

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09014

研究課題名(和文) 滑膜マクロファージ由来エクソソームが関節炎の病態進行に及ぼす影響

研究課題名(英文) Investigation of roles of the synovial macrophage-derived exosomes on the progression of osteoarthritis and rheumatoid arthritis

研究代表者

本谷 和俊 (Hontani, Kazutoshi)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：10805279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、申請者は滑膜マクロファージ由来細胞外小胞による関節疾患進行メカニズムを解明することを目的とした。申請者は、炎症性マクロファージ由来細胞外小胞は、軟骨細胞の異化因子放出を増加させ、軟骨変性を誘導することを示した。また、炎症性マクロファージは、細胞外小胞を介して、軟骨細胞のパイロトーシスを惹起し、軟骨変性を進行させる可能性があることを示した。本知見は、関節疾患の病態の一つとして、軟骨細胞のパイロトーシスの関連性を示唆するものであり、今後の関節疾患に対する原因療法開発の一助となることが推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

平均寿命の延伸に伴う要介護者数の増加要因として、変形性関節症をはじめとする関節疾患は上位に位置する。現状、変形性関節症の治療は、薬物療法や装具療法、および人工関節置換術などの手術療法であるが、これらは対症療法の域を脱することはできず、原因療法は未だ存在しない。申請者は、新たに滑膜マクロファージ由来細胞外小胞を介した軟骨細胞パイロトーシスによる軟骨変性誘導機序を示した。この軟骨細胞のパイロトーシスを抑制する手法は、軟骨変性および関節破壊を抑制することにより、変形性関節症をはじめとする関節疾患の進行を抑制する原因療法の一つとなりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to clarify the mechanism of joint disease progression by synovial macrophage derived extracellular vesicles (EVs). Stimulation of chondrocytes with EVs resulted in an elevation in chondrocyte catabolic factors including Matrix metalloproteinase (MMPs), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTs) and pro-inflammatory mediators, leading to cartilage degeneration. In addition, our current results demonstrated that inflammatory macrophages derived EVs increased pyroptosis related molecules in chondrocytes. Our findings indicated that EVs induced chondrocyte pyroptosis, leading to cartilage degradation. This study provides a novel molecular mechanism for the destruction of cartilage in joint diseases and suggests attractive therapeutic target for treatment.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 マクロファージ 細胞外小胞 軟骨細胞 パイロトーシス

1. 研究開始当初の背景

エクソソームやマイクロベシクルなどの細胞外小胞は、細胞間の情報伝達を担い、疾患の病態形成に重要な役割を果たしている。滑膜マクロファージは、滑膜内の主要な細胞成分であり、変形性関節症(Osteoarthritis、以下 OA)および関節リウマチ(Rheumatoid arthritis、以下 RA)などの関節疾患の病態形成に重要な役割を担うが、この滑膜マクロファージ由来細胞外小胞の機能については知られていない。そこで、我々は滑膜マクロファージ由来細胞外小胞の機能解析を行うことで、関節疾患の新規バイオマーカー同定およびその病態メカニズムの解明に繋がる

2. 研究の目的

本研究の目的は、滑膜マクロファージ由来細胞外小胞が関節構成体に及ぼす影響を解析し、マクロファージと関節構成体との相互作用による関節疾患進行メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

1) マクロファージ由来細胞外小胞の単離方法確立

申請者は、はじめにマクロファージ由来細胞外小胞(以下 M-EVs)の単離方法の確立を行った。マクロファージを単離した後に、各種刺激を添加し 24 時間細胞培養を行った。炎症性マクロファージ誘導刺激として、100ng/ml のリポポリリサッカライド(Lipopolysaccharide、以下 LPS)を用いた。その後、培養上清を採取し、超遠心法による細胞外小胞の単離を行った。図 1 に、超遠心法の詳細について示す。超遠心法により得られた粒子が細胞外小胞であることを検証するため、ウエスタンブロッティングによる細胞外小胞マーカの確認および粒度分布解析を行った。また、LPS 添加マクロファージ由来細胞外小胞について、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

