

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05974

研究課題名（和文）滑膜マクロファージに着目した関節リウマチ病態の性差メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of sexual dimorphism of rheumatoid arthritis focusing on synovial macrophages.

研究代表者

佐伯 法学（Saeki, Noritaka）

愛媛大学・学術支援センター・講師

研究者番号：80791607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチは女性優位な病態性差を持つ疾患である。我々は、女性ホルモンのエストロゲンとその受容体ERの機能に着目し、関節リウマチの性差構築機構を明らかにするため、遺伝子改変マウスを用いてゲノムワイドな解析手法により研究を行った。その結果、滑膜マクロファージのERは、細胞内代謝を活性化し細胞死を誘導することで関節炎の悪化に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病態における性差は古くより知られているがその分子機構は不明な点が多い。また、多くの治療法は男性基準であることが多く、性差を考慮した医療の確立が重要であると考えた。本研究では、性差が明確な代表的な疾患である関節リウマチに関して研究を行い、女性ホルモンによる性差構築機構の一端を明らかにした。さらに詳細なメカニズムが明らかになれば、女性を対象としたテーラーメイド医療への展開、性差を考慮した治療ガイドラインの制定など多岐に渡り発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease with sexual dimorphism in pathogenesis. Disease morbidity and activity of RA are worse in females than in males. To reveal molecular mechanisms of the sexual dimorphism in RA, we investigate the functions of 17 $\beta$ -Estradiol and the receptor, ER, in a mouse model using genome-wide analysis. As a result, we found that ER signaling in synovial macrophage promotes arthritis pathogenesis via activation of cellular metabolism, leading to apoptosis.

研究分野：動物生命科学

キーワード：関節リウマチ 滑膜マクロファージ エストロゲン受容体 性差

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来から、特定の疾患において性差が生じることが知られているが、性差の詳細な分子機構は未だ不明である。特に自己免疫疾患は罹患リスクに性差が生じることが明確であり、その代表的疾患として関節リウマチがある。関節リウマチは、男女比が1:3~4で女性罹患が有意であり、閉経前後の女性に好発することや妊娠中に症状が緩和することから、少なくとも女性ホルモンが発症や病態に関与していると考えられているが詳細な分子機構は不明であり、性差を考慮した治療法は確立されていない。免疫細胞の一つであるマクロファージ (M $\phi$ ) は微小環境に対応して炎症反応や抗炎症反応・組織修復に働く。近年、関節炎モデルマウスや関節リウマチ患者の滑膜組織を用いた single-cell RNA-seq 解析が行われ、滑膜炎病態下では様々な滑膜 M $\phi$  のサブポピュレーションが存在し多様性を示すことが示唆されている。これまでに、滑膜 M $\phi$  サブポピュレーションに着目して性差を解析した報告は存在しない。

### 2. 研究の目的

申請者は、代表的な女性ホルモンであるエストロゲンの受容体 ER $\alpha$  がマウス関節炎由来滑膜 M $\phi$  で高発現することを見出した。このことから、本研究は、関節リウマチにおける性差を、滑膜 M $\phi$  サブポピュレーションに発現する ER $\alpha$  の機能に着目して解析し、関節炎病態にどのように影響するか関節炎モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 滑膜 M $\phi$ の ER $\alpha$ 発現解析

雌あるいは雄の Wild type (WT) の C57BL/6 マウスに K/BxN serum transfer arthritis (K/BxN STA) を惹起し、関節炎組織から汎滑膜 M $\phi$  を採取する。汎滑膜 M $\phi$  における性ホルモン受容体 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、Gpr30、Pgr、AR) の発現を RT-qPCR で解析した。

#### (2) M $\phi$ における ER $\alpha$ の機能解析

ER $\alpha^{flox/flox}$  マウスと LysM-Cre マウス (汎 M $\phi$  特異的 Cre 発現マウス) や Cx3cr1-Cre マウス (組織在住 M $\phi$  特異的 Cre 発現マウス) を交配し、汎 M $\phi$  特異的 ER $\alpha$  欠損 (LysM-Cre; ER $\alpha^{flox/flox}$ =ER $\alpha^{\Delta LysM}$ ) マウスと組織在住 M $\phi$  特異的 ER $\alpha$  欠損 (Cx3cr1-Cre; ER $\alpha^{flox/flox}$ =ER $\alpha^{\Delta Cx3cr1}$ ) マウスを作成した。K/BxN STA を惹起し、ER $\alpha^{flox/flox}$  マウスあるいは LysM-Cre; ER $\alpha^{flox/+}$  や Cx3cr1-Cre; ER $\alpha^{flox/+}$  と比較し ER $\alpha^{\Delta LysM}$  マウスや ER $\alpha^{\Delta Cx3cr1}$  マウスで病態に差異が認められるか雌雄で解析した。具体的には、関節炎誘導後の後肢の病態を肉眼的、臨床的、組織学的に評価した。

