



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
Author(s)	濱崎, 雅成; Hamasaki, Masanari
Description	配架番号 : 2555
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14089号
Issue Date	2020-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14089">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14089</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/83622">https://hdl.handle.net/2115/83622</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Masanari_Hamasaki.pdf



学位論文

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

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

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	4 頁
略語表	7 頁
緒言	8 頁
実験方法	10 頁
実験結果	15 頁
考察	23 頁
総括および結論	27 頁
謝辞	28 頁
利益相反	29 頁
引用文献	30 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。

1 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Kentaro Homan, Norimasa Iwasaki, A Novel Cartilage Fragments Stimulation Model Revealed that Macrophage Inflammatory Response Causes an Upregulation of Catabolic Factors of Chondrocytes In Vitro. Cartilage. 2019:1947603519828426.

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

2 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Norimasa Iwasaki, Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments new aspects for exploring the mechanism of synovitis in osteoarthritis Arthritis and Rheumatology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1 濱崎 雅成, Mohamad Alaa Terkawi, 小野寺 智洋, 宝満 健太郎, 上徳 善太, 松原 新史, 菱村 亮介, 金 佑泳, 徐 亮, 岩崎 倫政

マクロファージ共培養モデルにおいて軟骨破片が軟骨細胞に与える影響  
第31回日本軟骨代謝学会 2018.3/2.3 名古屋 口演

2 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Kentaro Homan, Zenta Joutoku, Shinji Matsubara, Ryosuke Hishimura, Kim Woo Young, Liang Xu, Norimasa Iwasaki A novel cartilage-fragments stimulation model revealed that macrophage inflammatory response causes an upregulation of catabolic factors of chondrocytes in vitro Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting 2018.3/10-13 New Orleans, USA, poster

3 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Kentaro Homan, Zenta Joutoku, Shinji Matsubara, Ryosuke Hishimura, Kim Woo Young, Liang Xu, Norimasa Iwasaki

An Up-Regulation Of Catabolic Factors Of Chondrocytes In Cartilage-Fragments Stimulation Model With Macrophages

2018 International Cartilage Repair Society world congress Macao 2018.4/9-12 podium

4 濱崎 雅成 Mohamad Alaa Terkawi, 小野寺 智洋, 宝満 健太郎, 上徳 善太, 松原 新史, 岩崎 倫政 マクロファージ共培養モデルにおいて軟骨破片が引き起こすマクロファージの炎症反応及び軟骨細胞への影響 第33回日本整形外科学会基礎奈良 2018.10/11-12 ポスター

5 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Gen Matsumae, Yuan Tian, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki

Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments: Toward exploring the mechanism of progressive osteoarthritis Orthopaedic

Research Society 2019 Annual Meeting USA Austin 2019.2/3 poster

6 濱崎雅成, Mohamad Alaa Terkawi, 小野寺 智洋, 宝満 健太郎, 上徳 善太, 松原新史, 岩崎 倫政 第32回日本軟骨代謝学会

網羅的遺伝子発現解析によるマクロファージに対する軟骨破片の影響の検討

大阪 2019.3/2-3 口演

7 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera Kentaro Homan, Zenta Joutoku S. Matsubara R. Hishimura, Kim Woo Young, Liang Xu, Norimasa Iwasaki

Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments a reveals novel mechanism for osteoarthritis 2019 International Cartilage Repair

Society world congress Vancouver Canada 2019.10/9-12 podium

8 濱崎 雅成 Mohamad Alaa Terkawi 小野寺 智洋 宝満 健太郎 徐 亮 宮崎  
拓自 田 園 江畑 拓 松前 元 岩崎 倫政 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 第34回日本整形外科学会基礎 横浜  
2019.10/11-12 口演

本研究の一部は以下の学会に発表予定である。

9 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Gen Matsumae,  
Yuan Tian, Hend Alhasan, Taku Ebata, Norimasa Iwasaki Blockade of macrophage  
surface receptors suppresses inflammatory response triggered by cartilage fragments  
in vitro  
2020Orthopaedic Research Society Annual Meeting2020.2/8-12 New Phoenix, USA,  
poster

## 要旨

### 【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  $\mu\text{m}$  (平均3.11  $\mu\text{m}$ ) 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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、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- $\alpha$ 、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。軟骨破片をマクロファージに添加し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- $\alpha$  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 $\alpha$

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- $\alpha$ 量を定量した。

【結果】抗MARCO中和抗体では有意なTNF- $\alpha$ の産生抑制を認めなかったが抗Tlr2抗体および抗ITGA5抗体によるブロックングによりTNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 、Toll like受容体、NF- $\kappa$   $\beta$ 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クング実験ではこれらのうちTLR2とITG $\alpha$ 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。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GO	gene ontology
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
ITG $\alpha$ 5	integrin alpha 5
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome)
LPS	lipopolysaccharide
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure
MMP	matrix metalloproteinase
NF $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NO	nitric oxide
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate-buffered saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA-Seq	RNA sequencing
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TLR	Toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor

## 緒言

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 (Loeser et al., 2012)。主に高齢者の慢性の痛み及び運動能力の低下の原因となり、60 歳以上の男性の 10%以上、60 歳以上の女性の 18%に影響を及ぼすと言われている (Glyn-Jones et al., 2015)。

軟骨細胞は関節軟骨の主たる細胞構成要素であり、軟骨組織の恒常性維持に不可欠な要素であるが、一方で過剰な力学的ストレスや炎症性メディエーターに暴露され、病的な状態となると、軟骨細胞はmatrix metalloproteinases (MMP) やaggrecanases を含むカタボリックファクターを惹起し軟骨組織の変性に寄与する (Conaghan et al., 2011)。従来OAは単純な摩耗による疾患 (wear and-tear disease) と考えられてきたが、近年の研究では免疫学的機序に関して着目されており、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OAの中心的病態として認識され始めている (Conaghan et al., 2011; Loeser et al., 2012)。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、その後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。軟骨組織の破壊は滑膜炎および骨棘の形成を引き起こすと言われている (Conaghan et al., 2011; Robinson et al., 2016)。炎症が起きている滑膜組織ではマクロファージや好中球、リンパ球などの様々な免疫細胞の集簇が起きることが知られており (de Lange-Brokaar et al., 2012)、OAにおける滑膜炎において、炎症性メディエーターの放出は軟骨組織の変性に重要な要素である。OAの病態理解は種々の研究により進んでいるが、その病態メカニズムは解明されていない。現時点でOAに対する効果的な治療薬はなく、そのためOAの進行に関する分子学的理解が必要である。

軟骨組織の摩耗は、OAの進行過程で起こり、その結果生じる「軟骨破片」は関節内に放出される。OAにおける軟骨破片に着目した過去の研究では、軟骨破片の大きさや形状とOA進行との関連性や (Kuster et al., 1998; Mendel et al., 2010)、OA患者の滑膜組織に含まれる軟骨破片が滑膜組織に炎症反応を惹起することが明らかにされている (Saito et al., 2002; Schedel et al., 2004)。また、動物実験レベルでは、軟骨破片の関節内投与により滑膜炎および軟骨組織の

関節症変化が誘発されたことなどが報告されている (Evans et al., 1984)。これらの報告から、軟骨破片は滑膜炎を引き起こす原因の一つであると考えられているが (Loeser et al., 2012; Robinson et al., 2016) 軟骨破片が滑膜中のどの細胞と反応して、どのように炎症を引き起こしているかの詳細なメカニズムはわかっていない (de Lange-Brokaar et al., 2012)。

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 (Bondeson et al., 2010; Kraus et al., 2016)。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 (Blom et al., 2007)。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。 (Bondeson et al., 2006) 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、軟骨破片がマクロファージの炎症反応を惹起させ、軟骨変性に寄与するという仮説のもと、まずは軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞の相互作用を観察可能な新たな*vitro* モデルの構築を目指した。構築されたモデルでは、軟骨破片刺激によってマクロファージに炎症反応を引き起こし、軟骨細胞のカタボリックファクターを惹起させることが可能である。次いで、軟骨破片に対するマクロファージの反応の分子学的メカニズムを解明するために、軟骨破片に対するマクロファージの反応の網羅的遺伝子発現解析を行った。

