

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09471

研究課題名(和文)炎症収束性貪食細胞由来細胞外小胞による関節炎収束メカニズムの解明

研究課題名(英文)Resolving mechanism of arthritis induced by extracellular vesicles derived from resolving neutrophil

研究代表者

浅野 毅 (Asano, Tsuyoshi)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：50722493

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)：炎症を収束させる好中球への誘導刺激を選定し、TGF- $\beta$  と PPAR gamma agonist による刺激を受けた好中球が炎症反応によって生じる軟骨細胞の異化因子の発現を抑制することを示した。また、これらの炎症収束型好中球が炎症環境下の軟骨細胞に与える影響に炎症収束型好中球由来の細胞外小胞が寄与していることを示した。炎症収束型好中球由来の。この分子機序として細胞外小胞が軟骨細胞中の炎症シグナルを制御することで、軟骨異化因子放出を減弱させ、軟骨基質の分解を抑制することで、軟骨変性を抑制する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性関節炎の発症は、炎症が適切に収束されない点にある。これまでは、関節炎の活性化メカニズムに着目した研究が大多数であり、炎症収束メカニズムに着目した研究は少なく、関節内の貪食細胞が担う炎症収束メカニズムを解明した研究はない。本研究では炎症収束型好中球は、炎症反応によって生じる軟骨細胞の異化因子放出を抑制しており、この反応に細胞外小胞が関与していることが示された。その分子機序として軟骨細胞中の炎症シグナルを制御することで、軟骨異化因子放出を減弱させ、軟骨変性を抑制する可能性を示した。関節炎の炎症収束に関わるメカニズムを解明したことで、病態の解明や、新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I found TGF- $\beta$  and PPAR gamma agonist as the stimulation for neutrophils to converge the phenotype of neutrophil toward resolving. I showed that these neutrophils inhibit the release of chondrocyte catabolic factors produced by the inflammatory response, and extracellular vesicles are involved in this response. The molecular mechanism of this process seemed to be extracellular vesicles regulate inflammatory signaling in chondrocytes, suppress the catabolic process and prevent cartilage degeneration.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：好中球 細胞外小胞 軟骨

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチをはじめとする関節炎疾患患者は、炎症による軟骨変性・関節破壊によって関節痛および関節可動域制限を生じ、日常生活レベルが低下する。近年の炎症誘導メカニズムの解析により、多くの抗炎症治療薬が開発され、その有益な治療効果により患者満足度は向上してきた。その一方、これらの治療のみでは、軟骨変性や関節破壊が進む症例が少なからず存在しており、それに伴うADL障害に苦しむ患者も散見される。また、現行の治療では、過度な免疫抑制が生じ、感染症などの副作用によりADL低下を来す症例もみられる。

本来炎症反応は、生体防御において重要な生理機能である。有害刺激に対し、免疫細胞が炎症を誘導し、起炎物質を排除するが、同時に周囲の組織障害を引き起こす。そのため、好中球やマクロファージや好中球などの貪食細胞が、形質転換することで、炎症を収束させ、これらの細胞が放出する因子が、損傷組織の修復に寄与する(図1)。一方で、この収束機構が破綻すると、慢性炎症や組織障害を伴う病態へと発展する。すなわち、炎症の慢性化とそれに伴う組織障害には、炎症収束に働く貪食細胞(炎症収束型貪食細胞)の機能障害が関与している(図2)。

この概念は関節炎疾患にも当てはまるが、これまでの研究は炎症誘導機構の解明が主体であり、炎症収束機構に焦点をあてた研究はみられなかった。そこで、申請者は、関節炎疾患における炎症収束機構に着目し、機能障害を生じた炎症収束型貪食細胞が放出する因子の関節内投与が、関節炎の収束と炎症による組織障害を低減することが可能となると着想した。

貪食細胞の放出因子として、「細胞外小胞」に着目した。細胞外小胞は、内包される核酸やタンパク質、脂質などの複数因子を他の細胞に伝達する。すでに、心筋梗塞や脳梗塞などの疾患において、貪食細胞由来細胞外小胞が組織修復に寄与することが報告されているが、これらは、炎症収束型貪食細胞由来のものではない。細胞外小胞は、放出される細胞の特性を反映することから、炎症収束型貪食細胞が放出する細胞外小胞は、他の貪食細胞由来のものよりも有益な治療効果を示す可能性がある。そこで、炎症収束型貪食細胞由来の細胞外小胞は関節炎を収束させ、副次的に生じる関節構成体の組織障害を減弱させると仮説をたて、関節炎における炎症収束機構の障害に着目した本研究提案に至った。

