Interleukin (IL)-4 (Peprotech) 200 ng/ml で 48 時間共培養した。これらの細胞は、ウェスタンブロッティング法のサンプルとして調整した (方法の 4-2. 参照)。

3-5. 破骨細胞分化アッセイにおける TYMP のノックダウン

3-1.と同様の方法でヒトマクロファージを単離し、同様のメディウム+MCSF 25 ng/ml で 6 日間共培養した。その後細胞をフラスコから剥離し、96 ウェルプレート

に 1.0×10^4 / well となるように細胞を播種し、small interfering RNA (siRNA) を用いた TYMP の抑制実験に使用した。まず、TYMP またはネガティブの siRNA 溶液 25 μ l (Thermo Fisher, Silencer[®] Select, Tokyo, Japan) を Opti-MEM[®] (Gibco, Thermo Fisher) で懸濁した。同時に、25 μ l の Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher) を Opti-MEM[®] で懸濁した。室温で 5 分間培養した後、siRNA と Lipofectamine の混合物 10 μ l を、細胞を播種したウェルに投与した。24 時間後、siRNA 混合物を除去し、2. で作製した UHMWPE 摩耗粉との共培養を行った。これには、各ウェルに 1 mg/cm³ となるように摩耗粉を各ウェルに播種し、96 ウェルプレートにシールで密閉する。そして、プレートを反転させることで、プレート底面に接着した細胞と摩耗粉が反応出来るようにした (Terkawi et al., 2018) (inverted cell culture method)。この培養を 24 時間行った。24 時間の培養後、摩耗粉の入っていない新たなメディウム (MEM+10% FBS + 5% L-glutamine + penicillin/streptomycin) に変更し培養を継続した。翌 1 日目と 3 日目にメディアムの交換を行い、6 日目に 3-1. と同様の方法で TRAP 染色を行った。その後、誘導された破骨細胞数を計測した。Biological replicate は 3 とした。また、siRNA により TYMP の発現が抑制されるかを検証するために、上記と同様にして準備したヒトマクロファージに対して siRNA を 24 時間刺激した後、タンパクを抽出してウェスタンブロッティング法で TYMP の発現を検証した (4-2. 参照)。

4. 臨床検体における TYMP の同定

4-1. 無菌性緩み症例の滑膜における因子の同定

まず、無菌性緩み症例に対する再置換術施行時に、関節滑膜を採取した (内訳は、60 歳男性、54 歳女性、59 歳女性)。採取した滑膜を、4%パラホルムアルデヒドで 48 時間固定後、パラフィン包埋した。パラフィンブロックを 3 μ m 厚に切り、proteinase K (Dako, CA) で 5 分培養し、その後 horse serum で 1 時間ブロッキングした。作製した切片は、1:250 濃度の TYMP monoclonal antibody (NeoMarkers, CA) で一晩反応させた後、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin secondary antibody (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame) で刺激し、hematoxylin で細胞核の対比染色を行った。

4-2. ウェスタンブロッティング法による因子の同定

無菌性緩み症例の関節液を samples buffer EzApply (ATTO, Osaka, Japan) と混合し、100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。抽出したタンパクを Sodium Dodecyl Sulfate – poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ゲルに充填し、電気泳動を行った後、ゲルを polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P Membrane; Merck, Darmstadt, Germany) に転写した。転写後のメンブレンは 5% スキムミルクで一晩ブロッキングを行った

後、1次抗体による刺激を行った。1次抗体に使用したものは、TYMP (NeoMarkers)、FYN Proto-Oncogene (FYN ; Biolegend)、phosphorylated FYN (pFYN ; R&D Systems, MN)、Integrin Subunit Beta 1 (ITG β 1 ; Thermo Fisher Scientific, IL)、Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH ; Affinity Biosciences)、P38、phosphorylated P38 (pP38)、phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2)、phosphorylated MEK1/2 (pMEK1/2)、c-Myc、phosphorylated c-Myc (pc-Myc)、phosphorylated Nuclear Factor Kappa B Subunit 1 (pNFkB1)、phosphorylated RELB Proto-Oncogene (pRELB ; Cell Signaling Technology, MA)、phosphorylated P65 (pP65 ; Gene Tex, CA)である。それぞれの1次抗体に対応する結合抗体を同定するために、2次抗体 (secondary antibody conjugated with HRP : Cell Signaling Technology)をそれぞれ使用した。バンドの検出には Ez WestLumi Plus (ATTO, Tokyo, Japan)と Quantity One v. 4.6.9 (Bio-Rad)ソフトウェアを使用した。バンド強度の定量評価は、GAPDH との対比で ImageJ により行った。このウェスタンブロットティング法は、5.における RNA-seq データの検証にも用いた。

4-3. ELISA 法による因子の血中濃度計測

無菌性緩み症例と健常者の血清中における TYMP 濃度を比較するため、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法を行った (R&D Systems Inc., MN)。採血によって得られた血液を遠心することで、血清を得た。無菌性症例3名、健常者3名から採血を行った。Biological replicate を3とし、各サンプルは 100 μ l の血清を用いた。吸光度を測定後検量線を作成し、これを基に各症例の血中 TYMP 濃度を計測した。

5. バイオインフォマティクスと in vitro での検証

5-1. 無菌性緩みにおける破骨細胞形成因子の同定

3-1.で示した破骨細胞形成を促し得る12個の因子同定のために、過去に我々のグループで報告した UHMWPE 摩耗粉とヒトマクロファージを用いた実験に着目した。これは、3-5.と同様の方法によりヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉を24時間共培養したものから、RNA を抽出し RNA-sequencing (RNA-seq)をしたものである (Terkawi et al., 2018)。この際得られた FASTQ ファイルは、UHMWPE 刺激群 (biological replicate = 3)と非刺激群 (Mock ; biological replicate = 3)の計6ファイル (paired-end)である。それぞれのFASTQファイルに対して、まず fastp による3'末端のトリミング (101番目の base pair)を行った (Chen et al., 2018)。次に、マッピングソフトウェアである STAR を用いて (Dobin et al., 2013)、GRCh38 を基にリードのマッピングを行った。続いて、RSEM を用いて遺伝子発現を定量した後 (Li and Dewey, 2011)、R のパッケージである DESeq2 の Wald test を用いて DEGs を解析した。発現上昇または低下した遺伝子は、UHMWPE 刺激群と非刺激群とで2群間の比較を行

い、False discovery rate (FDR)が 0.05 未満かつ Log2 fold change が 2.0 以上のものを有意とした。有意に発現した遺伝子群に対して、ヒートマップの作製 (pheatmap : R パッケージ)、Gene Ontology エンリッチメント解析 (NET-GE : <http://netge.biocomp.unibo.it/enrich>)、パスウェイ解析 (DAVID : <https://david.ncifcrf.gov/>)、MAplot の作製 (ggpubr : R パッケージ)を行った。FASTQ ファイルのアラインメント方法については様々な方法が報告されている。当グループが当初使用していた方法は、Tophat によるマッピングと Cufflinks による発現量計測、発現変動解析を組み合わせた手法であった。しかしながら、現在この手法は開発者によるサポートが終了していることや、精度面での問題が指摘されていることから、その使用が推奨されていない。そこで我々は、より精度の高いアラインメント方法である上記の STAR と RSEM、DESeq2 を用いたアラインメント方法、遺伝子発現解析方法を確立した上で、FASTQ データを解析した。我々が以前報告した論文では (Terkawi et al., 2018)、前述の Tophat/Cufflinks を用いているが、本研究において STAR/RSEM/DESeq2 を用いて解析し直すことで、遺伝子発現上昇遺伝子に差異が認められた。加えて、RNA-seq データから得られたリードカウントデータは通常転写産物長による補正を行う。Tophat/Cufflinks では FPKM (fragments per kilobase of exon per millinon reads mapped)が用いられるが、これは転写産物の発現量を正しく表せないことが報告されている。対して本研究で用いた STAR/RSEM では、補正方法として TPM (transcripts per million) が使用でき、補正方法に関してもより正確なデータが得られたと考える。

5-2. TYMP の破骨細胞形成メカニズムの解明

TYMP の破骨細胞形成メカニズム解明のために RNA-seq を行った。3-1.と同様の方法でヒトマクロファージを単離し、同様のメディウム+MCSF 25 ng/ml で 6 日間共培養した。その細胞を 96 ウェルプレートに 1.0×10^4 /well になるように播種した。その後、同様のメディウム+MCSF 25 ng/ml+TYMP 100 ng/ml で共培養したもの (TYMP 群)、同様のメディウム+MCSF 25 ng/ml+RANKL 50ng/ml で共培養したもの (RANKL 群)、同様のメディウム+MCSF 25 ng/ml のみで共培養したもの (MCSF 群)をそれぞれ biological replicate = 3 で用意した。これらを 3 日ごとにメディウム交換を行い、8 日間共培養した。8 日目にまず細胞を PBS で 3 回洗浄し、TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA)を加えた。その後、全 RNA は Rneasy Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)で抽出した。各々の取得 RNA の解析は、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara CA)による ribosomal RNA 比 (28S/18S)によって行った。RNA シークエンスは NovaSeq 6000 (Illumina)を用いて行った。以上の過程から得られた各群の FASTQ ファイル (paired-end であるため、計 18 ファイル)を、5-1.と同様の方法で解析した。

5-3. qRT-PCRによるFYNとSQSTM1の発現解析

5-2.の結果、TYMPの破骨細胞形成メカニズムにFYNとSQSTM1が関与していることが明らかとなった。そこでまずヒトマクロファージに対してTYMP刺激を行うことで、FYN・SQSTM1の発現上昇をqRT-PCR法を用いて検証した(qRT-PCR法に関しては6-3.参照)。具体的には、3-1.と同様の方法でヒトマクロファージを単離し、24ウェルプレートに 2.0×10^5 の細胞を播種した。その後100 ng/mlのTYMPと3時間共培養し、TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA)を加え溶解した。5-2.と同様の方法でRNAを抽出後、qRT-PCRによる遺伝子発現解析を行った。

5-4. 免疫蛍光染色によるFYNの発現同定

5-3.の結果から、FYNがTYMP刺激による破骨細胞分化に関与している可能性が示唆された。そこで、TYMP刺激によるヒトマクロファージでのFYN発現について免疫蛍光染色を行うことで検証した。まず3-1.と同様の方法でヒトマクロファージを単離し、 1.0×10^4 の数を15mmの円形カバースライド(MATSUNAMI MICRO COVER GLASS)に播種した。7日間培養後、4%パラホルムアルデヒドで30分間固定した。その後PBSで3回洗浄し、5%FBSを加えた。次に、10mlの5%FBSに対して30 μ lのTriton X-100 (Sigma-aldrich)を加え混合した。Triton X-100/FBS溶液2mlをカバースライドに加え、3分間放置した後、PBSで洗浄し5%FBSを加えた。37°Cで30分間培養後、1次抗体(FYN (Biolegend) 0.5 μ l + 5%FBS 100 μ l)で1時間室温で刺激した。その後PBSTで3回洗浄し、2次抗体(Alexa 488 1 μ l + DAPI 1 μ l + 5%FBS 300 μ l)で1時間遮光室温で刺激した。PBSTで3回洗浄後、Dako fluorescence Mounting Medium (Dako)を垂らしたスライドガラスにカバースライドを置き、カバースライド周囲にマニキュアを塗布した。15分後に顕微鏡で細胞を確認した。

5-5. プルダウンアッセイによるマクロファージにおけるTYMPの受容体の同定

3-1.と同様の方法で取得したヒトマクロファージ(1.2×10^6 個)に対してEzRIPA Lysis buffer (ATTO, Tokyo, Japan)を使用することで細胞を溶解し、タンパク質を取得した。取得したタンパク濃度を、Micro BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher, Tokyo, Japan)を用いて計測した。タンパク質溶解物はプルダウンアッセイを行うまで氷中に保存した。その後、100 μ lのHis60 Ni Magnetic Beads (Takara, Osaka, Japan)をPBSで洗浄し、10 μ gのHis-tagged TYMP (ATGEN, Korea)と一緒にslow-speed rotator (AS ONE Osaka, Japan)を用いて2時間攪拌した。その後、TYMP結合ビーズをPBSTで洗浄し、250 μ g/mlのタンパク質1mlと2時間反応させた。ここで、ネガティブコントロールとして、His-tagged TYMPを含まない細胞由来タンパク質+ビーズの混合物を使用した。タンパク質結合ビーズをPBST (PBS with Tween 20)で3回洗浄し、4-2.と同様の方法でウェスタンブロッティング法を行った。1次抗体には、FYNと

ITGβ1 を用いた。このプルダウンアッセイの妥当性を検証するために、GAPDH 抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行ったが、バンドは検出されなかった。

6. マウス頭頂骨骨吸収モデルによる in vivo 検証

6-1. 摩耗粉誘導骨吸収モデルを用いた TYMP の同定

4.において臨床検体における TYMP の同定を行ったが、摩耗粉誘導骨吸収モデルマウスにおいても TYMP が発現上昇していることを確認した。まず、8 週齢オスの C57BL/6 マウス (CLEA, Tokyo, Japan) を 6 匹用意し、3 匹ずつ 2 群に分けた (摩耗粉移植群と非移植群)。100 mg/kg のケタミンと 10 mg/kg を混合したものをマウス腹腔内に注射することで麻酔を行った後、耳介中央の毛をシェーバーで剃り、1cm 程の切開を加えた。そこからマウス頭頂骨上で骨に損傷を与えないように注意しながら皮下剥離を行った。剥離した頭蓋骨上の領域に、2.で作製したポリエチレン摩耗粉 6mg を移植した (摩耗粉移植群)。その後、切開部をステープラーで縫合した。非移植群は皮下剥離のみで切開部を同様に縫合した。移植後 7 日目にマウス頭頂骨を摘出した。摘出したマウス頭頂骨を細かく砕き、TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA) を加えた。その後、5-2.と同様の方法で全 RNA を抽出した。次に、得られた RNA における TYMP の発現を quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)法で検証した (6-3.参照)。

