



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16400
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95923
Type	doctoral thesis
File Information	KITAHARA_Keita.pdf



学 位 論 文

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)

2025年3月
北海道大学
北原圭太

学 位 論 文

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)

2025年3月
北海道大学
北原圭太

目 次

発表目録および学会発表目録	・ ・ ・ ・ ・ 1 頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・ 3 頁
略語集	・ ・ ・ ・ ・ 6 頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 8 頁
実験方法	・ ・ ・ ・ ・ 10 頁
実験結果	・ ・ ・ ・ ・ 19 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・ 33 頁
総括及び結論	・ ・ ・ ・ ・ 35 頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 36 頁
利益相反	・ ・ ・ ・ ・ 37 頁
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 38 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. Keita Kitahara, Taku Ebata, Yoshio Nishida, Yuki Ogawa, Chen Liyile, Taiki Tokuhira, Junki Shiota, Tatsuya Nagano, Taichi E. Takasuka, Tsutomu Endo, Tomohiro Shimizu, Hend Alhasan, Tsuyoshi Asano, Daisuke Takahashi, Dai Sato, Tomohiro Onodera, Ken Kadoya, M Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki
Chondroprotective functions of neutrophil-derived extracellular vesicles by promoting the production of secreted frizzled-related protein 5 in cartilage.
Cell Communications and Signaling

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 北原圭太, アラーテルカウイ, 江畑拓, 塩田惇喜, 西田善郎, 横田隼一, ヘンドアルハサン, 松前元, 高橋大介, 岩崎倫政
炎症収束型好中球が関節炎環境下の軟骨細胞に対して与える抗異化作用についての検討.
第 34 回日本軟骨代謝学会, Web 開催, 2022 年 3 月 18 日-19 日, 口演
2. 北原 圭太, 江畑 拓, 清水 智弘, 浅野 毅, 照川 アラー, 高橋 大介, 角家 健, 岩崎 倫政
炎症収束型好中球由来細胞外小胞による軟骨細胞抗異化作用の検討.
第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会, 宮崎市, 2022 年 10 月 13 日-14 日, 口演
3. Keita KITAHARA, Taku Ebata, Mohamad Alaa Terkawi, Yoshio Nishida, Hend Alhasan, Shunichi Yokota, Junki Shiota, Taiki Tokuhira, Tsutomu Endo, Tomohiro Shimizu, Tsuyoshi Asano, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki.
Extracellular Vesicles Derived From Neutrophils Suppress Catabolic Process Induced By Il-1 β Stimulation In Chondrocytes.
Orthopaedic Research Society (ORS) 2023 Annual Meeting. February 10-14, Dallas Texas, USA.
4. Keita Kitahara, Taku Ebata, M Alaa Terkawi, Taiki Tokuhira, Yoshio Nishida, Junki Shiota, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki.
Extracellular vesicles derived from resolving neutrophils suppress catabolic process induced by IL-1 β stimulation in chondrocytes. 17th World Congress International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society (ICRS)

2023. September 9-12, Sitges, Spain

5. 北原 圭太, 江畑 拓, 照川 アラー, 清水 智弘, 遠藤 努, 浅野 毅, 高橋 大介, 角家 健, 岩崎 倫政
炎症収束型好中球由来細胞外小胞による軟骨細胞抗異化作用についての検討.
第 38 回日本整形外科学会基礎学術集会, つくば市, 2023 年 10 月 19 日-20 日, 口演
6. Keita Kitahara, Mohamad Alaa Terkawi, Taku Ebata, Tomohiro Onodera, Tsutomu Endo, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Tsuyoshi Asano, Norimasa Iwasaki.
Extracellular vesicles derived from specific phenotype of neutrophils suppress catabolic process induced by IL-1 β stimulation in chondrocytes.
Orthopaedic Research Society(ORS) 2024 Annual Meeting. February 2-6, Long Beach, California, USA
7. 北原 圭太, 照川 アラー, 江畑 拓, 清水 智弘, 遠藤 努, 浅野 毅, 高橋 大介, 角家 健, 岩崎 倫政
好中球由来細胞外小胞は、secreted frizzled related protein 5 により軟骨変性を抑制する.
第 39 回日本整形外科学会基礎学術集会, 新宿, 2024 年 10 月 17 日-18 日, 口演

要 旨

【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、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、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 OA の軟骨変性を抑制し軟骨保護作用を有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、軟骨保護作用を有する好中球を同定し、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することで、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、トランズウェルを介して 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（N- β ）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。この軟骨細胞の網羅的遺伝子解析では IL-1 β 群で発現が上昇している遺伝子群に KEGG pathway 解析を行い IL-17 signaling, TNF signaling を上位に同定した。一方で、これらの遺伝子群は N- β 群では発現が減少していた。

また N- β 群に特異的に発現が上昇している遺伝子群に SFRP5 が含まれ、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参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 IL-17 signaling, TNF signaling に関わる遺伝子群の発現が抑制されており、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。また EVs の投与群において特異的に上昇している遺伝子群では SFRP5 の発現が上昇しており、SFRP5 が変形性関節症の軟骨変性を抑制する可能性が示唆された。

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。

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（アルファベット順）。

AnxA1	Annexin A1
cDNA	complementary DNA
CD9	Cluster of differentiation 9
cMMP	cleaved Matrix metalloproteinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extracellular Matrix
EVs	Extracellular vesicles
FBS	Fetal bovine serum
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IL	Interleukin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
OA	Osteoarthritis

PBS	Phosphate buffered salts
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RNA	Ribonucleic acid
SFRP5	Secreted Frizzled-Related Protein 5
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TNF	Tumor necrosis factor
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein

緒言

変形性関節症(Osteoarthritis, OA)は世界中で最も罹患率の高い関節疾患の一つであり、全世界で罹患者は3億人以上とされている(James et al, Lancet .2018)。OAは関節軟骨の変性が主たる病態であり、疼痛や関節の腫脹、関節の可動域の低下や関節の変形を伴い、OAの患者のQOLの低下と、それに伴う社会経済損失は大きい。人工関節全置換術や骨切りに代表される、OAに対する手術治療は良好な治療成績が報告されている一方で、内服や関節内への直接投与による、軟骨の変性を抑制する効果的な薬剤治療は未だ確立されていない。

OAの発症には加齢や女性、肥満などといったリスクファクターが知られており、これらが関わる、関節における微弱な炎症がOAの発症に関与している。本来、炎症反応は生体防御において重要な生理機能であり、感染、外傷などの有害刺激に対し、免疫細胞が炎症を誘導し、原因物質を排除するが、同時に周囲の組織障害を引き起こす。そのため、好中球やマクロファージなどの貪食細胞が、形質転換することで、炎症を収束させ、これらの細胞が放出する因子が、損傷組織の修復に寄与する。一方で、この炎症の収束機構が破綻すると、慢性炎症や組織障害を伴う病態へと発展する。

関節内に生じる慢性炎症は、相対的な軟骨異化作用の亢進により軟骨代謝を破綻させ、軟骨変性を促進する(Terkawi et al, 2022)。すなわち、変形性関節症の発症に係わる炎症の慢性化とそれに伴う組織障害を伴う病態には、好中球を含む炎症収束に働く貪食細胞の機能障害が関与していると考えられ、好中球関連因子がOAの発症に関与することも近年報告されている(Wilkinson et al, 2021)。

一方で好中球の中には、古典的に知られる炎症を惹起するだけではなく、炎症収束に働く形質を持つ好中球が存在し、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(W Loh et al, 2022)。

しかしながら、これらの炎症の収束に働く形質を持つ好中球が、異化作用の亢進した変性軟骨にどのような影響を及ぼすかについては未だ知られていない。我々はこのような経緯から、特定の刺激を受け活性化された好中球由来は抗炎症作用と組織修復の役割を持ち、軟骨の変性を抑制する作用を持つと仮説を立て、好中球由来の液性因子として、細胞外小胞

(Extracellular vesicles, EVs)に着目した。EVsはドナー細胞より放出され

る微小膜小胞で、内包する核酸・タンパク質・脂質などをレシピエント細胞に運搬し、細胞間における情報伝達を担う因子であり、この EVs は放出元のドナー細胞の形質により内包される因子が異なることが知られている（Raposo et al, 2013; Robbins et al, 2014; Kolonics et al, 2021）。よって、EVs は好中球による軟骨変性抑制作用を反映し、抗炎症作用と組織修復の役割を持ち、軟骨の変性を抑制すると仮説を立てた。

以上から本研究の目的は、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とした。最初に軟骨と好中球の共培養により、軟骨変性を抑制する形質の好中球を誘導する刺激を選定し、その後同好中球由来の EVs との共培養を行った軟骨に対して網羅的遺伝子解析を行った。続いて、この網羅的遺伝子解析結果から同定された因子である Secreted Frizzled-Related Protein 5（SFRP 5）の軟骨変性に対する影響を調べた。

