

骨・関節細胞のダイナミクスと免疫系の制御を包括した統合運動器学の確立

Establishment of an integrated locomotive science including dynamics of bone-articular cells and regulation by immune system

課題番号：19H05654

田中 栄 (TANAKA Sakae)

東京大学・医学部附属病院・教授



研究の概要（4行以内）

近年様々な疾患において免疫系の関与が明らかとなってきた。本研究では、免疫系システムによる運動器の恒常性維持機構を1細胞レベルで解明し、運動器疾患による変化（破綻）を解明する。シングルセル解析などの最先端の研究手法を駆使し、様々なリソース（分子、細胞、遺伝子改変動物モデル、ヒト組織、ヒトゲノム）を用いて、運動器恒常性維持の全貌解明に迫る。

研究分野：骨・軟骨代謝学、分子細胞生物学、運動器学、免疫学、ゲノム解析

キーワード：統合運動器学、運動器疾患、シングルセル解析、自然リンパ球

1. 研究開始当初の背景

運動は生体の恒常性維持に不可欠な活動であり、運動器の代表的疾患である変形性関節症、骨粗鬆症、関節炎は日常生活動作に制限をもたらし、大きな社会問題となっている。その根本的な原因として多様な細胞の集合体である運動器についての統合的な理解が不十分であることがあげられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動器の恒常性維持機構の1細胞レベルでの理解と、運動器疾患におけるその変化（破綻）の解明である。シングルセル解析などの最先端の研究手法を駆使し、これまで蓄積してきた様々なリソース（分子、細胞、遺伝子改変動物モデル、ヒト組織、ヒトゲノム）を使って解析を進める。さらに免疫系がこのような変化にどのように関与するか、主に自然リンパ球(ILC)に着目して解析し、運動器恒常性維持の全貌解明に迫る。

3. 研究の方法

変形性関節症(OA)モデル、関節リウマチ(RA)モデル、骨粗鬆症モデルのマウスから滑膜、骨髄、軟骨等を採取し、線維芽細胞、マクロファージ等の免疫細胞や軟骨細胞、破骨細胞など骨・関節構成細胞の数や分布、比率が疾患や病勢によってどのように変化するかを解析する。マーカー分子の免疫染色に加え、必要に応じて各細胞のレポーターマウスを用いる。また、組織から細胞を回収してシングルセル・RNA シーケンス(scRNAseq)を行い、疾患に伴う変化を解析する。具体的な手順は

以下のサブテーマ毎に研究を推進している。

- ① 運動器疾患に伴う骨・関節構成細胞と免疫細胞のダイナミクス：OA、RA、骨粗鬆症等のマウスモデル、およびヒト手術サンプルから滑膜、軟骨、骨を採取し、これらの組織を構成する滑膜線維芽細胞、マクロファージ、ILC、T細胞、軟骨細胞などの数、分布、比率が疾患によってどのように変化するか、heterogeneity、サブセットがどのように変化するかを解析する。
- ② ヒトゲノム解析による疾患関連候補遺伝子・細胞の抽出：疾患関連 SNPs データベースやゲノムワイド関連解析(GWAS)のデータから運動器疾患に関係しうる多型、ゲノム領域を入手し、replication を指標に疾患関連候補遺伝子を抽出する。患者の手術サンプルを用いて遺伝子多型と発現量を組み合わせたeQTL解析を行い、病態に関与する遺伝子を絞り込む。
- ③ 疾患関連候補遺伝子の機能解析：疾患関連候補遺伝子を絞り込み、flox マウスを作成する。特徴的な細胞種やサブセットが得られ、指標となる遺伝子が同定されれば CreERT マウスを作成し、細胞の機能を明らかにする。
- ④ 疾患関連候補細胞を基軸にした骨・関節構成細胞・免疫細胞間のクロストーク解析：疾患発症への関連が濃厚に疑われる候補細胞・サブセットについて、それらがその周囲の細胞とどのようにクロストークし、その変化がどのように疾患に繋がるのか、scRNAseq解析により OA、RA 等の発症に中心的役割を果たす疾患責任細胞/遺伝子を絞り込む。
- ⑤ 治療標的の設定と Proof of Concept の確