6-2. マウス頭頂骨骨吸収モデル

TYMP の in vivo における骨吸収能を評価するために、マウス頭頂骨骨吸収モデルを使用した。具体的には、6-1.と同様に 8 週齢オスの C57BL/6 マウス (CLEA, Tokyo, Japan) に対して、同様の麻酔後にマウス頭頂骨部を切開・皮下剥離した。1cm×1cm 大のスポンジ (PELNAC, Tokyo, Japan) に 4μg のリコンビナントマウス TYMP (Cloud-Clone Corp., TX) と 50μl の PBS を混和したものを染みこませ、皮下剥離部に移植した (TYMP 移植群)。同様に、ポジティブコントロールとして RANKL 移植群 (Biolegend)、メガティブコントロール群として PBS 移植群 (PBS のみ) と Sham 群 (皮下剥離のみでスポンジを移植せず) を作製した。マウス頭頂骨を 4 日目に摘出するグループ (biological replicate = 4) と 7 日目に摘出するグループ (biological replicate = 6) をそれぞれ用意した。4 日目に頭蓋骨を摘出したグループは 6-1.と同様に qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。7 日目に頭蓋骨を摘出したグループは、10% ホルマリンに保存した後、マイクロ Computed Tomography (CT) (R-mCT2, Rigaku, Tokyo, Japan) による頭蓋骨上の骨吸収域評価を行った。CT 画像を撮影後、10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid ; Wako, Osaka, Japan) で 3 日間脱灰した後、パラフィン包埋を行った。5μm 厚の切片を作製し、各々のサンプルに対して Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色と TRAP 染色をそれぞれ行った。マウス頭頂骨の骨吸収領域は、R-

mCT2 で 3 次元画像を作成した後これを 2 次元画像としてダウンロードし、ImageJ で頭蓋骨表面における骨吸収域を定量評価した。組織切片については、マウス頭蓋骨 1 個につき冠状断を 3 つの部位に分けて取得した。以下の定量評価では、3 つの領域の内、客観的な定量評価が可能な遠位 2 つの領域を使用した。H&E 染色切片については、マウス頭蓋骨の上に堆積している細胞浸潤を ImageJ で定量評価した。TRAP 染色では、赤色に染色される TRAP 染色域を ImageJ で定量評価した。

6-3. qRT-PCR による遺伝子発現解析

5-3、6-1、6-2. で得られた RNA から、GoScript™ reverse transcriptase kit (Promega, Madison) を使用して complementary DNA (cDNA) を作製した。次に、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara, Shiga, Japan) と標的遺伝子のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。遺伝子発現の定量評価には、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method を用いた。本研究で使用したプライマーは以下の通りである (h : human, m : mouse)

Target	Forward	Reverse
hFYN	TCATGATCTGCGCTTCCTCAA	TGGGCAGTTTGGGGAAGTATG
hSQSTM1	CTGTGGTAGGAACCCGCTAC	ACACAAGTCGTAGTCTGGGC
hLYN	ATGGCATAACATCGAGCGGAA	CCAGAACATTAGCTGCTCGC
hYES	AGTAACAAAGGGCCGAGTGC	GGCATCCTGTATCCTCGCTC
mTYMP	TGCACGCGGTGATAGATGG	AGCATGGCCCAATTTGTGT
mTNF α	AGCCGATGGGTTGTACCTT	ATAGCAAATCGGCTGACG
mIL-1 β	GCTTCAGGCAGGCAGTATCA	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
mIL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
mIL-7	TGCCCCGAATAATGAACCAAACCT	TGCGAGCAGCACGATTTAGA
mIL-10	AAGGGTTACTTGGGTTGCCA	CCTGGGGCATACTTCTACC
mIL-11	AACTAGCTGCACAGATGAGAGA	AAGATCCCAATGTCCCAGCG
mIL-23	TAATGTGCCCCGTATCCAGTG	GGCTGTTGTCCTTGAGTCCT
mSO FAT	TTGCTCAGAAGATGGGCCTG	GATGTCGTTGCGGTTCACTG
mTGF- β	TGGAGCTGGTGAAACGGAAG	CTGGCGAGCCTTAGITTTGGA
mRANKL	AGGGAGCACGAAAACTGGT	CGGAGCTTGAAAAATCCCCC
mOPG	TTTGCTGGGACCAAAGTGA	TTGTGAGCTGTGTCTCCGTT
mTRAP	TCTTCAGGACGAGAACGGTG	CCTTTCGTTGATGTCGCACA
mCTSK	CAGAAGCAGTATAACAGCAAGGT	CCCAAATTAACGCCGAGAGA
mMMP9	GCCAGCCGACTTTTGTGGTC	GTGTCCGTGAGGTTGGAGGT
mOSCAR	ACTCTCTGTGAGCTGTCCCTC	TGGGGGTATGAGGCTAGGGG

mNFATc1	GGAGAGTCCGAGAATCGAGAT	TTGCAGCTAGGAAGTACGTACGTCT
mDCSTAMP	CAAGGAACCCAAGGAGTCGT	AGGAATGCAGCTCGGTTCAA
mc-Fos	TACTACCATTCCCCAGCCGA	CGGACAGATCTGCGCAAAAAG
mNGF	CATCCACCCACCCAGTCTTC	CCAACCCACACACTGACACT
mTNFSF13	GCAGTACTCACCCAGAAGCA	TGTTAACTGGAACAAGATGCAGG
mTNFSF13B	GTGGTGAGGCAAACAGGCTA	GCAAAGATGGGGTCCGTGTA
mTNFSF14	TTGTGGTGATGGACAGACG	GTCTCCGGTGGTTCTGTTC
mTNFSF15	CACATTCCGAGGGACCACAT	AGTCTGGCTTGTGTTGGTTCGT

6-4. TYMP の破骨細胞形成メカニズムにおける抑制剤を用いた検証

5-2.、5-3.、5-4.、5-5.の結果、TYMP の破骨細胞形成メカニズムに FYN が関与していることが明らかとなった。このことから、6-1.の摩耗粉誘導骨吸収モデルに FYN の抑制剤である Saracatinib (Chemscene, NJ)を用いた検証を行うこととした。6-1.と同様の方法で摩耗粉誘導骨吸収モデルを作製した。Saracatinib は DMSO (Wako, Japan) と 300 μ l の corn oil (Wako)で溶解し、25mg/kg を経口投与した。投与回数は、摩耗粉移植前日と移植後 1、3、5 日目の計 4 回行った。摩耗粉移植後 7 日目に頭蓋骨を提出し、同様の方法で頭蓋骨表面の骨吸収域評価と、組織切片作製による細胞浸潤評価、TRAP 染色域評価をそれぞれ行った。Biological replicate を 6 とした。

7. 統計解析

本研究における統計解析には、GraphPad Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)を用いた。3 群以上の平均値を検定する場合は、ANOVA と Tukey の多重比較検定を用いた。2 群間の平均値の検定には、t 検定を用いた。統計結果は、平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean : SEM)で表し、p 値が 0.05 未満を有意とした。

結果

1. 無菌性緩みにおける破骨細胞形成因子の同定

無菌性緩みにおける破骨細胞形成因子の同定のために、ヒトマクロファージと人工的に作製した摩耗粉を24時間共培養したものに対してRNA-seqを行った。この結果、摩耗粉と共培養した群 (UHMWPE)では共培養していない群 (Mock)と比較して、2,143個の遺伝子が発現上昇していた (図 1. A)。次に、発現上昇した2,143個の遺伝子に対してGene Ontology エンリッチメント解析を行ったところ、“Osteoclast differentiation”タームや“Rheumatoid arthritis”タームが有意に上昇する結果となった (図 1.B)。さらに同遺伝子群に対してパスウェイ解析を行ったところ、Gene Ontology エンリッチメント解析と同じく、Osteoclasts differentiation や Rheumatoid arthritis が上昇する結果となった (図 1.C)。

この結果を検証するため、ヒトマクロファージとUHMWPE摩耗粉を共培養したものに対してTRAP染色を行ったところ、摩耗粉を加えることで破骨細胞が誘導された (図 2.)。以上の結果から、摩耗粉によるヒトマクロファージの刺激は、関節リウマチにおける破骨細胞形成に類似した反応が惹起されることが示唆された。

続いて、無菌性緩みにおける破骨細胞形成因子の絞り込みのために、Gene Ontology エンリッチメント解析における“Osteoclast differentiation”タームと“Rheumatoid arthritis”タームで上昇している因子12個を同定した (図 3.)。

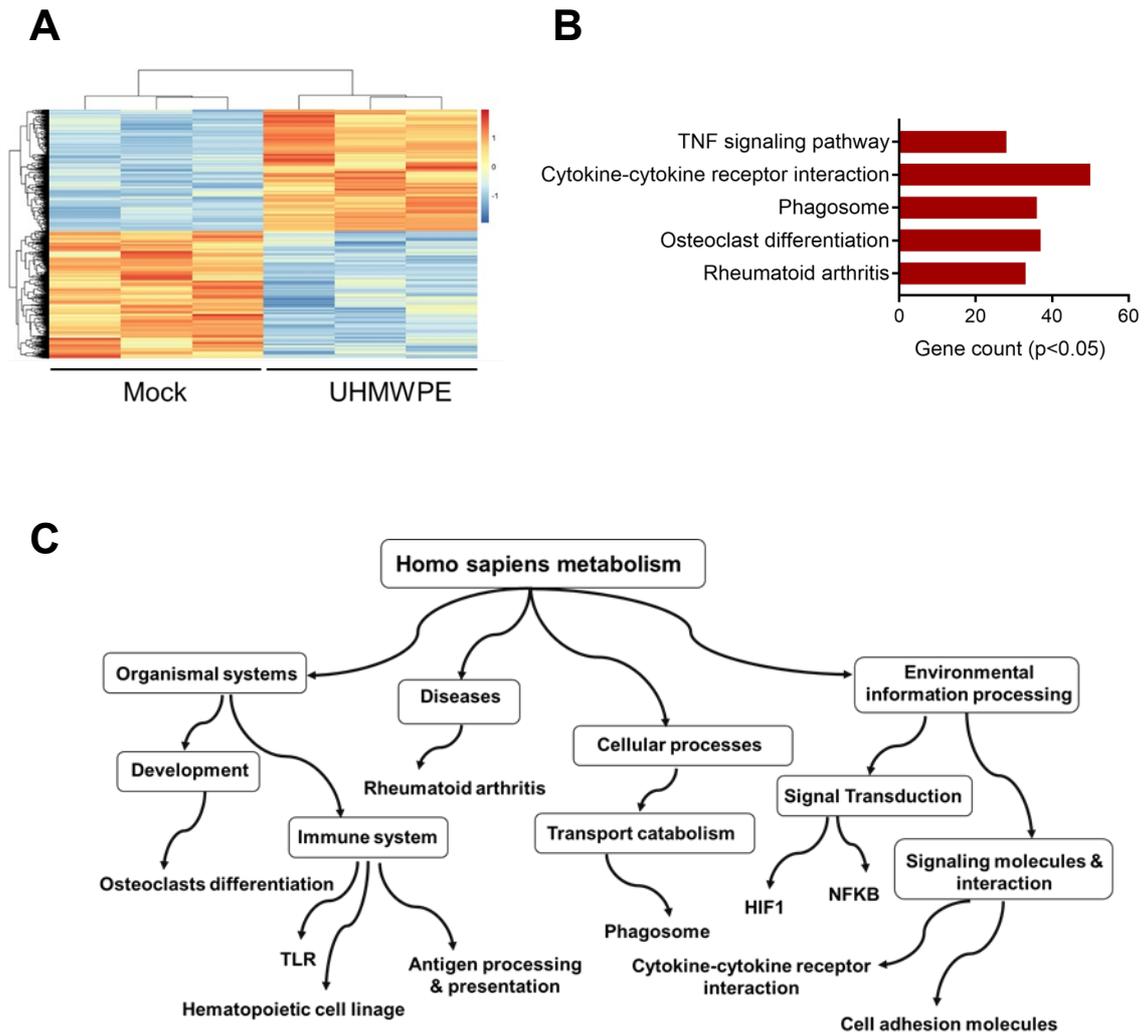


図 1. RNA-seq 結果 (ヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉との共培養)

- A) RNA-seq 結果のヒートマップ。UHMWPE が摩耗粉との共培養群、Mock は非共培養群をそれぞれ表す。データは標準化され、数値が高い方が橙色となる。
- B) 発現上昇した遺伝子に対する Gene Ontology エンリッチメント解析結果。縦軸はそれぞれ有意に上昇したタームを表し、下方に位置するターム程 p 値が低値となる。横軸は各タームに分類された遺伝子数を表す。
- C) 発現上昇した遺伝子に対してパスウェイ解析を行った結果。

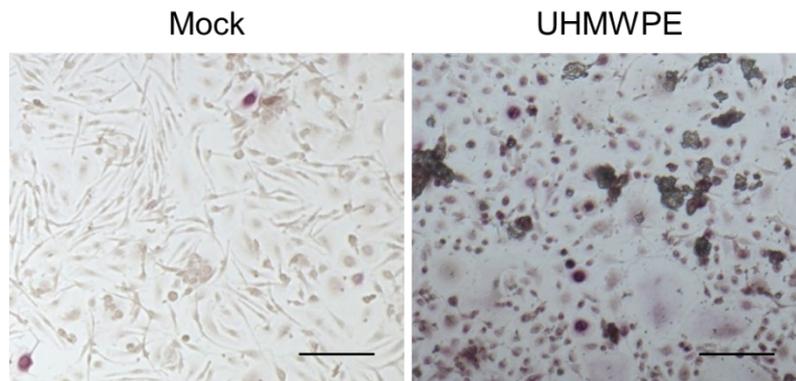


図2. ヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉を共培養し TRAP 染色したもの
 RNA-seq 結果の検証のため、ヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉の共培養後、
 TRAP 染色を行った。Mock は摩耗粉と共培養していない、ヒトマクロファージのみの
 群である。UHMWPE 摩耗粉との共培養により、TRAP 染色陽性で3核以上を有する
 破骨細胞が認められた。