本研究は軟骨保護作用を持つ形質を持つ好中球への誘導刺激を明らかにし、OA における軟骨変性抑制作用の分子機序を示したものである。ここにその成果を報告する。

実験方法

実験1:軟骨保護作用を持つ好中球への誘導刺激の選定

本研究において実施した動物実験は、すべて北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。

各種刺激を加えた好中球が軟骨細胞に及ぼす作用について、解析した。

好中球の単離および刺激

健康な成人から BD Vacutainer tubes containing ACD (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を用いて末梢静脈より静脈血を採取した。その後 Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare)を用いて遠心を行うことでヒト好中球を単離した。続いて単離した好中球を TNF- α または TGF- β (BioLegend, San Diego, CA, US)を 50 ng/ml の濃度で添加した MEM で 30 分間培養した。

好中球とヒト軟骨細胞セルラインの共培養

ヒト軟骨細胞 C-28I2 (Merck, Darmstadt, Germany)を 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10%FBS 含有 DMEM を用いて 24-well のプレート上に 5×10^5 の割合でマイクロマスの形態で播種した。12 時間の培養後に 1%の Insulin-Transferrin-Selenium(ITS, Sigma-Aldrich)を添加した DMEM F12(Sigma-Aldrich)で 24 時間培養した。

続いて 30 ng/ml の IL-1 β で 1 時間刺激を加えた後に Phosphate buffered salts (PBS,ナカライテスク、京都、日本)を用いて 3 回洗浄した。その後に、前項で記載の方法で刺激された好中球を、Transwell insert(Falcon, NJ, USA)上に 2×10^5 の割合で播種し、Transwell を well の上に載せ 4 時間培養し、その後 Transwell を除去し 20 時間培養した(Figure1.)。

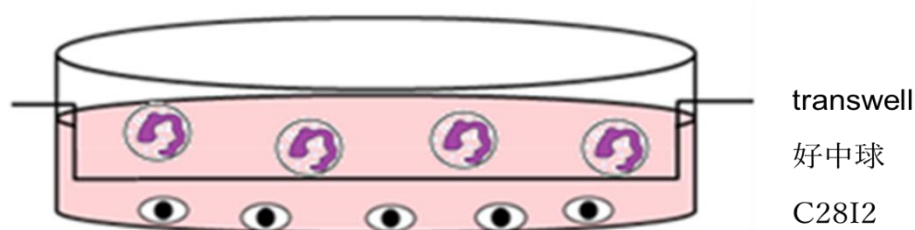


Figure1. ヒト軟骨細胞セルラインと好中球の共培養

24-well のプレート上に C-28I2 を播種し、Transwell insert を設置した後に好中球を添加し、4 時間共培養後に Transwell insert ごと好中球を除去した。

マウス軟骨細胞の単離

生後 5-6 日齢のマウス(C57BL/6J)の膝関節軟骨を採取した。同軟骨組織を、3 %の濃度に DMEM を用いて調整した collagenase D (Sigma-Aldrich,USA) 溶液で 45 分間の処理を 2 回行った。その後 0.5%に調整した collagenase D 溶液で 12 時間処理し、軟骨細胞を単離した(Gosset et al, 2008)。

マウス骨髓好中球の単離および condition medium の回収

4 週齢のマウス(C57BL/6J)の下肢骨から骨髓細胞を採取した。これらの骨髓細胞から MACS beads(Neutrophil isolation kit, Miltenyi Biotec)を用いて好中球を単離した。単離した好中球を 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA) 含有 DMEM にそれぞれの TNF- α 50 ng/ml, TGF- β 50 ng/ml, ロシグリタゾン (PPAR γ アゴニスト) 100 μ M を加え、3 時間培養し培養上清を回収した。

マウス軟骨細胞の好中球由来 condition medium 刺激

続いて得られたマウス軟骨細胞を 24-well のプレート上に 2×10^5 /well の割合で播種し、12 時間の培養後に 10 ng/ml IL-1 β (BioLegend)で添加した、上記の condition medium または DMEM で 24 時間培養を行った。

Real-time polymerase chain reaction quantification(qPCR)

回収した軟骨細胞を TRIzol Reagent(Invitrogen Carlsbad, CA, USA)を用いて溶解した。続いて NucleoSpin RNA (タカラ、東京、日本)を用いて RNA を採取した。500ng の RNA より GoScriptTM reverse transcriptase and random primer (Promega)を使用して逆転写を行い complementary DNA(cDNA)を作成した。その後 Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラ、大津、日本)および SYBR Premix Ex Taq II (タカラ)を使用して qPCR を施行した。メッセンジャーRNA(mRNA)の発現量は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)および β -actin の遺伝子発現量を用いて標準化した。各遺伝子の相対的発現レベルについては、 $\Delta\Delta C_t$ 法および補正計算法を使用して、GAPDH および β -actin 遺伝子の C_t 値に対して正規化された C_t 値として求めた。(Hamasaki et al, 2019; Hamasaki et al, 2020; Ebata et al, 2021)。各プライマーについては、Primer-BLAST

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を使用して作成した。な

お本研究において使用した各プライマーのシーケンスは全て実験方法の末尾の Table 1 で示した。

ウェスタンブロッティング

RIPA lysis buffer(ATTO corporation, 東京、日本)を使用して、軟骨細胞を溶解した。その後にサンプルバッファーを添加し、100 度で 5 分間加熱した。続いて SDS-PAGE 電気泳動を行い、電気泳動後のゲルをメンブレンに転写し、室温でスキムミルクを用いて 1 時間ブロッキングを行った。その後各種 1 次抗体溶液でメンブレンを 1 時間振盪し、HRP 標識 2 次抗体で 1 時間反応を行った。洗浄後に、Quantitiy One v.4.6.9(Bio-Rad)を使用して、バンドの検出を行った。本研究で使用した抗体については、実験方法の末尾の Table2 で示した。

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

実験 1 のウェスタンブロッティングおよび qPCR 法の結果から、TGF- β および PPAR γ アゴニストによる刺激を加えた好中球が、軟骨細胞における異化因子の発現を抑制することが示された。そこで好中球由来の液性因子である EVs に着目し、その単離と軟骨細胞への作用の検証を行った。

EVs の単離

実験 1 と同様の手順で単離した好中球に刺激を加え、3 時間培養後に上清を回収した。この際 FBS については exosome-depleted, heat-inactivated FBS (System Biosciences, Palo Alto, CA)を使用した。その後細胞の除去のため、400 $\times$ g で 5 分、続いて 2000 $\times$ g で 10 分の遠心を行った。その後細胞片の除去のため 1.2 μ m filter unit (Sartorius Minisart® syringe filter, Sartorius, Goettingen, Germany) を使用した。

上記で得られた培養上清を超遠心機 (L-80XP, Beckman Coulter, California, USA) を用いて、100000 $\times$ g で 70 分間超遠心した。その後、PBS を用いて得られた EVs を懸濁し、タンパク質濃度の測定のため、得られた溶液の一部を UD-100. An ultrasonic disruptor (TOMY SEIKO Co., Ltd., Japan) を使用し超音波処理を行った。続いてタンパク質濃度を BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)を用いて計測した。

EVs の評価

超遠心法で単離された粒子が EVs であることを確認するため、実験 1 と同様にウェスタンブロッティング法で transmembrane protein および cytosolic protein の EVs マーカーを検出した。

また EVs の撮像のため透過型電子顕微鏡を用いて粒子を確認するとともに、粒子径の確認のため粒度分布解析を ELSZneo (Otsuka Electronics, Osaka, Japan)を用いて行った。

マウス軟骨細胞と EVs の共培養

実験 1 と同様にマウス軟骨細胞をマウス膝関節より単離した。単離した軟骨細胞を 24-well のプレート上に 2×10^5 /well の割合で播種し 10 ng/ml IL-1 β および 5 μ g/ml の EVs で刺激し 24 時間培養を行った。

ヒト軟骨細胞セルラインと EVs の共培養

ヒト軟骨細胞セルライン C-28I2 (Merck, Darmstadt, Germany)を 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10%FBS 含有 DMEM を用いて 24-well のプレート上に 5×10^5 の割合でマイクロマスの形態で播種した。12 時間の培養後に 1%の Insulin-Transferrin-Selenium(ITS, Sigma-Aldrich)を添加した DMEM F12(Sigma-Aldrich)で 24 時間培養した。続いて 20 ng/ml IL-1 β を添加し、EVs 群については 5 μ g/ml の濃度で EVs を加え、24 時間培養を行った。