#### (3) 組織在住滑膜 M $\phi$ と末梢血由来 M $\phi$ における ER $\alpha$ の機能解析

雌の ER $\alpha^{flox/flox}$  マウスと ER $\alpha^{\Delta LysM}$  マウスに K/BxN STA を誘導し、末梢血単球 (classical monocyte, intermediate monocyte, non-classical monocyte) の割合を Flow cytometry で解析した。雌の ER $\alpha^{flox/flox}$  マウスと ER $\alpha^{\Delta LysM}$  マウスの皮膚を外科的に縫合して結合しパラバイオーシスを作成した。両マウスに K/BxN STA を誘導し、関節炎誘導後の後肢の病態を肉眼的、臨床的に評価した。

#### (4) 全身と関節局所におけるエストロゲンの機能解析

Wild type (WT) の雌 C57BL/6 マウスに卵巣摘出を施したのちに、エストロゲンペレットを腹部皮下あるいは後肢皮下に包埋した。その後、K/BxN STA を誘導し、関節炎誘導後の後肢の病態を肉眼的、臨床的に評価した。

#### (5) 脂肪組織由来エストロゲンの機能解析

Aromatase<sup>flox/flox</sup> マウスと aP2-Cre (脂肪細胞特異的 Cre 発現マウス) を交配し、脂肪細胞特異的 Aromatase 欠損 (Aromatase<sup>ΔaP2</sup>) マウスを作成した。雌の Aromatase<sup>flox/flox</sup> マウスと Aromatase<sup>ΔaP2</sup> マウスに性腺摘出を施したのちに、K/BxN STA を誘導し、関節炎誘導後の後肢の病態を肉眼的、臨床的に評価した。

#### (6) 滑膜 M $\phi$ に発現する ER $\alpha$ の分子機構解析

雌の ER $\alpha^{flox/flox}$  マウスと ER $\alpha^{\Delta LysM}$  マウスに K/BxN STA を誘導し、誘導3日目の滑膜組織からシングルセルを採取し、single-cell RNAseq を実施した。得られたデータを用いてクラスタリング解析を行い、特異的マーカー発現を調べ、M $\phi$  サブポピュレーションを解析した。M $\phi$  サブポピュレーションの細胞数や遺伝子発現パターンを ER $\alpha^{flox/flox}$  と ER $\alpha^{\Delta LysM}$  で比較した。

#### (7) M $\phi$ の細胞内代謝解析

雌の ER $\alpha^{flox/flox}$  マウスと ER $\alpha^{\Delta LysM}$  マウスから骨髓由来 M $\phi$  を採取し、M1 (炎症型) と M2 (抗炎症型) に分極化させ、解糖系と酸化的リン酸化を Flux analyzer で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 滑膜 M $\phi$ の ER $\alpha$ 発現解析

K/BxN STA マウスから汎滑膜 M $\phi$  を採取し、性ホルモン受容体の発現を RT-qPCR で解析したところ、ER $\alpha$  の発現が最も高

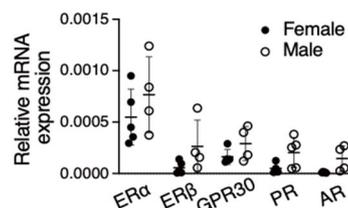


図1 滑膜M $\phi$ における性ホルモン受容体発現の雌雄差

いことが明らかとなった。また、汎滑膜 M $\phi$  における性ホルモン受容体の mRNA 発現は雌雄で差は認めなかった (図 1)。

### (2) M $\phi$ における ER $\alpha$ の機能解析

雌では Control マウスと比較して ER $\alpha^{\Delta\text{LysM}}$  マウスあるいは ER $\alpha^{\Delta\text{Cx3cr1}}$  マウスでは関節炎病態が有意に抑制することが明らかとなった。一方で、雄では差は認めなかった (図 2)。このことから、M $\phi$  に発現する ER $\alpha$  がリガンド依存的に関節炎を促進することが明らかとなった。