本研究において、軟骨破片がマクロファージの炎症反応において重要な役割を果たしていることが明らかになり、OAの病態に関して新たな知見を得たのでここに報告する。

## 実験方法

### 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

#### 軟骨破片の作製、評価

本研究のために実施した動物実験に関する許可は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。軟骨破片を4週齢のC57/B6マウスの大腿骨頭の軟骨より軟骨成分を取り出し(Stanton et al., 2011)作成した。取り出した軟骨組織部分をマルチビーズクラッシャー (Yasuikikai, Japan) で粉碎し軟骨破片を作成した。

作成した軟骨破片について、大きさ、形状について走査型電子顕微鏡:S-4800 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan) での評価および粒度分布計:Morphologi G3 (Malvern Instruments, UK) で計測をおこなった。さらに作成した軟骨破片のエンドトキシン量をToxinSensor Single Test Kit (Genscript, USA) で調べ、検出感度以下であることを確認した。

#### 軟骨破片とマクロファージの共培養及び反応評価

骨髄細胞を軟骨破片作成に使用したマウスの大腿骨から単離した。骨髄細胞を25 mg/l penicillin/streptomycin および 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) を添加したRPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich) 培地で3時間培養後、単核球をPBS (Phosphate buffered salts) で2回洗浄し、50 ng/ml mMCSF (mouse recombinant macrophage colony-stimulating factor) (Peprotech, USA) を添加したRPMI培地で7日間培養しマクロファージに分化させた。得られたマクロファージをプレート上に播種し軟骨破片を添加、24時間後に評価を行った。コントロールとしてマクロファージ単独を培養したものをを用いた。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電子顕微鏡で行った。

#### 培養液中のTNF- $\alpha$ およびNOの測定

マウスTNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) キット (R&D System, USA) およびGriess Reagent System (Promega, USA) を用いて、培養液中のTNF- $\alpha$  およびNO (Nitric oxide) を測定した。TNF- $\alpha$  については抗TNF- $\alpha$  抗体 (biotin-conjugated polyclonal

antibody)をプレコートしたプレートに軟骨培養液を分注し、HRP (avidin conjugated to Horseradish)を加え、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 基質にて発色させた。450 nm で吸光度を測定し、標準曲線からTNF- $\alpha$  量を算出した。NOについては培養液50  $\mu$ l にsulfanilamide 溶液を50  $\mu$ l 加え、10 分間遮光してインキュベートした。さらにN-1naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) 溶液50  $\mu$ l を加え10 分間遮光してインキュベートした後、540 nm で吸光度を測定し、標準曲線からNO量を算出した。

### 透過型電子顕微鏡によるマクロファージの評価

軟骨破片との培養開始後24時間で マクロファージは1.5%ホルムアルデヒド・1%グルタルアルデヒド混合固定液でpH7.4条件にて15分固定した。カコジル酸緩衝液で洗浄し1%オスミウム酸でさらに2時間ほど固定し再度カコジル酸緩衝液で洗浄おこなった。その後段階的エタノール法で脱水しエポキシ樹脂に包埋した。超薄切標本は2%酢酸ウラニルメタノール溶液で10分室温下に染色し、蒸留水で洗浄した後にさらに鉛染色液 (SIGMA-ALDRICH) で6分ほど染色した。Hitachi H-7100 transmission electron microscope:JEM-1400(Nihon Denshi, Japan) の 80 kVで観察行った。

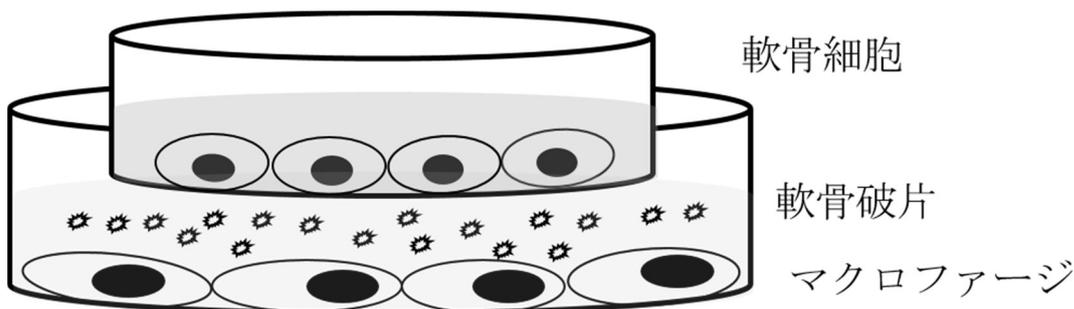
結果で後述するように実験①において軟骨破片の添加によりマクロファージの活性化及び炎症性メディエーターの放出が確認されたので、これらの軟骨細胞への影響を評価するために、関節内での軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞の関係を模擬する軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞を使用した共培養モデル作成へ実験を進めた。

### 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

骨髄細胞および骨頭軟骨をC57/B6マウスから採取した。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。軟骨細胞は生後5 日齢の野生型マウスの膝関節軟骨から、軟骨細胞を単離した(Gosset et al., 2008)。骨端線部で解離した軟骨片をDMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Sigma-Aldrich) (1% antibiotic solution + 10% FBS を含む)で3 mg/ml に調整したコラゲナーゼD (Sigma-Aldrich) にて37° C で45 分間処理することを2 回繰り返した後、6 倍希釈液 (0.5 mg/ml) にて37° C で10 時間処理し、軟骨細胞を単離した。

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として、マクロファージを24Wellに播種し、軟骨破片を添加その上にtranswell insert (CORNING, USA)を載せそこに軟骨細胞を播種した。(Fig1) コントロールとしては軟骨破片を添加しないものを使用した。培養後24時間および48時間に回収し伝子発現評価を行った。



**Figure 1** transwell insertを使用し上層に軟骨細胞を培養した軟骨破片刺激マクロファージ共培養モデル

#### 定量RT-PCR (Reverse Transcription polymerase chain reaction) 評価

軟骨破片を添加もしくは添加なしの24時間および48時間培養したマクロファージ、共培養した軟骨細胞からTRIzol Reagent (Invitrogen, USA) およびRNEasy mini kit columns (Qiagen, Germany) を使用しRNAを抽出した。0.5 $\mu$ gのRNAサンプルをGoScript™ reverse transcriptase and random primer (Promega) を用いて逆転写しcDNA。を作成した。その後SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara, Japan) を用いてThermal Cycler Dice System 2 (Takara) を使用しリアルタイムPCR を行 っ た 。 各 プ ラ イ マ ー は Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) でデザインしたものを使用した。本研究で使用した主要なプライマーのシーケンスは実験方法セクション末尾のTable 1 に示した。メッセンジャーRNA (mRNA) の発現量は全てGAPDH の発現量により標準化した。各標的遺伝子の相対mRNA 発現レベルは、 $\Delta\Delta$ Ct 法および個々の効率補正計算法を用いて、GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子のCt 値に対して正規化された各遺伝子のCt 値として表した。

結果で後述するように実験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上昇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

#### 軟骨破片とマクロファージの共培養

骨髄細胞および骨頭軟骨をC57/B6マウスから採取した。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軟骨破片を添加し24時間培養した。

#### RNAの抽出及びライブラリの作成、シーケンシング

軟骨破片を添加し24時間培養したマクロファージおよび添加なしのマクロファージからTRIzol ReagentおよびRNEasy mini kit columnsを使用しRNAを抽出した。ライブラリはTruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, Inc, USA)を使用し作成、1サンプル当たり6900万リード平均でペアエンドリードをIllumina HiSeq 2500 (Illumina), で取得した。リードはマウスゲノム (mm10) をアライメントに使用し、Tophat とBowtieでマッピングをおこなった。Cufflink および Cuffdiff (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffdiff/index.html>)によりアノテーションを行った(Trapnell et al., 2012)。