その後実験 1 と同様の方法でヒト軟骨細胞セルラインから RNA を採取し、qPCR を行い、異化因子の遺伝子発現量を評価した。

EVs のヒト軟骨細胞セルラインへの取り込みの確認

ヒト軟骨細胞 C-28I2 を 24-well のプレート上に播種し、ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red (同仁化学研究所、熊本、日本)を用いて標識した EVs で 3 時間刺激後に観察した。

RNA の抽出及びライブラリーの作成、RNA シークエンス

上記共培養後に無刺激群 (control 群)、IL-1 β 群、無刺激好中球由来 EVs 添加群 (N-none)、TGF- β + PPAR γ アゴニスト刺激好中球由来 EVs 添加群 (N- β) の軟骨細胞を採取した。回収した軟骨細胞を TRIzol Reagent(Invitrogen Carlsbad, CA, USA)を用いて溶解した。続いて NucleoSpin RNA (タカラ、東京、日本)を用いて RNA を採取した。ライ

ブラリーは NEB® Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB, MA, USA)を用いて作成し、1 サンプルあたり 2600 万リード平均でペアエンドリードを Illumina NovaSeq 6000 (Illumina sequencing platforms) で取得した。ヒトゲノム参照配列(hg38)をアライメントに使用しマッピングを行った。

未加工データを Subio Platform plug-ins software (東京、日本) で解析し発現変動遺伝子と fold change を計算した。IL-1 β 群および N- β 群間で False discovery rate<0.05 および Fold change >1 の遺伝子群を抽出し、軟骨細胞の異化因子の抑制に働く候補因子を比較検討した。

マウス大腿骨頭と EVs の共培養

6 週齢のマウス(C57BL/6J)より大腿骨頭を採取した。採取した大腿骨頭を PBS (ナカライテスク) で洗浄した後に、96-well plate に設置し 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10%FBS 含有 DMEM で 48 時間の培養を行った。10 ng/ml の IL-1 β および 10 μ g/ml の EVs で刺激し 72 時間の培養を行った。

組織切片の作成

マウス大腿骨頭を回収し、4%のパラホルムアルデヒドで固定した後に、10%EDTA で脱灰を行った。続いてパラフィン包埋を行い、パラフィン切片を作成した。その後サフラニン O 染色を行い、軟骨表層のサフラニン O 染色性を評価した。撮像した画像を RGB channels を用いて R、G、B に分割し、軟骨表層におけるサフラニン O 染色領域の割合を計算した。

(Headland et al, 2015)。

ヒト臨床検体を用いたヒト軟骨細胞の単離および EVs の軟骨保護作用検証

ヒト臨床検体の取得にあたり、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。文書による説明および同意を患者から得た後にヒト OA 患者より OA 軟骨組織を採取し実験に使用した。OA 軟骨組織は、人工膝関節全置換術患者より、手術中に骨切りを行う際に切除する膝関節部分の軟骨を含む骨片を採取した。OA 患者軟骨組織より、後述する方法により、ヒト軟骨細胞の単離を行った。

OA 軟骨細胞の単離、培養

採取した軟骨片を 1mm^3 に切断し、DMEM F12 を用いて 0.15% に調整した collagenase II 溶液 (Gibco) を加えた後に、 37°C の温浴槽で 12 時間振盪した。続いて 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10% FBS 含有 DMEM F12 を用いて細胞培養を行った。

ヒト軟骨細胞と EVs の共培養

24-well のプレート上に $2 \times 10^5/\text{well}$ の割合で軟骨細胞を播種し、 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10% FBS 含有 DMEM F12 を培養液として使用し、 10 ng/ml IL-1 β および $5\mu\text{g/ml}$ の EVs で刺激し 24 時間培養を行った。

実験 3 : SFRP5 の軟骨変性抑制効果の検証

実験 2 の結果から、N- β の刺激によって軟骨細胞に発現が上昇した SFRP5 に着目し、軟骨細胞及び軟骨組織に対する作用機序の解析を行った。

軟骨細胞に対する SFRP5 刺激の作用

マウス膝関節より単離した軟骨細胞を 24-well のプレート上に $2 \times 10^5/\text{well}$ の割合で播種し 10 ng/ml IL-1 β および 100 ng/ml の SFRP5 (R&D, Minneapolis, MN, US) で刺激し 24 時間培養を行った。

軟骨組織に対する SFRP5 刺激の作用 (Ex vivo)

実験 2 と同様に、6 週齢のマウスより大腿骨頭を採取後、96-well plate に設置し 25 mg/l penicillin/streptomycin および 10% FBS 含有 DMEM で 48 時間の培養を行った。その後 10 ng/ml の IL-1 β および 100 ng/ml の SFRP5 (R&D) で刺激し 72 時間の培養を行った。

マウス OA モデルの作成

OA モデルマウスとして膝前十字靭帯切断 (anterior cruciate ligament transection (ACLT)) モデルマウスと Collagenase-induced OA (CIOA) モデルマウスを作成した。

ACLT モデルは、8 週齢のマウス (C57BL/6J) に麻酔下に膝前十字靭帯切断を施行し作成した。またコントロール群として皮切のみ行う偽手術群 (sham) を作成した。

CIOA モデルは、8 週齢のマウス(C57BL/6J)に麻酔下に 0.25unit/μl の type VII collagenase solution (Sigma)6μl を膝関節内に 2 回投与し作成した (Ebata et al., 2023) (Figure2.)。

マウス膝関節における OA 抑制効果の検証

ACLT、CIOA モデルに SFRP5 および対象群として PBS の関節内投与を週 2 回、4 週間施行したのちに膝関節組織を回収した(Figure2.)。

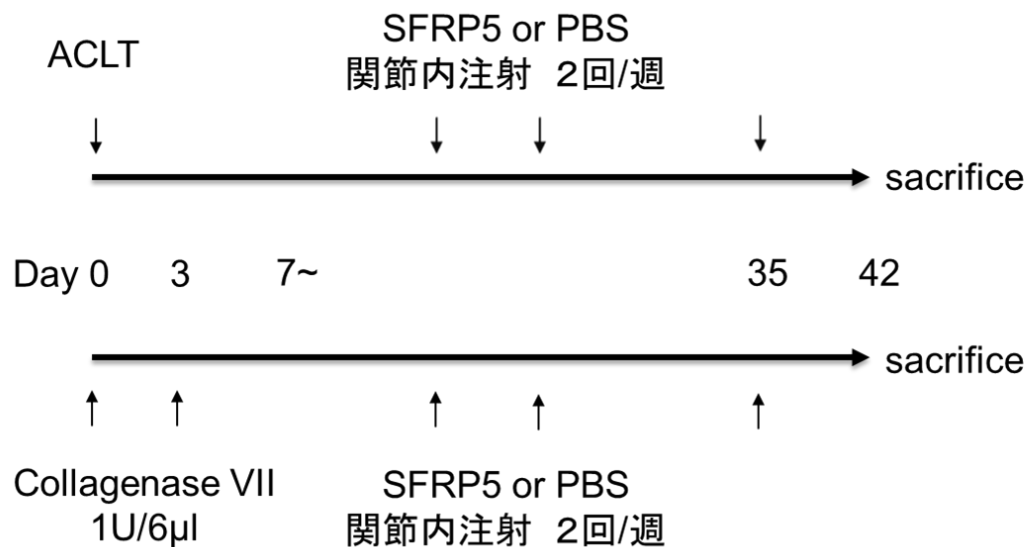


Figure2. OA モデルマウスの作成と SFRP 5 の関節内注射

各 OA モデルを作成後 SFRP5 および対照群として PBS の関節内投与を週 2 回、4 週間行った。

組織切片の作成

実験 2 と同様にマウス大腿骨頭については、4%のパラホルムアルデヒドで固定した後に、10%EDTA で脱灰を行った。マウス膝関節については回収後に PBS で洗浄を行い、10%ホルマリンを用いて固定し 10%の EDTA で脱灰を行った。

続いてパラフィン包埋を行い、パラフィン切片を作成した。その後サフラニン O 染色を行い、大腿骨頭については軟骨表層のサフラニン O 染色性を評価した。マウス膝関節については OA のグレードを軟骨組織における損傷の深達度および軟骨の損傷割合によりスコアリングを行う

Osteoarthritis Research Society International cartilage for OA histopathology(OARSI スコア)を用いて評価した。

RNA の抽出及びライブラリーの作成、RNA シークエンス

上記共培養後に無刺激群（control 群）、IL-1 β 群、SFRP5 添加群の軟骨細胞を採取した。回収した軟骨細胞から実験 2 と同様に RNA を採取した。1 サンプルあたり 4500 万リード平均でペアエンドリードを Illumina NovaSeq 6000（Illumina sequencing platforms）で取得した。マウスゲノム（mm10）をアライメントに使用しマッピングを行った。

