



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CCN3は関節内の細胞老化および破骨細胞形成を介して関節リウマチの病態に関与する
Author(s)	徳廣, 泰貴
Description	配架番号 : 2998
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16905号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16905
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99750
Type	doctoral thesis
File Information	TOKUHIRO_Taiki.pdf, 全文



学位論文

CCN3 は関節内の細胞老化および破骨細胞形成を介して関節リウマチの病態に関与する
(Cellular communication network factor 3 contributes to the pathological process of
rheumatoid arthritis through promoting cell senescence and osteoclastogenesis in the joint)

2026 年 3 月

北海道大学

徳廣泰貴

学位論文

CCN3 は関節内の細胞老化および破骨細胞形成を介して関節リウマチの病態に関与する
(Cellular communication network factor 3 contributes to the pathological process of
rheumatoid arthritis through promoting cell senescence and osteoclastogenesis in the joint)

2026 年 3 月

北海道大学

徳廣泰貴

目次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
要旨		2 頁
略語表		5 頁
緒言		6 頁
方法		8 頁
結果		14 頁
考察		28 頁
総括および結論		30 頁
謝辞		31 頁
利益相反		32 頁
引用文献		33 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。

Taiki Tokuhiko, Gen Matsumae, Tsutomu Endo, Yuki Ogawa, Takuya Ogawa, Chen Liyile, Yoshio Nishida, Hend Alhasan, Hideyuki Kobayashi, Taku Ebata, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Tomohiro Onodera, Ken Kadoya, M Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki.

Cellular communication network factor 3 contributes to the pathological process of rheumatoid arthritis through promoting cell senescence and osteoclastogenesis in the joint.

Journal of Autoimmunity. 2024 Nov.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 徳廣泰貴、小川裕生、小川拓也、西田善郎、小林英之、遠藤努、照川アラー、岩崎倫政
NOV をターゲットとした、マウス実験モデルでの関節リウマチの病的プロセスの抑制
第 38 回日本整形外科学会基礎学術集会、2024 年 10 月 17-18、東京都新宿区
2. Taiki Tokuhiko, M Alaa Terkawi, Gen Matsumae, Tsutomu Endo, Yuki Ogawa, Yoshio Nishida, Hend Alhasan, Hideyuki Kobayashi, Taku Ebata, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Tomohiro Onodera, Ken Kadoya, Norimasa Iwasaki
Cellular Communication Network Factor 3 is involved in the pathological process of rheumatoid arthritis and promotes cell senescence and osteoclastogenesis in the joint
Orthopaedic Research Society 2025 Annual Meeting, February 7-11, Phoenix, AZ
3. 徳廣泰貴、照川アラー、小林英之、岩崎倫政
関節リウマチの病態における、CCN3 の機能解明
第 43 回日本骨代謝学会学術集会、2025 年 7 月 24-26 日、熊本県熊本市

要旨

【背景と目的】

関節リウマチ（RA）は、滑膜炎と骨破壊を主徴とする慢性炎症性疾患であり、関節痛、腫脹、可動域制限、日常生活動作の低下など、患者の QOL を大きく損なう。生物学的製剤や JAK 阻害薬の登場により治療成績は飛躍的に改善したものの、依然として治癒には至らず、疾患活動性が完全に抑制されない患者も一定数存在する。また、高齢化に伴い増加する免疫老化（immunosenescence）の影響により、感染症リスクや薬剤による副作用が治療選択に大きな制限を与えることも少なくない。このような背景から、免疫抑制に依存しない新たな治療戦略の必要性が高まっている。

近年、RA の病態において「細胞老化」が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。老化細胞は細胞周期が停止するだけでなく、炎症性サイトカインやマトリックス分解酵素を分泌する SASP と呼ばれる特徴をもち、周囲細胞にも炎症を波及させる。RA 滑膜では、線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）やマクロファージに老化細胞が蓄積し、SASP を介して炎症の慢性化や骨破壊促進に寄与することが報告されている。すなわち、細胞老化の制御は、免疫抑制とは異なる新しい治療コンセプトとして注目されている。

そこで本研究では、細胞老化誘導因子として注目される CCN3 に着目した。CCN3 は細胞外マトリックス関連タンパクであり、組織修復、線維化、炎症など多彩な生理機能を持つことが知られている。また、加齢関連疾患との関連や、RA 患者の血清中 CCN3 濃度の上昇と疾患活動性との相関も報告されている。

本研究では、CCN3 が関節内で老化を促し、炎症や骨破壊を悪化させる因子であるという仮説を立て、RA の病態における CCN3 の機能と、CCN3 阻害が治療効果を持つかどうかを検討することを目的とした。

【対象と方法】

本研究では、ヒト RA 滑膜組織の解析、細胞培養を用いた *in vitro* 実験、マウス関節炎モデルを用いた *in vivo* 解析を組み合わせ、CCN3 の役割を多角的に評価した。

まず、ヒト滑膜サンプルは人工関節置換術を受けた RA 患者および変形性関節症患者から採取し、免疫染色により CCN3 発現を評価した。また、公開されている scRNA-seq データを解析し、滑膜内の細胞集団ごとの CCN3 発現パターンを調査した。

次に、*in vitro* 解析では、ヒト FLS を組換え CCN3 で刺激し、24、48、168 時間での刺激実験を行った。遺伝子発現は qRT-PCR で評価し、タンパク発現は Western blotting、老化細胞の検出は β -gal 染色により行った。さらに、RNA-seq 解析を実施

し、CCN3 刺激による遺伝子発現の変化、エンリッチメント解析、転写調節ネットワーク解析を行った。

破骨細胞分化への影響を評価するため、健常人末梢血由来単球を MCSF 存在下で破骨細胞前駆細胞へ誘導した後、RANKL または CCN3 で刺激した。破骨細胞分化は TRAP 染色およびアクチンリング形成により評価し、象牙質切片を用いて骨吸収能を測定した。また、FLS と単球を Transwell insert を介して共培養し、FLS から分泌される因子が破骨細胞形成に与える影響を検証した。

in vivo 解析として、CCN3 を含浸させたスポンジをマウス頭頂骨に移植する頭頂骨スポンジ移植モデルを作成し、組織染色および micro-CT により骨吸収・炎症・老化細胞の出現を評価した。さらに、CCN3 を膝関節内に投与するモデルでも細胞老化の誘導を検討した。

治療効果の検証として、CAIA モデルマウスを用い、抗 CCN3 抗体を投与した群と対照群で関節炎スコア、組織学的炎症、老化細胞、破骨細胞の割合を比較した。

統計解析は適切な検定手法を用い、有意水準は $p < 0.05$ と設定した。

【結果】

RA 患者の滑膜組織では、CCN3 陽性細胞が変形性関節症と比較して有意に多く認められた。また、scRNA-seq 解析の結果、CCN3 は主に炎症性 FLS サブセットに高発現していた。

in vitro 実験では、FLS に CCN3 を刺激すると、24 時間後には多数の遺伝子が有意に上昇しており、TGF- β シグナル、Hippo シグナル、破骨細胞分化経路などが活性化していた。GO 解析では、コラーゲン代謝や成長因子結合など組織リモデリング関連の機能が上位に挙げられた。また、老化関連遺伝子の発現も多く上昇し、SASP 因子の発現が亢進していた。刺激を 168 時間に延長すると、p53 および p21 の発現上昇、 β -gal 陽性細胞の増加が見られ、FLS の細胞老化を認めた。

膝関節内投与モデルでも、CCN3 を投与した膝滑膜では、p53 および β -gal 陽性細胞が有意に増加し、関節内での細胞老化誘導作用が確認された。

単球への CCN3 刺激では、破骨細胞様細胞への分化を促進し、TRAP 陽性細胞およびアクチンリング形成が増加し、象牙質片上での骨吸収領域が拡大した。RNA-seq 解析では細胞老化、破骨細胞分化、TGF- β シグナル、接着分子経路などが活性化し、SP1、FOS、RB1、TP53 など老化関連転写因子ネットワークが関与していた。

頭頂骨スポンジ移植モデルでは、micro-CT で骨吸収領域が拡大し、TRAP 陽性細胞および老化細胞が増加した。炎症性サイトカインの発現も上昇していた。

CAIA モデルでは、抗 CCN3 抗体投与により関節炎スコアが改善し、炎症細胞浸潤面積、 β -gal 陽性細胞、TRAP 陽性領域が減少した。

【考察】

本研究により、CCN3 が RA 滑膜において細胞老化を誘導し、炎症と骨破壊を増悪させる中心的な役割を担うことが明らかとなった。特に、FLS における細胞老化の誘導と SASP の活性化、さらに破骨細胞様細胞形成の促進という二重の作用により、CCN3 は「老化-炎症-骨破壊」の悪循環を形成していた点が重要である。

既存の RA 治療は主に免疫の制御に焦点を当てているが、本研究は細胞老化制御という新しい視点の重要性を示した。また、CCN3 は RA 患者で増加し、活動性とも関連することから、バイオマーカーとしての有用性も期待される。CCN3 阻害は、老化細胞の蓄積を抑えつつ炎症と骨破壊も改善する戦略であり、免疫抑制の副作用に悩む高齢 RA 患者にも適応可能な治療コンセプトとなりうる。

【結論】

本研究では、CCN3 が RA 関節内で細胞老化を誘導し、炎症と骨破壊の進行に寄与することを明らかにした。CCN3 は FLS および単球系細胞に作用し、SASP 誘導、破骨細胞分化亢進、骨吸収促進を引き起こす。in vivo モデルにおいても、CCN3 投与は細胞老化と骨吸収を増加させ、抗 CCN3 抗体投与は関節炎症状および組織破壊を改善した。さらに、本研究で示された CCN3 による FLS 老化・SASP 誘導と破骨細胞形成促進という二方向性の作用は、RA 関節で生じる“老化-炎症-骨破壊の悪循環”を形成する中心的機序を支持するものである。以上より、CCN3 は RA における新規病態修飾因子であり、細胞老化制御を介した新たな治療戦略の標的となり得ることが示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

β-gal	β-galactosidase
CAIA	Collagen Antibody-Induced Arthritis
CCN3	Cellular Communication Network Factor 3
Cdkn1a	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A
CT	Computed Tomography
DEGs	Differentially Expressed Genes
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FLS	Fibroblast-Like Synoviocytes
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
H&E	Hematoxylin and Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MCSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEM	Minimum Essential Medium
MMP	Matrix Metalloproteinase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pP53	Phosphorylated p53
PS	Penicillin–Streptomycin
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RA	Rheumatoid Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RB	Retinoblastoma
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype
SEM	Standard Error of the Mean
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

緒言

関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis : RA）は全身性の自己免疫疾患であり、主要な症状として滑膜炎および関節破壊を引き起こし、進行性に発症する。その結果として、患者は日常生活動作能力が低下し、重度の機能障害を呈することもある(Gravallese et al., 2023)。本疾患は高い有病率を示し、2019 年には世界で約 1,800 万人が罹患していると推定され、そのうち 55 歳以上の女性が 70%を占めた。平均寿命の延伸に伴い、有病率は今後も増加すると考えられている。

RA の進行は、(1) 自己抗体の出現やサイトカイン異常など、細胞・分子レベルで自己免疫異常が生じる時期であり、まだ臨床症状はみられない前臨床期、(2) 滑膜炎を主体とする強い炎症が誘発され、関節痛・腫脹などの臨床症状が出現する臨床期、(3) 関節破壊や関節外病変が進行する慢性期の 3 段階に分類される(Holmdahl et al., 2014)。

治療法としては、症状緩和のための薬物療法、関節負荷軽減のための理学療法、疼痛軽減および関節機能回復を目的とした外科的介入が行われる(Gill et al., 2023)。しかし、TNF 阻害薬をはじめとする生物学的製剤による免疫調節療法は、高齢者においては免疫老化（immunosenescence）や感染リスクの増大、併存疾患の影響などにより効果が限定的であることが報告されている(Bathon et al., 2006 ; Boots et al., 2013 ; Radovits et al., 2009)。したがって、より安全かつ効果的な新規治療薬の開発を目的とした研究の継続が求められる。