#### バイオインフォマティクス解析

マクロファージの軟骨破片に対する反応を一般化するために、公共データベースから取得したLPS (lipopolysaccharide)に対するマクロファージの遺伝子発現(Raza et al., 2014)との比較を行った。その後 $p\text{-value} \leq 0.05$  でFold change:FC >1.3以上の発現変化がみられた遺伝子群に関してGO (gene ontology)エンリッチメント解析及びKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome)パスウェイ解析を行った。解析はアノテーション、視覚化統合ツールの一つであるDAVID (Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery online tools:david.abcc.ncifcrf.gov).を使用した。統計学的有意差のカットオフ値は $p \leq 0.05$  および gene count > 4を用いた。得られた結果のさらなるエンリッチメント解析をGenomatix Gene Ranker (<http://www.genomatix.de/>).を使用して行った。ヒートマップは各GOタームに関する視覚化に用いた。(http://biit.cs.ut.ee/clustvis/)タンパク質間相

相互作用に関する転写因子エンリッチメント解析は Enricher (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) を使用して行った。

結果で後述するように実験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キング実験を行った。

#### 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キング実験

骨髄細胞および骨頭軟骨をC57/B6マウスから採取した。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(1  $\mu$ g/ml; anti-mTLR2 InvivoGen, USA) 抗MARCO(Macrophage receptor with collagenous structure) 抗体(20  $\mu$ g/ml; clone ED31 Serotec, UK)、抗ITG  $\alpha$  5(Integrin alpha 5) 抗体(10  $\mu$ g/ml; MAB2514 Millipore, UK)を添加した。抗体を添加しない群、軟骨破片および抗体を添加しない群、Iso typeコントロール抗体を添加した群をコントロールとした。軟骨破片添加後24時間に上清を採取しELISAでのTNF- $\alpha$ 量を定量した。

#### 統計解析分析

ストウーデントt検定を用いてELISA、qRT-PCRで得た遺伝子発現の差を検定した。判定はP値<0.05で有意差ありとした。RNA-Seqにおける遺伝子発現量の統計学的有意差はfalse discovery rate (FDR) を用いて検定し、閾値をP値  $\leq$  0.01 としておこなった。

Table 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	AGCCGATGGGTTGTACCTG	ATAGCAAATCGGCTGACGGT
<i>IL-6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>iNOS</i>	GTTCTCAGCCCAACAATACAAG	GTGGACGGGTCGATGTCAC
<i>MMP-9</i>	GCAGAGGCATACTTGTACCG	TGATGTTATGATGGTCCCCTT
<i>MMP-13</i>	TTGGCCACTCCCTAGGTCTG	GGTTGGGGTCTTCATCGC
<i>GAPDH</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

## 実験結果

実験①の結果 作成した軟骨破片の添加によりマクロファージは活性貪食の形態をとり、炎症性メディエーターを放出した

マウス大腿骨頭軟骨より採取した軟骨組織を粉砕して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、作成した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。(Fig. 2A) 粒度分布計の計測で直径は0.54~ 55  $\mu\text{m}$  (平均3.11  $\mu\text{m}$ ) であった。(Fig. 2B) 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。(6, 7)

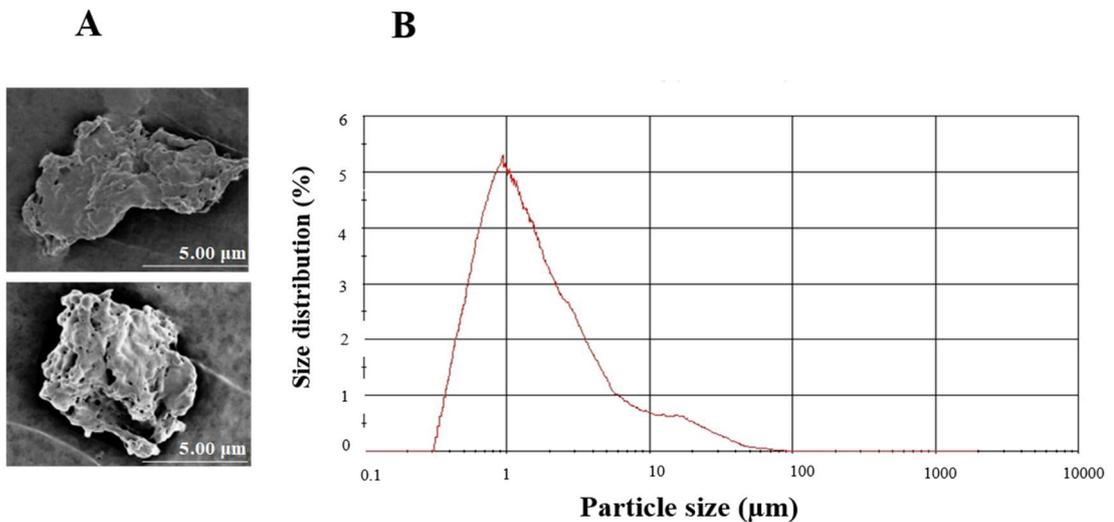


Figure 2 作製した軟骨破片の大きさ、形状の検討

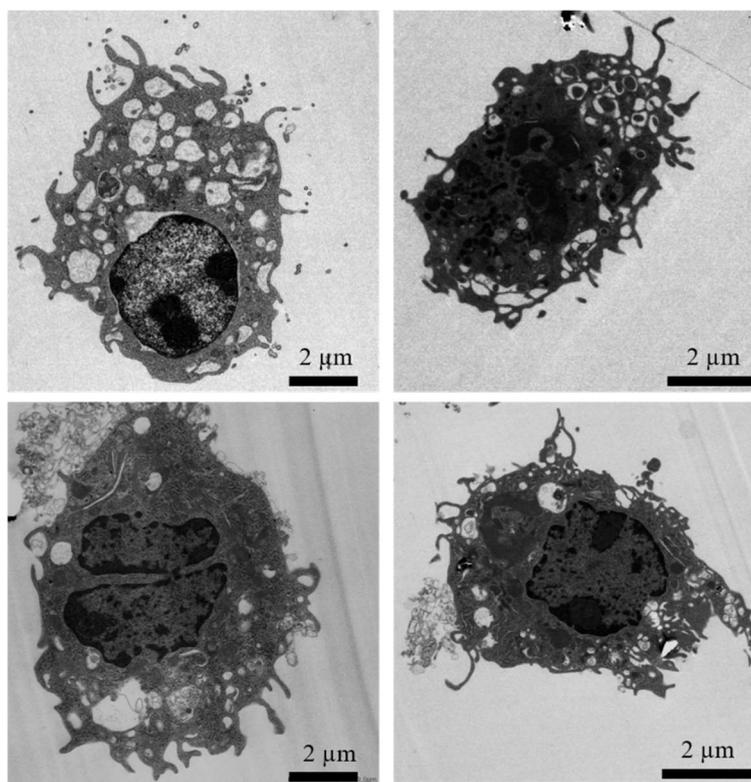
(A) 作製した軟骨破片を走査型電子顕微鏡により撮像した像 スケールバーは5 $\mu\text{m}$ を示す

(B) 作製した軟骨破片を粒度分布計により計測した粒度分布

さらにマクロファージの軟骨破片に対する活性化について評価するため、軟骨破片を添加し培養したマクロファージについて透過型電子顕微鏡で形態学的計測および炎症性メディエーターの産生の評価を行った。軟骨破片を添加したマクロファージは透過型電子顕微鏡での観察で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。(Fig. 3).

