

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19707

研究課題名(和文)変形性関節症制圧を目指した新規免疫ネットワーク解析手法を用いた治療薬の開発

研究課題名(英文)Drug development using a novel immune network analysis method for osteoarthritis

研究代表者

小野寺 智洋(Onodera, Tomohiro)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70547174

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞・滑膜細胞を用いて、変形性関節症の関節内を模擬した共培養モデルを作成した。軟骨破片に関しては、組織破砕機を用いて実際の変形性関節症で見られる軟骨片と類似したサイズのものを作成することに成功した。本モデルを用いて、軟骨細胞・滑膜細胞の動態を観察したところ、153種類の遺伝子の統計学的有意な発現変化が見られた。現在はこれらの候補遺伝子のうち、特に関節炎と関係が深いと思われる最終候補遺伝子に対する機能解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞と軟骨細胞の相互作用を細胞レベルで研究することが可能となる新たな実験モデルを開発した。また、本プロジェクトで独自に開発したモデルを利用することで、軟骨変性のメカニズムに関する新たな洞察が得られた。本モデルを用いて我々が同定した153種類の遺伝子群には、変形性関節症を制御している因子が含まれている可能性が極めて高く、今後得られた遺伝子群の解析を進めることによって、新たな変形性関節症治療法の開発が可能となる。

研究成果の概要(英文):A co-culture model system, including cartilage fragments, macrophages, chondrocytes and synovial cells, to simulate the osteoarthritis joint was established. Regarding cartilage fragments, we successfully created cartilage fragments similar in size to that seen in human osteoarthritis. When we observed the cell dynamics of chondrocytes and synovial cells in our original model, we could observe statistically significant changes in the expression of 153 genes. Currently, among these candidate genes, we are conducting functional analysis on the final candidate gene, which is thought to be particularly related to osteoarthritis.

研究分野：整形外科

キーワード：関節病学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、変形性関節症(OA)の病態に関わる免疫ネットワークの解析手法を確立し、炎症発生および遷延化に関わる分子制御機序の解明と治療への応用を目指す。申請者らのグループはこれまで運動器炎症性疾患に対する解析手法を構築し、慢性関節炎が軟骨基質や軟骨細胞上の糖脂質・プロテオグリカンの破綻によって引き起こされることを明らかにしてきた(Arthritis Rheum. 2011, 2012; Osteoarthritis Cartilage. 2014)。これらの分子の破綻はOA発症の重要な因子であるが、その免疫学的分子調節機構については十分に解明されていない。これまでOAに関する免疫学的研究は、マクロファージや滑膜細胞と関節炎との関係に注目したものが多く、他の免疫細胞である樹状細胞や好中球、リンパ球の役割を検討したものはほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究では、変形性関節症(OA)の病態に関わる免疫ネットワークの解析手法を確立し、炎症発生および遷延化に関わる分子制御機序の解明と治療への応用を目指す。申請者らはこれまで、慢性関節炎が軟骨基質や軟骨細胞上の糖脂質・プロテオグリカンの破綻によって引き起こされることを明らかにしてきた。これらの分子の破綻はOA発症の重要な因子であるが、その免疫学的分子調節機構については十分に解明されていない。今回我々は、樹状細胞や好中球、リンパ球がOA発症に重要な役割を果たしており、これらの免疫細胞ネットワークからのシグナルを解析・制御することで、OAを抑制できると考えた。

本研究では、軟骨マトリックス片と免疫細胞群の分子制御機構を解明可能なシステムを確立し、相互作用の解析を行う。得られた結果を基盤として、それらを制御し得る新規治療薬を創出することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は軟骨破片存在下での免疫細胞(マクロファージ、樹状細胞、好中球、リンパ球)と滑膜細胞、軟骨細胞との相互関係をトランスクリプトームによって解析する。また、抽出された候補シグナルを *in vitro* ならびに *in vivo* で制御することで、免疫細胞が軟骨細胞を賦活化させる際の鍵となる新規シグナルを同定する。免疫ネットワークの協調的作用を解析するために、山中らがiPS細胞樹立に必要な4遺伝子(山中遺伝子)を24候補から同定した手法(Yamanaka et al. Cell 2006)を応用する。つまり候補となる全ての細胞(マクロファージ、樹状細胞、好中球、滑膜細胞、リンパ球)を軟骨破片存在下に軟骨細胞と共培養を行い、軟骨細胞の賦活化を確認する。その後、一つずつ免疫細胞を減らしていき、軟骨細胞の活性が減弱した免疫細胞を除いていくことで段階的に免疫細胞の選択を行い、最も軟骨細胞を活性化させる組み合わせを決定する(図1)。具体的には免疫細胞群と軟骨細胞を破砕軟骨片の存在下に共培養することで、生体内の軟骨変性状態を模擬することを確認し、至適細胞の組み合わせを決定する(実験1)。次いで、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行い(実験2)、siRNA実験で候補シグナルを絞り込む(実験3)。更に変形性関節症モデル動物を用いて *in vivo* での候補シグナル阻害効果の確認することで(実験4)、軟骨細胞を活性化させる新規シグナルを決定する。その後、決定したシグナルをターゲットとした薬剤に関して共培養モデルを用いて効果判定を行う(実験5)。

