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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　徳廣　泰貴

学 位 論 文 題 名

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)

【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。

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、破骨細胞様細胞への分化亢進、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。