加齢は自己免疫疾患発症の因子の一つであり、高齢者では免疫細胞機能の低下とともに、自己抗体および炎症性サイトカインの産生増加が認められる。最近の報告では、RA 滑膜組織において老化細胞、すなわちマクロファージや線維芽細胞様滑膜細胞の蓄積がみられ、これらが疾患病態における主要なエフェクター細胞として関与していることが示唆されている(Bartok and Firestein, 2009 ; Del Rey et al., 2019 ; Udalova et al., 2016)。

細胞は内外からの刺激やストレスに応答して、p53-サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1A（Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A : Cdkn1a ; p21）やレチノブラストーマ（Retinoblastoma : RB）-Cdkn2a（p16）経路を活性化し、G1/S 期での細胞周期停止を誘導する。老化細胞は恒常性維持機能の喪失に加え、細胞老化随伴分泌現象（senescence-associated secretory phenotype : SASP）を形成し、炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素を高レベルで分泌することで、組織障害や慢性炎症を惹起する(Gasek et al., 2021)。したがって、細胞老化の抑制は、免疫抑制剤と比較して副作用が少ない新たな RA 治療戦略となり得る(Gasek et al., 2021)。そのためには、滑膜内における老化誘導機構を明らかにし、in vivo で老化を活性化させる因子を同定することが重要である。

また、我々は破骨細胞形成に関与するサイトカインが、骨・関節破壊の治療ターゲットになりうるという仮定のもと、RA 患者の末梢血由来 RNA を用いたトランスクリ

プトーム解析(Macias-Segura et al., 2018)と RA 患者滑膜に対する scRNA 解析 (Stephenson et al., 2018)から Communication network factor 3 (CCN3、別名 Nephroblastoma Overexpressed; NOV) を同定した。CCN3 は、CCN ファミリーに属する細胞外マトリックス関連タンパクであり、加齢関連疾患（変形性関節症、冠動脈疾患、肥満、インスリン抵抗性、癌、慢性炎症など）の発症や進展に関与することが知られている(Fadhil Jaafar et al., 2023 ; Hirose et al., 2022 ; Kuwahara et al., 2020 ; Lobaccaro et al., 2013 ; Martinerie et al., 2016 ; Son et al., 2023)。また、複数の研究により、RA 患者血清中の CCN3 濃度が DAS28 および抗 CCP 抗体値と相関することが報告されている (Saleem Zayed, 2022 ; Taneja et al., 2018 ; Wei et al., 2020)。

本研究では、CCN3 が関節内において細胞老化と骨破壊を活性化する因子として作用するとの仮説を立て、RA の進行過程における CCN3 の役割を検討した。その結果、CCN3 は細胞老化および破骨細胞形成を誘導するオートクライン／パラクライン因子として機能し、RA 病態の進展に寄与すること、さらに新たな治療標的となり得る可能性が示唆された。

方法

1. 倫理審査の承認および患者説明

本研究で使用したヒト検体は全て、北海道大学病院倫理審査委員会の承認を受けた後に取得し使用した（承認番号：020-0078、21-0044）。検体の取得に際しては、患者に対して文書による説明および同意を得た後に、臨床検体を回収し研究に使用した。

また、本研究における動物実験は、全て北海道大学大学院医学研究院における動物実験委員会の承認を受けて行った（承認番号：20-0065）

2. 滑膜組織の免疫組織化学染色

滑膜組織は、人工膝関節全置換術または人工手関節全置換術を受けた RA 患者から採取した。対照群の滑膜は、変形性関節症患者の人工膝関節全置換術時に採取した。採取した滑膜を、4%パラホルムアルデヒド（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）で 48 時間固定後、パラフィン包埋し、3 μ m 厚に切った切片を CCN3 抗体（Novus Biologicals, Centennial, CO, USA）で一晩反応させた。その後、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin secondary antibody (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で刺激し、hematoxylin で細胞核の対比染色を行った。

3. 組換え CCN3 を用いた in vitro 刺激実験

ヒト線維芽細胞様滑膜細胞（hFLS; Cell Applications, San Diego, CA, USA）は、 α MEM 培地に 10% Fetal bovine serum (FBS)、1% penicillin/streptomycin (PS)、1% L-glutamine を加えてインキュベーター（37°C, 5%CO₂）で培養した。hFLS に 100 ng/mL のヒト組換え CCN3（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）を加えて 24、48、または 168 時間刺激した。培地は 3 日ごとに新鮮な培地と交換した。その後、細胞を回収し、遺伝子およびタンパク発現解析を行なった。

ヒト単球は健常人ドナー（30 - 48 歳）の末梢血から密度勾配遠心分離法（Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare, Chicago, IL, USA）により分離し、その後 MACS Pan Monocyte Isolation Kit（Miltenyi Biotec, Auburn）を用いて単離した。単球は 25 ng/mL ヒト組換え macrophage colony-stimulating factor（hMCSF ; Peprotech, Cranbury, NJ, USA）を含む培地で 6 日間培養し、その後 100 ng/mL のヒト組換え CCN3 で 24 時間刺激した。

破骨細胞分化アッセイでは、単球を 25 ng/mL の hMCSF を含む培地で培養して破骨

細胞前駆細胞を作製した。その後、同培地に 50 ng/mL のヒト組換え Receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL ; Peprotech) を添加して 8 日間培養した(Tian et al., 2020)。培地は 3 日ごとに新しい培地と交換した。8 日目に、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色キット (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて染色した。また、アクチンリング染色にはファイロジン (Alexa Fluor 633 ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) および DAPI (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) を用いた。

破骨細胞の機能解析のため、単球を象牙質切片 (Wako) 上で 21 日間、同様の培地で培養した(Yokota et al., 2021)。骨吸収領域は、peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin (20 mg/mL, Sigma) および、3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.52 mg/mL, Phosphate buffered saline (PBS) 中 0.1 % H₂O₂含有) で染色し、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710 ; KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。得られた画像は ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) で解析し、骨吸収領域の面積を算出した。

4. qRT-PCR

培養した細胞から RNA を抽出するため、TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて細胞を溶解し、NucleoSpin RNA (Takara, Shiga, Japan) を用いて Total RNA を採取した。500ng の Total RNA から GoScript™ reverse transcriptase and random primer (Promega, Madison, WI, USA) を用いて逆転写し cDNA を合成した。次に、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara) と標的遺伝子のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。遺伝子発現の定量評価には、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method を用いた(Tian et al., 2020)。本研究で使したプライマーは、実験方法セクション末尾の表 1 に示した。

5. Western blot

培養した細胞を RIPA lysis buffer (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて溶解した。溶解液を samples buffer EzApply (ATTO) と混合し、100℃で 5 分間加熱処理した後、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後のゲルを polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P Membrane; Merck, Darmstadt, Germany) に転写した後、5%スキムミルクを用いて 1 時間室温でブロッキングを行った。次に、1 次抗体溶液でメンブレンを 1 時間室温で振盪した後、HRP 標識 2 次抗体を 1 時間室温で反応させた。十分に洗浄した後に、Quantity One software, version 4.6.9 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、標的タンパクのバンドを検出し、ImageJ を用いて標的タンパクのバンドの定量化を行った。本研究で使した抗体は、実験方法セクション末尾の表 2 に示した。

6. 細胞老化染色

組換え CCN3 で 168 時間刺激した培養細胞を固定し、Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて染色した。得られた画像はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) で観察し、 β -gal 陽性細胞の割合を ImageJ で解析した。

7. RNA sequence およびバイオインフォマティクス解析

各条件につき 3 サンプルの Total RNA を抽出した。1 μ g の RNA から NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) によりライブラリーを作製し、Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて塩基配列を決定した。150 bp $\times$ 2 ペアエンド、1 サンプルあたり 4 - 6 Gb のリードデータを得た。得られたシーケンスデータはトリミング後、HISAT2 v2.0.5 によりマッピングを行った。リード数は RSEM で定量し、得られた raw count データを edgeR R パッケージ (ver. 3.22.5) で解析し、Differentially expression genes (DEGs) および fold change を算出した。統計的有意性は false discovery rate (FDR) < 0.05 を基準とした。

Gene Ontology (GO) および pathway enrichment 解析は、ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go74/>) を用いて実施し、可視化およびグラフ作成には SRplot tools (<http://www.bioinformatics.com.cn/srplot>) を用いた。さらに、single-cell RNA シーケンス (scRNA-seq) 公的データベースの解析には BBrowserX ソフトウェア (BioTuring Inc., San Diego, CA, USA; <https://bioturing.com/bbrowserx>) を使用した。

本研究で得られた RNA-seq データは Gene Expression Omnibus (GEO) データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登録されており、アクセッション番号は GSE271643、GSE171542、および GSE272743 である。その他、本研究で使用した公的データベースとして GSE129087 および GSE100191 を利用した。

8. In vivo 刺激実験

CCN3 の生体内での効果を検証するため、2 種類のモデルを使用した。

まず、4 μ g の組換え CCN3 (R&D Systems) を 50 μ L の PBS に溶解し、その溶液を染み込ませた 1cm $\times$ 1cm のスポンジ (PELNAC artificial dermis ; Gunze Limited, Kyoto, Japan) を 10 週齢の BALB/cAJcl マウス (CLEA, Tokyo, Japan) の頭頂骨上に移植し投与した (図 1)。このモデルでは、スポンジから CCN3 が緩徐に放出され、骨と直接作用することが可能となる。スポンジ移植部位の頭頂骨は、遺伝子発現解析のために 4 日目に、骨組織形態解析のために 7 日目に採取した (Matsumae et al., 2021)。固定後の

頭頂骨は、マイクロ Computed Tomography (CT) 撮影 (R-mCT2, Rigaku, Tokyo, Japan) を実施し、得られた三次元画像を作成した後に、これを二次元画像として抽出後、ImageJ を用いて頭頂骨表面における骨吸収域を定量的に評価した。頭頂骨は、CT を撮影後に 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; Wako) で 3 日間脱灰した後に、パラフィン包埋を行った。5 μ m 厚の切片を作製し、各々のサンプルに対して Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色と TRAP 染色をそれぞれ行い組織学的に評価した。H&E 染色切片については、マウス頭頂骨の上に堆積している細胞浸潤厚を、TRAP 染色については、赤色に染色される TRAP 染色陽性領域を ImageJ で定量評価した



図 1. CCN3 を染み込ませたスポンジを、マウスの頭頂骨上の皮下に移植

次に、組換え CCN3 を 10 週齢の BALB/cAJcl マウス (CLEA) の左膝関節腔内に投与した。投与は隔日で週 3 回行い、7 日目に膝関節を採取した。試料は 10%EDTA で脱灰した後に、パラフィン包埋し、組織学的解析を行った。切片は H&E 染色および p53 抗体 (GeneTex, Irvine, CA, USA) による免疫染色を行い、関節滑膜における p53 陽性細胞数を計測した。

9. コラーゲン抗体誘導関節炎モデル (CAIA)

10 週齢の BALB/cAJcl マウス (CLEA) に、4mg の関節炎誘導用モノクローナル抗体カクテル (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を尾静脈内投与し、3 日目に 50 μ g の Lipopolysaccharide (LPS ; Sigma-Aldrich) を腹腔内投与し炎症を誘導した(Endo et al., 2015)。3 日目に、マウスを無作為に 2 群に分け、治療群には 40 μ g の抗 CCN3 抗体 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) を、対照群には同量 (40 μ g) の IgG 抗体 (Bio-Techne) をそれぞれ腹腔内投与した。これらの投与は、実験期間中、週 2 回の頻度で繰り返し行った。