未加工データを Subio Platform plug-ins software（東京、日本）で解析し発現変動遺伝子と fold change を計算した。

RNA シークエンスデータの解析

IL-1 β 群、SFRP5 添加群間で有意水準を $FDR < 0.05$ として発現上昇遺伝子群に対して Gene ontology(GO)エンリッチメント解析および、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome(KEGG)パスウェイ解析を行った。解析は公開データベースである A Gene Annotation & Analysis Resource Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)を用いて行った。データの視覚化とグラフ作成には SRplot tools (<http://www.bioinformatics.com.cn/srplot>)を使用した。

統計分析

全てのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差（SEM）で表記した。全てのデータは 2 群間での比較では Student の t 検定を用い、多群間では One-way analysis of variance (ANOVA)を行い、下位検定として Turkey の多重比較法を行った。有意水準は $p < 0.05$ とし、統計解析は Prism (GraphPad Software Inc., USA)を用いた。

Table1. 本研究で用いたプライマー

Target	Forward	Reverse
<i>mGapdh</i>	TGCAGCGAACTTTATTGATG	ACTTTGTCAAGCTCATTTCC
<i>mMmp13</i>	TTGGCCACTCCCTAGGTCTG	GGTTGGGGTCTTCATCGC
<i>mMmp3</i>	TTCTGGGCTATACGAGGGCA	TTCTTCACGGTTGCAGGGAG
<i>mIl-6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>hβ-ACTIN</i>	CCTCACCTGAAGTACCCA	TCGTCCAGTTGGTGACGAT
<i>hMMP13</i>	GGCTTAGAGGTGACTGGCAA	CATCAGGAACCCCGCATCTT
<i>hMMP3</i>	CACAGACCTGACTCGGTTCC	GAGTCAGGGGGAGGTCCATA
<i>hIL-6</i>	AGAAAAAGGTGGGTGTGTCCT	GTCTTTGAGCCTGTCTTCCCC
<i>hSFRP5</i>	CGACTACTATGGCTGGCAGG	GCAGGGATGTCAAGGCACT

Table2. 本研究で用いた抗体

Antibody	Dilution	Manufacturer
<i>TSG101</i>	1:1000	Novus
<i>CD9</i>	1:500	Novus
<i>Annexin A1</i>	1:1000	BioLegend
<i>Collagen II</i>	1:1000	Abcam
<i>MMP13</i>	1:1000	Abcam
<i>MMP3</i>	1:1000	Abcam
<i>Phospho-SMAD1/5</i>	1:1000	Cell signaling
<i>SFRP-5</i>	1:1000	Fabgennix
<i>β actin</i>	1:1000	BioLegend

実験結果

実験 1 : 軟骨保護作用を持つ好中球への誘導刺激の選定

TGF- β 刺激好中球は、非投与群と比較し、ヒト軟骨細胞セルラインにおける IL-1 β 刺激でみられる異化因子の発現増加を抑制した。

最初に、軟骨保護作用を持つ好中球への誘導刺激の選定のため、各種好中球とヒト軟骨細胞セルラインの共培養を行い、回収した C-28I2 に対して qPCR を行った。無刺激群 (control 群) と比較して、IL-1 β 刺激群においては異化因子の発現量が増加していた。一方で各種刺激を加えた好中球と共培養した群においては、TGF- β 刺激好中球群 (β 群) においてヒト軟骨細胞セルラインにおける Matrix metalloproteinase (MMP)-3、MMP-13 などの異化因子の発現が抑制されていた (Figure3A)。

続いて各種刺激を加えたマウス好中球の condition medium でマウス好中球を培養し、マウス細胞における作用をウェスタンブロッティング法および qPCR で評価した。ヒト軟骨細胞セルラインと好中球の共培養の結果と同様に、IL-1 β 刺激群においては異化因子の発現量が増加していた一方で、 β 群においては軟骨細胞の異化因子の発現が抑制される傾向にあった (Figure3B)。TGF- β に加えてロシグリタゾンを添加した群も同様に異化因子の発現を抑制した (Figure3C)。

これらの結果から、TGF- β によって刺激された好中球は液性因子を介して、IL-1 β による軟骨細胞における異化因子の発現を抑制することが示唆された。

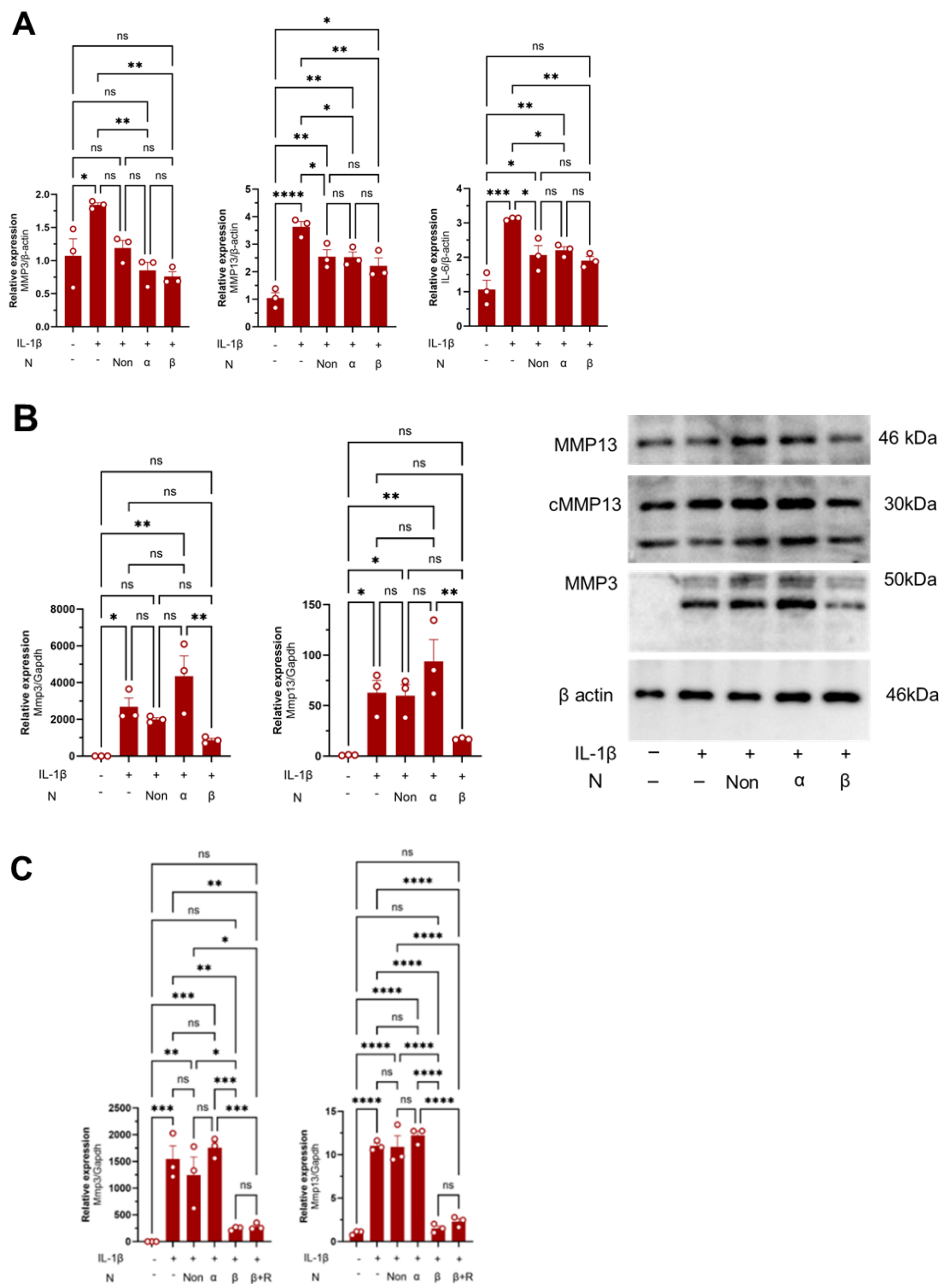


Figure3. TGF-β 刺激好中球の軟骨保護作用

- A. ヒト軟骨細胞セルライン C-28I2 と好中球の共培養実験の qPCR 結果 (n=3)。
- B. マウス軟骨細胞のマウス好中球由来 condition medium による刺激実験結果。左図は qPCR、右図はウェスタンブロッティングの結果を示す (n=3)。
- C. TGF-β + ロシグリタゾン添加群を加えたマウス軟骨細胞の condition medium 刺激実験結果(n=3)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、**** : $p < 0.0001$