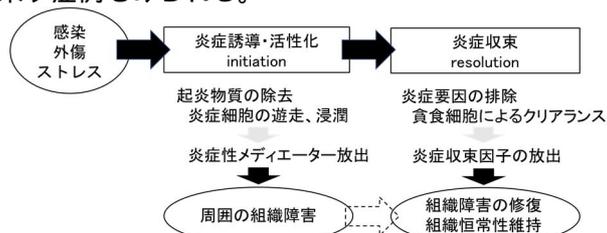


図1. 生理的条件下では、有害刺激に応じて、炎症が誘導されるが、貪食細胞の働きにより炎症は収束する。その際に、炎症誘導により生じた組織障害を修復し、組織恒常性を維持している。

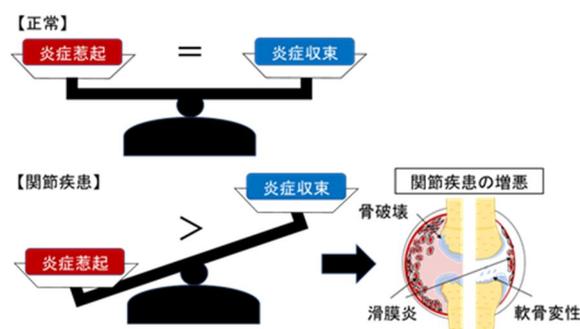


図2: 生理的状态では、炎症の惹起と収束の均衡は維持されているが、慢性炎症状態では、炎症収束は相対的に減弱しており、疾患増悪に繋がる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症収束型貪食細胞由来細胞外小胞が、炎症反応により副次的に生じた関節組織の障害を修復できるかを検討し、その分子生物学的メカニズムを解明することである。具体的には、以下の3点を明らかにすることを目的とした。

目的1: 炎症収束型貪食細胞由来の細胞外小胞が、炎症反応によって生じた関節構成体の機能障害から回復させることができるか調査する。

目的2: 炎症収束型貪食細胞由来の細胞外小胞に内包される因子を網羅的に解析し、その分子生物学的機序を明らかにする。

目的3: 炎症収束に関わる因子を同定し、関節炎の疾患進行を制御できるか検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 予備実験: 炎症収束型貪食細胞が関節構成体に及ぼす影響の解明

まず予備実験として、炎症収束型貪食細胞が関節構成体に及ぼす影響を *in vitro* で調査した。貪食細胞として好中球を用いた。ヒト血液およびマウス骨髄細胞から単離した好中球に対して、各種刺激を添加した後に、その培養培地を回収した。続いて、炎症環境を模倣するため、軟骨細胞に IL-1 刺激を添加した後に、上記培養培地を用いて軟骨細胞培養を行った。培養後に、軟骨細胞を回収し、遺伝子発現解析及びタンパク量の定量評価を行った。

(2)本実験1：炎症収束型好中球由来細胞外小胞の単離と、関節構成体へ及ぼす影響の調査

続いて、予備実験より同定した炎症収束型好中球を用いて、同細胞由来の細胞外小胞を単離し、関節構成体に及ぼす影響を調査した。予備実験と同様の方法で、好中球を刺激培養し、得られた培養培地より超遠心法を用いて細胞外小胞を単離した。単離した好中球由来細胞外小胞を用いて、IL-1 刺激軟骨細胞および軟骨組織に添加・培養した。培養後、得られた軟骨細胞および軟骨組織を回収し、各種評価を行った。

(3)本実験2：炎症収束型好中球由来細胞外小胞による関節炎収束機序解明

炎症収束型好中球由来の細胞外小胞の軟骨細胞に対する作用機序解明のため、網羅的解析を行った。実験1のIn vitroの手法を用いて、炎症収束型好中球由来細胞外小胞の軟骨細胞刺激を行い、培養後得られた軟骨細胞に対して網羅的遺伝子解析を行った。また、炎症収束型好中球由来細胞外小胞の内包因子を同定するために、同細胞外小胞内に含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 予備実験：炎症収束型貪食細胞が関節構成体に及ぼす影響の解明