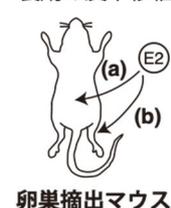
### (3) 組織在住滑膜 M $\phi$ と末梢血由来 M $\phi$ における ER $\alpha$ の機能解析

関節炎における末梢血単球の ER $\alpha$  シグナルの病態生理機能を明らかにするため、末梢血単球全体、classical monocyte、intermediate monocyte、non-classical monocyte の割合を調べたところ、関節炎の有無に関わらず ER $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  マウスと ER $\alpha^{\Delta\text{LysM}}$  マウスで大きな変動は認めなかった。また、関節炎における滑膜 M $\phi$  の ER $\alpha$  シグナルの病態生理機能を明らかにするため、ER $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  マウスと ER $\alpha^{\Delta\text{LysM}}$  マウスで作出したパラバイオシスに K/BxN STA を誘導したところ、(2)と同様に ER $\alpha^{\Delta\text{LysM}}$  マウスで関節炎が有意に抑制することが明らかとなった (図 3)。このことから、末梢血単球ではなく滑膜 M $\phi$  の ER $\alpha$  シグナルが関節炎を促進することが示唆された。

### (4) 全身と関節局所におけるエストロゲンの機能解析

一般的にエストロゲン投与は関節炎を抑制することが報告されていた。エストロゲンの詳細な作用を調べるため、卵巣摘出したマウスの腹部皮下あるいは後肢皮下にエストロゲンを再補充して K/BxN STA を誘導したところ、腹部皮下に投与した場合は既報の如く関節炎が抑制したが、後肢皮下に投与した場合、逆に関節炎は悪化した (図 4)。このことから、関節局所でのエストロゲン産生は関節炎病態を悪化することが示唆された。

エストロゲン (E2) 製剤の皮下移植



卵巣摘出マウス

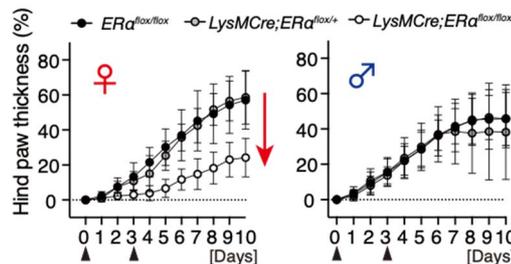
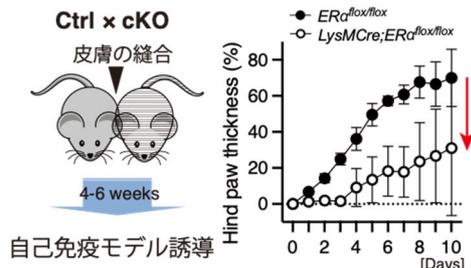


図2 M $\phi$  特異的 ER $\alpha$  欠損マウスの関節炎腫脹の推移



自己免疫モデル誘導

図3 パラバイオシス (Ctrl-cKOペア) の概略図 (左) と関節炎病態 (右)

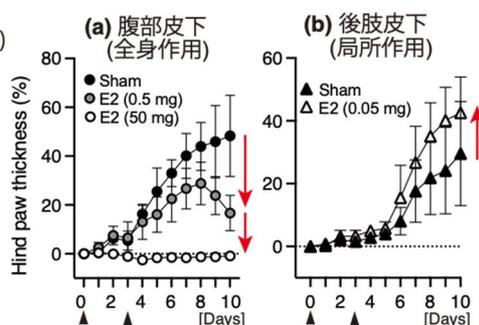


図4 関節炎におけるエストロゲンの全身作用 (a, 抑制) と関節局所作用 (b, 促進)

### (5) 脂肪組織由来エストロゲンの機能解析

エストロゲンはテストステロンが Aromatase によって代謝されて生合成される。脂肪細胞は Aromatase を発現するためエストロゲン産性能があると考えられる。また、多くの関節組織には滑膜に接して脂肪体 (Fat pad) が局在する。そこで、Aromatase $^{\Delta\text{Ap2}}$  マウスを作出し脂肪組織由来エストロゲンの関節炎における影響を解析した。その結果、性腺摘出の有無に関わらず、Aromatase $^{\text{fllox/fllox}}$  マウスと比較して Aromatase $^{\Delta\text{Ap2}}$  マウスでは関節炎病態が有意に抑制することが明らかとなった。このことから、脂肪組織由来エストロゲンが関節病態を悪化することが明らかとなった。

