

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16673

研究課題名（和文）軟骨細胞と骨細胞の相互作用に着目した変形性関節症における軟骨下骨骨硬化の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation pathophysiology of osteoarthritis - interaction between chondrocytes and osteocytes in subchondral bone-.

研究代表者

濱崎 雅成（Hamasaki, Masanari）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：60880044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：変性軟骨細胞と骨細胞の共培養を行い、軟骨細胞を介して骨細胞の細胞死を引き起こすことを発見した。また、発現遺伝子解析を通じて、骨細胞で炎症性細胞死であるパイロトーシスが惹起されている事が確認された。In vitroにおいても、変形性関節症(OA)モデルマウスにおいて、コントロール群と比較し軟骨下骨内骨細胞の細胞数低下、パイロトーシス関連タンパクであるGSDMDおよびCaspase1陽性骨細胞数の増加がみられた。以上の結果よりOA軟骨下骨では、骨細胞のパイロトーシスシグナルが増強しており、その一因として過剰なストレスにさらされた関節軟骨中の軟骨細胞由来因子が上記シグナルを増強させる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は、関節内組織の変性、骨形態の変形、関節痛を主訴とする関節疾患である。関節の変形や運動痛、可動域制限等により、起立や歩行などの日常生活動作に大きな影響を与える。現在のところ根本的な治療法は存在せず、疾患の進行予防が喫緊の課題である。本研究による知見は、OA進行予防に対する治療薬開発のためのターゲット分子の同定に繋がり、今後の治療方法に変革をもたらす事が期待される。

研究成果の概要（英文）：I found that co-culture of degenerated chondrocytes and osteocytes induced cell death of osteocytes.

gene express analysis revealed that pyrolysis, an inflammatory cell death process, is induced in osteocytes. In vitro, in a mouse model of osteoarthritis (OA), the number of osteocytes decreased in subchondral bone and the number of GSDMD or Caspase1 positive osteocytes, which are proteins related to pyrolysis, compared to the control group. These results indicated that osteocyte pyroptosis signaling is enhanced in OA subchondral bone, and that chondrocyte-derived factors in articular cartilage exposed to excessive stress may contribute to the enhancement of these signals.

研究分野：変形性関節症

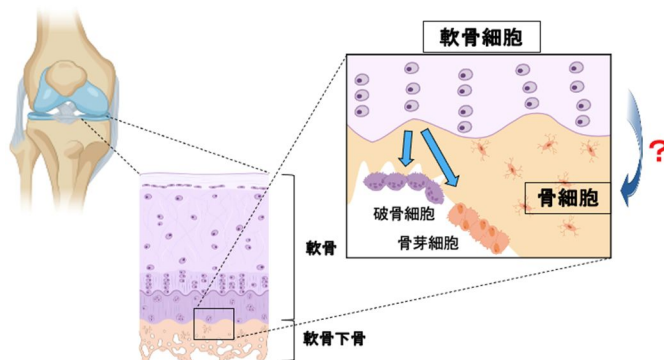
キーワード：骨細胞 軟骨下骨 軟骨細胞 変形性関節症 炎症性細胞死

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、関節内組織の変性、骨形態の変形、関節痛を主訴とする関節疾患である。関節の変形や運動痛、可動域制限等により、起立や歩行に大きな影響を与え、潜在的な患者数は約 **3000** 万人と推定されている。現在のところ根本的な治療法は存在せず、疾患の進行予防が喫緊の課題である。

近年の研究結果より、OA の進行には軟骨を下支えする「軟骨下骨」の状態が重要であることが明らかになりつつある。実際に、OA 患者の画像所見として、初期にはMRIで「軟骨下骨の骨髄浮腫像」がみられ、進行すると「軟骨下骨の骨硬化像」が確認される。このようなOAにおける軟骨下骨の変化は、OA 進行に関わる重要な一要素であると考えられるが、なぜOA患者の軟骨下骨にこのような変化が生じるのか、その分子学的機序は明らかにされていない。これまでの報告から、軟骨下骨とその表層に存在する関節軟骨は、様々な液性因子を介して相互作用を合い、その恒常性を維持する可能性が示唆されている。そのため、関節軟骨が過剰な機械的および生物学的刺激にさらされると、その深層にある軟骨下骨の組織環境にも悪影響を及ぼす可能性がある。骨の恒常性は、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞による協調作用でその機能が維持されている。特に骨細胞は骨構成の大部分を占め、細胞外マトリックスを透過する多細胞ネットワークの形成に関与する。骨細胞は、機械的、生物学的、化学的刺激に反応し、骨形成や骨吸収を制御する役割を担う。

