



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〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	松前, 元
Description	配架番号 : 2717
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14982号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85860
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MATSUMAE_Gen_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 松前 元

学 位 論 文 題 名

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)

【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、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関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、健康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、破骨細胞分化に関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 ITGβ1 を同定した。続いて、TYMP 刺激によりマクロファージ内の NFκB 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 が関与することを始めて示した。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関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る。実際、無菌性緩み症例の滑膜で TYMP が存在し、健康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 ITGβ1 が関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関連する報告がある。FYN と ITGβ1 の組み合わせについては希突起膠細胞の分化・成熟に関与する報告があるものの、破骨細胞分化に関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。