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

好中球由来 **condition medium** に超遠心法を施行し、粒度分布解析と EVs マーカーから EVs が単離されていることが確認された。

各種刺激好中球、または好中球由来 **condition medium** と軟骨細胞の共培養実験の結果より、TGF- β 刺激好中球は軟骨細胞における異化因子の発現を抑制するという知見が得られた。この分子機序の解明のため、好中球由来の液性因子として EVs に着目した。Condition medium より超遠心法を用いて EVs を単離した。超遠心法により単離された粒子は EVs の平均粒子径は 147.7nm であり、ウェスタンブロッティング法により transmembrane protein である AnxA1 と TSG101 および cytosolic protein である CD9 それぞれの EVs マーカーが検出された。(Figure4)。

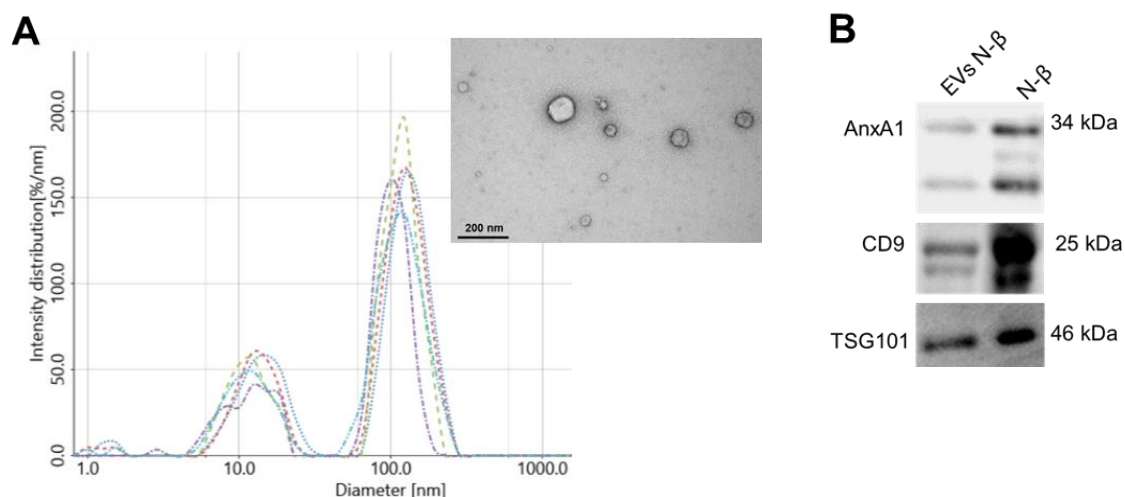


Figure4. TGF- β 刺激好中球の軟骨保護作用

- A. 超遠心で得られた EVs の粒度分布解析結果。および透過型電子顕微鏡による撮像画像。
- B. ウェスタンブロッティング法による EVs マーカーの検出。

TGF- β 刺激好中球由来 EVs (N- β) は、軟骨細胞における異化因子の減弱を促した。

EVs の軟骨細胞に対する作用を解析するため、In vitro において超遠心法により回収した EVs を用いた軟骨細胞の刺激実験を行った。ウェスタンブロットティングにおいて、MMP3、MMP13 といった異化因子のタンパク量が、IL-1 β 刺激群と比較し N- β 群において減少していた。同様に qPCR においても異化因子の発現量が優位に減少していた (Figure5)。

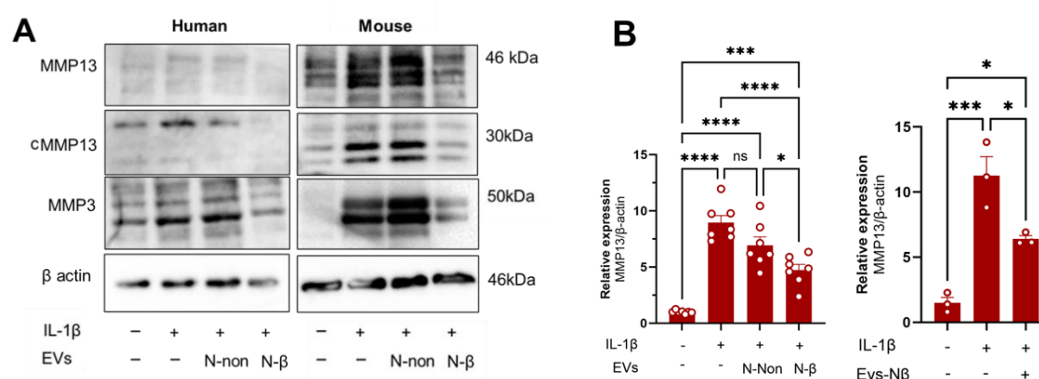


Figure5.EVs の軟骨保護作用

A. ウェスタンブロットティングによる EVs 刺激軟骨細胞のタンパク定量。

B. EVs による異化因子の遺伝子発現変動。右図はヒト軟骨細胞セルライン (n=7)、左図はマウス軟骨細胞における発現変動 (n=3)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、**** : $p < 0.0001$

EVs はヒト軟骨細胞セルラインにとりこまれていた

EVs が軟骨細胞に取り込まれているかを調べるため EVs を蛍光染色し、ヒト軟骨細胞セルライン C-28I2 へ添加し細胞への取り込みを確認した (Figure6)。

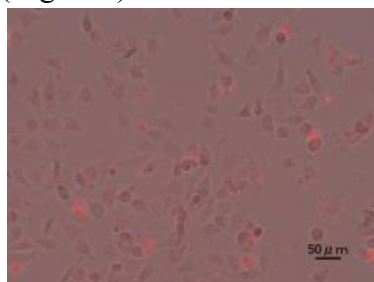


Figure6.EVs の軟骨細胞への取り込み

蛍光染色された EVs は軟骨細胞へ取り込まれていることが確認された。

TGF- β 刺激好中球由来 EVs (N- β) によって刺激したヒト軟骨細胞セルラインでは、炎症に関わる遺伝子発現が減少するとともに、**SFRP5** の遺伝子発現が増加していた。

EVs による刺激によって軟骨細胞に生じる変化を解析するために、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子解析を行った。IL-1 β 刺激群は Control 群に比較し 168 個の遺伝子発現が上昇していた。N-none 群では 282 個の遺伝子発現が上昇しており、N- β 群においては 161 個の遺伝子発現が上昇していた。これらの遺伝子群のうち N- β 群においてのみ上昇している遺伝子は 56 個であった (Figure7A)。

続いて IL-1 β 刺激群で発現が上昇していた遺伝子群に対して KEGG pathway 解析を行い、IL-17 signaling, TNF signaling を上位に同定した。またこれらの遺伝子群に対して Gene Ontology 解析を行うと、これらの遺伝子群はサイトカイン、およびケモカインに関わるものであった。一方で、これらの遺伝子群は N- β 群では発現が減少していた (Figure7B,C)。

N- β 群で特異的に上昇していた 56 遺伝子群についてパスウェイ解析を行うと metabolic pathway に関わる遺伝子発現群が発現上昇しており、それらの遺伝子群から、SFRP5 を軟骨細胞における異化因子の発現抑制にかかわる候補遺伝子として選択した。この SFRP5 は qPCR においても遺伝子発現の増加が確認され、ウェスタンブロッティングにおいてもタンパク量の増加していた (Figure7D,E)。

TGF- β 刺激好中球群由来 EVs (N- β) によって、マウス大腿骨頭軟骨表層の軟骨基質の分解が抑制された

続いて Ex vivo において、EVs による軟骨組織への作用を解析した。無刺激の好中球由来 EVs (N-none) 群においては軟骨基質の分解が抑制されていなかった一方で、N- β 群においては大腿骨頭軟骨表層のサフラニン O 染色性が有意に高く、軟骨表層の軟骨基質の分解が抑制されていた (Figure8)。

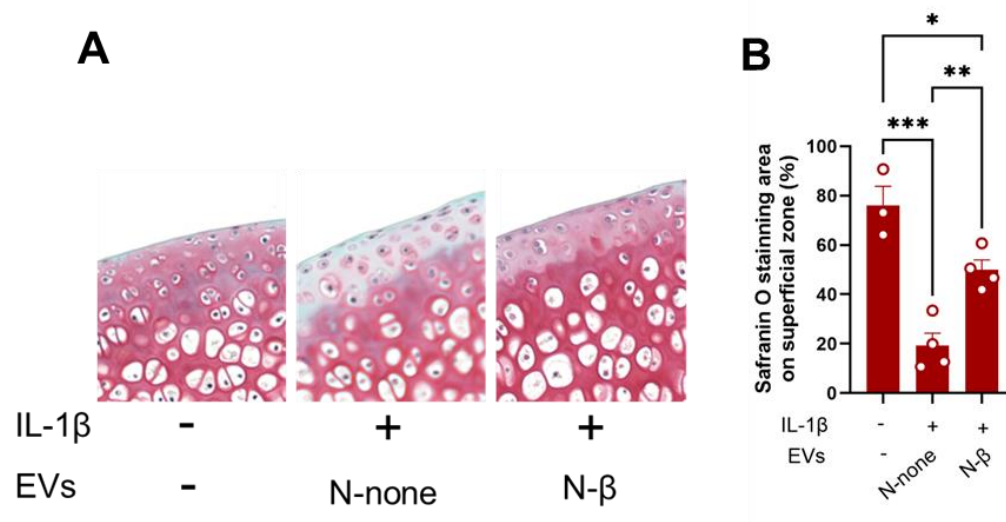


Figure8. EVs が軟骨に及ぼす影響の検討

A. マウス大腿骨頭軟骨における Safranin-O 染色画像。

B. ImageJ を用いたマウス大腿骨頭軟骨表層の Safranin-O 染色領域の定量評価。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$

ヒト軟骨細胞セルライン C-28I2 およびマウス軟骨細胞と同様に、ヒト軟骨細胞においても N- β 群の EVs は異化因子の発現を抑制した。

ヒト軟骨細胞セルラインおよびマウス軟骨細胞における結果と同様に、ヒト軟骨細胞においても MMP3、MMP13 といった異化因子の発現量が、IL-1 β 刺激群と比較し N- β 群において減少していた。(Figure9)。