4. 研究成果

軟骨破片、マクロファージ、軟骨細胞を用いた関節内を模擬する *vitro* 共培養モデルを作成した。4週齢の野生型マウス大腿骨頭軟骨より採取した軟骨を、組織破砕機を用いて粉碎して軟骨破片を作成した(図1)。

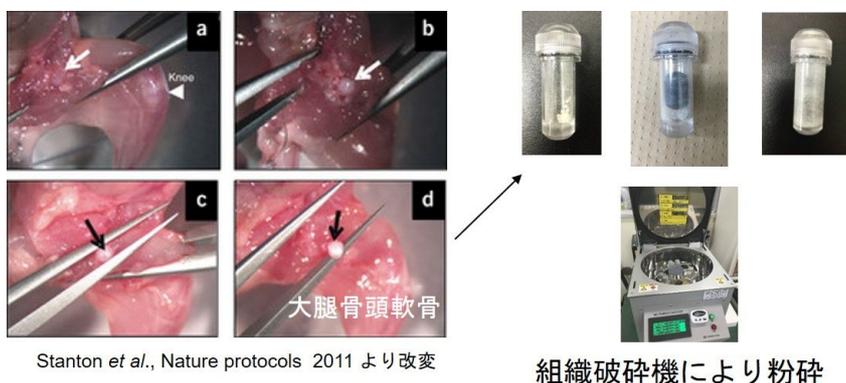


図1 マウス軟骨破片の作製

また同様の方法で人工膝関節置換術時に破棄されるヒト関節軟骨正常部分を使用し、ヒト軟骨破片を作成し、これらについて粒度分布計で計測を行った(図2)。

また、骨髄由来 MΦ と軟骨細胞をマウスから採取し軟骨破片との共培養を行った。さらに人工関節置換手術時に破棄される軟骨組織、ヒト骨髄液を回収し、軟骨組織から軟骨破片を、骨髄液から骨髄細胞を骨髄由来マクロファージに分化させヒト軟骨破片との共培養を行った。作成したマウス、ヒトの軟骨破片は不整で、大きさはマウスが直径平均 $3.11\mu\text{m}$ ($0.54\text{--}55\mu\text{m}$)、ヒトは $5.20\mu\text{m}$ ($0.34\text{--}127\mu\text{m}$) であった (図 3)