本研究では、軟骨細胞と骨細胞による共培養、骨代謝に影響を与える骨細胞由来因子の網羅的遺伝子発現解析、モデル動物を用いた解析を行うことで、OA 進行予防に対する治療薬開発のためのターゲット分子の同定を目指す。本研究による知見は、今まで対症療法しか存在しなかった変形性関節症の治療に対して、一石を投じるものであり、今後の治療方法に変革をもたらす可能性がある。



2. 研究の目的

研究代表者は、OA における軟骨下骨の変化は、軟骨細胞により刺激を受けた骨細胞が関与していると仮説を立てた。特に、OA 進行における骨細胞由来因子が骨代謝に与える影響を検証することで、OA 進行予防達成のための、ターゲット因子を同定することが可能だと考えた。本研究の目的は、OA 進行に特有の骨細胞由来因子を同定し、骨代謝への機能解析を行うことで、OA 進行予防に対する治療薬開発のための分子生物学的基盤を作ることである。

3. 研究の方法

目的を達成するために、以下の実験を行った。

(1) IL-1 β 刺激軟骨細胞と骨細胞の共培養

OA において、関節軟骨へのストレスが骨細胞に与える影響を検討するために、マウス軟骨細胞と骨細胞の共培養を行った。まず、マウス関節軟骨から軟骨細胞を単離した。OA において滑膜細胞などから関節液内に放出されるサイトカインである IL-1 β を用いて、軟骨細胞を 6 時間刺激することでストレスを加えた。その後生理食塩水で IL-1 β を洗い流し、トランスウエルを用いて、マウス骨細胞のセルラインである MLO-Y4 と共培養を行った。共培養後の骨細胞を回収し、遺伝子発現解析及びタンパク量の定量評価を行った。また、クリスタルバイオレット染色を行い、骨細胞の形態的評価を行った。

(2) 軟骨細胞により活性化された骨細胞由来因子の網羅的遺伝子発現解析

上記の共培養を行った骨細胞から RNA を抽出し、Bulk RNA シークエンスを行った。遺伝子発現解析、Gene Ontology エンリッチメント解析などを行うことにより、軟骨細胞を介した骨細胞由来遺伝子の変化を解析した。この解析結果から、軟骨細胞を介し変化した骨細胞由来遺伝子について、上記の共培養モデルを用いて遺伝子発現解析及びタンパク量の定量評価を行うことで検証した。

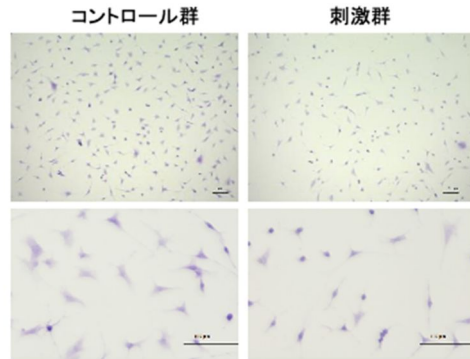
(3) OA モデル動物を用いた in vivo 解析

OA モデルマウスを用いた実験を行った。OA モデルマウスは、過去に報告されている関節不安定性モデルを作成し行った。膝関節不安定化術を行った 6 週間後に膝関節を回収し評価を行った。関節の評価では、HE 染色を用いて軟骨下骨の厚みおよび骨細胞数の計測を行い、組織染色(上記(2)で同定した骨由来遺伝子の評価)を施行した。

4. 研究成果

(1) IL-1 β 刺激軟骨細胞と骨細胞の共培養

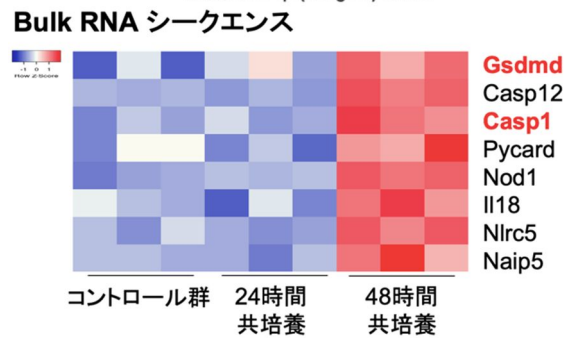
IL-1 β 刺激軟骨細胞と骨細胞を *in vitro* で共培養したところ、骨細胞数が経時的に減少しており、骨細胞マーカーである β -catenin、DMP1 の遺伝子発現およびタンパク量発現の低下もみられた。これらの結果より、IL-1 β 刺激軟骨細胞と共培養する事で「骨細胞の細胞死」が生じていることが示された。