スケールバー：100 μ m

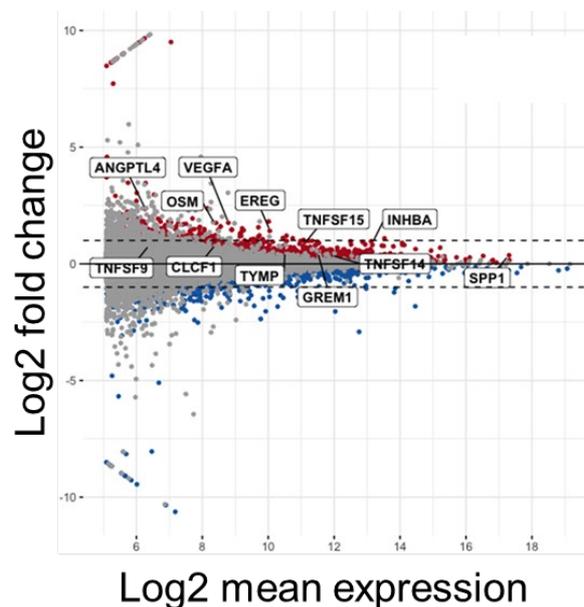


図3. RNA-seq 結果の MA プロット

有意差のある遺伝子において、Log2 fold change が 2.0 以上のものが赤色で、-2.0 以下
 のものが青色でそれぞれ示されている。本研究で同定した 12 個の因子について、その
 名称をプロット中に図示した。

2. 最も破骨細胞形成を促す因子の同定と *in vitro* 評価

結果 1. で同定した 12 個の因子の中から、最も破骨細胞形成を促す因子を同定するために、*in vitro* においてヒトマクロファージとそれぞれの因子を共培養した後、TRAP 染色を行い誘導破骨細胞数を計測した。この結果、TYMP が 12 個の因子の中で最も破骨細胞を誘導することが明らかとなった (図 4.)。そこで以下の実験では、TYMP に着目して行うこととした。

次に、TYMP が RANKL 非依存的に破骨細胞形成を促すかを検証するため、RANKL のデコイ受容体である OPG を用いて同様に *in vitro* で破骨細胞形成を検証した。この結果、TYMP は OPG の存在下であっても破骨細胞の形成が可能であった (図 5.)。

TYMP によって形成される破骨細胞の機能を検証するために、TYMP により誘導された破骨細胞に対してアクチン染色を行った。この結果、破骨細胞に特徴的である細胞周囲のアクチン染色が陽性となった (図 6.A)。また、TYMP により誘導された破骨細胞の骨吸収能を検証するために、象牙質切片上での培養を行った。この結果、有意差は無いものの、TYMP により誘導された破骨細胞は骨吸収傾向を示した (図 6.B)。

また、TYMP による破骨細胞形成の関与を検証するため、TYMP の siRNA を用いたノックダウン実験を行った。この結果、TYMP のノックダウンにより、破骨細胞形成数は有意に低下した (図 7.A-B)。

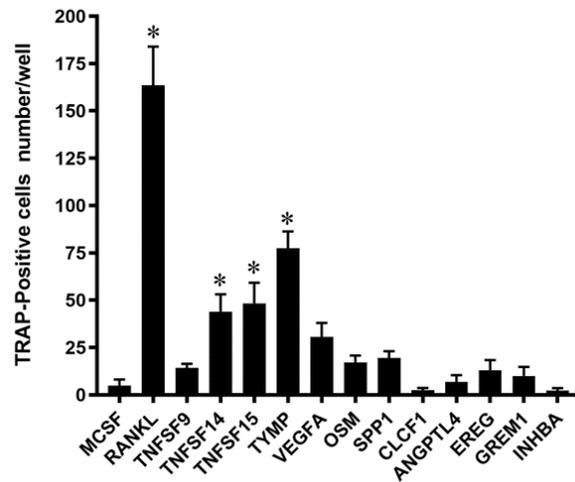


図4. 同定した12個の因子それぞれが誘導した破骨細胞数
 横軸に同定した12個の因子それぞれと、ネガティブコントロールであるMCSF(左端)、
 ポジティブコントロールであるRANKL(左端から2番目)を記載した。縦軸は誘導した破骨細胞数/well。*: $p < 0.05$

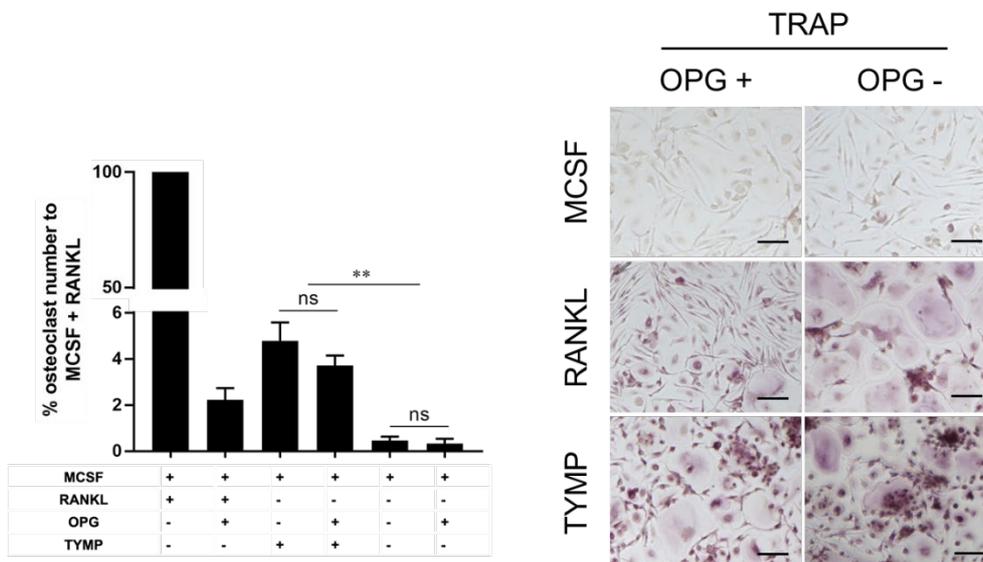


図5. OPGを用いたTYMPの破骨細胞形成評価
 左図の縦軸はポジティブコントロールであるMCSF+RANKLの破骨細胞形成数を100%とした時の、それぞれの条件(横軸)での破骨細胞数を表している。右図はOPG存在下でTYMPにより形成された破骨細胞を表す。OPG存在下ではRANKL刺激では破骨細胞は形成されていない。**: $p < 0.01$ 、スケールバー: 100 μ m

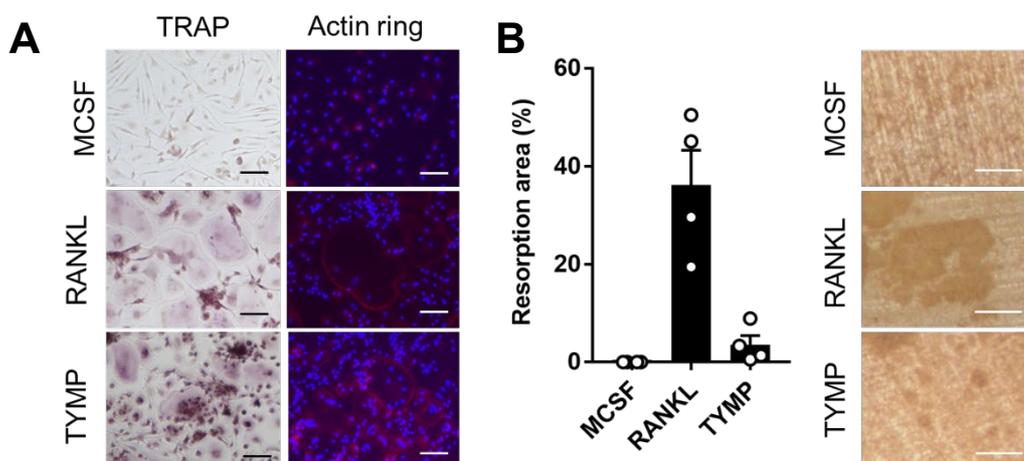


図 6. TYMP により誘導された破骨細胞の機能評価

- A) TYMP により誘導された破骨細胞の TRAP 染色 (左列)とアクチン染色 (右列)。ネガティブコントロールを MCSF 単独、ポジティブコントロールを RANKL 投与群とした。スケールバー：100 μ m
- B) 象牙質切片上での骨吸収窩の定量評価。左図縦軸が骨吸収窩 (%)を表し、横軸は各グループを表す。右図は象牙質切片を共焦点顕微鏡で撮影した画像。図中の濃色部分が骨吸収窩を示す。スケールバー：50 μ m

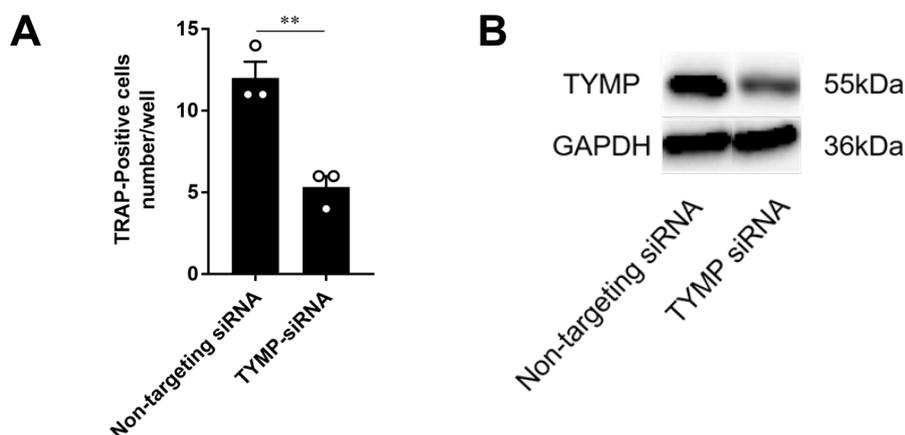


図 7. TYMP-siRNA を用いた破骨細胞形成評価

- A) TYMP-siRNA を用いたノックダウン実験の結果。縦軸はそれぞれのグループで形成された破骨細胞数/well を示す。TYMP-siRNA を使用することで、形成される破骨細胞数が有意に低下した。** : $p < 0.01$
- B) TYMP-siRNA による TYMP の発現低下をウェスタンブロッティング法で検証した結果。TYMP siRNA により TYMP の発現が抑制されている。

3. In vitro、in vivo、臨床検体における TYMP の同定

まずヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉で共培養したものに対して、TYMP の発現上昇をウェスタンブロットティング法で確認した。この結果、UHMWPE 摩耗粉での刺激群で有意に TYMP が上昇する結果となった (図 8.)。また、TYMP がどのマクロファージサブタイプに由来するかを検証するため、M0 型、M1 型、M2 型マクロファージそれぞれからタンパクを抽出し、ウェスタンブロットティング法で確認した。この結果、TYMP は M1 型で有意に高値となった (図 9)。

続いて、マウス摩耗粉誘導骨吸収モデルを用いて TYMP の発現を検証した。マウス頭頂骨に UHMWPE 摩耗粉を移植し、7 日目に頭蓋骨を摘出した。摘出した頭蓋骨から RNA を抽出し、qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。この結果、摩耗粉を移植していない Sham 群と比較して移植群で有意に TYMP の発現が上昇した (図 10.)。

最後に、ヒト臨床検体を用いて TYMP の発現を検証した。無菌性緩み症例 3 例から人工関節再置換術時に取得した関節液、関節滑膜と、採血により得た血清を用いた。関節液に対してはウェスタンブロットティング法を行うことで、TYMP タンパクの発現を確認した (図 11.A)。関節滑膜は免疫組織化学染色を行うことで、TYMP のみならずマクロファージのマーカーである CD68 の発現も確認した (図 11.B)。また、患者血清に対しては TYMP の血中濃度を ELISA 法で定量した。ネガティブコントロールには健常者 3 名の血清を用いた。この結果、無菌性緩み症例の血清において TYMP 濃度が有意に上昇した (図 11C.)。

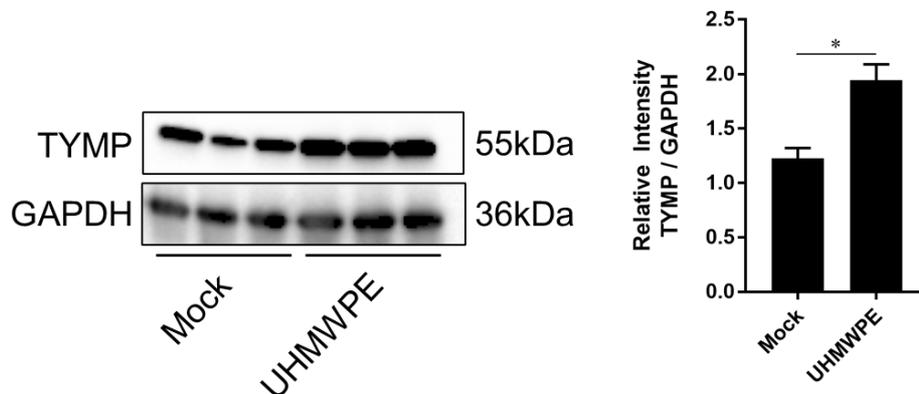


図 8. In vitro における TYMP の発現

In vitro でヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉を共培養したもの (UHMWPE 群)では、摩耗粉刺激していないもの (Mock 群)と比較して有意に TYMP が上昇した。右のグラフはバンドの定量評価結果を示しており、縦軸は GAPDH との比較強度である。