マウスの四肢を毎日観察し、関節炎の重症度を以下の基準に基づいて 0~4 点でスコ

ア化した（図2）。4肢すべてを合わせた最大スコアは16点とした。

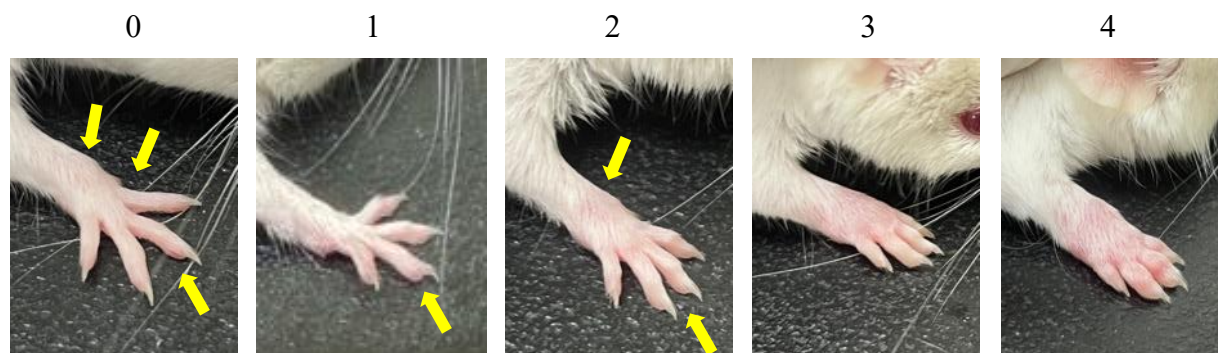


図2. 関節炎スコア

0点：いずれの関節（手指・足趾、手背・足背、手首・足首）にも炎症がない。1点：1つの関節に炎症がある。2点：2つの関節に炎症がある。3点：すべての関節に炎症がある。4点：すべての関節に高度な炎症がある。

14日目および28日目に、右後肢の足部を採取し、10%EDTA（WAKO）で脱灰した後、パラフィン包埋を行い、H&E染色およびTRAP染色を実施した。足関節を中心とした3×2 mmの範囲内でH&E染色では炎症細胞の浸潤面積を、TRAP染色ではTRAP陽性領域の割合をImageJ（NIH）を用いて定量評価した。

10. 統計解析

統計解析は GraphPad Prism 9（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて実施した。多群間の比較には一元配置分散分析（one-way ANOVA）を行い、Tukey の多重比較検定を実施した。2群間の比較には対応のない Student の t 検定を用いた。統計学的有意差は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$ 、*** $p < 0.0001$ 、**** $p < 0.00001$ を有意とし、ns は有意差なしを示す。エラーバーは標準誤差（standard error of the mean : SEM）を示す。

表 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

Target	Forward	Reverse
GAPDH	GACAGTCAGCCGCATCTTCT	CCATGGTGTCTGAGCGATGT
RUNX 2	TCTCCAGGAGGACAGCAAGA	GCAGCCTTAAATGACTCTGTTGG
Col 1	ACTGGCGAAACCTGTATCCG	CCAGTTCTTGGCTGGGATGT
VEGFA	AAAACACAGACTCGCGTTGC	CCTCGGCTTGTACATCTGC
SPP 1	CTGAACGCGCCTTCTGATTG	GGGTTTCAGCACTCTGGTCA
IL-6	AGAAAAAGGTGGGTGTGTCCT	GTCTTTGAGCCTGTCTTCCCC
IL-8	TCCAAACCTTTCACCCCAA	AATTTCTGTGTTGGCGCAGTG
TGF-β	TTGAGGGCTTTCGCCTTAGC	AGTGAACCCGTTGATGTCCA
OPG	CGTGTGCGAATGCAAGGAAG	GCTTGCACCACTCCAAATCC
IL-1α	ACGCCTGGTTTTCCAGTATCT	AGCAAGACTACTGGGTGTGC
IL-1β	GCAGAAGTACCTGAGCTCGC	AGTCATCCTCATTGCCACTGT
CCL 20	CCAAGAGTTTGCTCCTGGCT	CTTGCTGCTTCTGATTCGCC
RANKL	ATCTGGCCAAGAGGAGCAAG	GGGAACCAGATGGGATGTGC
MMP 1	AGGTCTCTGAGGGTCAAGCA	TTGICCCGATGATCTCCCCT
MMP 3	TCCTACTGTTGCTGTGCGTG	CCCTTGCAGCTCCATCCAAT

表 2. 本研究で用いた各種抗体

Antibody	Dilution	Manufacturer	Research Resource Identifier (RRID)
GAPDH	1:2000	BioLegend	AB_2734502
phospho-p21	1:2000	Bioss	AB_11097560
phospho-p53	1:2000	GeneTex	AB_2886801
β-galactosidase	1:2000	Invitrogen	AB_2851905

結果

1. RA 滑膜組織および炎症性線維芽細胞サブセットにおける CCN3 の検出

まず、滑膜組織における CCN3 の発現を確認するため、関節リウマチ（RA）患者から採取した滑膜組織に対して、特異的抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、RA 膝関節および手関節の滑膜組織において、CCN3 陽性細胞の強いシグナルが認められた（図 3）。

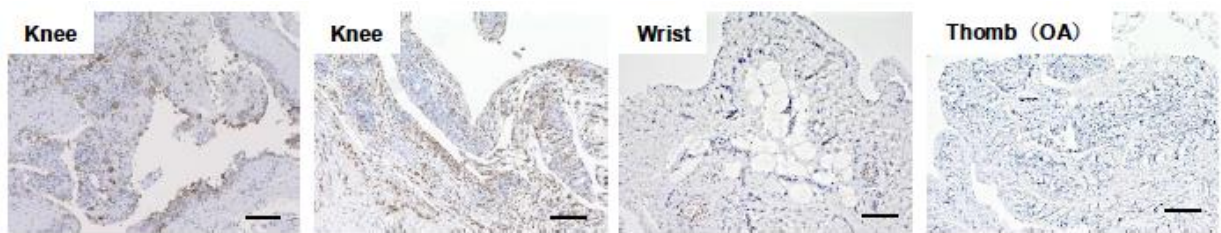


図 3. 膝関節および手関節の滑膜組織における CCN3 の免疫染色

さらに滑膜組織における CCN3 発現を裏付けるため、公開されている scRNA-seq データを解析した。ヒト RA 滑膜細胞（375 細胞）(Mizoguchi et al., 2018)のうち 110 細胞が CCN3 陽性であり、それらの大部分は線維芽細胞の炎症性サブセットに集中していた（図 4A、B）。同様に、マウス RA 滑膜の実験データベース(Croft et al., 2019)を解析した結果、滑膜全体の 4732 細胞のうち 844 細胞が CCN3 を発現しており、陽性細胞の多くが炎症性細胞であった（図 4C、D）。

これらの結果から、CCN3 は RA 関節の滑膜組織に発現しており、その主な発現部位は線維芽細胞の炎症性サブセットであることが明らかとなった。

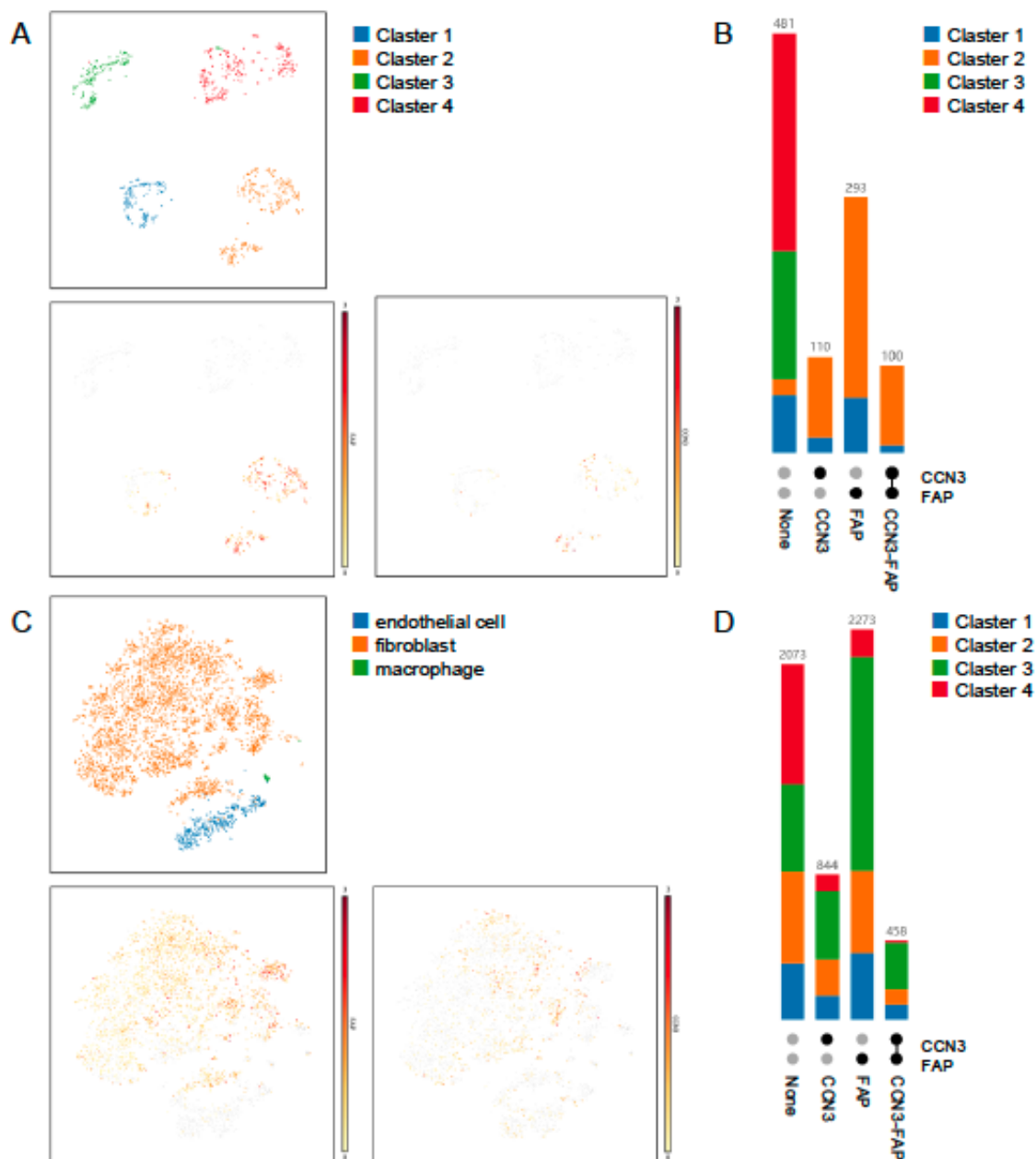


図 4. RA 滑膜組織における CCN3 の同定。

A) RA 臨床検体の滑膜細胞に対する scRNA-seq 解析。上図は滑膜細胞のクラスタリングを示す t-SNE プロット、下図は CCN3 および炎症マーカー FAP の発現分布。

B) 各クラスターにおける CCN3 および FAP 陽性細胞の割合。

C) RA モデルマウスの滑膜に対する scRNA-seq 解析。上図は関節内細胞の t-SNE プロット、下図は CCN3 および炎症マーカー FAP の発現分布。

