



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TGF- β 刺激好中球による軟骨保護作用のメカニズムの解明研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	北原, 圭太
Description	配架番号 : 2892
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16400号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95391
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KITAHARA_Keita_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 北原 圭太

学 位 論 文 題 名

TGF- β 刺激好中球による軟骨保護作用のメカニズムの解明研究

(Research on the mechanism of chondroprotective functions of TGF- β stimulated neutrophil)

【背景】

変形性関節症（Osteoarthritis, 以下 OA）は、軟骨変性を病態の基盤とする関節変性疾患である。近年 OA の患者の罹患者数は増加している、人工関節全置換術をはじめとした手術の良好な成績が報告されている一方で、現時点で OA を根治する治療法は開発されていない。このため OA の病態や治療法に関わる研究が多数進められているが、未だに OA の病態の全容は解明されておらず、未知の部分が多い疾患である。

OA の病変の主たる組織である関節軟骨は、組織学的には硝子軟骨と呼ばれ、細胞密度が低く、軟骨細胞が少量存在するのみで、血流にも乏しい。これらの特異的な構造から軟骨は再性能に乏しく、OA のリスクファクターとして知られる肥満や外傷、性別などといったことを背景に様々な要因により軟骨細胞は劣化し、軟骨変性が進行していく。この OA の病態に関わる要因として、炎症が注目されつつある。

一方で近年、古典的には炎症の惹起に働くことが知られている好中球の中には、炎症収束に働く形質を持つ好中球が存在し、これらの好中球由来因子は、様々な炎症性疾患の治療標的として着目されている。そこで、我々は特定の刺激により活性化された好中球由来因子は炎症を収束させることで、慢性炎症による OA の軟骨変性を抑制すると仮説をたてた。本研究では好中球由来因子として、放出元のドナー細胞の形質を反映する細胞外小胞（Extracellular vesicles, EVs）に着目した。本研究の目的は、好中球由来 EVs による軟骨細胞における抗異化作用について検討し、OA における軟骨変性の抑制に係わる因子を同定することである。

【方法】

実験 1：軟骨保護作用を持つ好中球への誘導刺激の選定

好中球に各種刺激を加えた後に、培養を行い、その培養培地（Condition medium）を回収した。Condition medium を IL-1 β 刺激されたマウス軟骨細胞に添加し培養した。ヒト好中球においてはトランズウェルを介し、ヒト軟骨細胞セルラインとの共培養を行った。その後、軟骨細胞を回収し、生じた変化を qPCR およびウェスタンブロッティング法で解析した。

実験 2：好中球由来 EVs の軟骨変性抑制効果の検証とその分子機序の解明

超遠心法を用いて condition medium よりタンパク質を単離した。単離されたタンパク質が EVs であることを確認するため、ウェスタンブロッティング法で各種 EVs マーカーを確認し、粒度分布解析と透過型電子顕微鏡で形状を確認した。この単離した EVs を IL-1 β 刺激軟骨細胞に添加し培養するとともに、蛍光染色した EVs を用いて軟骨細胞内への取り込みを確認した。EVs の軟骨細胞に対する作用機序の解明のため、添加された軟骨細胞に対し qPCR および RNA シークエンスを行った。

実験 3：実験 2 で同定された因子 Secreted Frizzled-Related Protein 5（以下 SFRP5）の軟骨変性抑制効果の検証

SFRP5 を IL-1 β 刺激マウス軟骨細胞へ添加し培養した。添加された軟骨細胞に対し、qPCR およびウェ

スタンブロッティング法、RNA シークエンスを行った。また in vivo での評価としてマウス膝前十字靱帯切断 OA モデルマウスと、コラゲナーゼ誘発性 OA モデルマウスを用いた関節内への SFRP5 の直接投与を行い、軟骨変性抑制効果を検証した。

【結果】

実験 1

マウス軟骨において Transforming growth factor-beta(以下 TGF- β)刺激好中球由来の Condition medium 投与群は、非投与群と比較し、IL-1 β 刺激でみられる異化因子の発現増加を抑制した。ヒト軟骨細胞セルラインにおいても、トランスフェクションを介して TGF- β 刺激好中球と共培養を行った群において、異化因子の発現が抑制されていた。

実験 2

この Condition medium 中より単離したタンパク質は EVs マーカーの発現が確認され、電子顕微鏡での観察も EVs として矛盾のないものであった。TGF- β 刺激好中球由来の Condition medium より単離した EVs 刺激群においても、実験 1 と同様に、IL-1 β 刺激軟骨細胞でみられる異化因子の発現増加を抑制した。この EVs で刺激された軟骨細胞の RNA シークエンスでは Wnt シグナルに関わる遺伝子発現が抑制されていた。また Wnt5 のアンタゴニストとして働く SFRP5 の発現が増加していた。qPCR においても SFRP5 の発現量が増加していた。

実験 3

SFRP5 の投与は軟骨細胞における IL-1 β 刺激軟骨細胞でみられる異化因子の発現増加を抑制した。in vivo での OA モデルへの SFRP5 の投与ではマウス膝関節における軟骨変性が抑制された。

【考察】

本研究の結果、TGF- β 刺激好中球は IL-1 β 刺激軟骨細胞の異化因子増加効果を減弱し、TGF- β 刺激好中球由来 EVs が軟骨細胞に対する抗異化作用に関与していることが示された。これにより TGF- β 刺激好中球由来 EVs が破綻した軟骨代謝を回復させ、軟骨変性を抑制することが示唆された。また EVs を投与された軟骨においては Wnt 5 に係わる遺伝子発現が抑制されるとともに、SFRP5 の発現が増加していた。SFRP5 が Wnt5 のアンタゴニストであることを踏まえると、RNA シークエンスの結果は抗異化作用を示すことに矛盾がないと考えられた。SFRP5 が変形性関節症の軟骨変性を抑制する可能性がある。

SFRP5 の in vitro でのマウス軟骨細胞への投与と、in vivo での OA モデルマウスへの SFRP5 の関節内投与において、異化因子の発現と軟骨変性が抑制されたことから、SFRP5 は TGF- β 刺激好中球由来 EVs の軟骨保護作用に寄与しており、軟骨変性の抑制作用を有していると考えられた。

【結論】

本研究より TGF- β 刺激好中球は、EVs を介して軟骨細胞の異化を抑制することが示された。またこの作用に関わる因子として SFRP5 を同定し、SFRP5 が軟骨細胞中の異化因子の発現を抑制することを明らかにした。SFRP5 は OA における治療標的因子の一つになり得ると考えられる。