* : $p < 0.05$

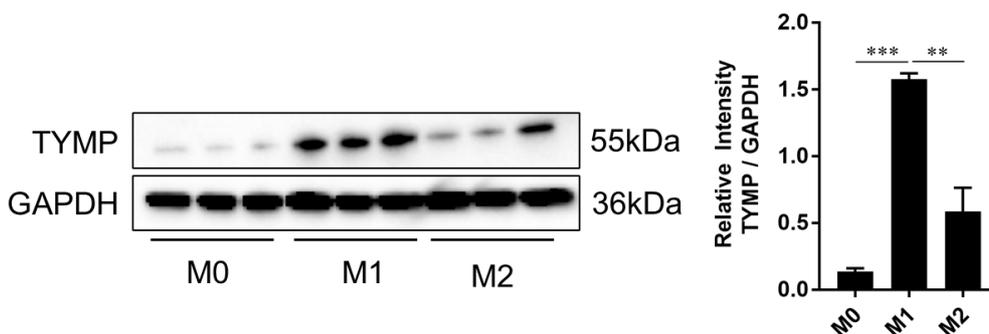


図 9. 各マクロファージサブタイプにおける TYMP の発現

M0 型、M1 型、M2 型マクロファージそれぞれにおける TYMP の発現結果。他のサブタイプと比較して、M1 型マクロファージにおいて有意に TYMP が上昇した。右図は定量評価のグラフで、縦軸が GAPDH に対するそれぞれの比較強度である。

** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$

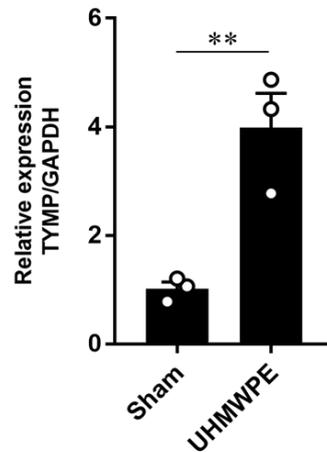


図 10. 摩耗粉誘導骨吸収モデルにおける TYMP の遺伝子発現解析

摩耗粉誘導モデルの頭蓋骨における遺伝子発現結果。UHMWPE 摩耗粉を移植した群において、移植していない Sham 群と比較して有意に TYMP の発現が増加した。

** : $p < 0.01$

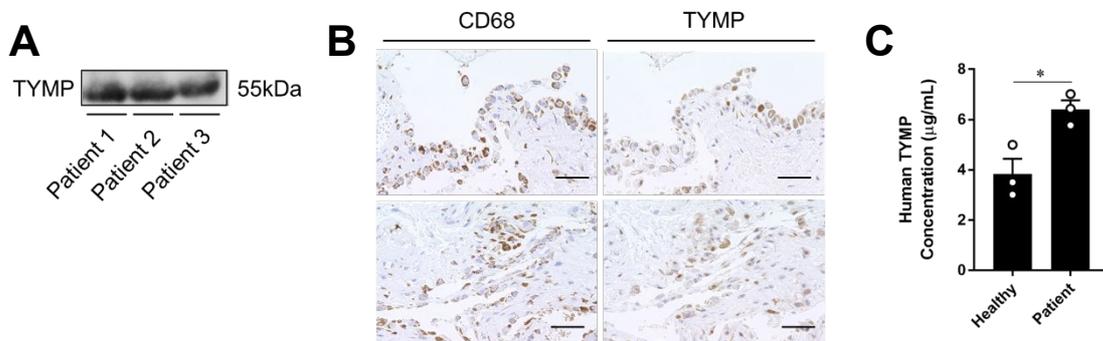


図 11. ヒト臨床検体における TYMP の同定

A) 無菌性緩み症例の関節液 3 例に対してウェスタンブロッティング法を行った結果。3 名とも TYMP の発現を認めた。

B) 無菌性緩み症例の関節滑膜を免疫組織化学染色したもの。左側 2 枚は CD68 で、右側 2 枚は TYMP でそれぞれ染色しており、同一行の画像は同一部位を表す。スケールバー : 50µm

C) 無菌性緩み症例と健常者の血清における TYMP 濃度の比較。無菌性緩み症例において TYMP 濃度が有意に上昇した。縦軸が TYMP の濃度 (µg/ml) を示している。 * : $p < 0.05$

4. マウス頭頂骨骨吸収モデルを用いた TYMP の骨吸収能評価

マウス頭頂骨に TYMP を吸収させたスポンジを移植して頭蓋骨に骨吸収を引き起こすモデルを用いて、TYMP の骨吸収能の評価を行った。スポンジ移植後7日目に頭蓋骨を摘出し、まずマイクロ CT による頭蓋骨表面の骨吸収域を定量評価した。この結果、ネガティブコントロール群 (PBS を吸収させたスポンジを移植した群とスポンジを移植していない Sham 群) と比較して、TYMP を移植した群において有意に骨吸収域が上昇した (図 12.A, D)。加えて、TYMP を移植した群はポジティブコントロール群 (RANKL を吸収させたスポンジを移植した群) と同等の骨吸収を示した。マイクロ CT 撮影後、マウス頭頂骨を脱灰・パラフィン包埋し、冠状断の組織標本を作製した。冠状断はマウス頭頂骨を3カ所に分け、その後の定量評価には遠位2カ所を使用した。まず H&E 染色ではマウス頭蓋骨上に堆積する細胞浸潤面積を定量評価し、各群で比較を行った。この結果、ネガティブコントロール群と比較して TYMP 移植群において有意に細胞浸潤が増加した。これは RANKL 移植群と同程度であった (図 12.B, D)。続いて、同じく頭蓋骨切片を TRAP 染色したものに対して、TRAP 染色域の定量評価を行った。この結果、H&E 染色と同様に TYMP 移植群においてネガティブコントロール群と比較して有意に TRAP 染色域が高く、また RANKL 移植群と同程度であった (図 12.C, D)。

次に、TYMP による骨吸収メカニズム解明のために同じくマウス頭頂骨骨吸収モデルを使用するが、移植後4日目に頭蓋骨を摘出したものに対して、qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。これは TYMP 移植群と PBS 移植群の2群間の比較を行い、TYMP 移植群において炎症性サイトカイン (IL-7, IL-11) と破骨細胞形成関連因子 (TRAP, Cathepsin K (CTSK), Matrix metalloproteinase 9 (MMP9), Osteoclast associated Ig-like Receptor (OSCAR), Nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1)) が有意に上昇した (図 13.)。

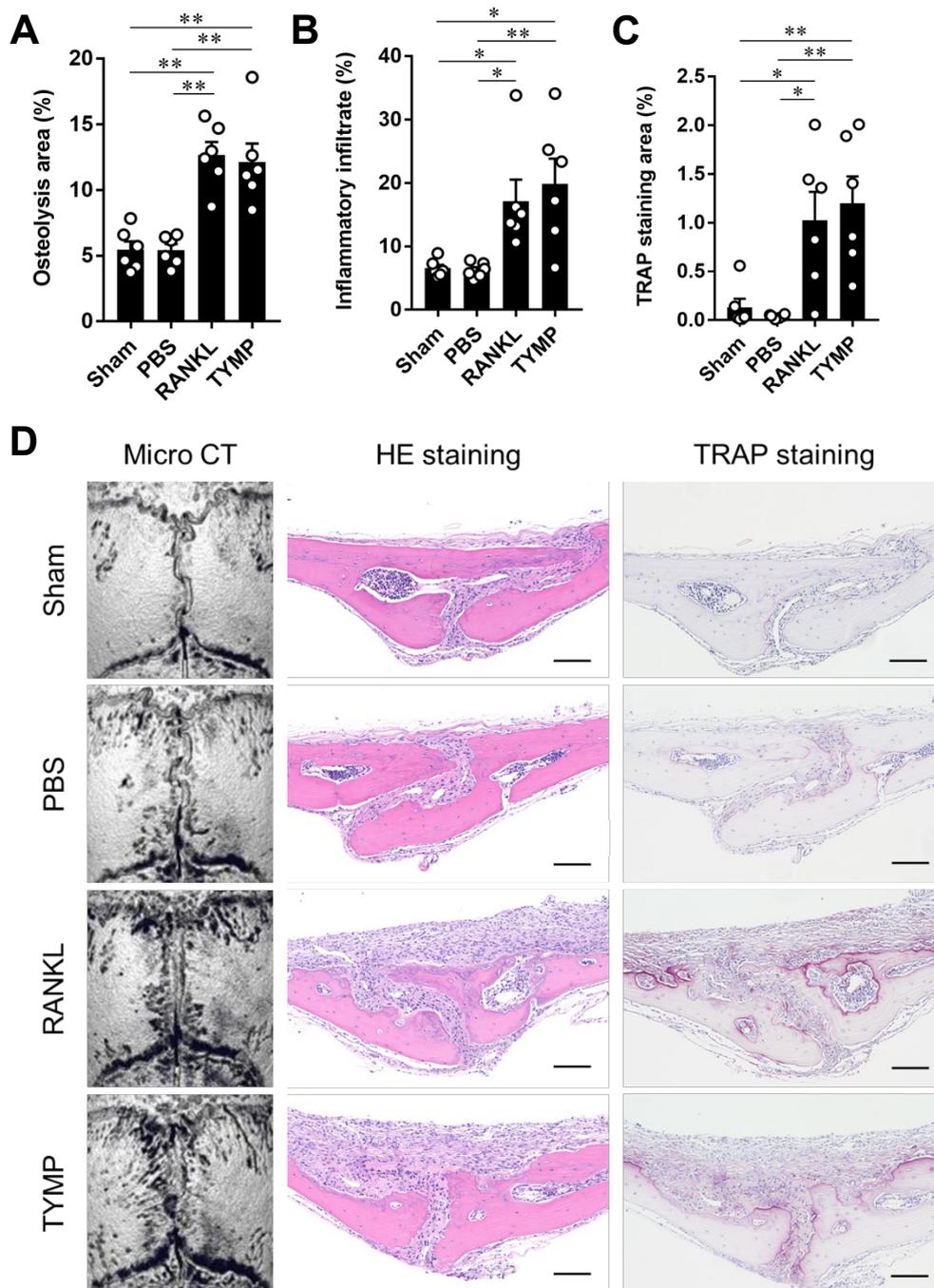


図 12. マウス頭頂骨骨吸収モデルを用いた TYMP の骨吸収能評価

A) マウス頭頂骨表面における骨吸収域の定量評価。

B) マウス頭頂骨冠状断 H&E 染色における細胞浸潤の定量評価。

C) マウス頭頂骨冠状断 TRAP 染色における TRAP 染色域の定量評価。

D) マイクロ CT、H&E 染色、TRAP 染色の各グループにおける代表画像。

*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、スケールバー : $50\mu\text{m}$

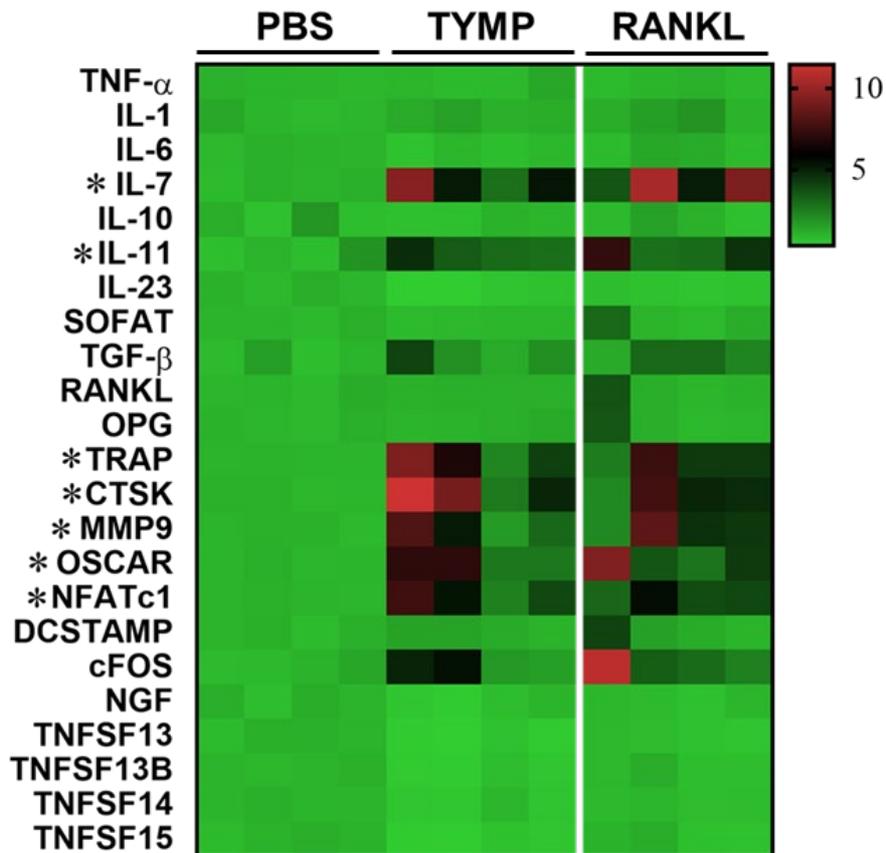


図 13. マウス頭頂骨骨吸収モデルを用いた遺伝子発現解析

マウス頭頂骨骨吸収モデルの頭蓋骨から RNA を抽出し遺伝子発現解析を行い、ヒートマップで表したもの。PBS 移植群と TYMP 移植群の 2 群間比較を行った。色が赤に近いほど発現が高値であり、緑に近いほど発現が低下したことを示している。右端の結果は RANKL 移植群の遺伝子発現解析結果。

* : $p < 0.05$

5. RNA-seq による TYMP の破骨細胞形成メカニズムの検証

TYMP の破骨細胞形成メカニズムを検証するために、ヒトマクロファージと TYMP を共培養したものから RNA を抽出し、RNA-seq を行った。この結果、ネガティブコントロール群 (MCSF 単独投与) と比較して、94 個の遺伝子が発現上昇した (図 14.A)。また、94 個の発現上昇遺伝子に対して Gene Ontology エンリッチメント解析を行ったところ、”Osteoclast differentiation” タームが有意に上昇する結果となった (図 14.B)。