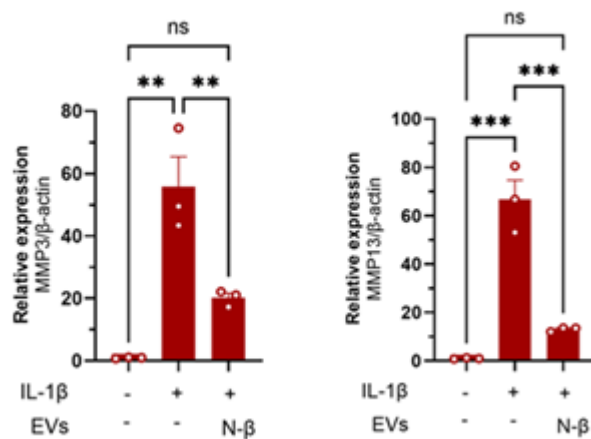


Figure9. EV とヒト軟骨細胞の共培養実験

qPCR による異化因子の遺伝子発現量の変動解析結果(n=3)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$

実験 3 : SFRP5 の軟骨変性抑制効果の検証

SFRP5 はマウス軟骨細胞における異化因子の発現を抑制した。

SFRP5 の軟骨細胞に対する作用を解析するため、SFRP5 recombinant を用いた軟骨細胞の刺激実験を行った。IL-1 β 刺激群と比較し SFRP5 群において異化因子の遺伝子発現量が有意に減少しており、SFRP5 は軟骨の変性を抑制することが示唆された (Figure10)。

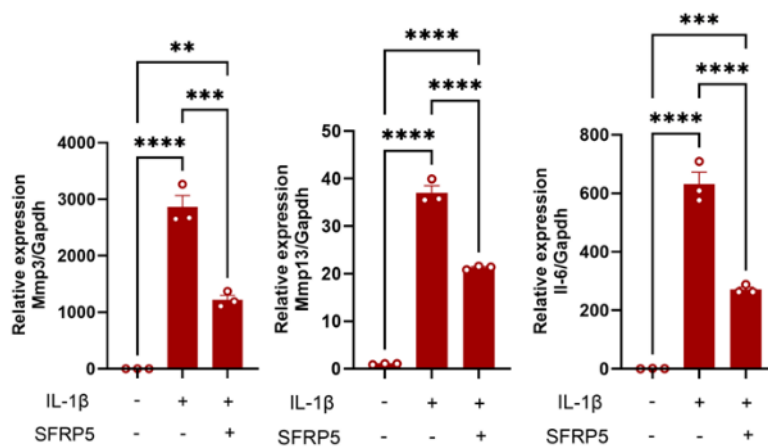


Figure10. マウス軟骨細胞の SFRP5 刺激実験

qPCR による異化因子の遺伝子発現量の変動解析結果(n=3)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、**** : $p < 0.0001$

SFRP5 によって、軟骨表層の軟骨基質の分解が抑制された

続いて EVs と同様に、Ex vivo において、SFRP5 による軟骨組織への作用を解析した。SFRP5 群においては大腿骨頭軟骨表層のサフラニン O 染色性が有意に高く、軟骨表層の軟骨基質の分解が抑制されていた (Figure11)。

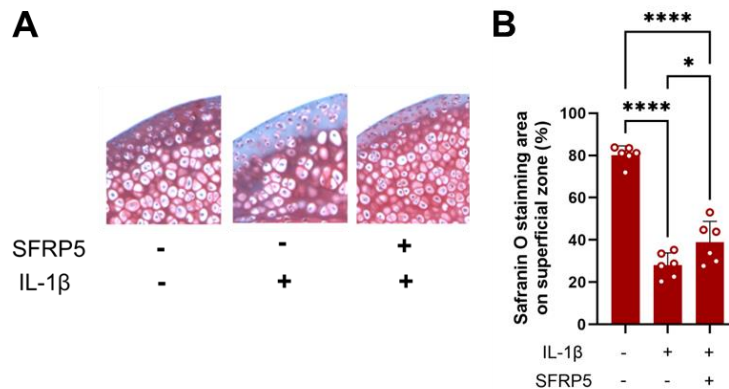


Figure11. SFRP5 が軟骨に及ぼす影響の検討

A. マウス大腿骨頭軟骨における Safranin-O 染色画像。

B. ImageJ を用いたマウス大腿骨頭軟骨表層の Safranin-O 染色領域の定量評価(n=6)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、**** : $p < 0.0001$

マウス OA モデルへの SFRP5 の膝関節内投与は、OA の進行を抑制した。

in vivo, ex vivo で得られた SFRP5 の軟骨変性抑制作用の生体内での検証のため、OA モデルマウスへの膝関節内投与を行った。対照群である PBS の投与群に比較し、SFRP5 投与群では OARSI スコアが有意に低く、SFRP5 はマウス膝関節における OA の進行を抑制した(Figure12)。

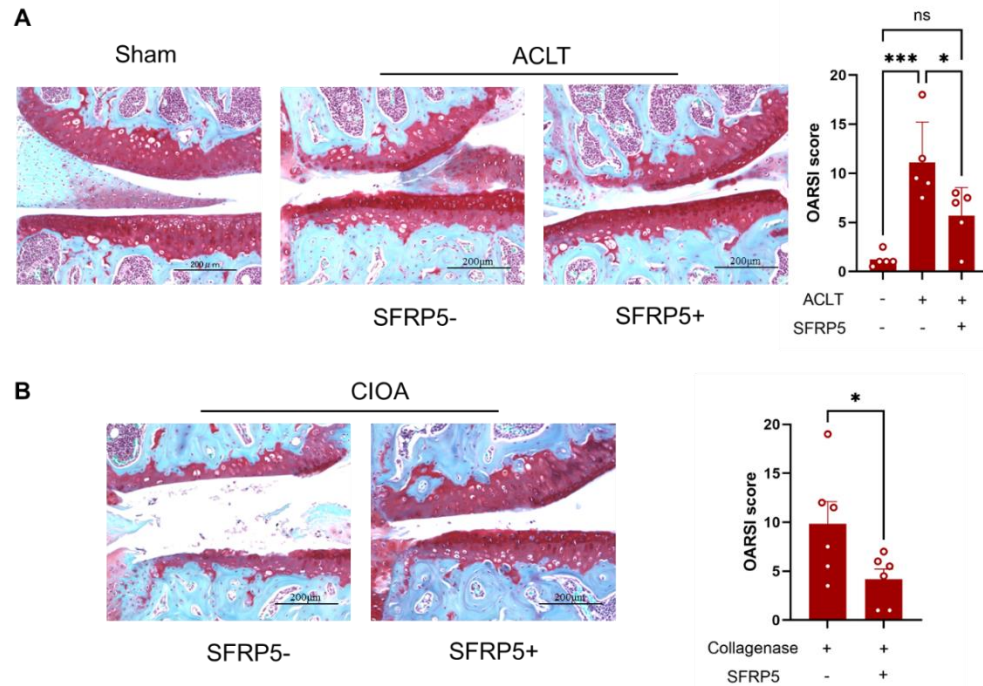


Figure12. SFRP5 の OA 進行抑制作用の検証

A. ACLT モデルにおける Safranin-O 染色画像および OARSI スコア(n=5)。

B. CIOA モデルにおける Safranin-O 染色画像および OARSI スコア(n=6)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$

SFRP5 によって刺激したマウス軟骨細胞では、IL-1 β 刺激群で発現が上昇する OA 進行に関わる遺伝子群の発現が抑制されていた

IL-1 β 刺激された軟骨細胞において 1736 個の遺伝子発現が上昇しており、SFRP5 によって刺激された軟骨細胞では 1535 個の遺伝子発現が上昇していた(Figure13A)。続いて IL-1 β 群における発現上昇遺伝子群に対し KEGG pathway 解析を行ったところ、TNF signaling、IL-17 signaling、cytokine–cytokine receptor interaction pathways を上位に同定した。(Figure13B)。