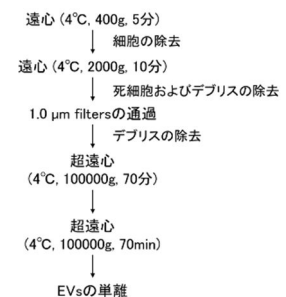


図1. 超遠心法によるEVs単離法

2) マクロファージ由来細胞外小胞が軟骨に及ぼす影響の解析

次に、上記方法で単離したマクロファージ由来細胞外小胞が、軟骨細胞および軟骨組織に及ぼす影響を調べた。まず In vitro において、LPS 刺激マクロファージ由来細胞外小胞(以下 M-LPS EVs)および無刺激マクロファージ由来細胞外小胞(以下 M-0 EVs)を、マウス初代軟骨細胞に in vitro で添加した。24 時間後に、軟骨細胞および培養上清を採取し、各種評価を行った。続いて Ex vivo において、上記マクロファージ由来細胞外小胞を 6 週齢のマウスから採取した大腿骨頭軟骨組織およびマウス初代軟骨細胞に添加した。72 時間後に組織および培養上清を採取し、その影響を評価した。

3) 炎症性マクロファージ由来細胞外小胞を介した軟骨細胞傷害メカニズムの解明

In vitro で証明した軟骨細胞傷害メカニズムを解明するために、炎症性マクロファージ由来細胞外小胞刺激軟骨細胞に対して、RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子解析を行った。(2)で使用した M-LPS EVs による軟骨細胞群と M-0 EVs による軟骨細胞群から RNA を抽出し、RNA-seq を行った。得られた解析結果から、遺伝子オントロジー解析およびパスウェイ解析を行った。結果から得られた仮説の検証実験として、LDH アッセイによる軟骨細胞の Viability 試験を行った。また、ウエスタンブロッティングによる軟骨細胞中のパイロトーシス関連因子の発現評価を行った。

4. 研究成果

1) マクロファージ由来細胞外小胞 (M-EVs) の単離方法確立

図 2 に単離した粒子の結果を示す。単離した粒子の粒子径は、M-0 EVs 群で、M-LPS EVs 群であった。また、M-LPS EVs 群の透過型電子顕微鏡解析では、200nm 以下の粒子が多数確認されており、粒度分布解析結果に矛盾しない結果であった。さらにウエスタンブロッティングにおいて、両群ともに TSG101 や CD9、Annexin V といった細胞外小胞マーカ

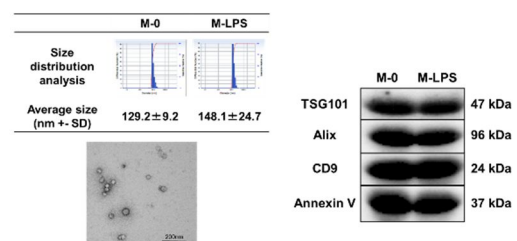


図2. 超遠心法により単離したマクロファージ由来細胞外小胞の解析。(左上)単離したマクロファージ由来細胞外小胞の粒度分布解析。(左下)単離したM-LPS EVsの透過型電子顕微鏡写真。観察される粒子は、大半が200nm以下のものであった。(右)単離したマクロファージ由来細胞外小胞のウエスタンブロッティング結果。M-0 EVsおよびM-LPS EVsともに各種細胞外小胞マーカ

が同定された。これらの結果から、超遠心法によりマクロファージ由来細胞

外小胞が十分に獲得できていると評価した。

2) マクロファージ由来細胞外小胞が軟骨に及ぼす影響の解析

次に、研究1で単離したマクロファージ由来細胞外小胞が軟骨細胞に及ぼす影響を、*in vitro*で解析した。結果を図3に記す。M-LPS EV刺激軟骨細胞群では、M-0 EVs刺激軟骨細胞群と比較し、MMP13やADAMTS5などの基質分解酵素およびIL-6をはじめとする炎症性サイトカインの発現が有意に増加していた。

続いて、*Ex vivo*においてマクロファージ由来細胞外小胞が軟骨組織に及ぼす影響を解析した。図4に記す通り、M-LPS EVs刺激群では、軟骨組織表層におけるサフランin Oの染色性が低下しており、上清中に放出されるグリコサミノグリカン量も増加していた。