Osteoclast differentiation タームには FYN、Sequestosome 1 (SQSTM1)、Mitogen-activated protein kinase 12 (MAPK12) が含まれていたが (図 14.C)、その中でも FYN に着目した。それは、RNA-seq のコントロールを RANKL 刺激群とした際にも、TYMP 刺激群で FYN は有意に上昇を示したからである (図 15.A, B)。これはつまり、TYMP が RANKL とは別の経路で FYN を介して破骨細胞形成を惹起している可能性を示唆していた。

一方、TYMP 刺激群と MCSF 単独刺激群との比較により発現上昇した 94 個の遺伝子に対する Gene Ontology エンリッチメント解析のうち、Molecular function と Biological process の結果は図 16. のようになった。特に Biological process では、NF- κ B シグナル伝達経路と Mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路が有意に上昇しており、これらが破骨細胞形成に関与する可能性が示唆された。

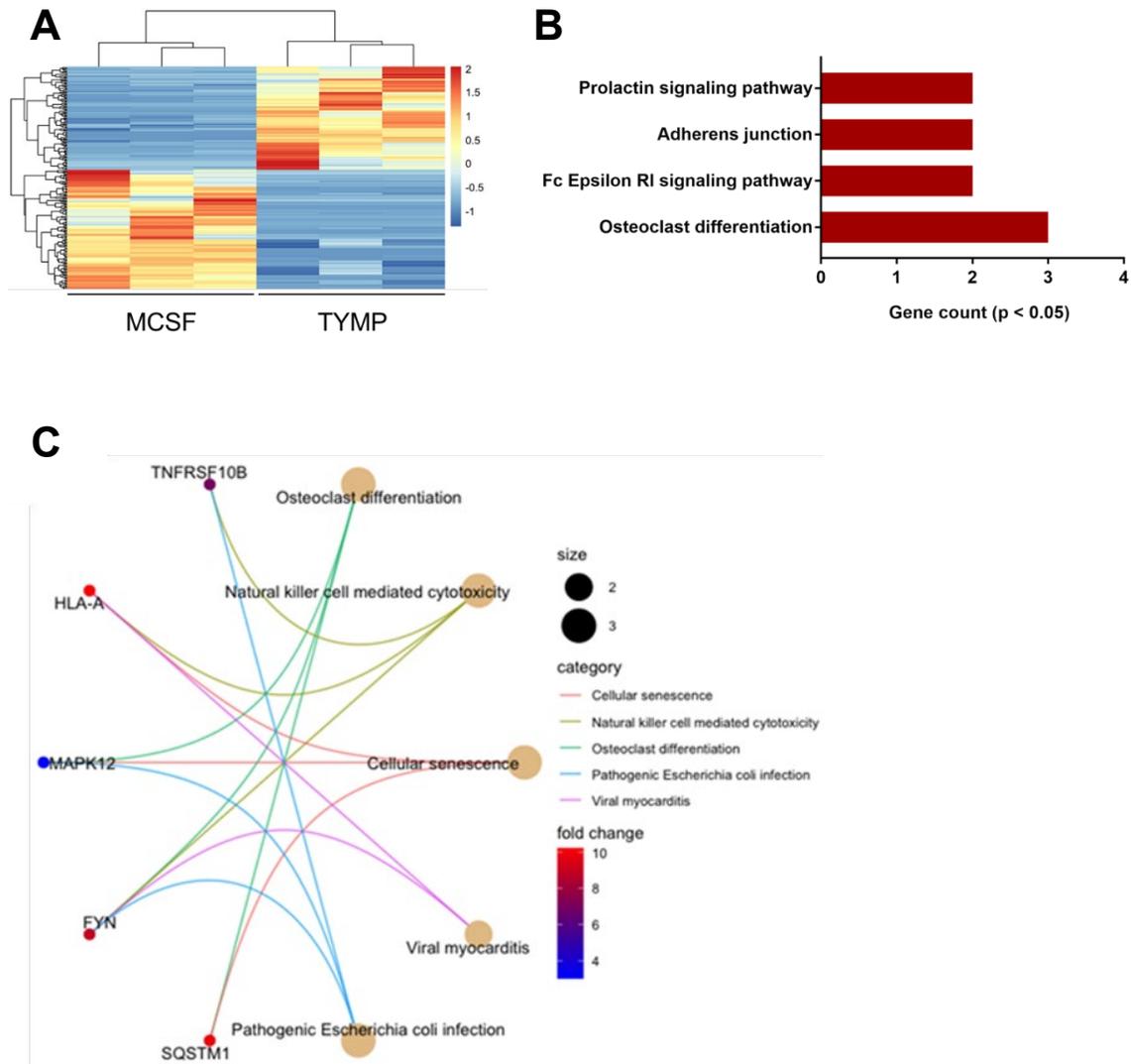


図 14. TYMP とヒトマクロファージを共培養したものに対する RNA-seq 結果

- A) TYMP 刺激群と MCSF 単独刺激群の発現遺伝子を示したヒートマップ。発現量は標準化されており、橙色が発現上昇を、青色が発現低下をそれぞれ表す。
- B) TYMP 群で遺伝子発現上昇したものに対する Gene Ontology エンリッチメント解析結果。縦軸がタームを、横軸は各タームに含まれる遺伝子数を表す。
- C) Gene Ontology エンリッチメント解析に対するサークルプロット。各タームに含まれる遺伝子を線でつないでいる。遺伝子発現は高値の場合赤色、低地の場合青色で示している。また、各タームの円のサイズは大きいほど多くの遺伝子を含むことを示す。

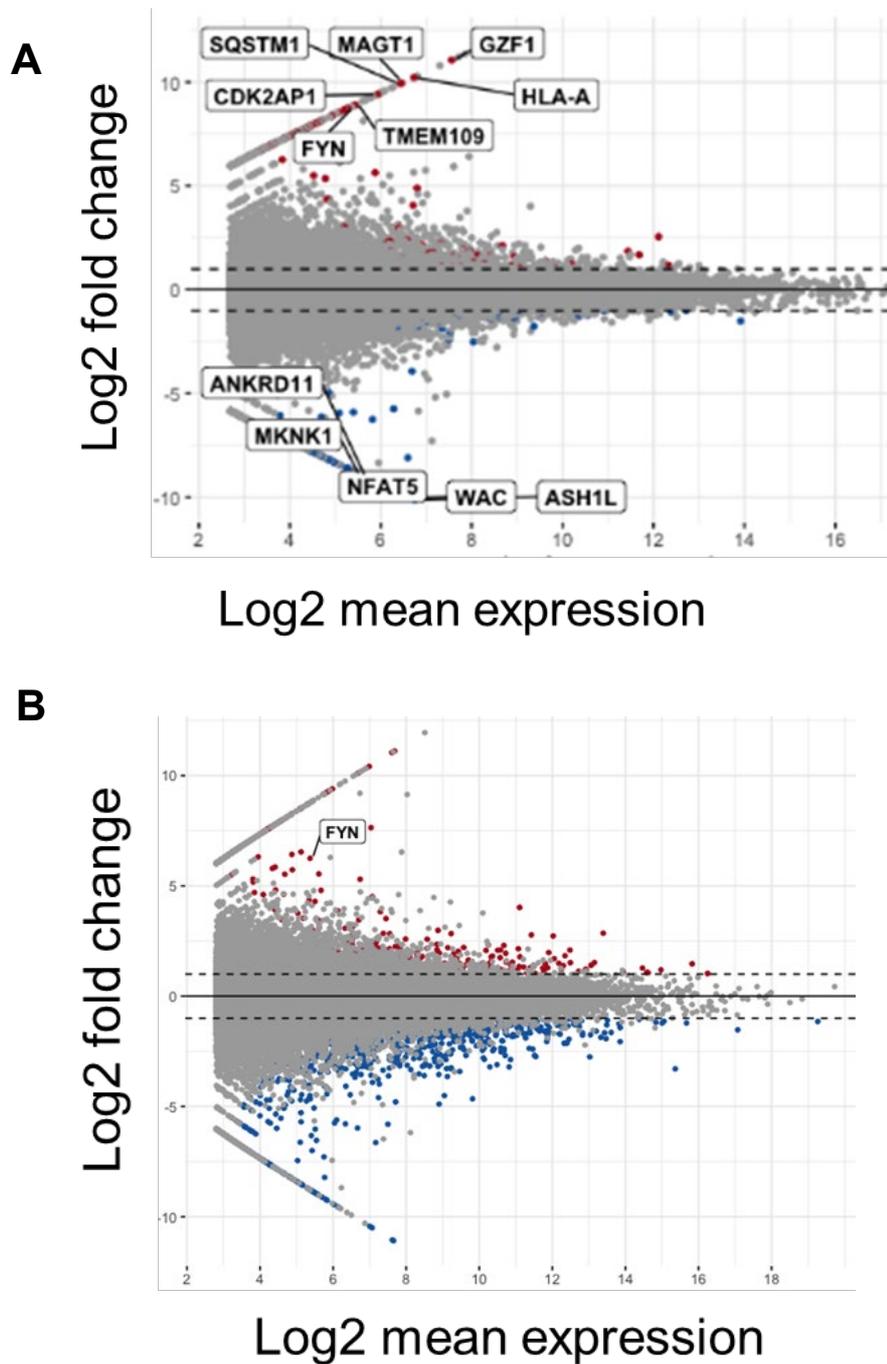


図 15. TYMP 刺激群に対して各コントロールと比較した MA プロット

- A) TYMP 刺激群と MCSF 単独刺激群とで比較した MA プロット。Osteoclast differentiation タームに含まれる FYN や SQSTM1 が発現上昇している。
- B) TYMP 刺激群と RANKL 刺激群とで比較した MA プロット。TYMP 刺激により FYN が上昇した。

A、B ともに $\text{Log}_2 \text{ fold change} > 2.0$ 、 $q < 0.05$ の遺伝子を赤色、 $\text{Log}_2 \text{ fold change} < -2.0$ 、 $q < 0.05$ の遺伝子を青色でそれぞれ示している。

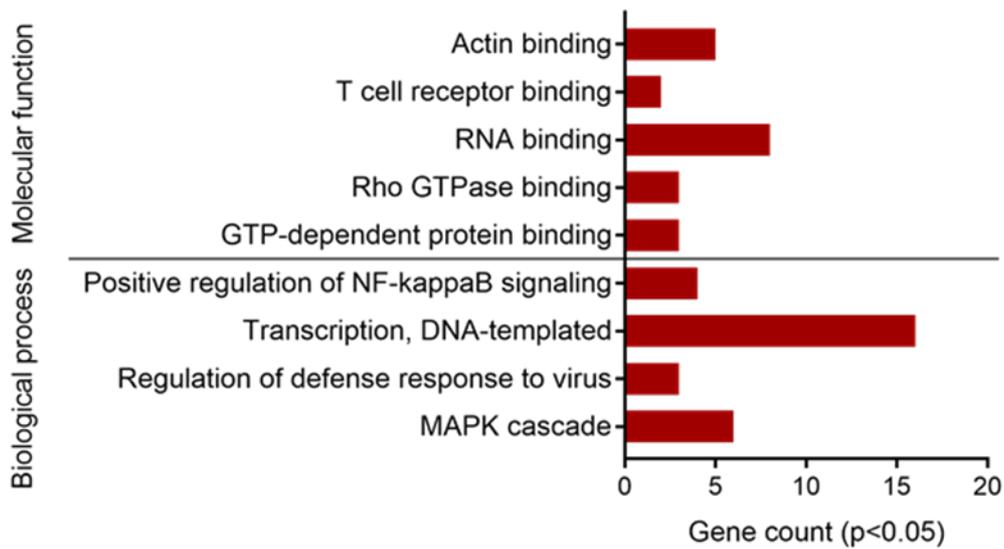


図 16. TYMP 刺激群と MCSF 単独刺激群とを比較した際の Gene Ontology エンリッチメント解析結果

図 14.B と同じデータでの Molecular function (上段) と Biological process (下段) をそれぞれ示した。どちらも縦軸が有意に上昇したタームであり、横軸は各タームに含まれる遺伝子数を示している。

6. RNA-seq 解析結果の検証

まず、ヒトマクロファージと TYMP の共培養により FYN と SQSTM1 の発現を検証した。ネガティブコントロール群として MCSF 単独共培養群、ポジティブコントロール群として RANKL 共培養群を用いた。培養は3時間行い、その後 RNA を抽出して、qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。この結果、TYMP 刺激群のみ FYN が増加する結果となった (図 17.)。対して、SQSTM1 はどの刺激でも上昇しなかった (図 17.)。このことから、TYMP による破骨細胞分化には FYN がより関与している可能性を考え、ウェスタンブロッティング法によるタンパク発現解析を行った。この結果、TYMP によるヒトマクロファージの3時間刺激により FYN 及びリン酸化 FYN が有意に上昇する結果となった (図 18.)。同じくヒトマクロファージを TYMP と3時間共培養したものに対して免疫蛍光染色を行ったところ、FYN の発現を確認した (図 19.)。

続いて、マクロファージ上における TYMP の受容体同定のためにプルダウンアッセイを行った。この結果、TYMP 刺激において FYN を同定した (図 20.A)。過去の報告で、FYN は ITGβ1 と複合体を形成し、乏突起膠細胞の分化に関与するとされており (Quintela-Lopez et al., 2019)、この点を踏まえプルダウンアッセイにおいて ITGβ1 も検証してみた。この結果、ITGβ1 も同定することが出来た (図 20.B)。この結果から、TYMP はマクロファージにおける FYN- ITGβ1 複合体に作用することで、破骨細胞形成に関与することが示唆された。一方、FYN は SFK メンバーの一種であり、これには LYN、YES などが含まれる。そこで、プルダウンアッセイを行う前に、これらの遺伝子発現解析を行った。ヒトマクロファージに対して TYMP を3時間刺激し RNA を抽出することで、qRT-PCR を行った。この結果、これらの因子は上昇しなかったため、プルダウンアッセイは行わなかった (図 21.)。