図 2 ヒト軟骨破片の作製

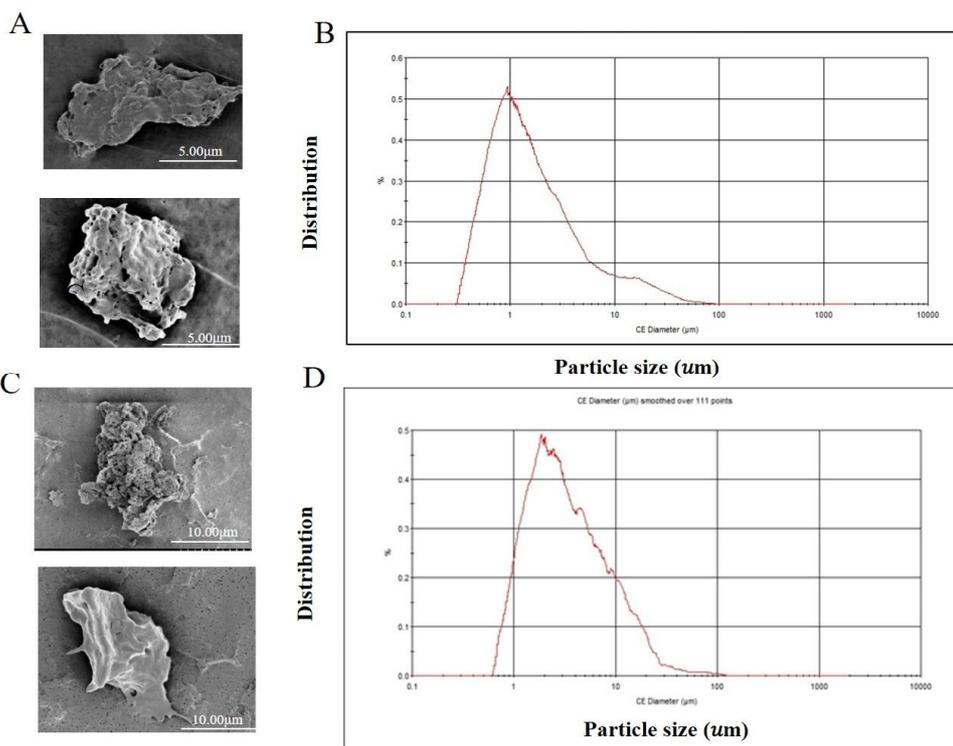
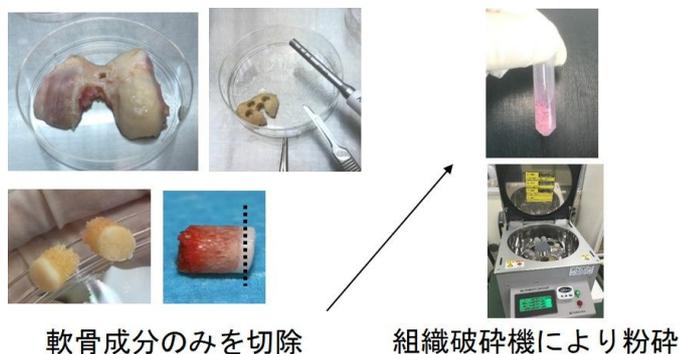


図3 作製した軟骨破片の大きさ、形状の検討

- (A) 作製したマウス軟骨破片を走査型電子顕微鏡により撮像した像
- (B) 作製したマウス軟骨破片を粒度分布計により計測した粒度分布
- (C) 作製したヒト軟骨破片を走査型電子顕微鏡により撮像した像
- (D) 作製したヒト軟骨破片を粒度分布計により計測した粒度分布

作成したマウス、ヒトの軟骨破片について、これらの形状・大きさは疾患患者における軟骨破片とほぼ同等であった。確立された軟骨破片刺激モデルにおいて軟骨破片はマクロファージを介する炎症反応を惹起し、軟骨細胞の catabolic factor を増加させた。続いて、本モデルにおけるマクロファージから RNA を抽出し、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析を行った。その結果、軟骨破片により発現上昇したマクロファージ遺伝子は 153 個同定された。この遺伝子群について、Gene ontology 解析および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) Pathway 解析を行った。(図 4 , 5)

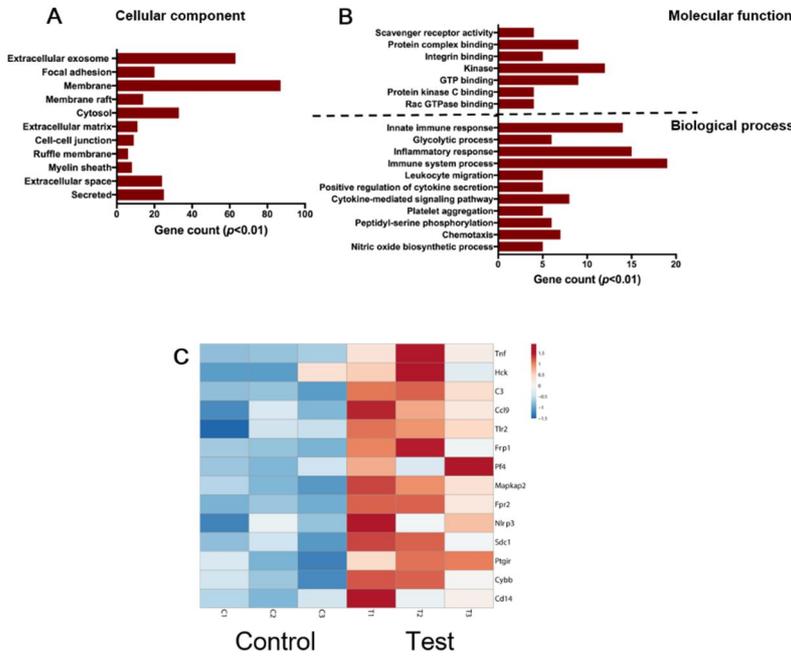


図4 軟骨破片に対するマクロファージの反応に関するGene ontology解析 A) cellular componentに関するGO term B) molecular function 及び biological processに関するGO terms C) 炎症反応に関しての各遺伝子発現に関するヒートマップA 相対的発現上昇を赤、発現低下を青で示す。