D) 各細胞群における CCN3 および FAP 陽性細胞の割合。

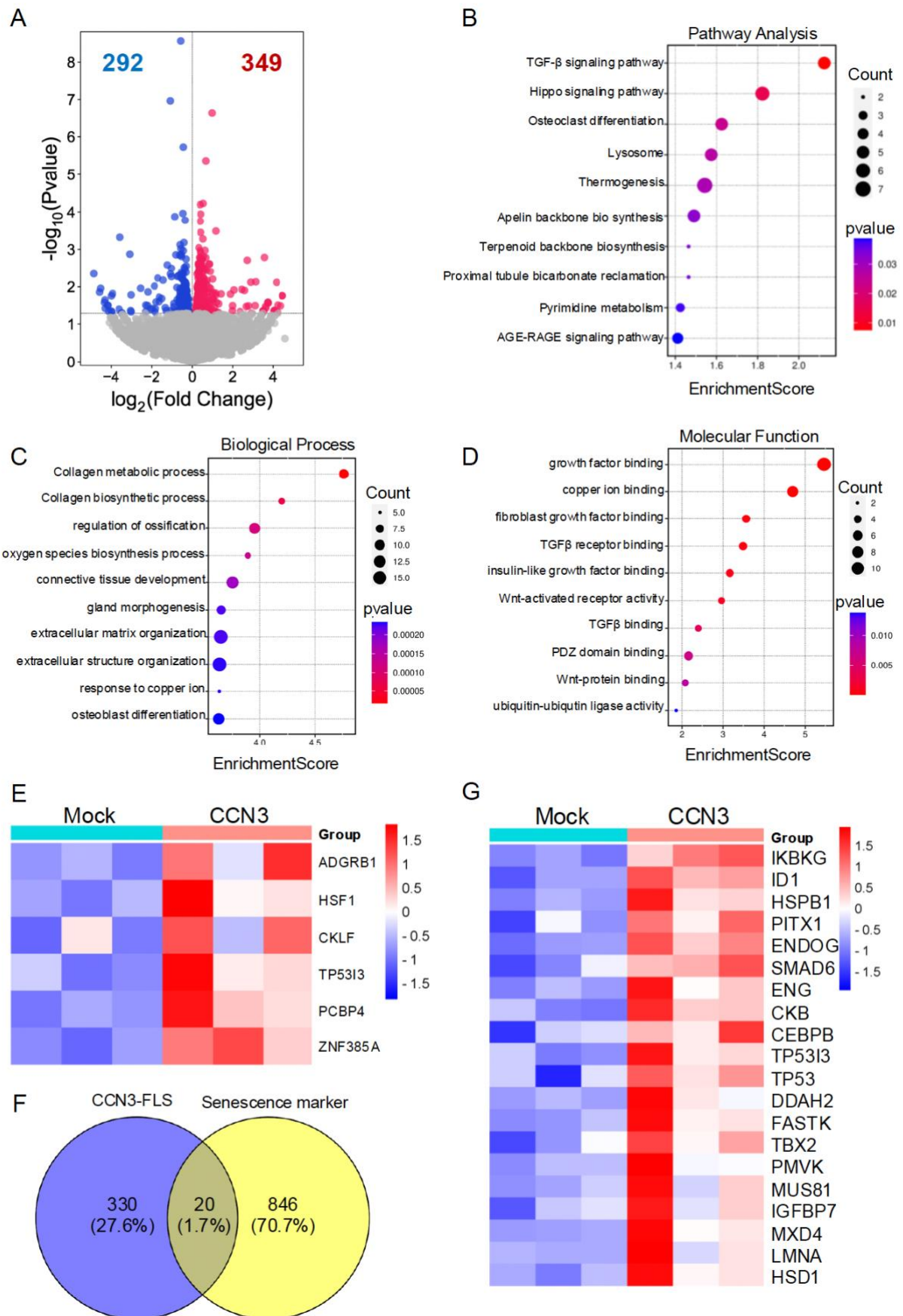
2. CCN3 刺激は、滑膜細胞における細胞老化経路を活性化させる (in vitro および in vivo)

RA における CCN3 の役割を明らかにするため、ヒト線維芽細胞様滑膜細胞 (hFLS) を培養し、組換え CCN3 で 24 時間刺激した後に bulk RNA-seq 解析を行った。その結果、CCN3 刺激で刺激した hFLS では 349 個の遺伝子が有意に発現上昇しており、これらの遺伝子は TGF- β シグナル、Hippo シグナル、破骨細胞分化、およびリソソーム関連経路に関連していた (図 5A、B)。GO (Gene Ontology) 解析では、生物学的プロセスとして「コラーゲン代謝」、分子機能として「成長因子結合」に参与する遺伝子の発現上昇が確認された (図 5C、D)。さらに転写調節ネットワーク解析の結果、上昇していた遺伝子は腫瘍抑制タンパク質 p53 関連経路に有意に関連しており、TP53 関連遺伝子群には ADGRB1、HSF1、ID1、KLF、TP53I3、PCBP4、ZNF385A が含まれていた (図 5E)。このうち、PCBP4 および ZNF385A は細胞老化において重要な役割を果たすことが知られている。

Venn 解析では、CCN3 で刺激した hFLS で発現上昇した 20 個の遺伝子が老化細胞で高発現しており、細胞老化に関連していることが示された (図 5F、G)。同様に、CCN3 刺激 hFLS における SASP (senescence-associated secretory phenotype) 関連遺伝子の発現上昇が qRT-PCR によって確認された (図 5H)。さらに、CCN3 刺激時間を 168 時間に延長すると、 β -gal、p53、p21 タンパク質の発現が有意に増加し、培養細胞内の β -gal 陽性 FLS の数も増加した (図 6A、B)。

また、CCN3 が細胞老化を活性化する役割をさらに明らかにするため、CCN3 をマウス膝関節内に投与し、7 日後に p53 および β -gal 陽性細胞数を解析した。その結果、組換え CCN3 を注入した膝滑膜では PBS 投与マウスと比較して、p53 および β -gal 陽性細胞の割合が有意に増加していた (図 7A-D)。