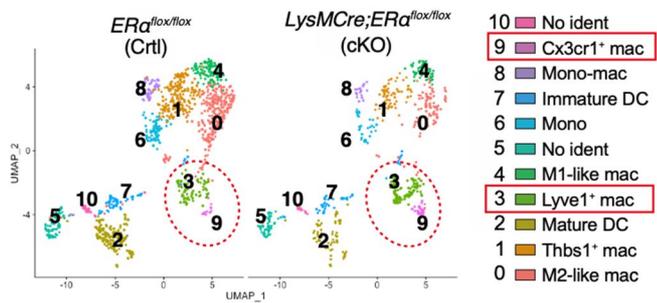
### (6) 滑膜 M $\phi$ に発現する ER $\alpha$ の分子機構解析

滑膜 M $\phi$  の ER $\alpha$  シグナルを解析するため、single-cell RNAseq を行った。クラスタリング解析および特異的マーカー発現解析の結果より、11 種の M $\phi$  lineage クラスタが同定された (図 5)。各クラスタの細胞数や割合を解析したところ、滑膜組織在住 M $\phi$  のポピュレーションである Cx3cr1+ M $\phi$  と Lyve1+ M $\phi$  のクラスタが ER $\alpha^{\Delta\text{LysM}}$  と比較して ER $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  で少ないことが明らかとなった。Cx3cr1+ M $\phi$  と Lyve1+ M $\phi$  の両クラスタに関して Gene ontology 解析と Pathway 解析で遺伝子発現パターンを解析したところ、ER $\alpha^{\Delta\text{LysM}}$  と比較して ER $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  で免疫反応関連や細胞内代謝関連の遺伝子が有意に高いことが明らかとなった (図 5)。また、Lyve1+ M $\phi$  クラ

スターに関しては  $ER\alpha^{\Delta LysM}$  と比較して  $ER\alpha^{flox/flox}$  でアポトーシス関連遺伝子が有意に高いことも明らかとなった。

(7)  $M\phi$  の細胞内代謝解析

$ER\alpha$  シグナルが  $M\phi$  の代謝機能に及ぼす影響を明らかにするため、骨髄由来  $M\phi$  の細胞内代謝を解析したところ、 $ER\alpha^{flox/flox}$  由来細胞と比較して  $ER\alpha^{\Delta LysM}$  由来細胞で、無刺激の  $M\phi$  ( $M0$ ) では差を認めないが、 $M1$  で細胞外酸化速度が減少し、 $M2$  で酸素消費速度が減少した。



※ Cx3cr1, Lyve1: 滑膜  $M\phi$  サブポピュレーションのマーカー

GO biological processes (Cluster 9, Cx3cr1+ mac, Cont > cKO)

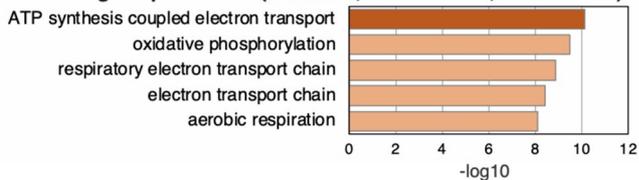


図5 関節炎3日目の滑膜組織のクラスタリング解析(上図; クラスタ3・9がCtrlで減少)とクラスタ9のGO解析(下グラフ, TOP5)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Noritaka Saeki, Yuuki Imai	4. 巻 38
2. 論文標題 Crosstalk between synovial macrophages and fibroblasts in rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histology and histopathology	6. 最初と最後の頁 1231-1238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Shuhei, Ikedo Aoi, Yanagihara Yuta, Sakaue Tomohisa, Saeki Noritaka, Imai Yuuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Bub1 suppresses inflammatory arthritis-associated bone loss in mice through inhibition of TNF-mediated osteoclastogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 341 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jbmr/zjae015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kato Hiroaki, Saeki Noritaka, Imai Matome, Onji Hiroshi, Yano Akiko, Yoshida Shuhei, Sakaue Tomohisa, Fujioka Toru, Sugiyama Takashi, Imai Yuuki	4. 巻 13
2. 論文標題 LIM1 contributes to the malignant potential of endometrial cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2023.1082441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saeki Noritaka, Imai Yuuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Isolation and Culture of Primary Synovial Macrophages and Fibroblasts from Murine Arthritis Tissue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/65196	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 -