これらの結果から、炎症性マクロファージ由来細胞外小胞により、軟骨細胞の異化因子放出が増加し、軟骨組織中の基質分解を促進する可能性があることが示唆された。

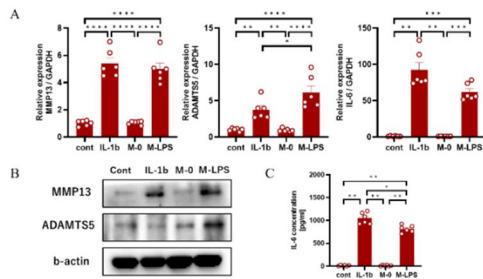


図3. *In vitro*でのマクロファージ由来細胞外小胞添加実験。マクロファージ由来細胞外小胞を軟骨細胞に添加し24時間刺激を行った。(A) qPCRによる遺伝子発現解析。(B) ウェスタンブロッティング。M-LPS EVs群では、軟骨細胞中のMMP13やADAMTS5などの基質分解酵素およびIL-6の発現上昇がみられた。(C) ELISAによる培養上清中のIL-6濃度の定量化。M-LPS EVs群では、IL-6の放出量増加を認めた。

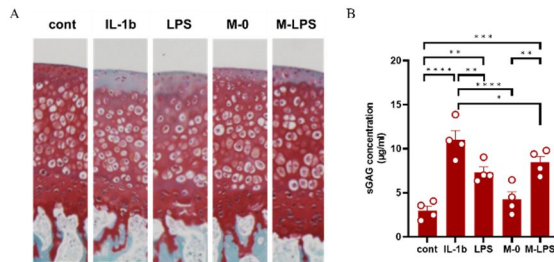


図4. *Ex vivo*でのマクロファージ由来細胞外小胞添加実験。マクロファージ由来細胞外小胞をマウス大腿骨頭軟骨組織に添加し、72時間刺激を行った。(A) マウス大腿骨頭軟骨組織のサフランin Oの染色画像。M-LPS EVs群では、軟骨表層におけるサフランin Oの染色性低下を認めた。(B) DMMBアッセイによる培養上清中のグリコサミノグリカン(GAG)量の定量化。M-LPS EVs群では、M-0 EVs群と比較し、培養上清中のsGAG放出量が増加していた。

3) 炎症性マクロファージ由来細胞外小胞を介した軟骨細胞傷害メカニズムの解明

研究2で示した、炎症性マクロファージ由来細胞外小胞による軟骨細胞傷害メカニズムを解析するために、マクロファージ由来細胞外小胞で刺激された軟骨細胞について、RNAシーケンスによる網羅的遺伝子解析を行った。結果を図5に示す。M-LPS EVs刺激群では、1760個の発現上昇遺伝子が確認された。これらの発現上昇遺伝子に対して、遺伝子オンロジー解析を行ったところ、G0 biological processから、Cell CycleおよびApoptotic processに関わる遺伝子群が多く含まれることが示された。また、KEGG pathway解析から、TNF-signaling pathwayに関わる遺伝子が多く含まれることが示された。

これらの結果から、「炎症性マクロファージは、細胞外小胞を介して、軟骨細胞の炎症性細胞死であるパイロトーシスを惹起する」と仮説づけた。

この仮説を検証するために、まずLDHアッセイを用いた軟骨細胞のViability試験を行った。図6Aに示すように、M-LPS EVs刺激群では、M-0 EVs群と比較し、上清中のLDH放出量が有意に多いことが確認され、M-LPS EVsが軟骨細胞の細胞死を惹起する可能性が示唆された。さらに、ウェスタンブロッティングにおいて、軟骨細胞中のパイロトーシス関連因子の発現を検証したところ、図6Bの通り、M-LPS EVs刺激群でCaspase11およびGasdermin D (GSDMD)の発現増加を示した。