これらの結果から、CCN3 は滑膜細胞における老化経路を活性化し、関節内の炎症を惹起することが示唆された。



H

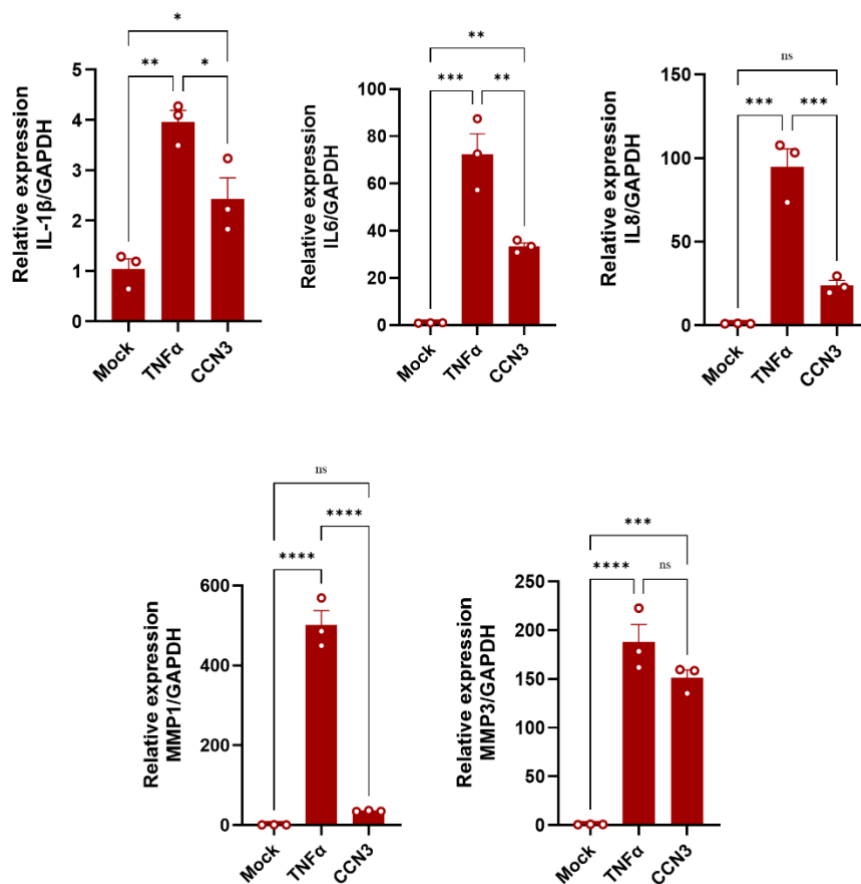


図 5. CCN3 刺激は *in vitro* において滑膜細胞の老化経路を活性化させる。

A) CCN3 で刺激した hFLS (n=3) の分子応答を示すボルケーノプロット。赤は有意に発現上昇した遺伝子、青は有意に発現低下した遺伝子。

B) 発現が上昇した遺伝子群に対する KEGG パスウェイエンリッチメント解析。

C, D) 発現が上昇した遺伝子群に対する Gene Ontology 解析。

E) RNA-seq により同定された老化関連経路に関与する遺伝子の発現変動を示すヒートマップ。

F) CCN3 刺激により有意に発現上昇した遺伝子と、組織の老化／加齢に関連する遺伝子の Venn 解析。

G) RNA-seq により同定された組織老化関連遺伝子の発現変動を示すヒートマップ。

H) CCN3 刺激により、FLS からの SASP 関連因子の発現が亢進

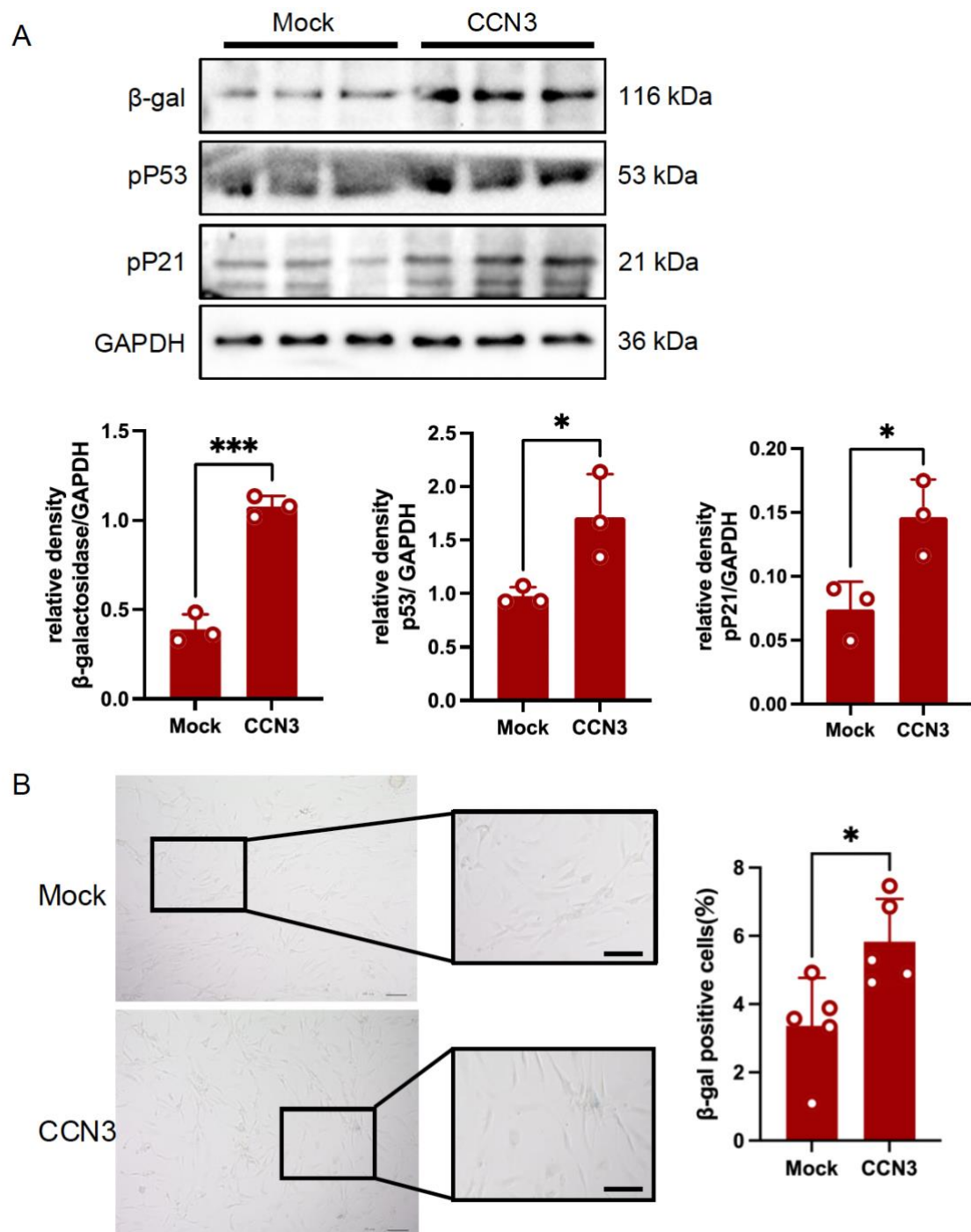


図 6. CCN3 刺激後の FLS の老化マーカーの発現

A) 老化マーカーの発現を Western blot 解析により検出した。グラフはタンパク発現量の定量結果。

B) FLS の β -gal 免疫染色。CCN3 刺激により β -gal 陽性細胞数は増加した。

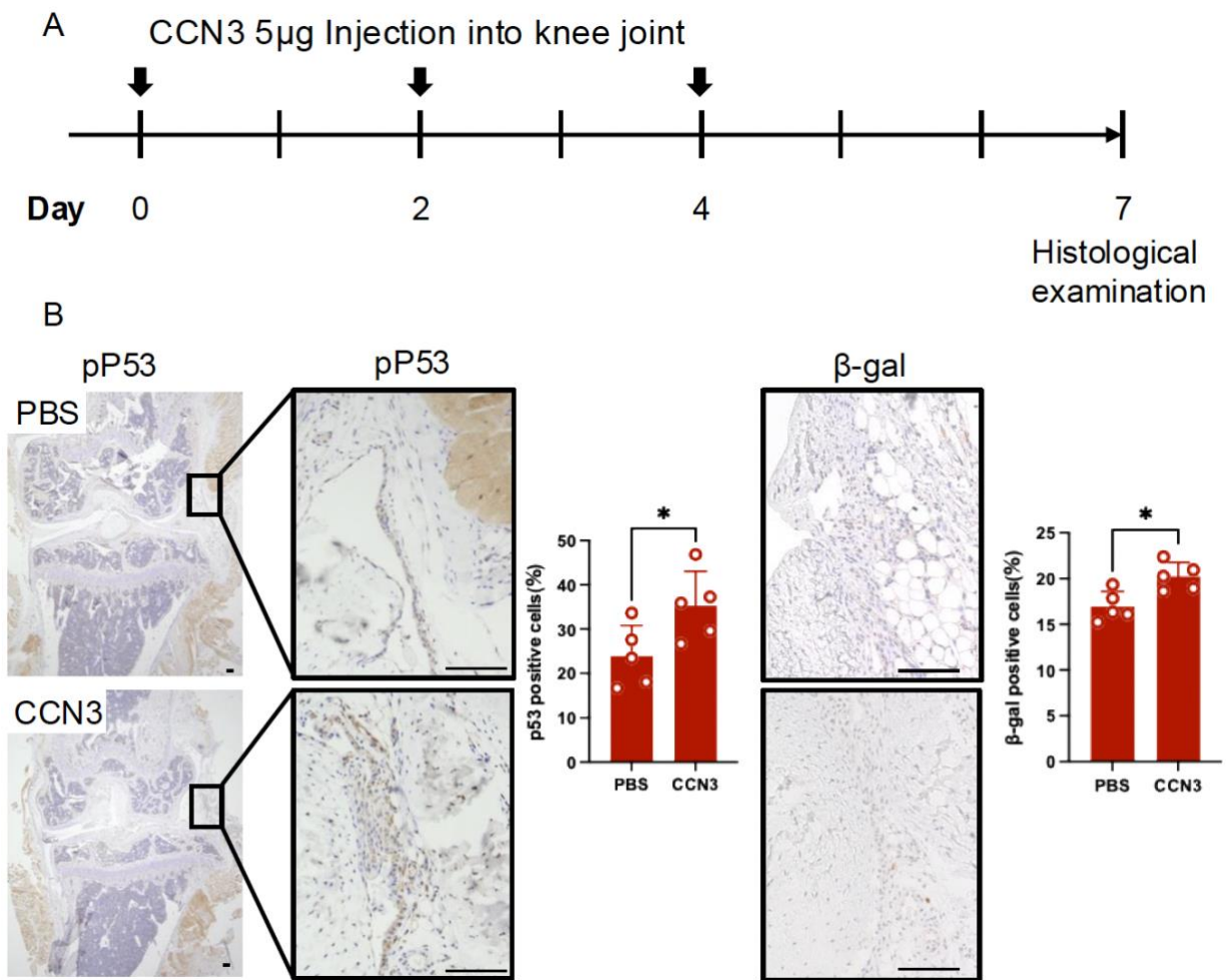


図 7. 膝関節内 CCN3 投与は老化経路を活性化させる。

A) 膝関節内への CCN3 投与の実験手順。

B) 左図は pP53 と β -gal 抗体染色標本の代表画像を示し、それぞれグラフは切片中の pP53 と β -gal 陽性細胞の割合。

3. CCN3 刺激は、破骨細胞様細胞形成を促進する (in vitro および in vivo)

FLS を CCN3 で刺激すると、破骨細胞分化に関与する主要な転写因子である NFATc1 および AP1 の発現が上昇した。この結果から、CCN3 が破骨細胞分化を誘導し得るかどうかを検討した。

ヒト単球を CCN3 で 8 日間刺激し、TRAP 染色およびアクチンリング染色により形態学的評価を行った。さらに、骨吸収能を評価するため、ヒト単球を象牙切片上で 21 日間 CCN3 で刺激し培養した。その結果、CCN3 刺激により、in vitro で骨吸収活性を有する破骨細胞様細胞の形成が確認された (図 8A-C)。

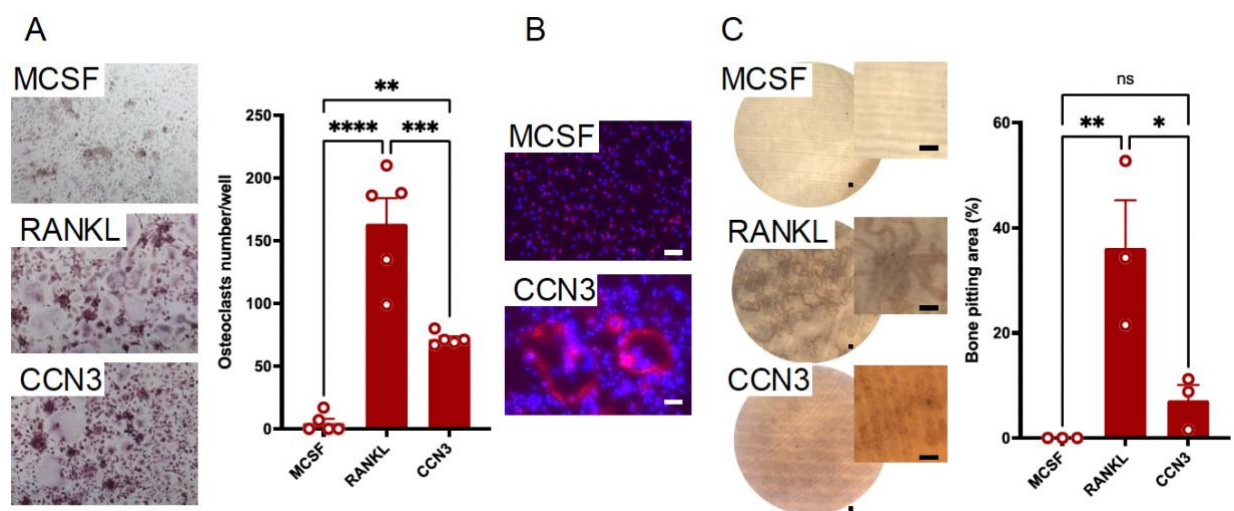


図 8. 破骨細胞分化アッセイ

A) ヒト単球を RANKL または CCN3 のいずれかで 8 日間刺激し、TRAP 染色を実施した。左図は TRAP 染色の代表画像を示し、グラフは各ウェルにおける TRAP 陽性細胞数。

B) アクチンリング形成。細胞はファロイジンで染色し、アクチンリング (赤) および細胞核 (青) を蛍光で検出した。

C) 象牙質片上の骨吸収領域。左図は象牙質片上の骨吸収面を示し、グラフは定量解析結果。

CCN3 刺激により誘導された破骨細胞様細胞の遺伝子発現解析では、発現が上昇した 315 個の遺伝子が、KEGG 経路および生物学的プロセス解析において「細胞老化」「破骨細胞分化」「テロメラーゼ活性の制御」に有意に関連していた (図 9A-C、図 10A)。さらに、これらの遺伝子は「細胞周期」や「TGF- β シグナル」、ITGB4、ITGB5 など「細胞接着」の経路にも有意に関連していた (図 10B、C)。転写調節ネ