1. 著者名 Saeki Noritaka, Inoue Kazuki, Ideta-Otsuka Maky, Watamori Kunihiko, Mizuki Shinichi, Takenaka Katsuto, Igarashi Katsuhide, Miura Hiromasa, Takeda Shu, Imai Yuuki	4. 巻 132
2. 論文標題 Epigenetic regulator UHRF1 orchestrates proinflammatory gene expression in rheumatoid arthritis in a suppressive manner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI150533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakakibara Iori, Yanagihara Yuta, Himori Koichi, Yamada Takashi, Sakai Hiroshi, Sawada Yuichiro, Takahashi Hirotaka, Saeki Noritaka, Hirakawa Hiroyuki, Yokoyama Atsushi, Fukada So-ichiro, Sawasaki Tatsuya, Imai Yuuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102303 ~ 102303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102303	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 佐伯法学, 井上和樹, 大塚まき, 渡森一光, 水木伸一, 竹中克斗, 五十嵐勝秀, 三浦裕正, 竹田秀, 今井祐記
2. 発表標題 関節リウマチ病態の滑膜恒常性維持に寄与するエピジェネティック制御因子UHRF1
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Noritaka Saeki, Yuuki Imai
2. 発表標題 ER signaling in resident synovial macrophages promotes inflammatory arthritis via the activation of cellular metabolism
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noritaka Saeki, Yuuki Imai
2. 発表標題 ER signaling in synovial macrophage promotes inflammatory arthritis via excessive metabolic flux
3. 学会等名 第 21 回松山国際学術シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯法学, 井上和樹, 大塚まき, 渡森一光, 水木伸一, 竹中克斗, 五十嵐勝秀, 三浦裕正, 竹田秀, 今井祐記
2. 発表標題 関節リウマチ病態を網羅的に制御するDNAメチル化因子UHRF1
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯法学, 今井祐記
2. 発表標題 滑膜マクロファージにおけるER シグナルは細胞内代謝を介して関節炎病態を増悪する
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯法学, 今井祐記
2. 発表標題 滑膜マクロファージのER シグナルは細胞内代謝を制御し関節炎病態を悪化する
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯法学, 今井祐記
2. 発表標題 滑膜マクロファージのER シグナルは細胞内代謝制御を介して関節炎病態を悪化する
3. 学会等名 第13回 Orthopedic Research Club
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯法学
2. 発表標題 関節リウマチ病態に寄与するエピジェネティック制御因子の同定と新規治療標的としての可能性
3. 学会等名 PRIME・PROS 第10回学術シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯法学, 今井祐記
2. 発表標題 Estrogen receptor-alpha promotes activation of synovium-resident macrophages in arthritis model mice.
3. 学会等名 プロテイン・アイランド2022国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯 法学, 井上 和樹, 大塚 まき, 渡森 一光, 水木 伸一, 竹中 克斗, 五十嵐勝秀, 三浦 裕正, 今井 祐記
2. 発表標題 滑膜線維芽細胞に発現するUHRF1はDNAメチル化を介して関節リウマチの多様な増悪因子を抑制する
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯法学, 今井祐記
2. 発表標題 関節炎モデルマウスにおけるマクロファージの ER 機能解析
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noritaka Saeki, Kazuki Inoue, Maky Ideta-Otsuka, Kunihiko Watamori, Shinichi Mizuki, Katsuto Takenaka, Katsuhide Igarashi, Hiromasa Miura, Yuuki Imai
2. 発表標題 Stabilization of UHRF1 in synovial fibroblasts is a novel therapeutic strategy for rheumatoid arthritis.
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society (ECTS) Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯 法学, 井上 和樹, 大塚 まき, 渡森 一光, 水木 伸一, 竹中 克斗, 五十嵐勝秀, 三浦 裕正, 今井 祐記
2. 発表標題 エピジェネティック制御因子UHRF1は関節リウマチの多様な増悪因子を抑制する
3. 学会等名 第39回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noritaka Saeki, Kazuki Inoue, Maky Ideta-Otsuka, Watamori Kunihiko, Shinichi Mizuki, Katsuto Takenaka, Katsuhide Igarashi, Hiromasa Miura, Yuuki Imai
2. 発表標題 Stabilization of UHRF1 in synovial fibroblasts is a novel therapeutic strategy for rheumatoid arthritis.
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯法学, 井上和樹, 大塚まき, 渡森一光, 水木伸一, 竹中克斗, 五十嵐勝秀, 三浦裕正, 今井祐記
2. 発表標題 UHRF1は関節リウマチの多様な増悪因子を抑制する
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Noritaka Saeki (共著)	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Humana	5. 総ページ数 365
3. 書名 Rheumatoid Arthritis: Methods and Protocols	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------