一方でこれらの遺伝子群は SFRP5 刺激群において、発現が抑制されており、これらの遺伝子群には NF κ B signaling に関わる遺伝子群も含まれていた。また、SFRP5 の発現上昇遺伝子群には SMAD をはじめとして TGF- β signaling pathway に関わる遺伝子が多く含まれていた(Figure13CDE)。

以上の知見をもとにウェスタンブロッティングでタンパク質量を評価し、SFRP5 群において MMP-3, MMP-13 の発現は抑制される一方で、SMAD の発現は増加していた(Figure14)。

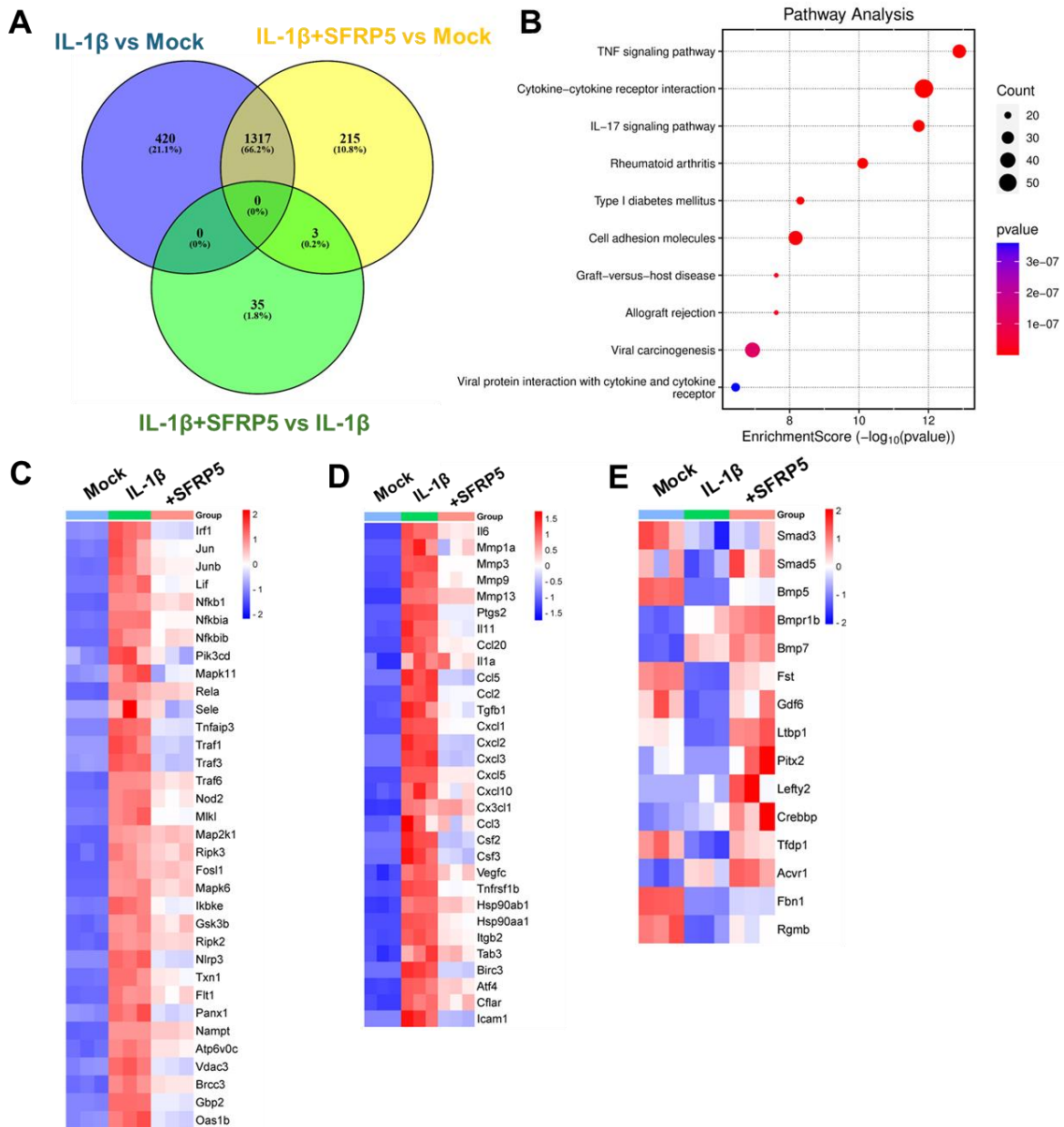


Figure13. SFRP5 刺激軟骨における網羅的遺伝子解析

- A. IL-1 β 群および SFRP5 群の発現上昇遺伝子を比較した Venn 図。
- B. IL-1 β 群の発現上昇遺伝子群の KEGG パスウェイ解析。
- C. TNF signaling に関わる遺伝子群のヒートマップ。
- D. inflammatory signaling and catabolic processes に関わる遺伝子群のヒートマップ。
- E. TGF- β signaling に関わる遺伝子群のヒートマップ。

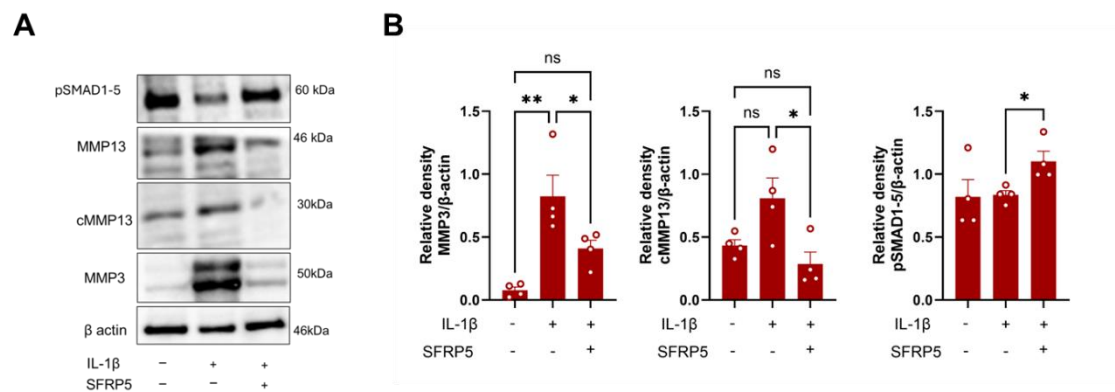


Figure14. SFRP5 刺激軟骨におけるタンパク質定量評価。

A. ウェスタンブロッティング。

B. ウェスタンブロッティングの定量化(n=4)。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$

考察

OA は世界中で非常に多くの罹患者がおり、手術加療のみならず OA の進行を抑制する薬剤の誕生が望まれるが、OA の病態は未だ解明されていない部分が多く、決定的な治療薬は現在のところ存在しない。近年 OA の病態を明らかにし、治療標的因子を検討するにあたり、EVs による関節内の細胞間コミュニケーションに注目した研究が散見される (Headland et al, 2015; Zhenhong et al, 2020)。そこで我々は近年報告されている組織恒常性の維持に働く好中球に着目し、軟骨保護作用を持つ形質の好中球を同定しその因子として細胞間のコミュニケーションに関わる EVs を解析することで軟骨細胞保護作用の分子機序を明らかにすることを着想した。

本研究では軟骨保護作用を持つ好中球として TGF- β 刺激好中球を同定した。これに炎症収束させる作用を持つ好中球への誘導にかかわる刺激としてしられる PPAR γ アゴニストを添加し、これらの刺激により活性化した好中球由来の EVs が軟骨細胞に与える作用を解析した (Lin et al, 2022)。TGF- β 刺激好中球由来の EVs (N- β) による刺激を受けた軟骨細胞の網羅的遺伝子解析の結果から、軟骨細胞内では IL-17 signaling, TNF signaling などの経路に関わる遺伝子群の発現が抑制されていることが示された。またこれらの軟骨の異化を抑制する作用に関わる候補因子として、N- β による刺激を受けた軟骨細胞中に特異的に上昇している遺伝子群の中から SFRP5 を同定した。先行研究で幹細胞由来の EVs が軟骨保護作用を持つことが示されており、これらの他の細胞由来の EVs が細胞間のコミュニケーションを通じて軟骨保護作用を持ちうることは、EVs に着目した我々の研究結果と矛盾しないと考えられる (Zhang et al, 2019)。