はじめに、予備実験として各種刺激を加え形質変化させた好中球がIL-1 刺激軟骨細胞に及ぼす影響を調査した。その結果、TGF- 刺激好中球群は、非投与群と比較し、IL-1 刺激軟骨細胞で見られるMMP-13 および IL-6 などの異化因子発現を最も抑制した(図3)。この結果から、好中球の形質によって、軟骨細胞に及ぼす影響は異なり、TGF- 刺激による炎症収束型好中球が軟骨細胞異化因子放出を抑制する効果が大きい傾向があることが示された。

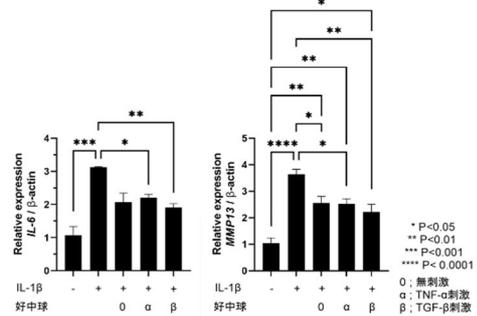


図3:TGF-β刺激好中球由来活性因子は、軟骨細胞異化因子発現を抑制した

(2) 本実験1：炎症収束型好中球由来細胞外小胞の単離と、関節構成体へ及ぼす影響の調査

続いて、炎症収束型好中球から単離した細胞外小胞を、IL-1 刺激軟骨細胞に添加・培養し、その影響をin vitroで調査した。予備実験の結果から、炎症収束刺激としてTGF- を使用した。また、TGF- に加え炎症収束誘導因子の一つであるPPAR gamma agonistを添加し、TGF- のみの刺激好中球と、TGF- +PPAR gamma agonist 刺激好中球それぞれから細胞外小胞を単離し軟骨細胞への影響を比較した。遺伝子発現解析の結果から、TGF- +PPAR gamma agonist 刺激好中球由来の細胞外小胞を投与群は、TGF- 刺激好中球由来の細胞外小胞群と比較し、IL-1 刺激軟骨細胞で見られるMMP-13 および IL-6 等の軟骨細胞異化因子の放出をより抑制する傾向にあった(図4)。

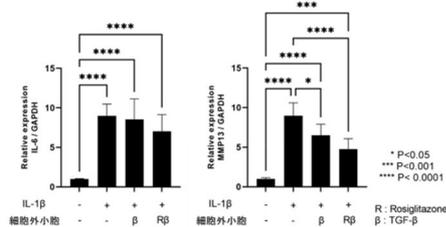


図4:細胞外小胞は、IL-1βによる刺激で見られる、軟骨細胞における異化因子の発現増加を抑制した

この結果より、以後の実験ではTGF- +PPAR gamma agonist 刺激を炎症収束型好中球への誘導刺激として採用した。

続いて、ex vivoで上記細胞外小胞を軟骨組織に添加・培養した。結果、細胞外小胞投与群において軟骨基質の基質分解が抑制される傾向にあった。(図5)

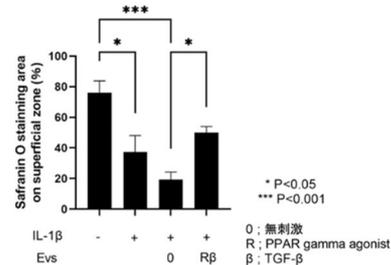
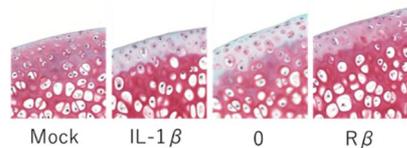


図5:炎症収束型好中球由来の細胞外小胞は、ex vivoの軟骨組織において、IL-1βによる刺激で見られる軟骨の変性を抑制した。

### (3) 本実験2：炎症収束型好中球由来細胞外小胞による関節炎収束機序解明

炎症収束型好中球由来細胞外小胞による軟骨保護作用および炎症収束機序を解明するために、各種網羅的解析を行った。

#### 炎症収束型好中球由来の細胞外小胞内包因子の同定

まず、炎症収束型好中球由来の細胞外小胞に内包されるタンパクを、網羅的に解析した。プロテオーム解析の結果、無刺激好中球由来の細胞外小胞には 530 種のタンパク質が含まれている一方、炎症収束型好中球由来の細胞外小胞においては 249 種類タンパク質が含まれており、炎症収束型好中球由来の細胞外小胞に内包される特異的タンパク質が 37 種同定された(図 6)。これら 37 種の特異的タンパクのエンリッチメント解析を行ったところ、細胞周期や細胞成長、恒常性維持に関連する因子が多く含まれていることを確認した。