ネットワーク解析では、上昇遺伝子が SP1、FOS、RB1、TP53 の制御ネットワークに最も有意に関連していた（図 9D）。

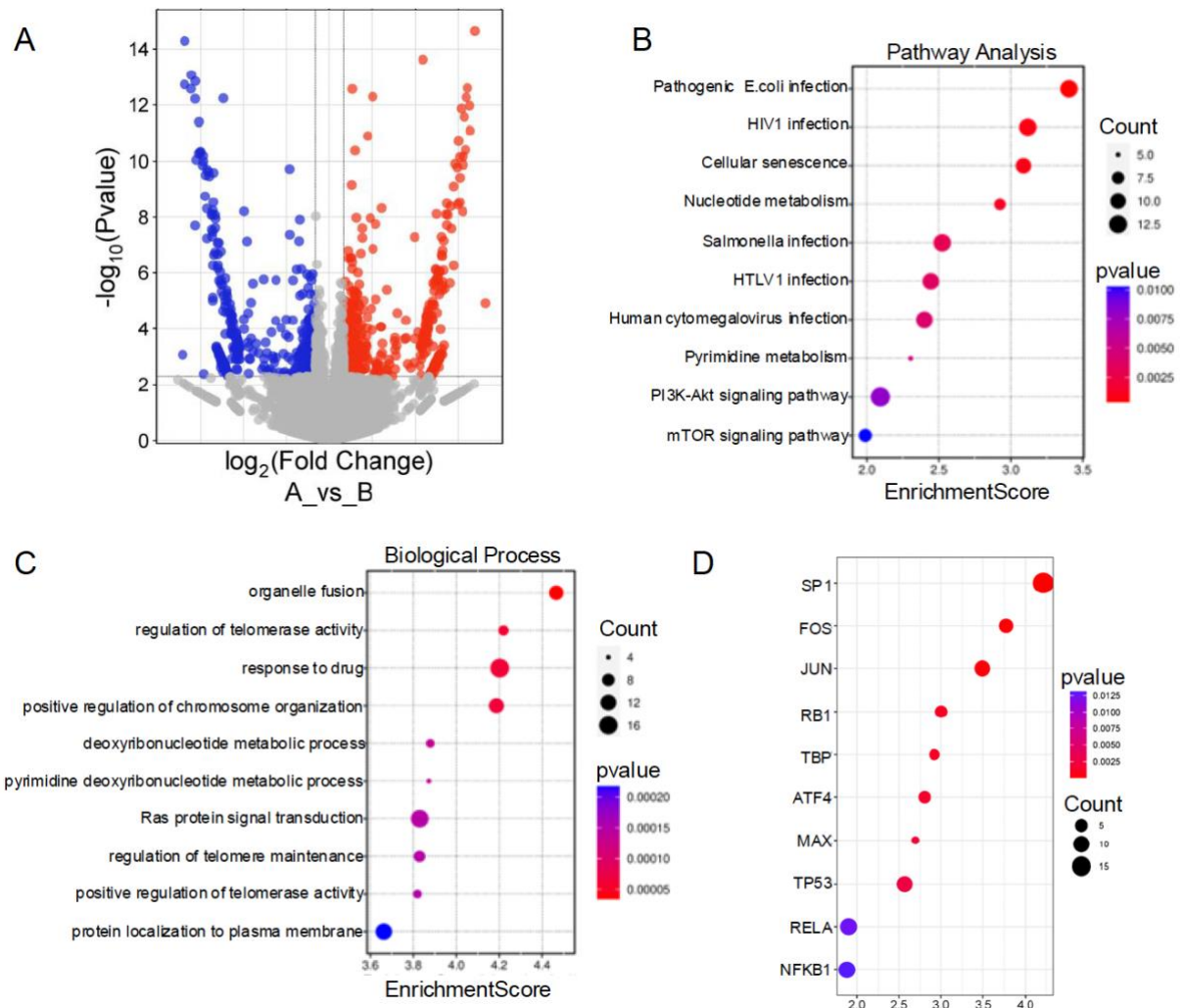


図 9. CCN3 刺激によって誘導された破骨細胞様細胞からの発現遺伝子の解析

A) 組換え CCN3 で 8 日間刺激した単球の分子応答を示すボルケーノプロット。赤は有意に発現上昇した遺伝子、青は有意に発現低下した遺伝子。

B) 発現上昇した遺伝子群に対する KEGG パスウェイエンリッチメント解析。

C) 発現上昇遺伝子に対する生物学的プロセスに基づく Gene Ontology 解析。

D) 差次的発現遺伝子 (DEGs) に基づく転写調節ネットワークエンリッチメント解析。

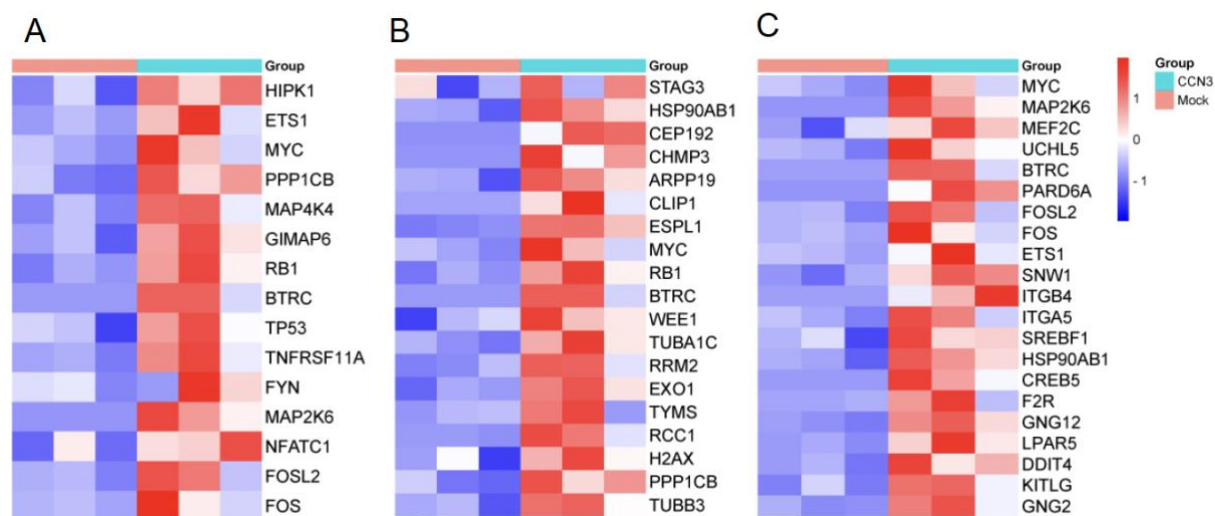


図 10. CCN3 刺激によって誘導された破骨細胞様細胞の遺伝子群のヒートマップ

A) RNA-seq 解析により同定された、刺激単球における破骨細胞分化および老化経路関連遺伝子の発現変動を示すヒートマップ。

B、C) RNA-seq 解析により同定された、TGF- β シグナル経路 (B) およびフォーカルアドヒージョン経路 (C) に関連する遺伝子の発現変動を示すヒートマップ。

これらの結果から、CCN3 刺激が単球・マクロファージにおいて細胞老化および破骨細胞形成に関与するシグナル経路を活性化することが示された。さらに、ヒトマクロファージを CCN3 で 168 時間刺激すると、*in vitro* で β -gal 陽性細胞が有意に増加した (図 11)。

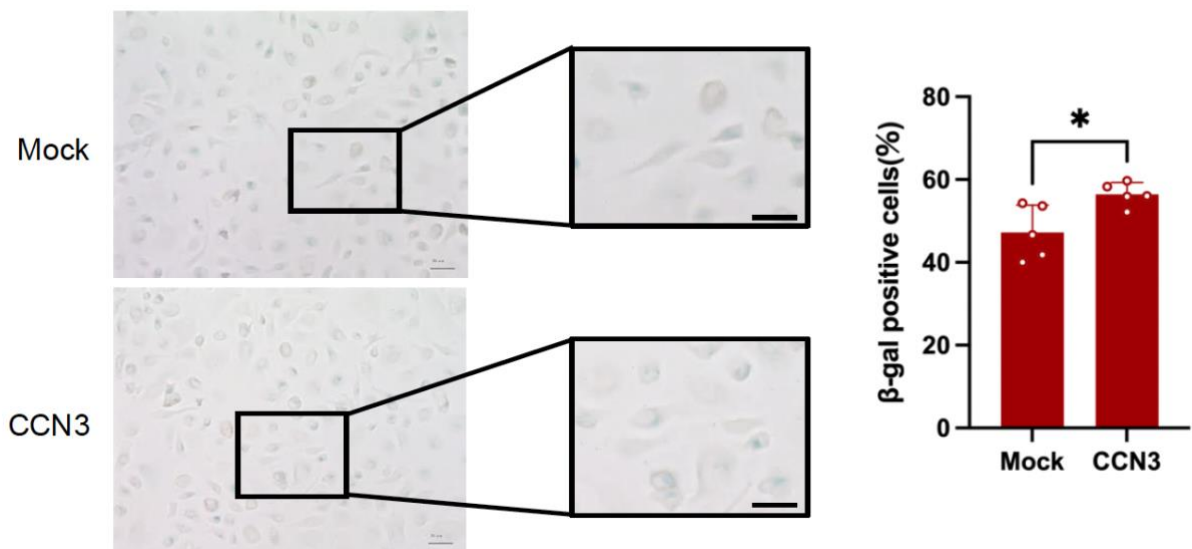


図 11. β -gal 免疫染色による老化マクロファージの検出。

FLS を組換え CCN3 で刺激後、固定し β -gal 抗体で染色した。左図は β -gal 染色細胞の代表画像、グラフは β -gal 染色陽性細胞の割合。

in vitro の結果をさらに検証するため、CCN3 を染み込ませたスポンジをマウス頭頂骨上に 7 日間移植し、7 日目に組織学的および骨形態計測学的解析を行った（図 12A）。その結果、CCN3 含浸スポンジ群では PBS 含浸スポンジ群に比べて骨吸収領域および TRAP 陽性領域が有意に拡大していた（図 12B、C）。さらに、CCN3 含浸スポンジ群では、移植部周囲における pP53 および β -gal 陽性細胞数の有意な増加が認められた（図 12D）。加えて、移植 4 日後に採取した頭頂骨では、SASP 関連因子である TNF α 、IL-7、MMP3 の発現が上昇していた。

これらの結果から、CCN3 は破骨細胞様細胞の形成および SASP を促進し、骨吸収と関節炎の進行に寄与することが示唆された。

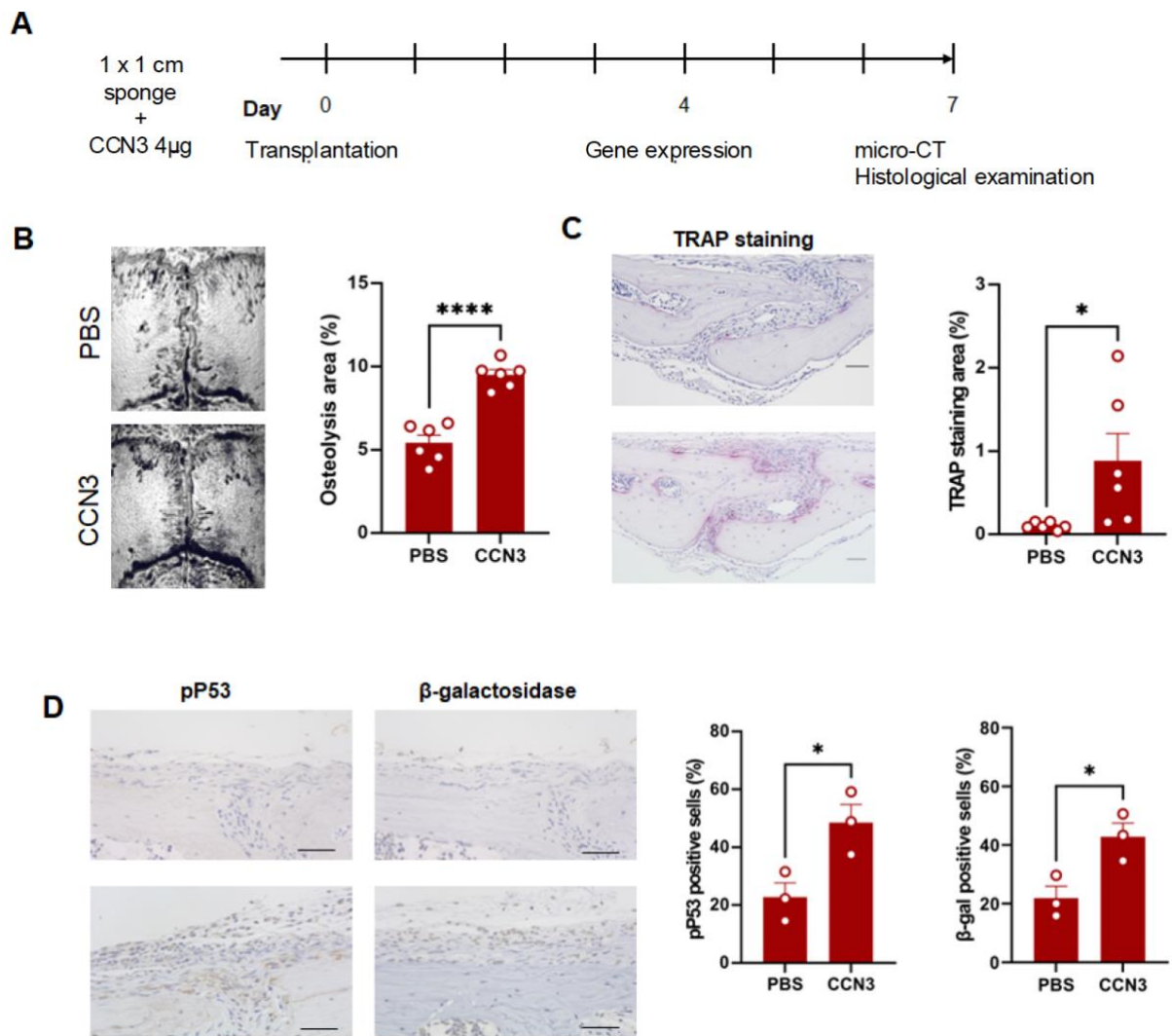


図 12. CCN3 含浸スポンジを頭頂骨に投与すると、局所的に破骨細胞および老化細胞の数が増加する。

A) 頭頂骨への CCN3 投与の実験手順。

B) マウス頭頂骨に CCN3 を投与した際に誘発された骨吸収性病変を micro-CT で評価した結果。左図は micro-CT 画像の代表例を示し、グラフは頭頂骨組織における骨吸収領域の定量解析結果。

C) TRAP 染色による破骨細胞の検出。左図は TRAP 染色切片の代表画像を示し、グラフは頭頂骨組織における TRAP 陽性領域の定量解析結果。

D) 頭頂骨組織における老化細胞の検出。左図は pP53 および β-gal 抗体で染色した切片の代表画像を示し、右グラフは染色陽性細胞の割合。

4. CAIA モデルにおける Ccn3 阻害の治療効果

Ccn3 が細胞老化および破骨細胞分化に関与する経路を促進することが明らかとなったことから、これらが RA 関節の特徴的な病態であることを踏まえ、RA モデル (CAIA) マウスにおける Ccn3 を標的とした治療の有用性を検討した。関節炎誘導用モノクローナル抗体カクテルおよび LPS を投与することで RA 症状を誘導し、マウス由来 Ccn3 に対する特異的抗体を用いて治療を行った (図 13A)。マウスの四肢は毎日観察し、関節炎の臨床スコアを評価した。また、14 日目および 28 日目に右後肢を採取し、組織学的解析を行った。

