



Title	摩耗軟骨片活性化マクロファージによる変形性関節症進行メカニズムの解明研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	江畑, 拓
Description	配架番号 : 2682
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14938号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85746">https://hdl.handle.net/2115/85746</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	EBATA_Taku_abstract.pdf, 論文内容の要旨



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 江畑 拓

### 学位論文題名

摩耗軟骨片活性化マクロファージによる変形性関節症進行メカニズムの解明研究  
(Research on the mechanism of progressive osteoarthritis mediated by inflammatory macrophages activated by cartilage wear)

#### 【背景と目的】

変形性関節症（Osteoarthritis、以下 OA）は、軟骨変性を基盤とする慢性退行性関節疾患である。OA の病態は複雑多岐に渡り、その全貌を解明することが OA の原因療法確立に必須とされる。OA の病変の首座である軟骨組織は、軟骨細胞によってその代謝が維持される。一方、OA 軟骨細胞では従来の生理的機能の劣化によって異化作用が亢進しており、軟骨変性の原因となる。従って、OA 軟骨細胞の劣化機序の解析は、OA の病態を解明する上で重要である。近年、OA 進行の重要な一病態として「炎症の慢性化」が挙げられる。これには、Damage-associated molecular patterns（DAMPs）で活性化したマクロファージが関連する。関節内の DAMPs を認識し活性化したマクロファージは、多数の液性因子を介して OA を進行させるが、その詳細な分子機序はわかっていない。そこで、DAMPs 活性化マクロファージによる軟骨細胞劣化機序を解析することで、慢性炎症による OA 進行機序の一端を解明できると考えた。本研究の目的は、DAMPs の 1 種である摩耗軟骨片活性化マクロファージが軟骨細胞に及ぼす変化の詳細を明らかにすることである。

#### 【対象と方法】

実験 1：摩耗軟骨片活性化マクロファージによる軟骨細胞劣化機序の解明

先行研究で確立した共培養システムを用いて、摩耗軟骨片活性化マクロファージと軟骨細胞との共培養実験を行った。48 時間共培養した後、軟骨細胞を回収し、RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子解析を行った。上記マクロファージと共培養した軟骨細胞中において発現上昇した遺伝子を抽出し、バイオインフォマティクス解析を行った。

実験 2：OA 進行に重要である軟骨細胞新規因子「Flightless I」の同定

実験 1 の発現上昇遺伝子中から「Flightless I」を同定し、OA 関節内における発現を免疫染色、ウエスタンブロットイングおよび ELISA 法を用いて調べた。さらに OA 軟骨細胞の Flightless I 分泌能を調べるために、培養軟骨細胞から回収した上清中の Flightless I 量を、上記と同様の方法を用いて調べた。

実験 3：軟骨細胞、軟骨組織における Flightless I 刺激の影響

Recombinant Flightless I（rFliI）をマウス軟骨細胞およびマウス大腿骨頭軟骨組織に添加し、その影響を解析した。

実験 4：Flightless I による軟骨変性機序の解明

rFliI により刺激した軟骨細胞中の Mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルの活性化の有無について、ウエスタンブロッティングを用いて評価した。また、rFliI と結合する軟骨細胞受容体を pull-down assay を用いて同定した。これらの結果に対して、上記で同定したシグナルに関連する阻害薬で軟骨細胞を前治療した後、rFliI 刺激を加え、軟骨細胞に対する rFliI の効果が減弱するかどうかを検証した。

#### 【結果】

実験 1：摩耗軟骨片活性化マクロファージによる軟骨細胞劣化機序の解明

摩耗軟骨片活性化マクロファージによって刺激した軟骨細胞では、328 個の遺伝子が発現上昇した。またこれらの発現上昇遺伝子に対してエンリッチメント解析を行い、骨化や石灰化、基質分解、肥大分化に関連する遺伝子群が多くみられることを明らかにした。

実験 2：OA 進行に重要である軟骨細胞新規因子「Flightless I」の同定

実験 1 の解析結果から、発現上昇遺伝子中の肥大分化や基質分解に関わる遺伝子として「Flightless I」を同定した。免疫染色により、OA 軟骨組織の表層から中間層にかけて同分子の発現を確認した。また、OA 関節液中にも Flightless I が検出されており、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  刺激した軟骨細胞の培養溶液中から同タンパクが多く検出された。

実験 3：軟骨細胞、軟骨組織における Flightless I 刺激の影響

In vitro において、rFliI 刺激は軟骨細胞の異化因子放出増加および同化因子減弱を促進した。また、rFliI 刺激により軟骨細胞の肥大分化関連因子の発現が増加した。Ex vivo では、rFliI 刺激によって、軟骨表層の基質分解が促進された。

実験 4：Flightless I による軟骨変性機序の解明

rFliI 刺激軟骨細胞では Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 シグナルが活性化しており、同シグナルの阻害剤 U0126 の前治療によって rFliI の効果は減弱した。また、pull-down assay の結果から rFliI 受容体として Toll-like receptor 4 が同定され、同阻害薬 TAK-242 の前治療によって、軟骨細胞に対する rFliI の効果が減弱した。

#### 【考察】

摩耗軟骨片活性化マクロファージ刺激軟骨細胞中に発現上昇した遺伝子群は、骨化や肥大分化、基質分解に関わる遺伝子を多く含み、これらは「軟骨内骨化」の過程でに関わる。本結果より、非生理的な力学的ストレスのみならず、炎症反応によっても軟骨細胞の軟骨内骨化シグナルが助長され、OA を進行させる可能性が示唆された。また、Flightless I は軟骨細胞中の TLR4-ERK1/2 シグナルを活性化し、軟骨細胞の肥大分化を促進し異化作用を亢進することで、OA を進行させることを示した。軟骨細胞中の TLR4-ERK1/2 シグナルは、OA 進行に関わる重要なシグナルであることが示唆された。

#### 【結論】

摩耗軟骨片活性化マクロファージは、軟骨細胞の肥大分化および異化作用を亢進し、OA を進行させることを示した。また、この反応系に関連する軟骨細胞新規因子として、「Flightless I」を同定し、同分子が軟骨細胞中の TLR4-ERK1/2 シグナルを介して軟骨変性を進行させることを明らかにした。本研究は、慢性炎症による OA 進行機序の一端を解明したものである。同定した Flightless I は、OA に対する治療標的の一つと考えられる。