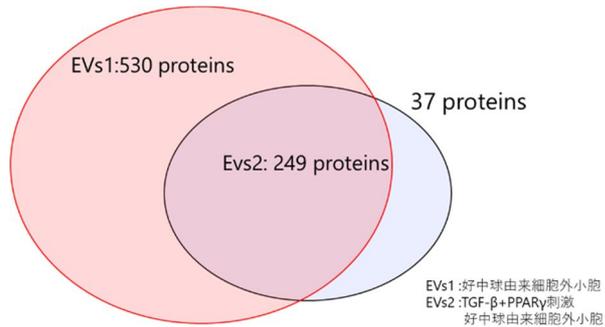


図6:無刺激の好中球由来の細胞外小胞と、炎症収束型好中球由来の細胞外小胞で内包されるタンパク質が異なっていた。

#### 炎症収束型好中球由来の細胞外小胞による軟骨保護機序解明

さらに、炎症収束型好中球由来細胞外小胞による軟骨保護作用の機序解明のため、実験1の *in vitro* で得られた軟骨細胞に対して、網羅的遺伝子解析を行った。

網羅的遺伝子解析から、IL-1 刺激軟骨細胞中の発現上昇遺伝子には、IL-17 signaling や NOD-like receptor signaling などの炎症シグナルに関連した遺伝子群が多く見られることがわかった。これらの炎症シグナルに関わる遺伝子を個別に調査したところ、炎症収束型好中球由来の細胞外小胞添加群では、IL-1 刺激軟骨細胞でみられた炎症シグナル関連遺伝子群の発現量減少がみられた。(図 7)

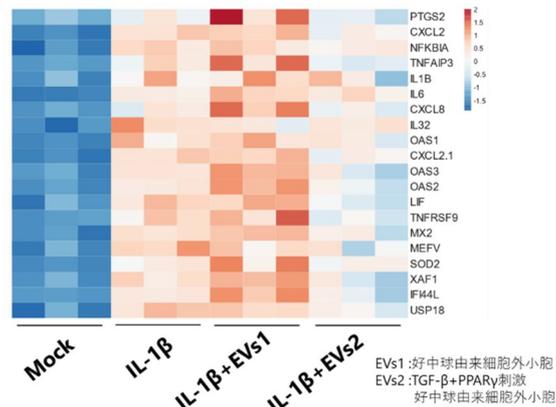


図7:IL-1β刺激軟骨細胞では、炎症シグナルに関連した遺伝子発現が増加していた。一方、炎症収束型好中球由来の細胞外小胞添加群では、炎症シグナル関連遺伝子群の発現量減少がみられた。

結果をまとめると、炎症収束型好中球は、炎症反応によって生じる軟骨細胞の異化因子放出を抑制しており、この反応に細胞外小胞が関与していることが示された。その分子機序として炎症収束型好中球由来の細胞外小胞が軟骨細胞中の炎症シグナルを制御することで、軟骨異化因子放出を減弱させ、軟骨基質の分解を抑制することで、軟骨変性を抑制する可能性を示した。今後、本実験2で得られた網羅的解析の結果を用いて、以下の検証実験を計画している。

- ・ 炎症収束型好中球由来細胞外小胞特異的に含まれる炎症収束因子の軟骨変性抑制効果を検証する。
- ・ 炎症収束型好中球由来細胞外小胞刺激によって生じた軟骨細胞の遺伝子変化より軟骨細胞保護因子を絞り込み、その効果を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北原 圭太, 江畑 拓, 照川 アラー, 清水 智弘, 遠藤 努, 浅野 毅, 高橋 大介, 角家 健, 岩崎 倫政
2. 発表標題 炎症収束型好中球由来細胞外小胞による軟骨細胞抗異化作用の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北原 圭太, 江畑 拓, 照川 アラー, 西田 善郎, ヘンド アルハサン, 横田 隼一, 塩田 惇喜, 徳廣 泰貴, 遠藤 努, 清水 智弘, 高橋 大介, 浅野 毅, 岩崎 倫政
2. 発表標題 Extracellular Vesicles Derived From Neutrophils Suppress Catabolic Process Induced By IL-1 Stimulation In Chondrocytes.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 ANNUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2023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	照川 アラー  (Terukawa Alaa)  (00723074)	北海道大学・医学研究院・助教    (10101)	
研究分担者	清水 智弘  (Shimizu Tomohiro)  (60784246)	北海道大学・大学病院・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
---------	---------