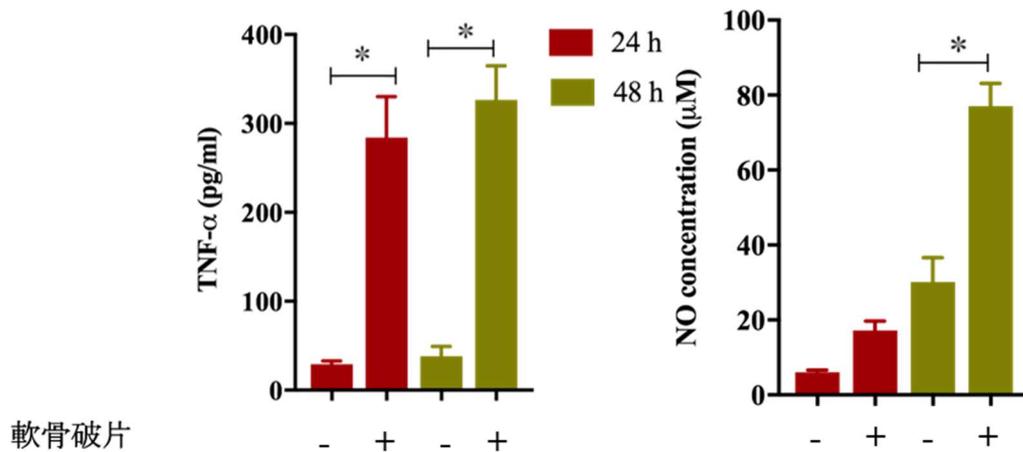
軟骨破片を添加したマクロファージ群は添加後24時間および48時間において軟骨破片を添加していないコントロール群に比べて、有意にTNF- $\alpha$ およびNOの産生が上昇していた(Fig. 4)

これらの結果はマクロファージは軟骨破片の添加により活性化しOAの進行に関与する炎症性メディエーターを産生することを示した。



**Figure 3** 透過型電子顕微鏡により撮像した軟骨破片で刺激したマクロファージ像

拡大したファゴリソームを伴う活性貪食の形態を示していた。スケールバーは2  $\mu$ mを示す。

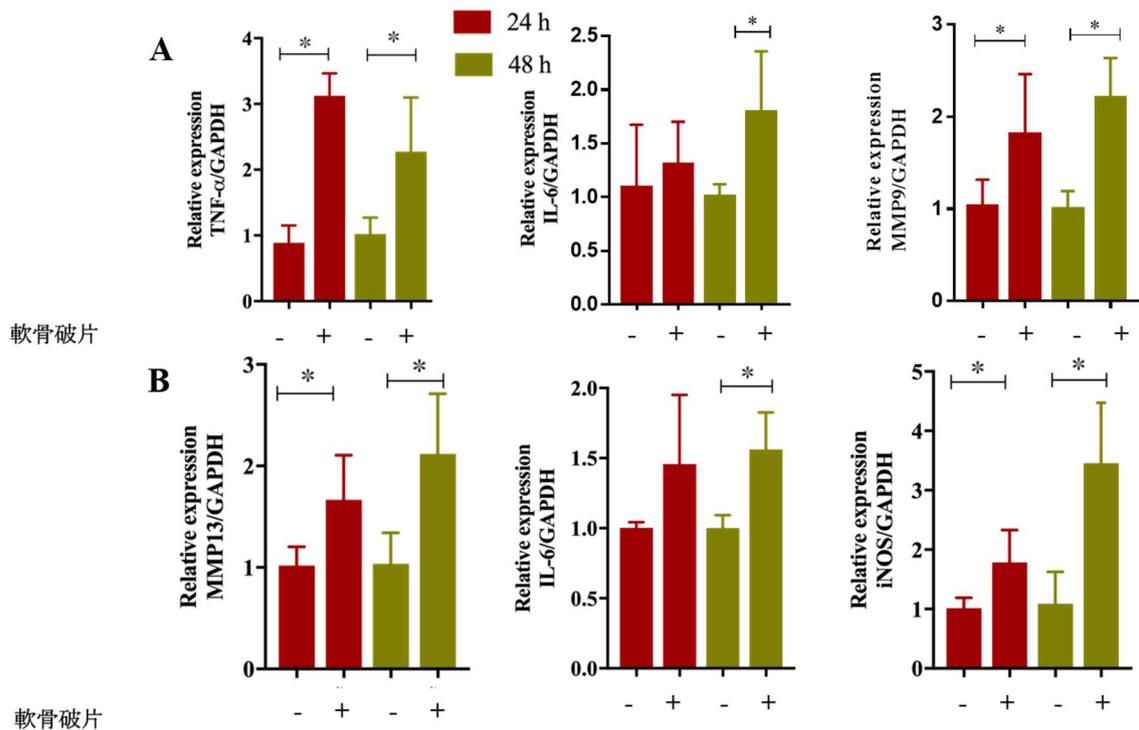


**Figure 4** 軟骨破片で刺激したマクロファージの24時間および48時間培養後の炎症性メディエーターであるTNF- $\alpha$ およびNOの測定 (+) が軟骨破片の添加あり群で (-) が軟骨破片の添加なしであることを示す。 \* $P < 0.05$ . \*

実験②の結果：共培養モデルにおいてマクロファージは炎症性メディエーターに関する遺伝子発現の上昇、軟骨細胞はカタボリックファクターに関する遺伝子発現の上昇がみられた

軟骨破片で刺激したマクロファージの液性因子による軟骨細胞への影響を評価するために、共培養モデル (Fig1) での軟骨細胞およびマクロファージの遺伝子発現をqRT-PCRで評価したところ、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- $\alpha$ 、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。(Fig. 5A)

軟骨細胞に関する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。(Fig. 5B) これらの結果は、軟骨破片による刺激を受けたマクロファージが軟骨細胞に作用しOAの進行に寄与する可能性を示唆した。



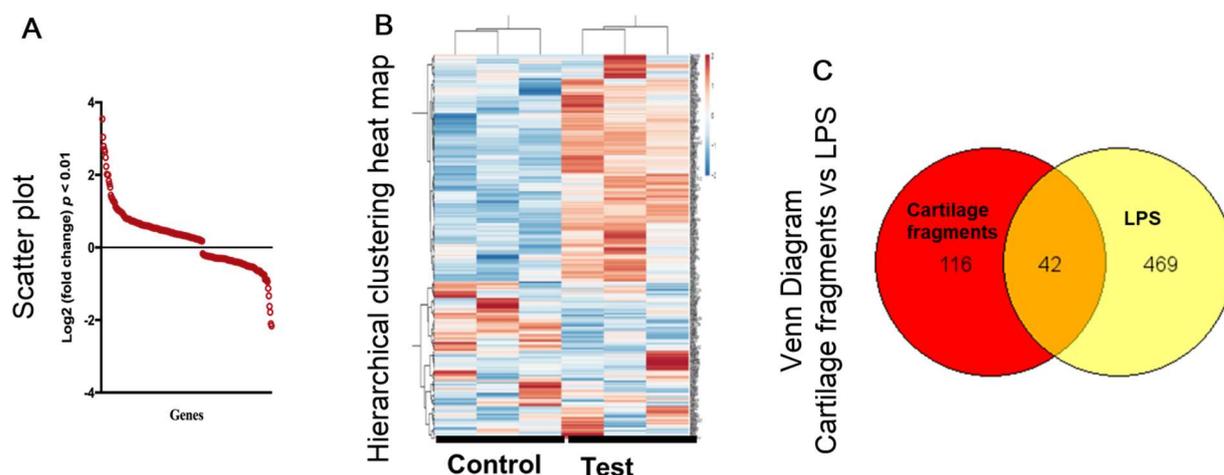
**Figure 5** 軟骨破片刺激共培養モデルにおけるRT-PCRでの遺伝子発現定量  
 (A) マクロファージの炎症性メディエーターに関する遺伝子発現定量  
 (B) 軟骨細胞のカタボリックファクターに関する遺伝子発現定量  
 (+) が軟骨破片の添加ありで (-) が軟骨破片の添加なしであることを示す。  
 \* $P < 0.05$ . \*

実験③の結果: 網羅的遺伝子発現解析により軟骨破片とマクロファージの炎症反応には TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、Focal adhesion および Scavenger receptor activity に関する遺伝子発現が重要である可能性が示された

軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して、詳細な分子レベルでの解明を目指し、マクロファージと軟骨破片を24時間反応させて、網羅的遺伝子発現解析をRNA-Seqを使用しておこなったところ、統計学的に有意な153遺伝子の発現上昇および105遺伝子の発現低下が確認された (Fig6A.B)。軟骨破片に対するマクロファージの活性化状態の分析のため、LPSで活性化させたマクロファージの遺伝子発現変化 (Raza et al., 2014) と比較を行った。ベン図に示す

通り42遺伝子に関してのみ遺伝子発現変化が共通しており、この結果は軟骨破片に対する反応はLPSに対する反応とは違った反応であることを示唆していた (Fig6C)。

これらの結果は変形性関節症における滑膜炎の病態の一つとして、軟骨破片に対するマクロファージの反応は独特な遺伝子発現変化をすることを示唆した。



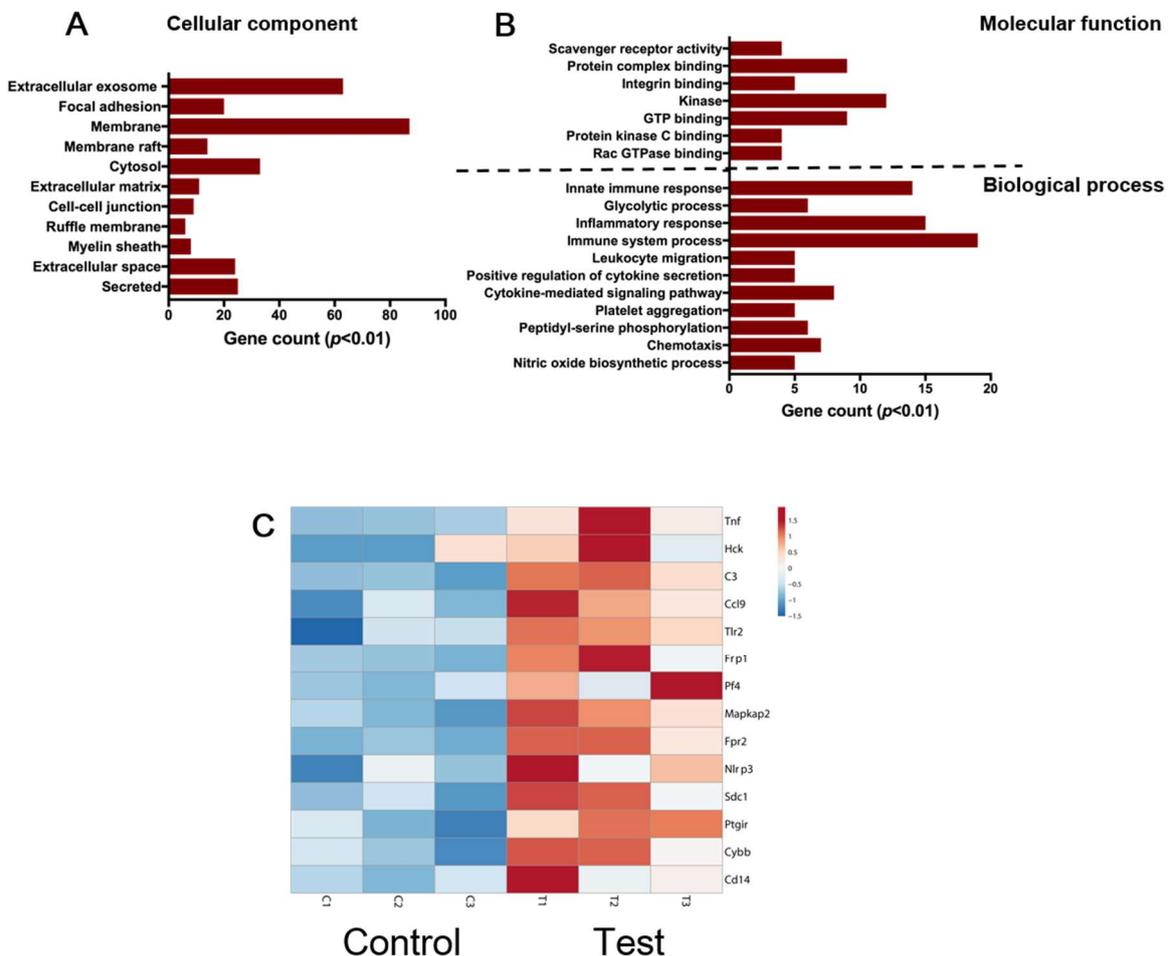
**Figure 6** 軟骨破片に対するマクロファージの反応に関する網羅的遺伝子発現解析

- A) 統計学的に有意に発現上昇及び低下した遺伝子群に対するスクアッタープロット解析
- B) 統計学的に有意に発現上昇および低下した遺伝子群に対するヒエラルキークラスタリング Control群（軟骨破片を添加しない群）及びTest群（軟骨破片を添加した群）で各遺伝子の相対的発現上昇を赤、発現低下を青で示す(n = 3)
- C) 軟骨破片およびLPSでの刺激に対してのそれぞれ有意な発現上昇を認めた遺伝子数に関するベン図

詳細な機能的および生物学的解析のため、得られたRNA-Seqのデータに関してGO(Gene ontology)解析を行った。GO解析の結果、発現変化のあった遺伝子はcellular components に関しては11の用語 (extracellular exosome, focal adhesionおよびmembraneなど) にカテゴライズされた。(Fig7A) 発現変化のあった遺伝子はmolecular functionに関してはscavenger receptor activity, protein complex bindingやintegrin bindingなどの7の用語が検出された。(Fig. 7B) biological processに関してはimmune system process, inflammatory response, glycolytic processやinnate immune responseなどの11の用語が検出された。(Fig. 7B) 軟骨破片に対するマクロファージの反応は炎症反応に関

してTNFを含む14の遺伝子発現が有意に上昇していた。(Fig. 7C)