次に、マクロファージに対する TYMP 刺激における下流シグナルを同定するためにウェスタンブロッティング法を行った。この結果、NF-κB シグナル伝達経路と MAPK シグナル伝達経路に関する因子のうち、pc-Myc、pP38、pP65、pP50、pP105、pRELB が TYMP 刺激群で有意に上昇する結果となった (図 22.)。このことは、RNA-seq における Biological process の結果 (図 16.) と合致するものであった。

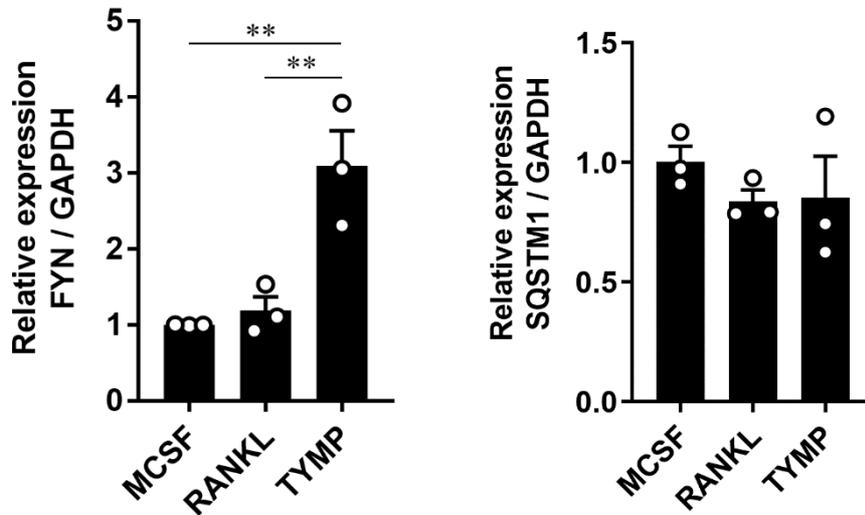


図 17. ヒトマクロファージと TYMP を共培養した際の FYN・SQSTM1 の発現
ヒトマクロファージを TYMP で 3 時間刺激することで、FYN 遺伝子が有意に発現上昇した。対して、MCSF 単独投与群、RANKL 刺激群では FYN 遺伝子の上昇は認められなかった。SQSTM1 はどの刺激でも特に変化はなかった。コントロールを GAPDH とした。*: $p < 0.01$

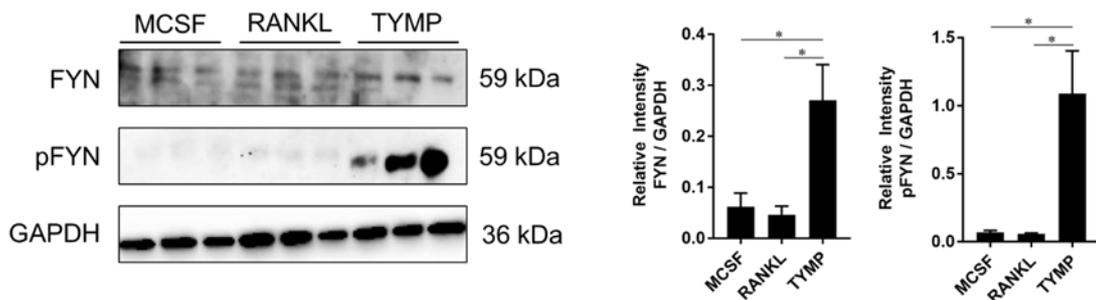


図 18. ヒトマクロファージと TYMP を共培養した際の FYN の発現
ヒトマクロファージを TYMP で 3 時間刺激することで、FYN 及び pFYN が有意に発現上昇した。対して、MCSF 単独投与群、RANKL 刺激群では FYN 及び pFYN の上昇は認められなかった。右のグラフは FYN 及び pFYN それぞれのバンド強度を定量評価したものである。コントロールを GAPDH としており、それぞれ GAPDH に対する相対的なバンド強度を計算した。*: $p < 0.05$

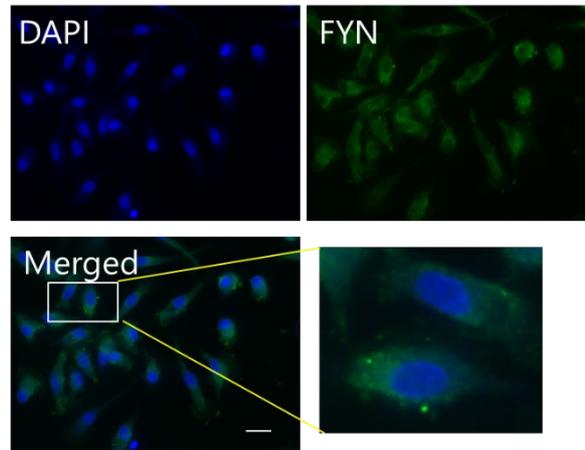


図 19. ヒトマクロファージと TYMP を共培養した時の免疫蛍光染色
ヒトマクロファージを TYMP で 3 時間後、FYN で免疫蛍光染色した。TYMP 刺激により FYN の存在が同定できた。スケールバー：20 μ m。

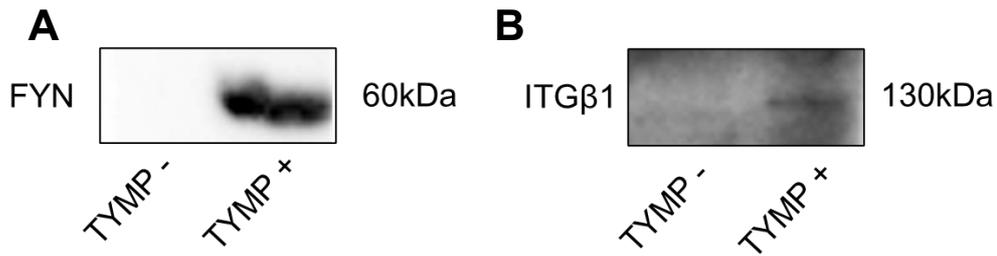


図 20. プルダウンアッセイの結果
 A) TYMP 存在下に FYN を同定した。
 B) TYMP 存在下に ITGβ1 を同定した。

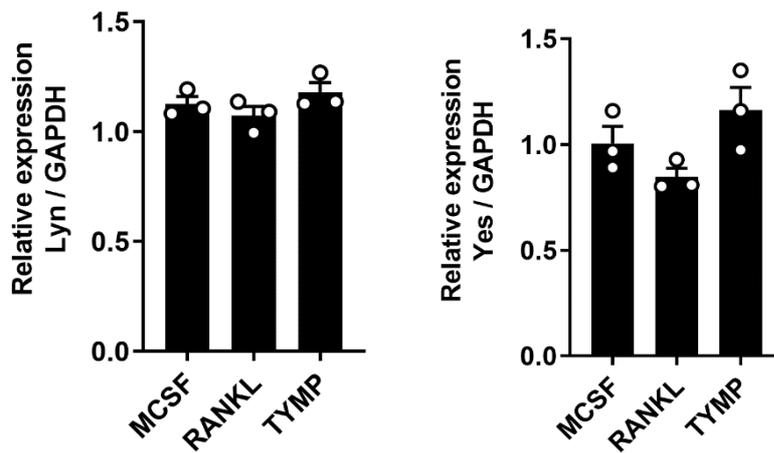


図 21. SFK メンバーに対する qRT-PCR
 ヒトマクロファージを TYMP で 3 時間後、RNA を抽出し qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

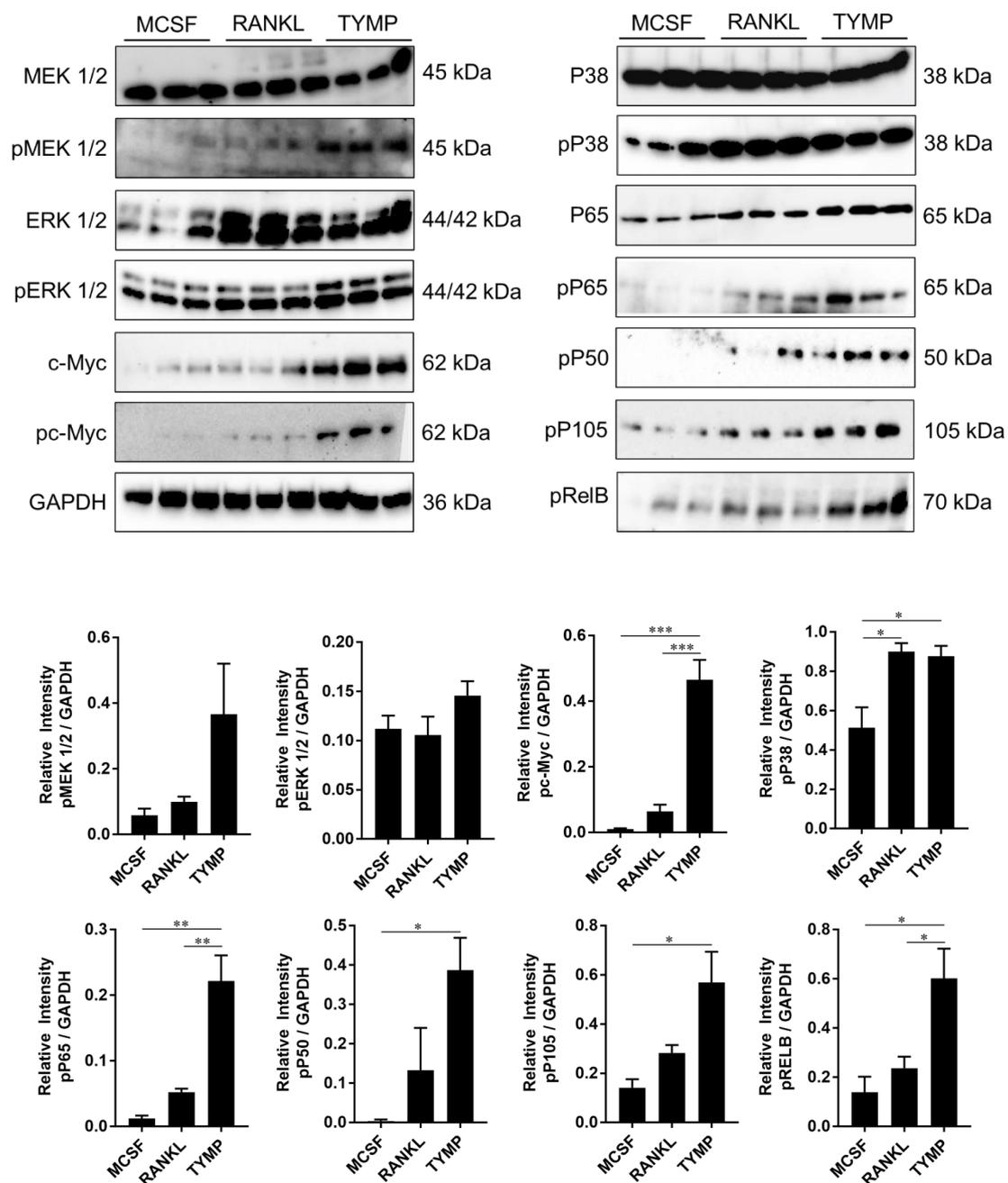


図 22. ヒトマクロファージと TYMP を共培養した際の下流シグナルの検証

(上段) ヒトマクロファージと TYMP を共培養したものからタンパクを抽出しウェスタンブロッティング法を行った結果。NF- κ B シグナル伝達経路と MAPK シグナル伝達経路に関する因子を検証した。

(下段) リン酸化因子におけるバンドの定量評価結果。それぞれ GAPDH に対する相対的なバンド強度を計算した。 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

7. FYN の抑制剤を用いた in vivo 検証

これまでの実験から、TYMP がマクロファージの ITGβ1 と FYN の複合体に作用し破骨細胞形成が惹起されることが示唆される。そこで、FYN の抑制剤 (Saracatinib) が摩耗粉誘導骨吸収モデルにおける骨吸収に及ぼす効果を検証することにした。この結果、抑制剤使用群では、マウス頭頂骨における骨吸収域と頭蓋骨内の TRAP 染色域が有意に低下することが判明した (図 23.A, C, D)。頭蓋骨上における細胞浸潤は、有意差はないものの抑制剤の投与により細胞浸潤が低下傾向を示した (図 23.B, D)。