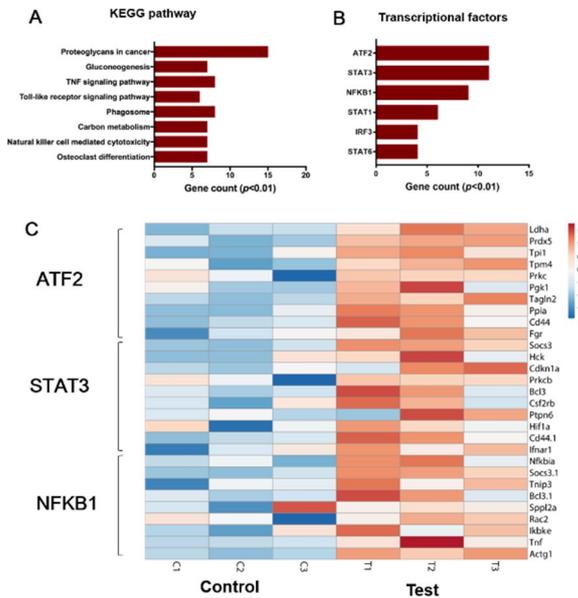


図5 軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して有意に発現上昇した遺伝子群に対するKEGGパスウェイ 及び転写因子解析. A)有意に同定された上位のKEGGパスウェイ B)転写因子解析で有意に同定された転写因子 C)軟骨破片に対するマクロファージの反応に関して有意に変化があった転写因子に関するヒートマップ。相対的発現上昇を赤、発現低下を青で示す。

さらに、本モデルにおける軟骨細胞からRNAを抽出し、同様に網羅的遺伝子解析を行ったところ、340個の遺伝子が有意に発現上昇を認めた。これらの発現上昇遺伝子群に対して、Gene ontology解析およびKEGG pathway解析を行ったところ、骨化および骨石灰化や基質分解などの項目が上位に同定された。(図6, 7)

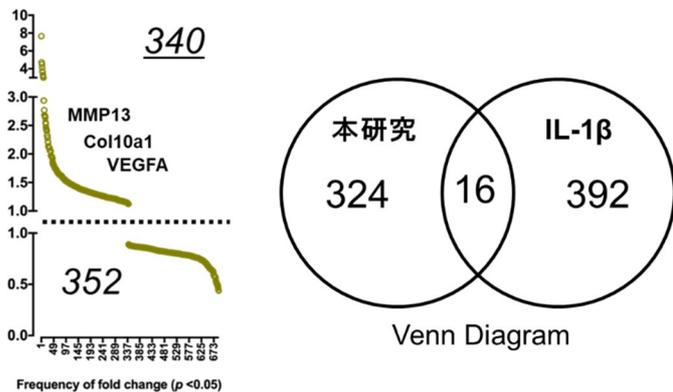


図6. 共培養モデルにおける軟骨細胞の網羅的遺伝子解析

本モデルにおける軟骨細胞の発現上昇遺伝子は 340 個同定された。それらの発現上昇遺伝子群を、IL-1 β 刺激軟骨細胞において発現上昇する遺伝子群と比較したところ、共通遺伝子はわずか 16 個のみであった。この結果から、軟骨破片により活性化したマクロファージ由来因子は、IL-1 β とは異なる可能性が示唆された。