我々が治療標的因子として同定した SFRP5 は、軟骨細胞において異化因子の発現を減弱させ、OA モデルマウスの膝関節内において軟骨の変性を抑制し、OA の進行を抑制した。SFRP 5 は一般に抗炎症作用を持ち、Wnt protein が frizzled target protein に結合することを妨げることで、Wnt 経路をブロックするため Wnt 経路のアンタゴニストとして知られ、SFRP5 の組織における作用としてはインスリン抵抗性の改善や肥満を含むメタボリックシンドロームの改善の可能性が報告されている (Song et al, 2023; Tong et al, 2019)。しかしながら、軟骨細胞における SFRP5 の作用の研究は少ない。先行研究でマウス軟骨前駆細胞セルラインである ATDC5 において、

SFRP5 が Wnt5a/JNK の活性化を通して LPS によって惹起される炎症とアポトーシスを抑制することが報告されている(Sun et al, 2021)。しかしながら、今回我々は、SFRP5 は軟骨細胞における IL-17 signaling や TNF signaling、NFκB signaling の関連遺伝子の発現を抑制するとともに、TGF-β signaling を活性化することで軟骨保護作用を有するという知見を得た。

TNF signaling は、軟骨細胞のアポトーシスを誘発し、軟骨形成に必要とされる SOX9 の発現を抑制することによって、OA の進行に関与しているとされ、TNF-α を標的因子として抑制することで、OA における軟骨変性や骨軟骨病変の修復に有益であることが示されている(Welhling et al, 2009; Chisari et al, 2020)。

一方で、NFκB signaling は軟骨細胞や関節内の他の細胞において、マトリックス分解酵素や炎症性メディエーターの生成を調整することが知られている(Roman-Blas and Jimenez, 2006; Hamasaki et al, 2020)。これらのことから NFκB signaling の上流における制御因子は OA における潜在的な治療標的因子であると考えられ、NFκB signaling の制御因子である IkappaB kinases が、軟骨細胞の異化を抑制し、軟骨の変性を抑制することが報告されている(Olivotto et al, 2015)。

本研究では SFRP5 の投与による TGF-β signaling の活性化と、TNF signaling や NFκB signaling に関わる遺伝子発現の減少との関わりが示唆された。先行研究で、TGF-β は NF-κB signaling を抑制することで強力な抗炎症効果を発揮し、その抗炎症効果に関連して、TGF-β1 はプロテオグリカンの合成を刺激し、関節炎モデルマウスの軟骨におけるプロテオグリカンの損失を防ぐことが示されている(Kulkarni et al, 1993; Monteleone et al, 2004; Glansbeek et al, 1998)。

これらの知見を踏まえると、本研究で示された SFRP5 の in vitro および in vivo で観察された軟骨保護作用は、TNF signaling および NFκB signaling の活性化を抑制し、OA の進行中に軟骨細胞で TGF-β signaling を誘導する作用に関連していることが示唆された。

本研究における limitation として、軟骨における SFRP5 の発現の増加は確認している一方で、EVs が軟骨における SFRP5 の発現増加する機序についての検証実験結果がないことである。この点に関しては今後細胞外小胞の内容物についての解析実験を検討している。

総括及び結論

- TGF- β 刺激好中球が軟骨細胞における異化因子の発現を抑制することを示した。
- 同好中球の軟骨保護作用のメカニズムを明らかにするために、EVs に着目し、軟骨細胞との共培養を行い、EVs の軟骨保護作用に関わる因子として SFRP5 を同定した。
- SFRP5 は、軟骨細胞における TNF signaling や NF κ B signaling を抑制することによる軟骨細胞の異化因子発現抑制と、軟骨の変性抑制作用を有することを示した。

本研究は、TGF- β 刺激好中球が軟骨保護作用を有することを示し、その液性因子として EVs に着目し、好中球の軟骨保護作用の分子機序を解析したものである。本研究により、軟骨細胞における異化因子の発現抑制や、OA の軟骨変性を抑制する因子として SFRP5 が同定され、その機序の一部として TNF signaling や NF κ B signaling といった OA の進行に関わるシグナル経路の抑制であることを示した。今後さらなる詳細なメカニズムの解明が必要ではあるが、SFRP5 は OA の進行抑制の治療標的因子として期待される。

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。

これまでの研究過程において、実験の技術のご指導ならびに研究に関するご助言を頂きました整形外科学分野助教の照川アラー先生に深く感謝を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数々のご指導を賜りました、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感謝を申し上げます。

本研究（の一部）は、日本学術振興会基盤研究 C; 20K09471, 日本医療研究開発機構(Moonshot Research and Development Program, PJ4221KB01)および小林財団の助成を受けたものです。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Chisari E, Yaghmour KM and Khan WS. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(5):708-18.

Ebata T, Terkawi MA, Hamasaki M, Matsumae G, Onodera T, Aly MK, Yokota S, Alhasan H, Shimizu T, Takahashi D et al. Flightless I is a catabolic factor of chondrocytes that promotes hypertrophy and cartilage degeneration in osteoarthritis. *iScience*. 2021;24(6):102643.

Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM and van den Berg WB. Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest*. 1998;78(2):133-42.

Gosset, M, Berenbaum F, Thirion S and Jacques C. 2008. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc*, 3, 1253-60.

Hamasaki M, Terkawi M A, Onodera T, Homan K and Iwasaki N. 2019. A Novel Cartilage Fragments Stimulation Model Revealed that Macrophage Inflammatory Response Causes an Upregulation of Catabolic Factors of Chondrocytes In Vitro. *Cartilage*, 1947603519828426.

Hamasaki M, Terkawi M A, Onodera T, Tian Y, Ebata T, Matsumae G, Alhasan H, Takahashi D and Iwasaki N. 2020. Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments revealed a strategy for treatment of progressive osteoarthritis. *Sci Rep*, 10, 7558.

Headland S E, Jones H R, Norling L V, Kim A, Souza P R, Corsiero E, Gil C D, Nerviani A, Dell'accio F, Pitzalis C, et al. 2015. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*, 7, 315ra190

James S L, Abate D, Abate K H, Abay S M, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A, et al. 2018. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392, 1789-1858.

Kolonics F, Kajdacs E, Farkas VJ, Veres DS, Khamari D, Kittel A, Merchant ML, McLeish KR, Lorincz AM and Ligeti E . Neutrophils produce proinflammatory or anti-inflammatory extracellular vesicles depending on the environmental conditions. *J Leukoc Biol*. 2021;109(4):793-806.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB Sporn MB, Ward JM and Karlsson S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(2):770-4.

Lin R, Yi Z, Wang J, Geng S and Li L. Generation of resolving memory neutrophils through pharmacological training with 4-PBA or genetic deletion of TRAM. *Cell Death Dis*. 2022;13(4):345.

Loh W and Vermeren S. Anti-Inflammatory Neutrophil Functions in the Resolution of Inflammation and Tissue Repair. *Cells*. 2022;11(24).

Monteleone G, Mann J, Monteleone I, Vavassori P, Bremner R, Fantini M, Blanco GDV, Tersigni R, Alessandrini L, Mann D, et al. A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation. *J Biol Chem*. 2004;279(6):3925-32.

Ni Z, Zhou S, Li S, Kuang L, Chen H, Luo X, Ouyang J, He M, Du X and Chen L. Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Res*. 2020;8:25.

Raposo G and Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-83.

Robbins PD and Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):195-208.

Song Y, Ma Y, Zhang K, Zhang W, Xiong G, Qi T, Shi J, Qiu H, Zhang J, Han F, et al. Secreted frizzled-related protein 5: A promising therapeutic target for metabolic diseases via regulation of Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023;677:70-6.

Sun M, Wang W, Min L, Chen C, Li Q and Weng W. Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) protects ATDC5 cells against LPS-induced inflammation and apoptosis via inhibiting Wnt5a/JNK pathway. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):129.

Terkawi MA, Ebata T, Yokota S, Takahashi D, Endo T, Matsumae G, Shimizu T, Kadoya K, and Iwasaki N . Low-Grade Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Cellular and Molecular Mechanisms and Strategies for Future Therapeutic Intervention. *Biomedicines.* 2022;10(5).

Tong S, Ji Q, Du Y, Zhu X, Zhu C and Zhou Y. Sfrp5/Wnt Pathway: A Protective Regulatory System in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Interferon Cytokine Res.* 2019;39(8):472-82.

Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, Liu F, Wells JW, Muller PE, Evans CH and Porter RM. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):801-12.

Wilkinson DJ, Falconer AMD, Wright HL, Lin H, Yamamoto K, Cheung K, Charlton SH, Arques MDC, Janciauskiene S, Refaie R et al. Matrix metalloproteinase-13 is fully activated by neutrophil elastase and inactivates its serpin inhibitor, alpha-1 antitrypsin: Implications for osteoarthritis. *FEBS J.* 2022;289(1):121-39.