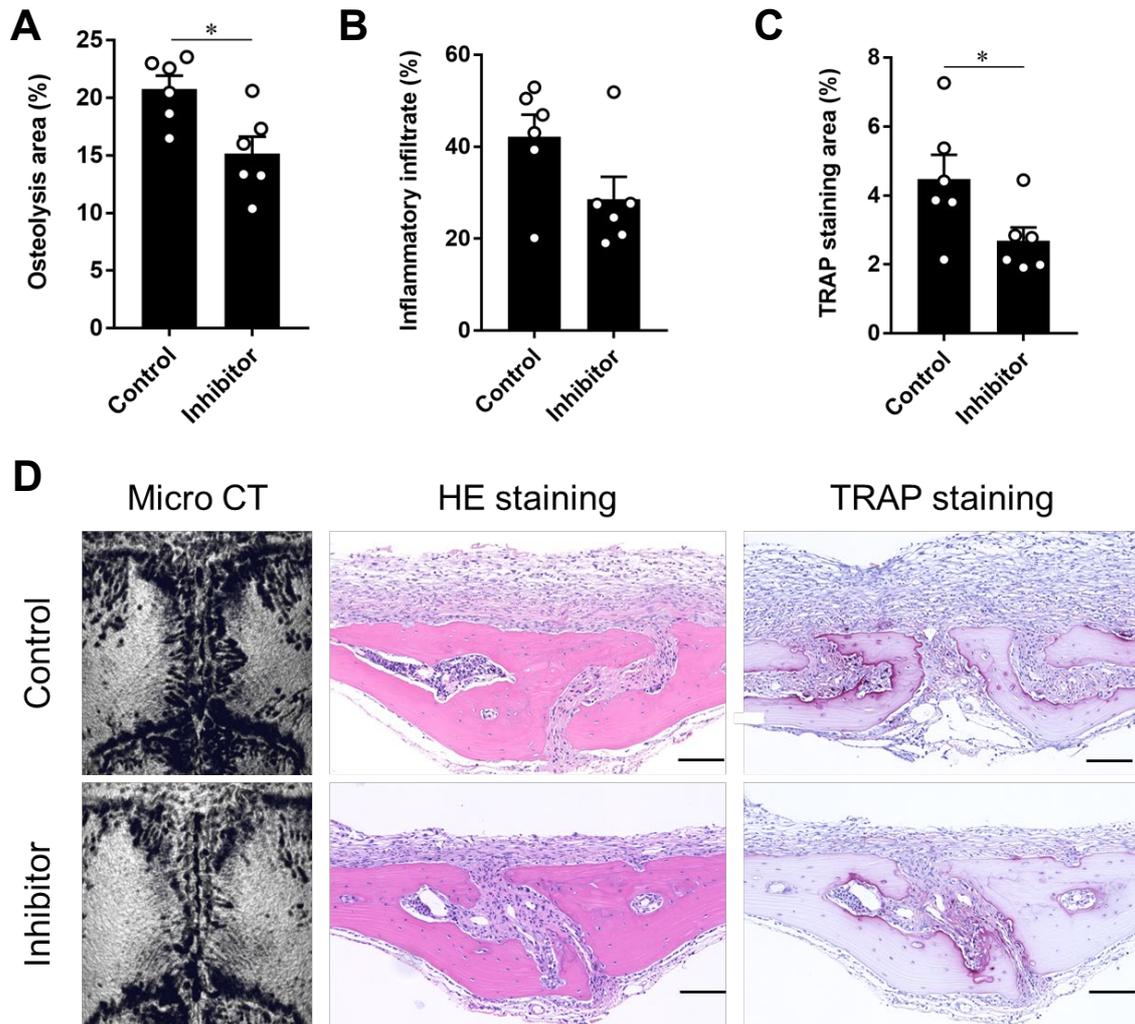


図 23. FYN の抑制剤を用いた *in vivo* 検証

- A) マウス頭頂骨表面における骨吸収域の定量評価。
 B) マウス頭頂骨冠状断 H&E 染色における細胞浸潤の定量評価。
 C) マウス頭頂骨冠状断 TRAP 染色における TRAP 染色域の定量評価。
 D) マイクロ CT、H&E 染色、TRAP 染色の各グループにおける代表画像。
 *: $p < 0.05$ 、スケールバー : 100 μ m

考察

炎症性マクロファージから放出される免疫因子が破骨細胞前駆細胞へ作用し、破骨細胞の成熟とそれに続く骨吸収に関与するという報告は多数ある。無菌性緩みにおいては、UHMWPE 摩耗粉の蓄積が組織常在マクロファージを持続的に活性化することで、破骨細胞分化・骨吸収が惹起されることによりインプラントの緩みが生じる。マクロファージはヘテロな集団であり、あらゆる組織に存在しながら主に炎症性の M1 型か抗炎症性の M2 型に極性を持つ。近年、骨内の骨梁構造表面に存在するとされる骨マクロファージの存在が明らかとなった。これは、骨芽細胞上に位置しながら、種々のサイトカイン放出により骨代謝を制御するとされている。炎症性マクロファージや骨マクロファージは、微小環境における刺激に応じて種々のサイトカインを放出する (Mbalaviele et al., 2017; Miron and Bosshardt, 2016)。こうした炎症性サイトカインは線維芽細胞や骨組織に作用することで、結果的にインプラント周囲の骨吸収を惹起する。事実、抗 TNF- α 抗体 (インフリキシマブ、アダリムマブなど) や抗 IL-6 抗体 (トシリズマブ) などの炎症性サイトカインの抑制剤が、無菌性緩みと同様の炎症性骨吸収を特徴とする関節リウマチ症例に臨床応用されている (Collison, 2018; Feldmann and Maini, 2003)。さらに、こうした生物学的製剤が無菌性緩みにも治療効果を有し得るという報告はいくつかある (Chen et al., 2012; Huang et al., 2013; Zhou et al., 2010)。しかしながら、未だ臨床応用されているものは皆無である。この一つの原因として過剰な免疫抑制が挙げられる。このため、より無菌性緩みを制御するより安全な治療薬開発のためのターゲットが必要となる。本研究では、無菌性緩みにおける破骨細胞の形成、及び骨吸収に TYMP が強く関与することを示した。

まず摩耗粉で刺激したマクロファージに対して網羅的遺伝子発現解析、及び破骨細胞分化アッセイを用いたスクリーニングにより TYMP を同定した。網羅的遺伝子発現解析には、過去の我々の論文 (Terkawi et al., 2018) のデータを使用した。FASTQ ファイルの方法論は変更した。このことにより、従来の方法でアライメントを行った結果と本研究で確立した方法による結果では多少の違いが現れた。とはいえ、元々同定していた因子が新しい方法論でも有意に同定することが出来た。実際これらの因子を破骨細胞分化アッセイを用いて破骨細胞能を検証した所、多少の違いはあるにせよ破骨細胞が誘導された。このことから、本研究における方法論にも妥当性があると考えられる。

このスクリーニングには過去に破骨細胞形成能を有すると報告されている TNFSF14 や TNFSF15、VEGFA 等が含まれていたが (Brunetti et al., 2014; Nakagawa et al., 2000; Terkawi et al., 2018)、その中でも TYMP が最も破骨細胞形成能を有することが明らかとなった。しかしながら、TYMP は象牙質切片では有意な骨吸収域を示さなかった。象牙質切片上での培養は誘導された破骨細胞の骨吸収能を評価している。ただ、細胞を播種する際の技術的な問題なのか、細胞が象牙質切片辺縁にいく傾向が強い。このため、骨吸収域はみられたものの、そのほぼ全てが辺縁であり、それでも強く骨吸収能を示す RANKL と比較して、骨吸収域が実際より低く評価されている可能性はある。一方、TYMP は、破骨細胞分化に必須とされる RANKL の阻害因子である OPG の投与下でも破骨細胞形成能を示した。OPG は RANKL のデコイ受容体であり、OPG 500 ng/ml 投与下でも破骨細胞を形成できたことは TYMP が RANKL 非依存性に破骨細胞形成を惹起する可能性を示唆する。しかしながら、破骨細胞形成における RANKL 非依存的な経路の活性化を真に証明するためには、RANKL ノックアウトマウスにおけるマクロファージを用いた破骨細胞形成実験を行わなければならない。この証明のため Cre/loxP システムを用いた RANKL ノックアウトマウスの作製に着手した。しかしながら、本論文作成時点でノックアウトマウスが完成していないため、将来的な課題となる。RANKL ノックアウトマウスは歯の萌出がないことから、育成するのが困難なマウスである。同時に、骨皮質が非常に厚く固いため、骨髄からマクロファージを得ることが出来ない。このため脾臓からマクロファージを抽出し、*in vitro* で破骨細胞分化能を検証することになる。

ヒトサンプルを用いた検証では、無菌性緩み患者の滑膜において TYMP の発現を確認した。TYMP の発現と同時に、CD68 の発現も確認できたことから、同定した TYMP がマクロファージ由来であることが示唆された。興味深いことに、摩耗粉を用いた破骨細胞分化アッセイにおいて TYMP をノックダウンしたところ、破骨細胞形成が有意に低下した。ただ、ノックダウンの実験ではネガティブコントロール群、ポジティブコントロール群両方において、形成される破骨細胞の絶対数が低下していることから、リポフェクタミンによる細胞毒性も考慮に入れた方が良いと思われる。スポンジを用いたマウス頭頂骨骨吸収モデルを用いた検証では、TYMP の投与により RANKL 投与に匹敵する骨吸収効果が得られた。*In vitro* の破骨細胞分化アッセイ、骨吸収アッセイと比較すると、この結果は驚くべきものであるが、恐らく *in vivo* においては TYMP 単

独の破骨細胞形成だけでなく、他のシグナル伝達が複合的に関与して破骨細胞の過形成と骨吸収に繋がっていると考えられる。とはいえ、これらの結果から TYMP は無菌性緩みにおける破骨細胞形成、骨吸収に関与する因子であることが示唆される。事実、無菌性緩みと同様に局所的な炎症と骨吸収を起こす疾患である関節リウマチや悪性腫瘍の骨転移においても、TYMP が上昇することが報告されている (Bronckaers et al., 2009; Goto et al., 2012; Liu et al., 2016; Toyoda et al., 2014)。悪性腫瘍の骨転移では、TYMP が破骨細胞前駆細胞表面のインテグリンに結合し、PI3K/Akt シグナルを活性化することで、IRF8 のメチル化を促進し、最終的に破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 を発現させることで、破骨細胞形成・骨吸収を惹起する (Liu et al., 2016)。

TYMP は当初、チミジンとデオキシウリジンの可逆的なリン酸化を触媒する酵素として同定された。TYMP は主にマクロファージで発現をしており、血管新生や腫瘍の成長、浸潤、転移に関与する。悪性腫瘍における TYMP 濃度の上昇は、予後不良因子の一つである (Goto et al., 2012; Kawahara et al., 2010; Shimaoka et al., 2000)。細胞内の TYMP は、細胞質でミトコンドリア DNA の維持に関与し、TYMP の遺伝子変異はミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症の原因となる。これは、眼瞼下垂、進行性の外眼筋麻痺、末梢神経障害、重度の腸管運動障害、悪液質、白質脳症を特徴とする疾患である (Hirano et al., 2005)。過去には TYMP ノックアウトマウスも作製されたが、明らかな表現型を示さないため、骨解析に使用するのは困難と考え、本研究では使用しなかった。一方、免疫細胞から放出される細胞外 TYMP は TNF- α や IL-6、IL-8、CLCL10 などの炎症促進因子の発現や、NF- κ B 経路を通じて Reactive oxygen species (ROS) の産生を促す。また、細胞外 TYMP は Src family kinase (SFK) を含む SH3 ドメインへの結合とインテグリンの活性化により、血小板と血栓形成を促進する。実際、マクロファージから放出された TYMP はアテローム性プラークの形成に関与し、結果的に致命的な心血管疾患を引き起こす (Li and Yue, 2018)。以上の知見は、TYMP が組織リモデリングに関する様々な経路の活性化に強く関与していることを示唆している。

さらに本研究結果から、マクロファージを TYMP で刺激することで、FYN 活性が上昇すること、さらに FYN は ITGB1 と複合体を形成することが明らかとなった。特筆すべき点は、TYMP による 3 時間の培養のみで RANKL 刺激とは明らかに異なる FYN の発現がみられたことである。このことは、TYMP が RANKL とは別の経路で破骨細胞分化を促進する可能性を示唆している。過去に、TYMP が直接 SFK の N 末端

と結合し血小板の活性化と凝集を促すとする報告があるが、本研究結果はこれに合致したものとなった (Li and Yue, 2018)。SFK には Src、Yes、Fyn、Fgr、Lck、Hck、Blk、Lyn、Frk が含まれ、これらは非受容体型チロシンキナーゼとして破骨細胞の生存と機能に関与している (Miyazaki et al., 2004)。この中でも特に FYN は、破骨細胞の増殖と分化、アポトーシスの抑制に強く関与している (Kim et al., 2010)。本研究では SFK の中で特に FYN の発現が上昇する一方、LYN や YES の上昇は認めなかった。つまり、SFK というよりは FYN が破骨細胞分化に強く関与していることが推察される。一方、FYN とインテグリンの結合は、細胞内シグナル伝達に関与することで、細胞活性化や増殖、分化を促す (Liang et al., 2004; Liu et al., 2016; Quintela-Lopez et al., 2019)。FYN と ITGβ1 の結合は、希突起膠細胞の分化や成熟、生存を制御することが報告されている (Liang et al., 2004; Quintela-Lopez et al., 2019)。こうした知見は、TYMP 刺激による破骨細胞分化において FYN/ITGβ1 シグナルが重要であることを示唆している。

TYMP は Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) の発現低下を介して、結果的に NFATc1 の発現を上昇させることで破骨細胞形成を促すことが報告されてきたが、本研究結果はそれとは異なる骨吸収メカニズムを明らかにした (Liu et al., 2016)。本研究における TYMP 刺激によるマクロファージに関する RNA-seq 結果では、IRF8 の発現低下は認めなかった。これは、TYMP が IRF8 を介さない別のメカニズムで破骨細胞形成を惹起することを示唆している。しかしながら、本研究結果と過去の研究結果の相違の原因として、異なった方法を用いたことが挙げられる。事実、我々はヒトマクロファージに対して TYMP 単独で刺激を行ったが、Liu らは単球に骨髄腫細胞と少量の RANKL を添加している (Liu et al., 2016)。一般に、破骨細胞形成は RANKL を介する canonical pathway と RANKL を介さない noncanonical pathway (RANKL independent) に大別できる。Canonical pathway では、RANKL が受容体である RANK に結合し、下流シグナルである TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) の発現と、NF-κB、MAPK、activator protein 1 (AP-1) の活性化を通じて破骨細胞が形成される (Nakashima and Takayanagi, 2011)。TRAF6 と NF-κB、c-Fos の活性化は、NFATc1 を産生し、結果的に破骨細胞の成熟を促す。Noncanonical pathway では、現在の所 TNF-α や IL-6、IL-11、LIGHT などが *in vitro* において RANKL 刺激なしで破骨細胞を形成することが報告されている (Sabokbar et al., 2016)。これらの因子は、NF-κB、MAPK、NFATc1 の発現を経て破骨細胞形成に関与する。しかしながら、noncanonical pathway により形成された破骨細胞と