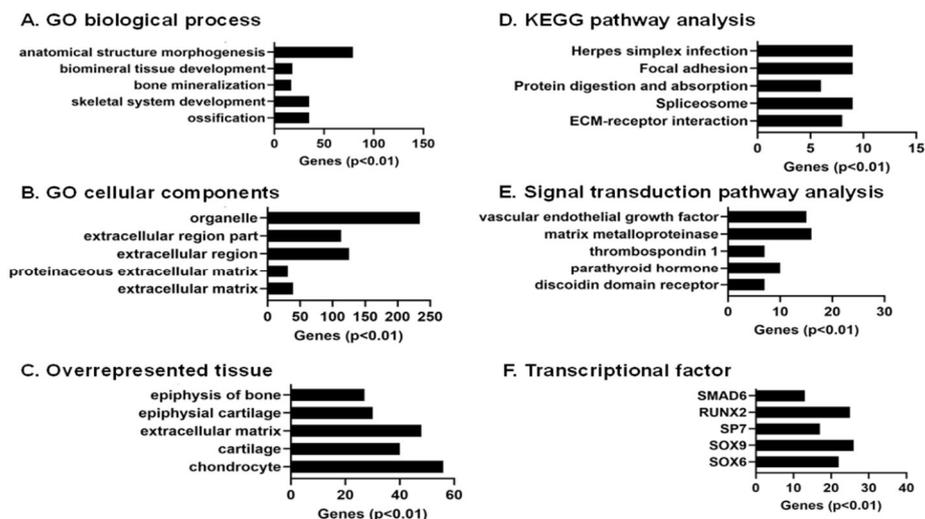


図 7. エンリッチメント解析およびパスウェイ解析

本モデルにおける軟骨細胞において有意に発現上昇した遺伝子について、エンリッチメント解析およびパスウェイ解析を行った。これらの解析結果から、発現上昇した遺伝子群では、骨化や骨石灰化、細胞外基質および基質分解、軟骨細胞の肥大分化など、軟骨内骨化シグナルに関わる項目が上位に同定された。

現在はこれらの発現上昇遺伝子から、特に関節炎と関係が深いと思われる最終候補遺伝子に対する機能解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件(うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件)

1. 著者名 Hamasaki Masanari, Terkawi Mohamad Alaa, Onodera Tomohiro, Homan Kentaro, Iwasaki Norimasa	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A Novel Cartilage Fragments Stimulation Model Revealed that Macrophage Inflammatory Response Causes an Upregulation of Catabolic Factors of Chondrocytes In Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CARTILAGE	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1947603519828426	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 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 濱崎雅成, TERKAWI Mohamad Alaa, 小野寺智洋ら
2. 発表標題 マクロファージ共培養モデルにおいて軟骨破片が引き起こすマクロファージの炎症反応および軟骨細胞への影響
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱崎雅成, TERKAWI Mohamad Alaa, 小野寺智洋ら
2. 発表標題 マクロファージ共培養モデルにおいて軟骨破片が軟骨細胞に与える影響
3. 学会等名 第31回 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanari Hamasaki, Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera et al.
2. 発表標題 A novel cartilage-fragments stimulation model revealed that macrophage inflammatory response causes an upregulation of catabolic factors of chondrocytes in vitro
3. 学会等名 2018 Orthopaedic Research Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanari Hamasaki, Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera et al.
2. 発表標題 An Up-Regulation Of Catabolic Factors Of Chondrocytes In Cartilage-Fragments Stimulation Model With Macrophages
3. 学会等名 2018 International Cartilage Repair Society World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ebata T, Hamasaki M, Terkawi MA, Onodera T, Matsumae G, Tian Y, Alhasan H, Takahashi D, Iwasaki N
2. 発表標題 Inflamed macrophages by articular cartilage fragments elicits typical gene expression signature of endochondral ossification in chondrocytes in vitro.
3. 学会等名 2020 Orthopaedic Research Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera, Gen Matsumae, Yuan Tian, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments: Toward exploring the mechanism of progressive osteoarthritis
3. 学会等名 2019 Orthopaedic Research Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱崎 雅成, Mohamad Alaa Terkawi, 小野寺 智洋, 宝満 健太郎, 上徳 善太, 松原 新史, 岩崎 倫政
2. 発表標題 網羅的遺伝子発現解析によるマクロファージに対する軟骨破片の影響の検討
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanari Hamasaki, Mohamad Alaa Terkawi, Tomohiro Onodera Kentaro Homan, Zenta Joutoku S. Matsubara R. Hishimura, Kim Woo Young, Liang Xu, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments a reveals novel mechanism for osteoarthritis
3. 学会等名 2019 International Cartilage Repair Society world congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱崎 雅成 Mohamad Alaa Terkawi 小野寺 智洋 宝満 健太郎 徐 亮 宮崎 拓自 田 園 江畑 拓 松前 元 岩崎 倫政
2. 発表標題 軟骨破片に対するマクロファージ炎症反応の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第34回 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江畑拓、濱崎雅成、テルカウイアラ、小野寺智洋、松前元、田園、アルハサンヘンド、宮崎拓自、徐亮、菱村亮介、岩崎倫政
2. 発表標題 軟骨破片刺激モデルにおいて軟骨細胞は軟骨内骨化関連の遺伝子発現が上昇する
3. 学会等名 第34回 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小野寺智洋、濱崎雅成、Alaa Terkawi, 岩崎倫政	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 別冊B10 Clinica (バイオクリニカ) 慢性炎症と疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