その結果、Ccn3 抗体の投与は関節炎スコアを有意に低下させた (図 13B-D)。さらに、この治療により、組織切片中の炎症細胞浸潤面積、 β -gal 陽性細胞数および TRAP 陽性領域がそれぞれ有意に減少した (図 13E)。

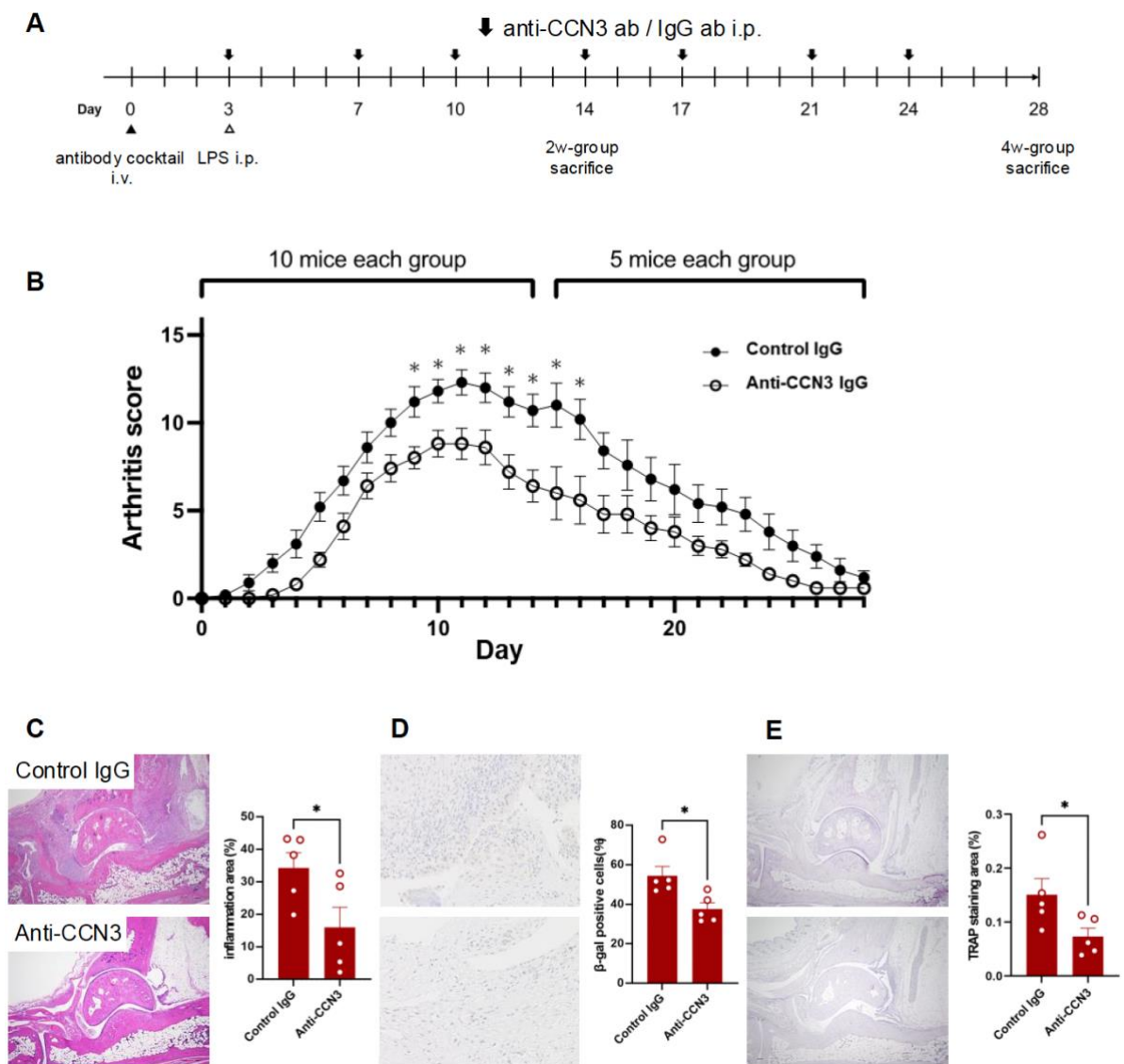


図 13. CAIA モデルにおける CCN3 阻害の治療効果。

A) CAIA モデルおよび治療の実験手順。

B) マウスの関節炎臨床スコアを 28 日間評価した結果。

C) 炎症スコアの組織学的評価。左図は右後肢の HE 染色切片の代表画像を示し、グラフは関節内の炎症領域の定量結果。

D) 関節切片における β -gal 陽性細胞の検出。左図は右後肢切片の免疫染色代表画像を示し、グラフは β -gal 陽性細胞の割合。

E) 関節切片における TRAP 陽性細胞の検出。左図は右後肢切片の TRAP 染色の代表画像を示し、グラフは TRAP 陽性領域の割合。

これらの結果を総合すると、CCN3 を標的とした治療は生体内で有益な効果を示し、関節リウマチの新たな分子標的となり得ることが示唆された。

考察

関節リウマチ（RA）の病態解明は近年大きく進展しているものの、依然として多くの課題が残されている(Strand et al., 2007)。しかし、細胞老化（senescence）のメカニズムを理解することは、RA を含む自己免疫疾患に対する新たな治療戦略を見出すための重要な手がかりになると考えられる (Gasek et al., 2021)。このことから、関節内で老化を媒介・誘導する因子を標的とすることで RA の進行を抑制できるかどうか注目された。本研究では、RA 患者の関節および血中で検出され、疾患重症度と関連することが報告されている老化関連分子 CCN3(Armaka et al., 2022 ; Taneja et al., 2018 ; Wei et al., 2020)を、RA 治療の新たな標的として解析した。

本研究の結果、CCN3 は滑膜細胞において老化経路を活性化し、さらに破骨細胞前駆細胞における分化を促進することで、RA の病態形成に寄与することが明らかとなった。これと一致して、関節軟骨で CCN3 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、軟骨細胞の老化形態および重度の軟骨変性が認められている。また、組換え CCN3 を軟骨細胞に投与すると、p21 および p53 の発現が増加することも報告されている(Kuwahara et al., 2020)。一方で、IL-1 β 誘導性変形性関節症モデルにおいては、CCN3 投与が PI3K/AKT/mTOR 経路の抑制と軟骨細胞オートファジーの促進を介して軟骨分解を軽減することも報告されている (Huang et al., 2019)。さらに、CCN3 は Notch シグナル依存的に平滑筋細胞でサイクリン依存性キナーゼ阻害因子を活性化する能力を持つことも知られている(Shimoyama et al., 2010)。

本研究の RNA-seq 解析では、CCN3 刺激がマクロファージおよび滑膜細胞において TGF- β シグナル経路を活性化することが示された。TGF- β シグナルは、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子との相互作用を介して老化経路を誘導することが複数の研究で報告されている(Matsuda et al., 2023 ; Ueda et al., 2021)。したがって、CCN3 が組織内で細胞老化を誘導する能力は、血中および組織中での CCN3 上昇と炎症性サイトカイン産生との関連性を説明する可能性がある(Fadhil Jaafar et al., 2023)。同様に、関節内における CCN3 の存在は、滑膜細胞における老化関連分泌表現型（SASP）を誘導し、慢性炎症を引き起こす。これにより免疫細胞の老化が加速し、「炎症－老化」の悪循環が形成される。

さらに、CCN3 は骨リモデリングや溶骨性転移性骨腫瘍において重要な役割を果たすことも報告されている(Dankner et al., 2019 ; Ouellet and Siegel, 2012)。野生型マウスと比較して、CCN3 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、海綿骨量が減少する一方で、骨芽細胞および破骨細胞数には変化がなかった。また、骨髄間質細胞株 ST-2 における CCN3 過剰発現や高濃度の組換え CCN3 投与は、BMP および Notch シグナル経路を介して骨芽細胞分化を抑制したことが報告されている(Rydziel et al.,

2007)。さらに、Son らは、CCN3 が Wnt/ β -catenin/MITF シグナル軸を介して EGFR シグナルを活性化し、乳がんにおける転移と腫瘍進展を促進することを報告している (Son et al., 2023)。また、前立腺がんにおいては、CCN3 が内皮前駆細胞における FAK/AKT/NF- κ B シグナルを活性化し、VEGF 依存的血管新生を促進することも示されている (Chen et al., 2014)。一方、別の研究では、CCN3 が NF- κ B シグナルを抑制し、内皮細胞の活性化および炎症性サイトカイン産生を阻害することも報告されている (Lin et al., 2010)。

本研究のもう一つの重要な発見は、CCN3 刺激によって骨吸収能を有する破骨細胞様細胞の形成を誘導した点である。この刺激は単球におけるインテグリン発現の増加を伴っていた。これまでの報告でも、CCN3 が内皮細胞において α v β 3 および α 5 β 1 インテグリンと相互作用し、それらを活性化して細胞接着・移動・血管新生を促進することが示されている (Lin et al., 2003)。また、CCN3 は線維芽細胞のインテグリン活性化を介して皮膚創傷治癒にも関与していることが報告されている (Lin et al., 2005)。インテグリン (特に α v β 3 インテグリン) は、破骨細胞前駆細胞の接着および融合、さらに骨吸収に必要な細胞骨格構造の形成に重要な役割を果たすことが知られている (Duong et al., 2000)。したがって、CCN3 刺激後の破骨細胞様細胞形成は、細胞接着および融合を媒介するインテグリン活性化によるものと考えられる。さらに、RNA-seq 解析では、CCN3 刺激が非古典的破骨細胞分化経路に関与する TGF- β シグナルを活性化することも明らかとなった (Xia et al., 2022)。

総合すると、CCN3 は細胞老化、接着、分化、血管新生など複数の生物学的プロセスに関与する転写因子群を活性化し、RA 治療における有望な分子標的となる可能性が示された。さらに、抗 CCN3 抗体による全身投与は、滑膜組織の炎症および老化細胞・破骨細胞数を減少させ、関節炎症状を改善させた。これらの結果は、CCN3 阻害により炎症性細胞浸潤および腎間質線維化を抑制できると報告した Marchal らの研究結果とも一致する (Jia et al., 2015)。

多くのエビデンスが、CCN ファミリーが慢性炎症性疾患、間質性肺疾患、慢性腎疾患、肝線維症、がんなど様々な疾患における魅力的な治療標的であることを示している (Monsen and Attramadal, 2023)。特に CCN2 は肺線維症の治療標的として臨床応用が進んでおり、その抗体 (FG-3019) は特発性肺線維症患者で有意な治療効果を示している (Sgalla et al., 2020)。

総括および結論

- 関節リウマチの滑膜組織において、CCN3 の発現が亢進しており、特に線維芽細胞の炎症性サブセットに強く局在していた。
- CCN3 刺激により、線維芽細胞様滑膜細胞で p53/p21 経路が活性化し、 β -gal 陽性細胞が増加するなど、細胞老化が誘導された。
- CCN3 刺激は TGF- β シグナル経路や IL-6, IL-8, MMP3 などの SASP 関連因子を活性化し、慢性炎症および組織障害を促進した。
- 単球系細胞に対しても CCN3 刺激は破骨細胞分化シグナルを誘導し、骨吸収能を有する破骨細胞様細胞の形成を促進した。
- in vivo モデルにおいて、CCN3 投与は滑膜内 p53 および β -gal 陽性細胞および TRAP 陽性領域を増加させ、骨吸収と炎症進行を促進した。
- 一方で、抗 CCN3 抗体投与は CAIA モデルマウスにおける関節炎スコアを有意に低下させ、炎症浸潤領域・老化細胞・破骨細胞数を減少させた。
- CCN3 は関節内で「老化-炎症-骨破壊」を連結する中心的メディエーターとして機能し、RA 病態の進行に寄与していることが示唆された。

本研究の結果は、CCN3 が関節内でオートクライン／パラクライン因子として機能し、細胞老化および破骨細胞形成を促進することで炎症と骨吸収を増悪させる一方、抗 CCN3 抗体の全身的投与がこれらの病態を軽減することを示した。以上の知見は、CCN3 が関節リウマチの新たな治療標的として有望であることを示唆している。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学院医学専攻博士課程整形外科学教室の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった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整形外科学教室 岩崎倫政教授に深い感謝の意を表します。また本研究全般にわたり直接のご指導ご鞭撻を賜りました同助教 照川アラー先生に心より感謝致します。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、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整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様に心より感謝を申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業（若手研究：23K15704）、日本医療研究開発機構 ムーンショット型研究開発事業（PJ4221KB01）、および小林財団の助成を受けたものです。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Armaka M, Konstantopoulos D, Tzaferis C, Lavigne MD, Sakkou M, Liakos A, Sfrikakis PP, Dimopoulos MA, Fousteri M and Kollias G (2022) Single-cell multimodal analysis identifies common regulatory programs in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients and modeled TNF-driven arthritis. *Genome Medicine* 14.