以上の結果から、炎症性マクロファージは、細胞外小胞を介して、軟骨細胞のパイロトーシスを

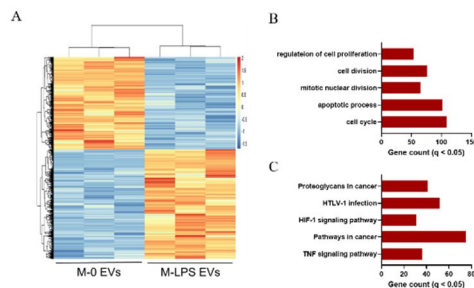


図5. M-LPS EVs刺激軟骨細胞とM-0 EVs刺激軟骨細胞との間の遺伝子発現比較をRNAシーケンスを用いて網羅的に行った。(A) 各群における発現変動遺伝子のヒートマップ図。赤が発現上昇、青が発現減少を示す。(B) 遺伝子オンロジー解析。Biological processにおいて、細胞周期や細胞死に関わるTermが上位に同定された。(C) KEGGパスウェイ解析。炎症シグナルの一つであるTNF signaling pathwayが最上位に同定された。

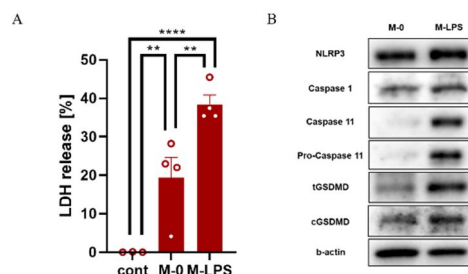


図6. RNAシーケンスの結果から得た仮説の検証実験。(A) LDHアッセイによる軟骨細胞viability試験。M-LPS EVs群では、M-0 EVs群と比較し、培養上清中に放出されるLDH量が増加していた。(B) ウェスタンブロッティングによるパイロトーシス関連因子の同定。M-LPS EVs群では、Caspase11およびGSDMDの発現増加を認めた。

惹起し、軟骨変性に寄与する可能性が示唆された。

今後、OA および RA をはじめとする関節疾患の軟骨組織中におけるパイロトーシス関連因子の発現を検証するとともに、軟骨細胞のパイロトーシス経路阻害による軟骨変性抑制効果の検証を行う予定である。さらに、OA モデルマウスおよび RA モデルマウスに、パイロトーシス経路阻害物質を投与することによる、軟骨変性および軟骨破壊抑制効果の有無と疾患進行抑制効果の有無について、組織学的に評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hontani Kazutoshi, Onodera Tomohiro, Terashima Michiyo, Momma Daisuke, Matsuoka Masatake, Baba Rikiya, Joutoku Zenta, Matsubara Shinji, Homan Kentaro, Hishimura Ryosuke, Xu Liang, Iwasaki Norimasa	4. 巻 107
2. 論文標題 Chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cells using the three dimensional culture with ultra purified alginate gel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1086 ~ 1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Joutoku Zenta, Onodera Tomohiro, Matsuoka Masatake, Homan Kentaro, Momma Daisuke, Baba Rikiya, Hontani Kazutoshi, Hamasaki Masanari, Matsubara Shinji, Hishimura Ryosuke, Iwasaki Norimasa	4. 巻 9
2. 論文標題 CCL21/CCR7 axis regulating juvenile cartilage repair can enhance cartilage healing in adults	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41621-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kazutoshi Hontani, Daisuke Kawamura, Yusuke Nagano, Yuichiro Matsui, Atsushi Urita, Yukinori Tsukuda, Daisuke Momma, Hiroki Hamano, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Impact of ulnar shortening osteotomy on stress distribution patterns within the distal radioulnar joint: Morphologic study with computed tomography
3. 学会等名 73rd Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand. Boston, Massachusetts, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazutoshi Hontani, Daisuke Kawamura, Yuichiro Matsui, Atsushi Urita, Daisuke Momma, Hiroki Hamano, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Analysis on the Stress Distribution Patterns within the Distal Radioulnar Joint after Ulnar Shortening Osteotomy: Morphological Study with Computed Tomography
3. 学会等名 ORS 2019 Annual Meeting, Austin, Texas, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Ebata, M Alaa Terkawi, Gen Matsumae, Hiroaki Kida, Syunichi Yokota, Hend Alhasan, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Kazutoshi Hontani, Tomohiro Onodera, Ken Kadoya, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Inflammatory macrophage-derived extracellular vesicles promote chondrocyte catabolism and cartilage degeneration: An insight into the crosstalk between macrophage and chondrocytes in OA
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	テルカウィ アラー (Terkawi Alaa) (00723074)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------