その骨吸収窩は、canonical pathway のそれよりも小規模であることが報告されている (Sabokbar et al., 2016)。加えて、現在の所 RANKL または RANK ノックアウトマウスの細胞を用いた破骨細胞分化の報告はない。このことから、従来の noncanonical pathway と言われる経路で形成された破骨細胞は、正常な機能を持った破骨細胞ではない可能性がある。これは破骨細胞様細胞などと呼ばれる。TYMP 刺激は NF- κ B と MAPK の活性化を介して破骨細胞形成を促すことが本研究により明らかとなり、これは RANKL による破骨細胞形成と類似している。In vitro において OPG の存在下に TYMP が破骨細胞形成が可能であったが、RANKL ノックアウトマウスの細胞を用いた実験は行っていないため、TYMP が noncanonical pathway で破骨細胞分化を誘導出来るとするのは早計である。一方、過去の報告で T 細胞の活性化に FYN と MAPK、NF- κ B との関連が存在することがいわれている (Lovatt et al., 2006; Yu et al., 2020)。これらの知見からも、TYMP が多数のシグナル経路に関与することが示唆される。

本研究結果の一例として、FYN の抑制剤である saracatinib を用いた in vivo 検証を行った。本研究結果から saracatinib の経口投与により、マウス頭頂骨の骨吸収域が有意に低下することが明らかとなった。Saracatinib は Src 阻害剤の一種であるが、FYN 特異的な阻害剤ではない。本実験を行うにあたり、FYN 特異的な阻害剤を発見出来なかったため Saracatinib を用いたが、Saracatinib は FYN だけではなく、同じく SFK に属する SRC、LCK、LYN、YES を阻害する。このため、FYN の抑制効果のみならず、他の SFK 因子抑制による骨吸収抑制効果も考えられる点が本実験における limitation である。とはいえ、in vitro の結果からは LYN、YES の上昇は認めなかったため、Saracatinib が FYN 特異的な阻害剤ではないにせよ、FYN の抑制が骨吸収抑制に強く関与している可能性は高い。従来 Src 抑制剤はモデルマウスにおける悪性腫瘍の骨転移に対して治療効果があることが報告されている (Heusschen et al., 2016)。このため、より安全で効果的な濃度による saracatinib の投与は、無菌生緩みにおける骨吸収を制御する治療薬になり得ると考えられる。

総括および結論

- ・ 無菌性緩みにおける骨吸収メカニズムを検証するために、ヒトマクロファージと摩耗粉との共培養から RNA-seq を行った。この結果、有意に発現上昇した遺伝子群は破骨細胞形成や関節リウマチに関連するものが多数認められた。
- ・ RNA-seq の結果から、無菌性緩みにおいて破骨細胞形成に関与し得る 12 個の因子を同定した。これら 12 個の因子に対して、破骨細胞形成能の観点からさらにスクリーニングを行い、thymidine phosphorylase (TYMP) を同定した。TYMP により形成される破骨細胞は骨吸収能を示し、RANKL のデコイ受容体である OPG の存在下でも破骨細胞形成を示した。また、TYMP をノックダウンすることにより、有意に破骨細胞の形成が抑制された。
- ・ In vitro、in vivo、臨床検体において TYMP の発現を確認した。いずれにおいても、摩耗粉や無菌性緩みが関与する場合に TYMP が有意に上昇する結果となった。加えて、TYMP は M1 型マクロファージに由来することが判明した。
- ・ In vivo における TYMP の骨吸収能評価では、TYMP をマウス頭頂骨上に移植することにより、ネガティブコントロール群と比較して有意な骨吸収と細胞浸潤を認めた。また、遺伝子発現解析では炎症性サイトカインや破骨細胞形成マーカーが有意に上昇した。
- ・ TYMP の破骨細胞形成メカニズム検証のために RNA-seq を行った。この結果、破骨細胞形成において FYN が有意に上昇する結果となった。また、Biological process では NF- κ B シグナル伝達経路や MAPK シグナル伝達経路の関与が示唆された。実際、in vitro において TYMP 刺激による FYN の発現上昇や下流シグナルとしての NF- κ B シグナル伝達経路と MAPK シグナル伝達経路の上昇を確認した。プルダウンアッセイでは、TYMP が ITG β 1-FYN 複合体に結合することが示された。
- ・ FYN の抑制剤である Saracatinib をモデルマウスに使用することで、有意に骨吸収が低下した。この結果は、Saracatinib の将来的な臨床応用の可能性を示唆した。

本研究結果から、摩耗粉に刺激された炎症性マクロファージ由来の因子として TYMP を同定した。破骨細胞形成に関する TYMP-FYN の機能的関連を検証することで、これまで薬物治療法の存在しない無菌性緩みに対して、FYN が治療ターゲットとなり得ることを示した。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野博士課程の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室、岩崎倫政教授に深い謝意を表します。また本研究全般にわたり、直接のご指導ご鞭撻を賜りました同、Mohamad Alaa Terkawi 助教に心より感謝致します。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様に心より感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献 References

- Bronckaers, A., Gago, F., Balzarini, J., and Liekens, S. (2009). The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Med Res Rev* 29, 903-953.
- Brunetti, G., Rizzi, R., Oranger, A., Gigante, I., Mori, G., Taurino, G., Mongelli, T., Colaianni, G., Di Benedetto, A., Tamma, R., *et al.* (2014). LIGHT/TNFSF14 increases osteoclastogenesis and decreases osteoblastogenesis in multiple myeloma-bone disease. *Oncotarget* 5, 12950-12967.
- Chen, D., Zhang, X., Guo, Y., Shi, S., Mao, X., Pan, X., and Cheng, T. (2012). MMP-9 inhibition suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis through downregulation of RANK/RANKL in a murine osteolysis model. *Int J Mol Med* 30, 1417-1423.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34, i884-i890.
- Cobelli, N., Scharf, B., Crisi, G.M., Hardin, J., and Santambrogio, L. (2011). Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. *Nat Rev Rheumatol* 7, 600-608.
- Collison, J. (2018). Rheumatoid arthritis: Tocilizumab prevents progression of bone erosions. *Nat Rev Rheumatol* 14, 4.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.
- Feldmann, M., and Maini, R.N. (2003). Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 9, 1245-1250.
- Garrigues, G.E., Cho, D.R., Rubash, H.E., Goldring, S.R., Herndon, J.H., and Shanbhag, A.S. (2005). Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. *Biomaterials* 26, 2933-2945.
- Goto, T., Shinmura, K., Yokomizo, K., Sakuraba, K., Kitamura, Y., Shirahara, A., Saito, M., Kigawa, G., Nemoto, H., Sanada, Y., *et al.* (2012). Expression Levels of Thymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, and Thymidine Phosphorylase in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res*, 1757-1762.
- Gu, Q., Yang, H., and Shi, Q. (2017). Macrophages and bone inflammation. *J Orthop Translat* 10, 86-93.
- Heusschen, R., Muller, J., Binsfeld, M., Marty, C., Plougonven, E., Dubois, S., Mahli, N., Moermans, K., Carmeliet, G., Leonard, A., *et al.* (2016). SRC kinase inhibition with saracatinib limits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Oncotarget* 7, 30712-30729.
- Hirano, M., Lagier-Tourenne, C., Valentino, M.L., Marti, R., and Nishigaki, Y. (2005). Thymidine

phosphorylase mutations cause instability of mitochondrial DNA. *Gene* 354, 152-156.

Huang, J.B., Ding, Y., Huang, D.S., Liang, A.J., Zeng, W.K., Zeng, Z.P., Qin, C.Q., and Barden, B. (2013). Inhibition of the PI3K/AKT pathway reduces tumor necrosis factor-alpha production in the cellular response to wear particles in vitro. *Artif Organs* 37, 298-307.

Ingham, E., and Fisher, J. (2005). The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 26, 1271-1286.

Kandahari, A.M., Yang, X., Laroche, K.A., Dighe, A.S., Pan, D., and Cui, Q. (2016). A review of UHMWPE wear-induced osteolysis: the role for early detection of the immune response. *Bone Res* 4, 16014.

Kawahara, A., Hattori, S., Akiba, J., Nakashima, K., Taira, T., Watari, K., Hosoi, F., Uba, M., Basaki, Y., Koufujii, K., *et al.* (2010). Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer. *Oncol Rep* 24, 405-415.

Kim, H.J., Warren, J.T., Kim, S.Y., Chappel, J.C., DeSelm, C.J., Ross, F.P., Zou, W., and Teitelbaum, S.L. (2010). Fyn promotes proliferation, differentiation, survival and function of osteoclast lineage cells. *J Cell Biochem* 111, 1107-1113.

Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Kohara, H., Yoshimatsu, M., and Takano-Yamamoto, T. (2013). Immunological reaction in TNF-alpha-mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol* 2013, 181849.

Li, B., and Dewey, C.N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323.

Li, W., and Yue, H. (2018). Thymidine phosphorylase: A potential new target for treating cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 28, 157-171.

Liang, X., Draghi, N.A., and Resh, M.D. (2004). Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci* 24, 7140-7149.

Liu, H., Liu, Z., Du, J., He, J., Lin, P., Amini, B., Starbuck, M.W., Novane, N., Shah, J.J., Davis, R.E., *et al.* (2016). Thymidine phosphorylase exerts complex effects on bone resorption and formation in myeloma. *Sci Transl Med* 8, 353ra113.

Lovatt, M., Filby, A., Parravicini, V., Werlen, G., Palmer, E., and Zamoyska, R. (2006). Lck regulates the threshold of activation in primary T cells, while both Lck and Fyn contribute to the magnitude of the extracellular signal-related kinase response. *Mol Cell Biol* 26, 8655-8665.

Mbalaviele, G., Novack, D.V., Schett, G., and Teitelbaum, S.L. (2017). Inflammatory osteolysis: a conspiracy against bone. *J Clin Invest* 127, 2030-2039.

Miron, R.J., and Bosshardt, D.D. (2016). OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. *Biomaterials* 82, 1-19.

- Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W.C., and Baron, R. (2004). Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem* 279, 17660-17666.
- Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S., Sato, T., Yomada, T., Hanada, K., Kumegawa, M., and Hakeda, Y. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 473.
- Nakashima, T., and Takayanagi, H. (2011). New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1240, E13-18.
- Nich, C., Takakubo, Y., Pajarinen, J., Ainola, M., Salem, A., Sillat, T., Rao, A.J., Raska, M., Tamaki, Y., Takagi, M., *et al.* (2013). Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J Biomed Mater Res A* 101, 3033-3045.
- Quintela-Lopez, T., Ortiz-Sanz, C., Serrano-Regal, M.P., Gaminde-Blasco, A., Valero, J., Baleriola, J., Sanchez-Gomez, M.V., Matute, C., and Alberdi, E. (2019). Abeta oligomers promote oligodendrocyte differentiation and maturation via integrin beta1 and Fyn kinase signaling. *Cell Death Dis* 10, 445.
- Ritchlin, C.T., Haas-Smith, S.A., Li, P., Hicks, D.G., and Schwarz, E.M. (2003). Mechanisms of TNF- α - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 111, 821-831.
- Sabokbar, A., Mahoney, D.J., Hemingway, F., and Athanasou, N.A. (2016). Non-Canonical (RANKL-Independent) Pathways of Osteoclast Differentiation and Their Role in Musculoskeletal Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 51, 16-26.
- Shimaoka, S., Matsushita, S., Nitanda, T., Matsuda, A., Nioh, T., Suenaga, T., Nishimata, Y., Akiba, S., Akiyama, S., and Nishimata, H. (2000). The Role of Thymidine Phosphorylase Expression in the Invasiveness of Gastric Carcinoma. *Cancer*, 2220-2227.
- Terkawi, M.A., Hamasaki, M., Takahashi, D., Ota, M., Kadoya, K., Yutani, T., Uetsuki, K., Asano, T., Irie, T., Arai, R., *et al.* (2018). Transcriptional profile of human macrophages stimulated by ultra-high molecular weight polyethylene particulate debris of orthopedic implants uncovers a common gene expression signature of rheumatoid arthritis. *Acta Biomater* 65, 417-425.
- Terkawi, M.A., Kadoya, K., Takahashi, D., Tian, Y., Hamasaki, M., Matsumae, G., Alhasan, H., Elmorsy, S., Uetsuki, K., Onodera, T., *et al.* (2019). Identification of IL-27 as potent regulator of inflammatory osteolysis associated with vitamin E-blended ultra-high molecular weight polyethylene debris of orthopedic implants. *Acta Biomater* 89, 242-251.
- Toyoda, Y., Tabata, S., Kishi, J., Kuramoto, T., Mitsushashi, A., Saijo, A., Kawano, H., Goto, H., Aono, Y., Hanibuchi, M., *et al.* (2014). Thymidine phosphorylase regulates the expression of CXCL10 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol* 66, 560-568.
- Udalova, I.A., Mantovani, A., and Feldmann, M. (2016). Macrophage heterogeneity in the

context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12, 472-485.

Werner, J.H., Rosenberg, J.H., Keeley, K.L., and Agrawal, D.K. (2018). Immunobiology of periprosthetic inflammation and pain following ultra-high-molecular-weight-polyethylene wear debris in the lumbar spine. *Expert Rev Clin Immunol* 14, 695-706.

Wooley, P.H., and Schwarz, E.M. (2004). Aseptic loosening. *Gene Ther* 11, 402-407.

Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., and Hu, H. (2020). Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther* 5, 209.

Zhou, F., Lu, Zhu, X., Mao, H., Yang, H., Geng, D., and Xu, Y. (2010). Effects of a cannabinoid receptor 2 selective antagonist on the inflammatory reaction to titanium particles in vivo and in vitro. *J Int Med Res* 38, 2023-2032.