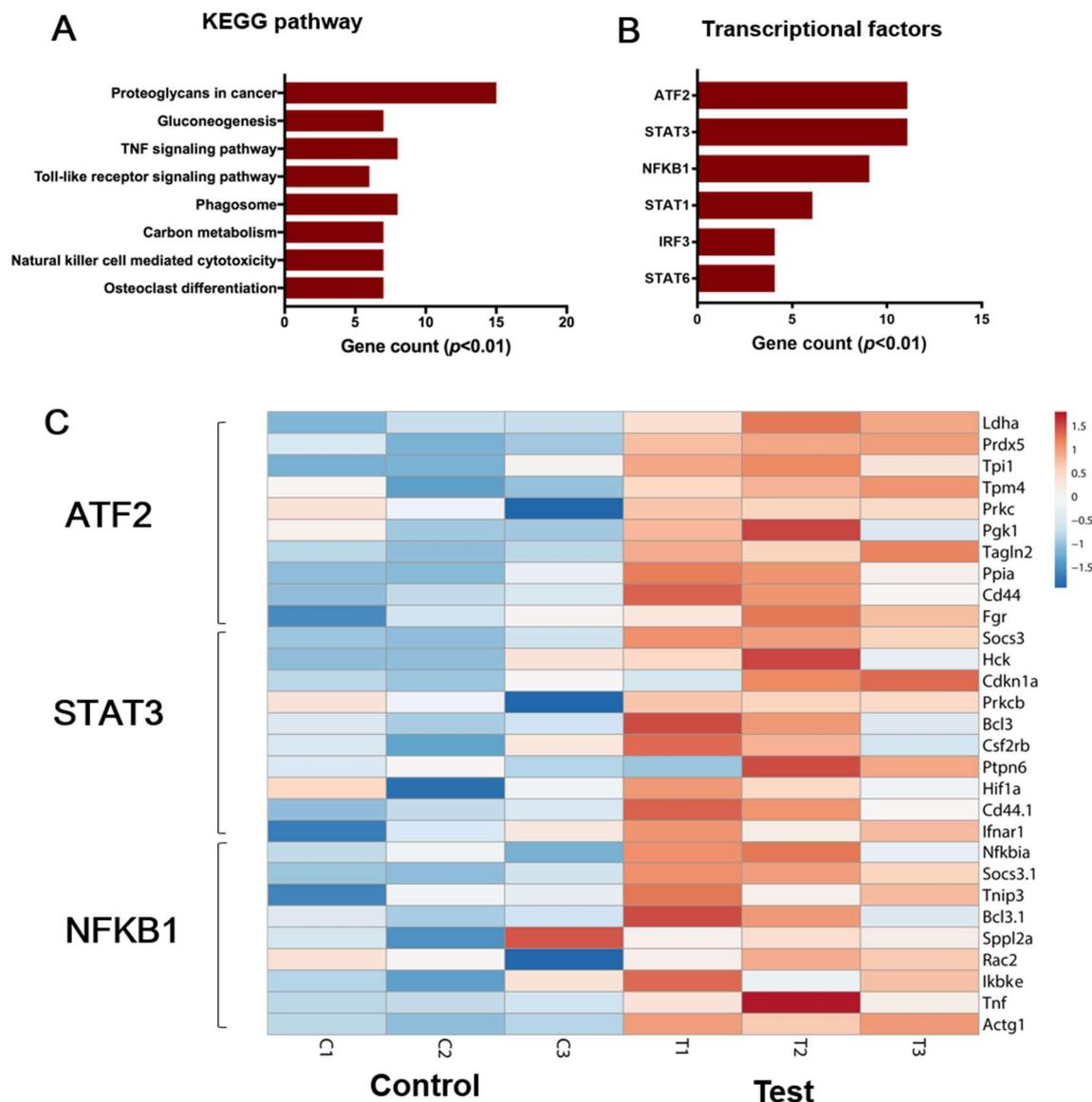
これらの結果から軟骨破片に対するマクロファージの反応は特徴ある炎症反応をきたしていることがわかった。



**Figure 7** 軟骨破片に対するマクロファージの反応に関するGene ontology解析 A) cellular componentに関するGO term B) molecular function及び biological processに関するGO terms C) 炎症反応に関しての各遺伝子発現に関するヒートマップA 相対的発現上昇を赤、発現低下を青で示す。

軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して細胞レベル、分子間相互作用ネットワーク(代謝、シグナル伝達、遺伝情報等)に基づいた解析をするため、KEGGパスウェイ解析および転写因子エンリッチメント解析を行った。結果はKEGGパスウェイ解析ではProteoglycan in cancer, Gluconeogenesis, TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathwayやPhagosome (Fig. 8A)などが同定された。これらのパスウェイがOAにおける滑膜炎において重要な役割をもつ可能性が示唆された。

転写因子エンリッチメント解析ではATF2, STAT3 and NFKB1 (Fig. 8BC)などの炎症反応に強く関係する転写因子が同定され、OAにおける滑膜炎においてこれらの転写因子が寄与する可能性が示唆された。



**Figure 8** 軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して有意に発現上昇した遺伝子群に対するKEGGパスウェイ 及び転写因子解析. A)有意に同定された上位のKEGGパスウェイ  
 B)転写因子解析で有意に同定された転写因子  
 C)軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して有意に変化があった転写因子に関するヒートマップ。相対的発現上昇を赤、発現低下を青で示す。

実験④の結果 中和抗体によるTLR2及びITG $\alpha$ 5のブロッキングは軟骨破片刺激によるマクロファージのTNF- $\alpha$ の産生を抑制した。

TLR2, MARCOおよびITG $\alpha$ 5 のマクロファージにおける受容体としての重要性 (Ley et al., 2016) および実験③の結果から、軟骨破片とマクロファージの炎症反応におけるこれらの受容体の関与を評価するために各々の中和抗体を使用し、TNF- $\alpha$ の産生を評価した。

結果としては抗MARCO中和抗体では有意なTNF- $\alpha$ の産生抑制を認めなかったが抗TLR2抗体および抗ITG $\alpha$ 5抗体によるブロッキングによりTNF- $\alpha$ の産生は有意に抑制された (Fig9) .

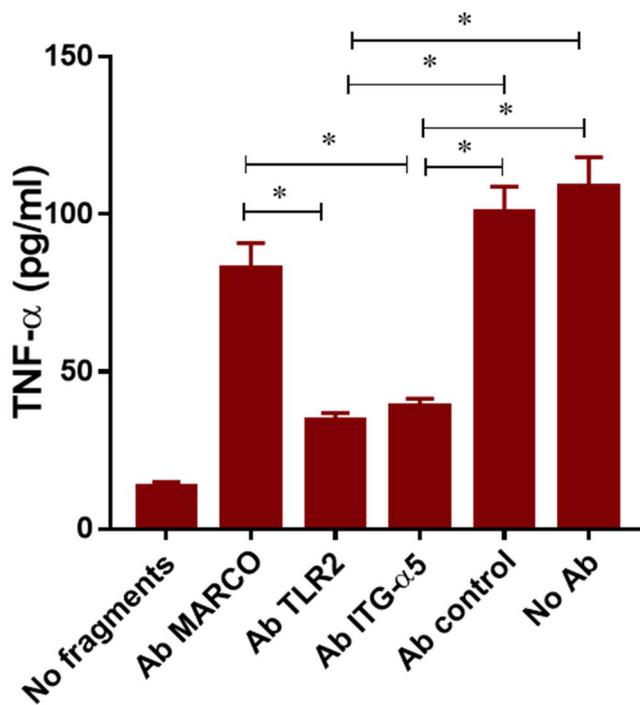


Figure 9 軟骨破片刺激に対するマクロファージ TNF- $\alpha$  の産生量に関する中和抗体のブロッキング効果

抗 TLR2 抗体または抗 ITG $\alpha$ 5 中和抗体の添加により有意に TNF- $\alpha$  の産生量が低下した。 \* $P < 0.05$ .

## 考察

OAにおいて軟骨破片は滑膜炎を引き起こし、軟骨細胞へ影響を与えると考えられているが(Sellam and Berenbaum, 2010; Wenham and Conaghan, 2010)、軟骨破片がどのように炎症反応を引き起こしているか詳細なメカニズムはわかっていない。本研究では軟骨破片の刺激により活性化したマクロファージによる軟骨細胞への影響を調査することは、OAへの病態理解につながり新規治療にもつながると考え、我々は関節内の軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞の関係を模擬することを旨とした*vitro*共培養モデルを作成した。さらに軟骨破片に対するマクロファージ炎症反応の詳細な検討を行うため網羅的遺伝子発現解析を行った。

我々はまず*vitro*モデルの確立に向けて、軟骨破片の作成に着手した。OA患者の関節内から採取された軟骨破片は不整形で、直径は1.4 ~234  $\mu\text{m}$ のマイクロメートルサイズであることが報告されている(Kuster et al., 1998; Mendel et al., 2010)。マクロファージと軟骨破片との反応は、その大きさや形に左右される。マクロファージは主に直径10  $\mu\text{m}$ 以下の粒子を貪食するが、それを超える大きさの粒子の場合は巨細胞を形成し対応する(Green et al., 2000)。一般的に、小さく細長い破片は強い炎症反応を起こしやすいと言われている(Sieving et al., 2003)。これらの過去の報告から、生体内のOA関節に近い環境を模倣するためには、軟骨破片の形状は不整形で、さらに直径10  $\mu\text{m}$ 付近を中心とした大きさが望ましいと考えられた。今回作製された軟骨破片は直径0.54~55  $\mu\text{m}$ でありOA患者の関節内から検出された軟骨破片(Kuster et al., 1998; Mendel et al., 2010)と比較して、その形状、大きさは妥当であると考えられた。