コントロール群: 無刺激
刺激群: IL-1 β (10ng/ml) 6時間

(2) 軟骨細胞により活性化された骨細胞由来因子の網羅的遺伝子発現解析

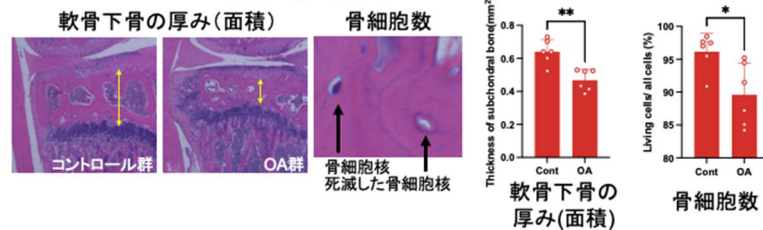
上記共培養モデルの骨細胞を回収し得られた RNA を用いた Bulk RNA-seq 解析では、炎症経路に関連した遺伝子群の発現上昇が多くみられ、KEGG pathway 解析において「NOD 様シグナル伝達経路」が最上位に同定された。これらの結果から、「変性軟骨細胞が、骨細胞の炎症性細胞死(パイロトーシス)を誘導した」と考え、結果を検証したところ、同骨細胞ではパイロトーシス関連遺伝子である GSDMD および Caspase1 が上昇していた。



(3) OA モデル動物を用いた *in vivo* 解析

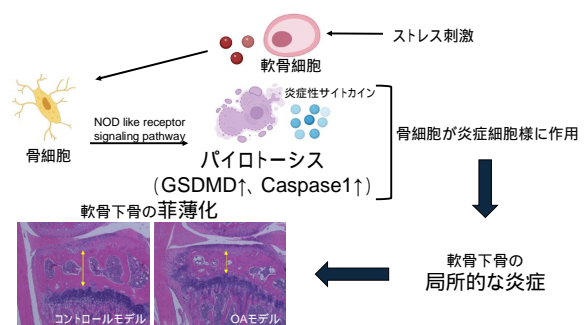
関節不安定性 OA モデルマウスおよびコラゲナーゼ注射モデルマウスではそれぞれにおいて、軟骨下骨の菲薄化しており、軟骨下骨内の骨細胞数の減少も確認され上記(1)(2)の *In vitro* 実験の結果と一致した。また、パイロトーシス関連タンパクである GSDMD の陽性骨細胞も増加していた。

【OAモデルマウスにおける軟骨下骨の評価】



以上の結果より、OA 軟骨下骨では、骨細胞のパイロトーシスシグナルが増強しており、その一因として、過剰なストレスにさらされた関節軟骨中の軟骨細胞由来因子が上記シグナルを増強させる可能性を示した。また、炎症性細胞死であるパイロトーシスにより軟骨下骨内の局所的な炎症が惹起された結果、軟骨下骨の変化を招いた可能性も示唆された。

今後は、骨細胞で GSDMD を特異的にノックアウトしたマウスを作成し、骨細胞中 GSDMD 抑制による OA 進行抑制効果を検証することを予定している。OA の治療標的として、「軟骨下骨の骨細胞パイロトーシス」に着目し、同シグナルの制御が有用なアプローチであると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 徳廣 泰貴、江畑 拓、濱崎 雅成、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
2. 発表標題 変性軟骨細胞が骨細胞機能に及ぼす影響 - 変形性関節症における軟骨 - 軟骨下骨連関機序の解明 -
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 Taiki Tokuhiko, Taku Ebata, Mohamad Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Yoshio Nishida, Junki Shiota, Keita Kitahara, Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Establishment of co-culture model of chondrocytes and osteocytes for exploration of interplay between cartilage and subchondral bone in osteoarthritis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 裕生、徳廣 泰貴、江畑 拓、濱崎 雅成、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
2. 発表標題 軟骨細胞の異化が軟骨下骨の骨細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 裕生、徳廣 泰貴、江畑 拓、濱崎 雅成、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
2. 発表標題 炎症性軟骨細胞は骨細胞のバイロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第142回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Ogawa, Taiki Tokuhira, Taku Ebata, Mohamad Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Yoshio Nishida, Junki Shiota, Keita Kitahara, Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Inflammatory chondrocytes induce cell death signaling in osteocytes: a study highlighting mechanism of bone remodeling activation in OA
3. 学会等名 17th World Congress ICRS 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 裕生、徳廣 泰貴、江畑 拓、濱崎 雅成、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
2. 発表標題 炎症性軟骨細胞は骨細胞のパイロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Ogawa, Taiki Tokuhira, Taku Ebata, Mohamad Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Yoshio Nishida, Junki Shiota, Keita Kitahara, Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Inflammatory chondrocytes induce cell death signaling pathway in osteocytes leading to progression of osteoarthritis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society ORS 2024 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小川 裕生、徳廣 泰貴、江畑 拓、濱崎 雅成、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
2. 発表標題 炎症性軟骨細胞は骨細胞のパイロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024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
--	---------------------------	-----------------------	----

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