Bartok B and Firestein GS (2009) Fibroblast - like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 233, 233-255.

Bathon JM, Fleischmann RM, Van der Heijde D, Tesser JR, Peloso PM, Chon Y and White B (2006) Safety and efficacy of etanercept treatment in elderly subjects with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 33, 234-243.

Boots AMH, Maier AB, Stinissen P, Masson P, Lories RJ and De Keyser F (2013). The influence of ageing on the development and management of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 9, 604-613.

Chen PC, Cheng HC, Wang J, Wang SW, Tai HC, Lin CW and Tang CH (2014). Prostate cancer-derived CCN3 induces M2 macrophage infiltration and contributes to angiogenesis in prostate cancer microenvironment. *Oncotarget* 5, 1595-1608.

Croft AP, Campos J, Jansen K, Turner JD, Marshall J, Attar M, Savary L, Wehmeyer C, Naylor AJ, Kembler S, et al (2019). Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* 570, 246-251.

Dankner M, Ouellet V, Communal L, Schmitt E, Perkins D, Annis MG, Barrès V, Caron C, Mes-Masson AM, Saad F, et al (2019). CCN3/Nephroblastoma Overexpressed Is a Functional Mediator of Prostate Cancer Bone Metastasis That Is Associated with Poor Patient Prognosis. *The American Journal of Pathology* 189, 1451-1461.

Del Rey MJ, Valín Á, Usategui A, Ergueta S, Martín E, Municio C, Cañete JD, Blanco FJ, Criado G and Pablos JL (2019). Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype. *Immunity & Ageing* 16.

Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I and Rodan GA (2000). Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol* 19, 97-105.

Endo T, Ito K, Morimoto J, Kanayama M, Ota D, Ikeshue M, Kon S, Takahashi D, Onodera T, Iwasaki N, et al (2015). Syndecan 4 Regulation of the Development of Autoimmune Arthritis in Mice by Modulating B Cell Migration and Germinal Center Formation. *Arthritis & Rheumatology* 67, 2512-2522.

Fadhil Jaafar A, Afrisham R, Fadaei R, Farrokhi V, Moradi N, Abbasi A and Einollahi N (2023). CCN3/NOV serum levels in coronary artery disease (CAD) patients and its correlation with TNF- α and IL-6. *BMC Research Notes* 16.

Gasek NS, Kuchel GA, Kirkland JL and Xu M (2021). Strategies for targeting senescent cells in human disease. *Nature Aging* 1, 870-879.

Gill TK, Mittinty MM, March LM, Steinmetz JD, Culbreth GT, Cross M, Kopec JA, Woolf AD, Haile LM, Hagins H, et al (2023). Global, regional, and national burden of other musculoskeletal disorders, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology* 5, e670-e682.

Gravallese EM, Longo DL and Firestein GS (2023). Rheumatoid Arthritis — Common Origins, Divergent Mechanisms. *New England Journal of Medicine* 388, 529-542.

Hirose K, Kuwahara M, Nakata E, Tetsunaga T, Yamada K, Saiga K, Takigawa M, Ozaki T, Kubota S and Hattori T (2022). Elevated Expression of CCN3 in Articular Cartilage Induces Osteoarthritis in Hip Joints Irrespective of Age and Weight Bearing. *International Journal of Molecular Sciences* 23.

Holmdahl R, Malmström V and Burkhardt H (2014). Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation — The three stages of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 44, 1593-1599.

Huang X, Ni B, Mao Z, Xi Y, Chu X, Zhang R, Ma X and You H (2019). NOV/CCN3 induces cartilage protection by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. *Journal of Cellular and*

Molecular Medicine 23, 7525-7534.

Jia Z, Marchal PO, Kavvadas P, Abed A, Kazazian C, Authier F, Koseki H, Hiraoka S, Boffa JJ, Martinerie C, et al (2015). Reduced NOV/CCN3 Expression Limits Inflammation and Interstitial Renal Fibrosis after Obstructive Nephropathy in Mice. Plos One 10.

Kuwahara M, Kadoya K, Kondo S, Fu S, Miyake Y, Ogo A, Ono M, Furumatsu T, Nakata E, Sasaki T, et al (2020). CCN3 (NOV) Drives Degradative Changes in Aging Articular Cartilage. International Journal of Molecular Sciences 21.

Lin CG, Chen CC, Leu SJ, Grzeszkiewicz TM and Lau LF (2005). Integrin-dependent Functions of the Angiogenic Inducer NOV (CCN3). Journal of Biological Chemistry 280, 8229-8237.

Lin CG, Leu SJ, Chen N, Tebeau CM, Lin SX, Yeung CY and Lau LF (2003). CCN3 (NOV) Is a Novel Angiogenic Regulator of the CCN Protein Family. Journal of Biological Chemistry 278, 24200-24208.

Lin Z, Natesan V, Shi H, Hamik A, Kawanami D, Hao C, Mahabaleshwar GH, Wang W, Jin ZG, Atkins GB, et al (2010). A novel role of CCN3 in regulating endothelial inflammation. Journal of Cell Communication and Signaling 4, 141-153.

Lobaccaro JMA, Pakradouni J, Le Goff W, Calmel C, Antoine B, Villard E, Frisdal E, Abifadel M, Tordjman J, Poitou C, et al (2013). Plasma NOV/CCN3 Levels Are Closely Associated with Obesity in Patients with Metabolic Disorders. PLoS ONE 8.

Macias-Segura N, Castaneda-Delgado JE, Bastian Y, Santiago-Algarra D, Castillo-Ortiz JD, Aleman-Navarro AL, Jaime-Sanchez E, Gomez-Moreno M, Saucedo-Toral CA, Lara-Ramirez EE, et al (2018). Transcriptional signature associated with early rheumatoid arthritis and healthy individuals at high risk to develop the disease. PLoS One 13, e0194205.

Martinerie C, Garcia M, Do TTH, Antoine B, Moldes M, Dorothee G, Kazazian C, Auclair M, Buyse M, Ledent T, et al (2016). NOV/CCN3: A New Adipocytokine Involved in Obesity-Associated Insulin Resistance. Diabetes 65, 2502-2515.

Matsuda S, Revandkar A, Dubash TD, Ravi A, Wittner BS, Lin M, Morris R, Burr R, Guo H, Seeger K, et al (2023). TGF- β in the microenvironment induces a physiologically occurring immune-suppressive senescent state. *Cell Reports* 42.

Matsumae G, Shimizu T, Tian Y, Takahashi D, Ebata T, Alhasan H, Yokota S, Kadoya K, Terkawi MA and Iwasaki N (2021). Targeting thymidine phosphorylase as a potential therapy for bone loss associated with periprosthetic osteolysis. *Bioengineering & Translational Medicine* 6.

Mizoguchi F, Slowikowski K, Wei K, Marshall JL, Rao DA, Chang SK, Nguyen HN, Noss EH, Turner JD, Earp BE, et al (2018). Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nature Communications* 9.

Monsen VT and Attramadal H (2023). Structural insights into regulation of CCN protein activities and functions. *Journal of Cell Communication and Signaling* 17, 371-390.

Ouellet V and Siegel PM (2012). CCN3 modulates bone turnover and is a novel regulator of skeletal metastasis. *Journal of Cell Communication and Signaling* 6, 73-85.

Radovits BJ, Kievit W, Fransen J, van de Laar MAFJ, Jansen TL, van Riel PLCM and Laan RFJM (2009). Influence of age on the outcome of antitumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68, 1470-1473.

Rydziel S, Stadmeyer L, Zanotti S, Durant D, Smerdel-Ramoya A and Canalis E (2007). Nephroblastoma Overexpressed (Nov) Inhibits Osteoblastogenesis and Causes Osteopenia. *Journal of Biological Chemistry* 282, 19762-19772.

Saleem Zayed N (2022). Association Of Cellular Communication Network Factor 3 (CCN3) With Rheumatoid Arthritis Disease And It's Severity (Case-Control Study). *Medical Science Journal for Advance Research* 3, 201-208.

Sgalla G, Franciosa C, Simonetti J and Richeldi L (2020). Pamrevlumab for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29, 771-777.

Shimoyama T, Hiraoka Si, Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Watanabe

A, Fujimoto M, Kawamura H, Sato S, et al (2010). CCN3 Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Modulation of Smooth Muscle Cell Growth and Migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 675-682.

Son S, Kim H, Lim H, Lee Jh, Lee Km and Shin I (2023). CCN3/NOV promotes metastasis and tumor progression via GPNMB-induced EGFR activation in triple-negative breast cancer. *Cell Death & Disease* 14.

Stephenson W, Donlin LT, Butler A, Rozo C, Bracken B, Rashidfarrokhi A, Goodman SM, Ivashkiv LB, Bykerk VP, Orange DE, et al (2018). Single-cell RNA-seq of rheumatoid arthritis synovial tissue using low-cost microfluidic instrumentation. *Nat Commun* 9, 791.

Strand V, Kimberly R and Isaacs JD (2007). Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 75-92.

Taneja V, Macías-Segura N, Castañeda-Delgado JE, Bastian Y, Santiago-Algarra D, Castillo-Ortiz JD, Alemán-Navarro AL, Jaime-Sánchez E, Gomez-Moreno M, Saucedo-Toral CA, et al (2018). Transcriptional signature associated with early rheumatoid arthritis and healthy individuals at high risk to develop the disease. *Plos One* 13.

Tian Y, Terkawi MA, Onodera T, Alhasan H, Matsumae G, Takahashi D, Hamasaki M, Ebata T, Aly MK, Kida H, et al (2020). Blockade of XCL1/Lymphotactin Ameliorates Severity of Periprosthetic Osteolysis Triggered by Polyethylene-Particles. *Frontiers in Immunology* 11.

Udalova IA, Mantovani A and Feldmann M (2016). Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 12, 472-485.

Ueda S, Tominaga T, Ochi A, Sakurai A, Nishimura K, Shibata E, Wakino S, Tamaki M and Nagai K (2021). TGF- β 1 is involved in senescence-related pathways in glomerular endothelial cells via p16 translocation and p21 induction. *Scientific Reports* 11.

Wei Y, Peng L, Li Y, Zhang N, Shang K, Duan L, Zhong J and Chen J (2020). Higher Serum CCN3 Is Associated with Disease Activity and Inflammatory Markers in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research* 2020, 1-7.

Xia Y, Inoue K, Du Y, Baker SJ, Reddy EP, Greenblatt MB and Zhao B (2022). TGFbeta reprograms TNF stimulation of macrophages towards a non-canonical pathway driving inflammatory osteoclastogenesis. Nat Commun 13, 3920.

Yokota S, Matsumae G, Shimizu T, Hasegawa T, Ebata T, Takahashi D, Heguo C, Tian Y, Alhasan H, Takahata M, et al (2021). Cardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) alleviates bone loss in osteoporosis mouse models by suppressing osteoclast differentiation through activating interferon signaling and repressing the nuclear factor- κ B signaling pathway. Bone 153.