生体内のOA関節に近い環境を模倣した今回の共培養モデルにおいて、軟骨破片はマクロファージを刺激して炎症性メディエーターの産生を促した。これは結果として、軟骨細胞に作用しOAの軟骨における主要なカタボリックファクターであるMMP-13やi-NOSの遺伝子発現上昇を惹起した。これらの結果はTNF- $\alpha$ やMMP-9がネガティブレギュレーターとして軟骨細胞の分化や軟骨代謝に作用することが主なる原因と考えられた。また、本モデルを用いることで、軟骨破片がマクロファージを活性化して炎症を引き起こす過程が*in vitro*で観察可能となった。本モデルを用いて軟骨破片刺激により活性化されるマクロファージ

の炎症反応および軟骨細胞への影響を評価することは、OAにおける滑膜炎の制御につながると考えられた。

さらなる検討としての軟骨破片に対するマクロファージの反応に関してRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析による検討を行った。網羅的遺伝子発現解析の結果として、軟骨破片に刺激されたマクロファージは多数の炎症性メディエーターおよびケモカインに関係する遺伝子発現上昇を認めた。具体的にはTNFスーパーファミリー (Tnf, Tnfaip2) や、インターロイキンファミリー (Il2rg, Irak3) 、ケモカインファミリー (Ccl9, Cxcl16) などの発現上昇が見られた。これらの結果はOA患者の滑膜組織において高い発現がみられていた炎症性メディエーターおよびケモカインと一致した結果であった (Dawes et al., 2013; Haseeb and Haqqi, 2013; Lambert et al., 2014; Wenham and Conaghan, 2010)。また、軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して発現上昇を示したこれらの炎症を制御する遺伝子群の多くは、主にTNF signalingに關与していた。これらの結果から、今回作製したin vitroモデルにおいて発現が変化した炎症関連遺伝子は、OAの滑膜炎に重要な役割を担い、その病態を反映している可能性がある。特に、TNF signalingに關連する遺伝子群が多く見られたことから、軟骨破片が起こす炎症反応にはTNF signalingが大きく關与していると考えられた。

本研究における軟骨破片に対するマクロファージの反応ではTLR2やCD14などのパターン認識レセプターに関する遺伝子発現上昇が見られた。これは、自己の損傷した組織による物質が自然免疫を活性化する炎症反応をおこすという概念であるDAMPs (damage-associated molecular patterns) の概念と一致する。DAMPsはパターン認識レセプターであるToll-like receptorsやNod-like receptorに主に認識される。破壊された関節組織由来の物質であるfibronectin, aggrecan, biglycan, tenascin CなどがOAの炎症に關与することが報告されている。 ((Scanzello et al., 2008; Sokolove and Lepus, 2013) 本研究ではこれらの成分を含む軟骨破片が、DAMPsとしてマクロファージに作用したことで炎症反応が起きたと考えられる。また、過去に報告のあるToll-like receptorsやNod-like receptors以外にも、細胞表面受容体の遺伝子発現の上昇がみられており、それらの細胞表面受容体がDAMPsの新たな受容体として働く可能性が考えられた。

軟骨破片との反応において、マクロファージ上の細胞表面受容体に関する遺伝子の発現変化が見られたことから、これらの細胞表面受容体の関連遺伝子を

解析することが、OA病態の解明に繋がると考えられた。具体的に遺伝子発現変化を来たした細胞表面受容体は、Itga5 (fibronectin receptor), Cd44 (hyalunoriac acid receptor), Sdc1, Sdc4 (syndecan family) および Marco, Scarf1 (scavenger receptor) などであった。Candelaらは ITG $\alpha$ 5の conditional knockout マウスにおけるOAモデルの検討で野生型マウスに比較して滑膜炎スコアの低下がみられたことを報告しており、OAの滑膜炎におけるITG $\alpha$ 5の重要性を示唆している (Candela et al., 2016)。CD44に関してはCD44に対する中和抗体の投与がOAモデルマウスでマクロファージの活性を抑制したとの報告がある (Qadri et al., 2018)。Syndecan4に関してEchtermeyerらはOAにおけるSyndecan4の重要性および治療ターゲットとして報告している (Echtermeyer et al., 2009)。MARCOはその発現が豚OA modelにおける滑膜組織での発現が示されており、マクロファージの細胞外基質に対する接着に関わり、サイトカインの産生に重要な働きをすると考えられている (Sieker et al., 2016)。SCARF1は細胞死した細胞の残骸の排除に重要な役割をし、炎症を制御すると言われているが (Ramirez-Ortiz et al., 2013)、OAにおける滑膜炎に関しては過去に報告が無い。Scarf1が滑膜炎に関与する受容体遺伝子であることは、これまで報告の無い新たな知見である。本研究において遺伝子発現上昇がみられたこれらの細胞表面受容体は、炎症反応の制御に重要な役割を担う可能性があると考えられた。

本研究では、以上の網羅的遺伝子発現解析の結果から炎症制御のターゲットとして細胞表面受容体に着目し、特にTLR2, MARCOおよびITG $\alpha$ 5に関する中和抗体での阻害実験を行った。TLR2の発現はOA患者の滑膜組織で上昇していることが言われており (Radstake et al., 2004)、さらに多くの研究によりTLR2がOAの病態に関係することが示されている (Lees et al., 2015; Liu et al., 2017)。MARCOは多数の組織にあるscavenger receptorであり、粒子に対する炎症反応に関して重要な役割をすることがいわれている (Thakur et al., 2009)。ITG $\alpha$ 5はfibronectin receptorであり、血管新生や炎症、組織変性を制御しており、OAの関与も近年言われている (Candela et al., 2016; Johnson et al., 1993)。そのため我々はこれらの中和抗体 (TLR2, MARCOおよびITG $\alpha$ 5) によるブロッキングの有無で軟骨破片に対する反応してのマクロファージのTNF- $\alpha$ の産生を比較した。結果としては、TLR2とITG $\alpha$ 5のブロッキングは有意にTNF- $\alpha$ の産生を抑制した。これらの結果はTLR2およびITG $\alpha$ 5がマクロファージに重要な役割を示すことを意味しており、今後さらなる研究としてOA実験モデルマウスなどを使用してのin vivoでの検討がOAの病態に役立つと考えている。

本研究にはいくつかのlimitationが存在する。まずマウスを用いた小動物での研究である点が上げられる。ヒトにおける炎症発生機序とは異なる可能性があるため、ヒト軟骨破片を使用した新たな実験が必要と考えられる。また本研究においてTLR2やITGA5に関して炎症反応抑制の可能性を示したが、生体内で実際に同様の効果を示すかは不明である。今後はin vivoでの検討が必要と考えられた。

本研究には上記limitationsがあるものの、本研究結果はOAにおいて関節内に発生する軟骨破片は、マクロファージを介して炎症反応の増悪に関与し、軟骨変性に寄与することを明らかにした。また、その炎症反応において細胞表面受容体およびTNF signalingが重要な役割を担っていることを示した。これらの結果はOAにおける滑膜炎発生の病態解明に重要な知見であり、これらの分子群はOA治療の新たな標的となりうることを示唆するものである。

## 総括および結論

- ・ 軟骨破片のOAの病態への関与について検証するためにvitroでの軟骨破片とマクロファージの炎症反応について検討した。
- ・ vitro の新規モデル（軟骨破片刺激マクロファージ共培養モデル）を作製し、同モデルでマクロファージの炎症性メディエーター産生および軟骨細胞のカタボリックファクターを惹起することを示した。
- ・ マクロファージの軟骨破片に対する反応に関して網羅的遺伝子発現解析を行い、TNF signaling、NF- $\kappa$ B、Focal adhesion およびScavenger receptor activityに関する遺伝子発現が重要である可能性が示された。
- ・ TLR2及びITG  $\alpha$  5に対する中和抗体の添加で軟骨破片に対するマクロファージTNF- $\alpha$ の産生が抑制されることにより、これらが軟骨破片に対するマクロファージの炎症反応に重要であることが示された。

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細胞表面受容体およびTNF signaling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。