立：見出したメカニズムから治療標的を設定し、疾患モデルマウスを用いて干渉実験を行う。新規治療法の Proof of Concept を確立する。

4. これまでの成果

本研究の基盤技術である scRNAseq を実施するにあたり、各疾患の最適なモデルの選定を進めると同時に、細胞の単離、1細胞化からライブラリー作成、シーケンスまでの実験的行程の予備検討を行い、最適化を完了した。まず OA モデルマウスの滑膜を採取し細胞を単離して scRNAseq を実施した。これらの細胞を発現遺伝子プロファイルに基づいてクラスター分類していくと、線維芽細胞、マクロファージ、内皮細胞の特徴を持った規模の大きい群と、各種 T 細胞や ILC などの特徴を有する規模の小さい細かいクラスターが複数同定された。Gene Ontology 解析、Trajectory 解析を行ったところ、OA で明確に増加する規模の大きいクラスターが同定され、主に対照群滑膜において Prg4 陽性のクラスターが存在した。また Ligand/Receptor 解析により、細胞増殖や走化性に関わる分子シグナルが OA の制御関連候補分子として示唆された。次に手術時に得られたヒト OA 関節滑膜を用いて解析を行った。炎症の強い滑膜、弱い滑膜の 2 検体の scRNAseq 解析したところ、いずれもマウス滑膜と同様に線維芽細胞、マクロファージ、内皮細胞のほか多様なクラスターが同定された。線維芽細胞の中で炎症の程度によって変化するサブセットが複数同定され、マウスと同じ分子シグナルが強く検出された。各サブセットのマーカー遺伝子を絞り込むことができた。力学的負荷が Ca²⁺チャネル TRPV2 を介して Prg4 を誘導すること (Nakamoto H, et al. Arthritis Rheumatol. 2020)、lubricin は比較的未分化な細胞から産生され、異所性軟骨形成や軟骨細胞の成熟を抑制することを解明した (Maenohara Y, J Bone Miner Res. 2020)。

ゲノム解析では、OA、RA 患者の滑膜サンプルを用いて遺伝子多型と発現量を組み合わせた eQTL 解析を行い、OA の病態に特徴的な遺伝子として複数の候補分子を抽出した。さらに ChIPseq データを用いてエンハンサーとプロモーターのループ形成を解析する HiC 解析により疾患関連遺伝子を絞り込んだ。

5. 今後の計画

今後の研究では、scRNAseq 解析やゲノム解析から抽出された疾患関連候補分子について病態との関連を精査する予定である。

骨・関節疾患の発症や病態への関連が濃厚に示唆される遺伝子においては flox マウスを作成する。また骨・関節構成細胞もしくはサブセットに対する CreERT マウスも作成・入手し、分子・細胞特異的に候補遺伝子の機能解析を行う。当研究室ではすでに Prg4 を始めと

して、複数の Cre マウスを所有している。疾患関連候補細胞やサブセットを抽出すると共に、さらにそれらがその周囲の細胞とどのようにクロストークし、その変化がどのように疾患に繋がるのか、in vitro、in vivo の系を用いて解析を進める。動物実験の裏付けによって、骨・関節の恒常性がどのような細胞間ネットワークによって維持されているかを明らかにして、特定の分子や細胞種の治療標的を設定する。疾患モデルマウスを用いて干渉実験を行い、新規治療法の確立を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Nakamoto H, Katanosaka Y, Chijimatsu R, Mori D, Xuan F, Yano F, Omata Y, Maenohara Y, Murahashi Y, Kawaguchi K, Yamagami R, Inui H, Taketomi S, Taniguchi Y, Kanagawa M, Naruse K, Tanaka S, Saito T*: TRPV2 is involved in induction of lubricin and suppression of ectopic endochondral ossification in articular joints. Arthritis Rheumatol. 2021.

2. Maenohara Y, Chijimatsu R, Tachibana N, Uehara K, Xuan F, Mori D, Murahashi Y, Nakamoto H, Oichi T, Chang SH, Matsumoto T, Omata Y, Yano F, Tanaka S, Saito T*: Lubricin Contributes to Homeostasis of Articular Cartilage by Modulating Differentiation of Superficial Zone Cells. J Bone Miner Res. 2020.

3. Tsuchiya H, Ota M, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Sakata T, Tsuchida Y, Inui H, Hirose J, Kochi Y, Kadono Y, Shirahige K, Tanaka S, Yamamoto K, Fujio K*: Parsing multiomics landscape of activated synovial fibroblasts highlights drug targets linked to genetic risk of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2020.

4. Okada K, Mori D, Makii Y, Nakamoto H, Murahashi Y, Yano F, Chang SH, Taniguchi Y, Kobayashi H, Semba H, Takeda N, Piao W, Hanaoka K, Nagano T, Tanaka S, Saito T*: Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF-κB signaling. Sci Rep. 2020.

5. Omata Y, Frech M, Lucas S, Primbs T, Knipfer L, Wirtz S, Kadono Y, Saito T, Tanaka S, Sarter K, Schett G, Zaiss MM*: Type 2 innate lymphoid cells inhibit the differentiation of osteoclasts and protect from ovariectomy-induced bone loss. Bone. 2020.

7. ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>