## 謝辞

本論文は、筆者が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 博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野教授岩崎倫政先生に心より感謝いたします。本研究を行うにあたり、免疫学をはじめ実験基礎技術のご指導並びに実験に関するご助言を頂きました整形外科学分野 助教 テルカウイ アラー先生に深い感謝の意を表します。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学病院整形外科講師の小野寺智洋先生をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

本研究（の一部）は、科研費 挑戦的研究（萌芽）：17K19707 の助成を受けたものであります

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

- Blom, A.B., van Lent, P.L., Libregts, S., Holthuysen, A.E., van der Kraan, P.M., van Rooijen, N., and van den Berg, W.B. (2007). Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum* *56*, 147-157.
- Bondeson, J., Blom, A.B., Wainwright, S., Hughes, C., Caterson, B., and van den Berg, W.B. (2010). The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* *62*, 647-657.
- Bondeson, J., Wainwright, S.D., Lauder, S., Amos, N., and Hughes, C.E. (2006). The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* *8*, R187.
- Candela, M.E., Wang, C., Gunawardena, A.T., Zhang, K., Cantley, L., Yasuhara, R., Usami, Y., Francois, N., Iwamoto, M., van der Flier, A., *et al.* (2016). Alpha 5 Integrin Mediates Osteoarthritic Changes in Mouse Knee Joints. *PLoS One* *11*, e0156783.
- Conaghan, P.G., Hunter, D.J., Maillefert, J.F., Reichmann, W.M., and Losina, E. (2011). Summary and recommendations of the OARSI FDA osteoarthritis Assessment of Structural Change Working Group. *Osteoarthritis Cartilage* *19*, 606-610.
- Dawes, J.M., Kieseewetter, H., Perkins, J.R., Bennett, D.L., and McMahon, S.B. (2013). Chemokine expression in peripheral tissues from the monosodium iodoacetate model of chronic joint pain. *Mol Pain* *9*, 57.
- de Lange-Brokaar, B.J., Ioan-Facsinay, A., van Osch, G.J., Zuurmond, A.M., Schoones, J., Toes, R.E., Huizinga, T.W., and Kloppenburg, M. (2012). Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage* *20*, 1484-1499.
- Echtermeyer, F., Bertrand, J., Dreier, R., Meinecke, I., Neugebauer, K., Fuerst, M., Lee, Y.J., Song, Y.W., Herzog, C., Theilmeier, G., *et al.* (2009). Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med* *15*, 1072-1076.
- Evans, C.H., Mazzocchi, R.A., Nelson, D.D., and Rubash, H.E. (1984). Experimental arthritis induced by intraarticular injection of allogenic cartilaginous particles into rabbit knees. *Arthritis Rheum* *27*, 200-207.

Glyn-Jones, S., Palmer, A.J., Agricola, R., Price, A.J., Vincent, T.L., Weinans, H., and Carr, A.J. (2015). Osteoarthritis. *Lancet* 386, 376-387.

Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S., and Jacques, C. (2008). Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 3, 1253-1260.

Green, T.R., Fisher, J., Matthews, J.B., Stone, M.H., and Ingham, E. (2000). Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J Biomed Mater Res* 53, 490-497.

Haseeb, A., and Haqqi, T.M. (2013). Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol* 146, 185-196.

Johnson, B.A., Haines, G.K., Harlow, L.A., and Koch, A.E. (1993). Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum* 36, 137-146.

Kraus, V.B., McDaniel, G., Huebner, J.L., Stabler, T.V., Pieper, C.F., Shipes, S.W., Petry, N.A., Low, P.S., Shen, J., McNearney, T.A., *et al.* (2016). Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 1613-1621.

Kuster, M.S., Podsiadlo, P., and Stachowiak, G.W. (1998). Shape of wear particles found in human knee joints and their relationship to osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 37, 978-984.

Lambert, C., Dubuc, J.E., Montell, E., Vergés, J., Munaut, C., Noël, A., and Henrotin, Y. (2014). Gene expression pattern of cells from inflamed and normal areas of osteoarthritis synovial membrane. *Arthritis Rheumatol* 66, 960-968.

Lees, S., Golub, S.B., Last, K., Zeng, W., Jackson, D.C., Sutton, P., and Fosang, A.J. (2015). Bioactivity in an Aggrecan 32-mer Fragment Is Mediated via Toll-like Receptor 2. *Arthritis Rheumatol* 67, 1240-1249.

Ley, K., Pramod, A.B., Croft, M., Ravichandran, K.S., and Ting, J.P. (2016). How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. *Front Immunol* 7, 204.

Liu, Y.X., Wang, G.D., Wang, X., Zhang, Y.L., and Zhang, T.L. (2017). Effects of TLR-2/NF- $\kappa$ B signaling pathway on the occurrence of degenerative knee osteoarthritis: an in vivo and in vitro study. *Oncotarget* 8, 38602-38617.

Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R., and Goldring, M.B. (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64, 1697-1707.

Mendel, K., Eliaz, N., Benhar, I., Hendel, D., and Halperin, N. (2010). Magnetic isolation of particles suspended in synovial fluid for diagnostics of natural joint chondropathies. *Acta Biomater* 6, 4430-4438.

Qadri, M., Almadani, S., Jay, G.D., and Elsaid, K.A. (2018). Role of CD44 in Regulating TLR2 Activation of Human Macrophages and Downstream Expression of Proinflammatory Cytokines. *J Immunol* *200*, 758-767.

Radstake, T.R., Roelofs, M.F., Jenniskens, Y.M., Oppers-Walgreen, B., van Riel, P.L., Barrera, P., Joosten, L.A., and van den Berg, W.B. (2004). Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* *50*, 3856-3865.

Ramirez-Ortiz, Z.G., Pendergraft, W.F., Prasad, A., Byrne, M.H., Iram, T., Blanchette, C.J., Luster, A.D., Hacohen, N., El Khoury, J., and Means, T.K. (2013). The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* *14*, 917-926.

Raza, S., Barnett, M.W., Barnett-Itzhaki, Z., Amit, I., Hume, D.A., and Freeman, T.C. (2014). Analysis of the transcriptional networks underpinning the activation of murine macrophages by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* *96*, 167-183.

Robinson, W.H., Lepus, C.M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T.M., and Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* *12*, 580-592.

Saito, I., Koshino, T., Nakashima, K., Uesugi, M., and Saito, T. (2002). Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* *10*, 156-162.

Scanzello, C.R., Plaas, A., and Crow, M.K. (2008). Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol* *20*, 565-572.

Schedel, J., Wenglén, C., Distler, O., Müller-Ladner, U., Schölmerich, J., Heinegård, D., and Krenn, V. (2004). Differential adherence of osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to cartilage and bone matrix proteins and its implication for osteoarthritis pathogenesis. *Scand J Immunol* *60*, 514-523.

Sellam, J., and Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* *6*, 625-635.

Sieker, J.T., Ayturk, U.M., Proffen, B.L., Weissenberger, M.H., Kiapour, A.M., and Murray, M.M. (2016). Immediate Administration of Intraarticular Triamcinolone Acetonide After Joint Injury Modulates Molecular Outcomes Associated With Early Synovitis. *Arthritis Rheumatol* *68*, 1637-1647.

Sieving, A., Wu, B., Mayton, L., Nasser, S., and Wooley, P.H. (2003). Morphological characteristics of total joint arthroplasty-derived ultra-high molecular weight

polyethylene (UHMWPE) wear debris that provoke inflammation in a murine model of inflammation. *J Biomed Mater Res A* 64, 457-464.

Sokolove, J., and Lepus, C.M. (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 5, 77-94.

Stanton, H., Golub, S.B., Rogerson, F.M., Last, K., Little, C.B., and Fosang, A.J. (2011). Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nat Protoc* 6, 388-404.

Thakur, S.A., Beamer, C.A., Migliaccio, C.T., and Holian, A. (2009). Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Sci* 108, 462-471.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7, 562-578.

Wenham, C.Y., and Conaghan, P.G. (2010). The role of synovitis in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2, 349-359.