

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20965

研究課題名（和文）肥満変形性関節症患者で増加する肥満細胞サブセットの同定とその機能解析

研究課題名（英文）Identification and Functional Analysis of Mast Cell Subsets Increased in Obese Osteoarthritis Patients

研究代表者

高田 研（Takata, Ken）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：20963698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肥満は変形性膝関節症（KOA）のリスク因子であるが、そのメカニズムは明らかになっていない。肥満患者の滑膜組織では肥満細胞（MC）が増加することを報告してきた。しかし、肥満患者の滑膜組織に存在する肥満細胞の特性は明らかになっていない。正常体重、過体重、および肥満に分類されたKOA患者の滑膜組織、肥満細胞におけるNMU、NMUR1、NMUR2および肥満細胞マーカーCPA3の発現を比較した。その結果、NMUR1の発現は肥満 KOA患者のSMで増加しており、その発現はMCに見られた。MCにおけるNMU/NMUR1経路を分析するさらなる研究が、肥満とKOAの病理との関連を明らかにするかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、変形性膝関節症（OA）における肥満細胞（MC）サブセットの役割を明らかにすることで、肥満とOAの病態における免疫細胞の関与を解明した点で学術的意義がある。特に、MCサブセットの中でCD88陽性MCの役割を示したことで、新たな標的細胞を明らかにした。また、NMU/NMUR経路の発現を明らかにしたことで、これを標的とした新しい治療法の開発が期待される。社会的意義としては、OAの主要なリスク因子である肥満の影響を理解し、予防や治療に役立つ知見を提供した点が挙げられる。肥満関連OA患者の治療法が進展すれば、健康寿命の延伸が期待される。

研究成果の概要（英文）：Obesity is a risk factor for knee osteoarthritis (KOA), yet its mechanism remains unclear. Increased mast cells (MCs) have been reported in the synovial tissue of obese patients, but the characteristics of these synovial MCs remain unknown. We compared the expression of NMU, NMUR1, NMUR2, and the MC marker CPA3 in synovial tissue and MCs from KOA patients classified as normal weight, overweight, and obese. The results revealed elevated NMUR1 expression in the synovial membrane (SM) of obese KOA patients, with expression detected in MCs. Further research analyzing the NMU/NMUR1 pathway in MCs may elucidate the association between obesity and KOA pathology.

研究分野：整形外科

キーワード：肥満細胞 滑膜組織 ニューロメジン 変形性関節症

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

高齢化にともない変形性膝関節症(OA)患者は年々増加しており、近年の大規模な疫学調査から、我が国にはOA患者が2400万人存在することが明らかになった。OAは患者の生活の質、日常生活動作を著しく障害するため、健康寿命延伸には病態解明、治療法の確立が極めて重要である。これまでの疫学研究から肥満は荷重関節である膝ばかりでなく、手などの非荷重関節のOAにおいても発症、進行のリスク因子であることが報告されている。申請者は肥満により滑膜組織中の免疫担当細胞に変化をもたらされるとの仮説の元、研究を展開してきた。

MCには種々のサブセットが存在することが報告されている。申請者は肥満OA患者の滑膜組織で増加する肥満細胞サブセットを同定すべく、検討を行った。種々の表面マーカー指標を用いてMCサブセットを検討した結果、CD88陰性MCと陽性MCが存在した。しかし、どちらのMCサブセットが肥満OA患者で増加しているかは不明であった。

### 2. 研究の目的

肥満で増加する肥満細胞(MC)サブセットの同定とその表現型を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

すべての参加者は当院で人工膝関節全置換術(TKA)を受け、その際に滑膜(SM)サンプルを採取した。合計で、206個の放射線学的変形性膝関節症(KOA)患者からSMサンプルを抽出した。各サンプルの一部を液体窒素で迅速に凍結し、RNA抽出の準備のために $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。5人の肥満KOA患者から採取したサンプルを用いて、マスト細胞(MC)におけるNMU/NMUR発現を調査した。患者を世界保健機関(WHO)のボディマス指数(BMI)の定義に従って以下のように分類した：正常体重(BMI  $<25\text{ kg/m}^2$ ,  $n=79$ )、過体重(BMI  $\geq 25$  および  $<30\text{ kg/m}^2$ ,  $n=87$ )、および肥満(BMI  $\geq 30\text{ kg/m}^2$ ,  $n=40$ )。リアルタイムPCRを用いて測定されたSMにおけるNMU/NMURおよびMCマーカーCPA3の発現レベルを、BMIグループ間で比較した。すべての遺伝子の発現レベルはGAPDHに正規化し、デルタデルタCT法を使用して解析した。相対発現(RE)は、NWグループの平均値に基づいて決定した。NMU/NMURの発現を評価するために、肥満KOA患者5名から抽出したSMサンプルから磁気分離法を用いてMCリッチ分画(MC-RF)とMCプアー分画(MC-PF)を抽出した。先行研究では、OAおよびRA患者のSMサンプルにおいてCD88(+)およびCD88(-)の異なるMCサブセットが同定されている。そのため、MC-RFをさらにCD88(+)とCD88(-)のMC-RFにb分離した。これらのMC-RFを得るために、新鮮なSMサンプルをコラゲナーゼ溶液にてオーバーナイトした。先行研究に基づき、THY-1(滑膜線維芽細胞マーカー)、CD3(Tリンパ球マーカー)、CD14(単球/マクロファージマーカー)、CD19(Bリンパ球マーカー)およびCD235a(赤血球マーカー)抗体と $4^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させた。PBSで2回洗浄後、細胞をストレプトアビジン結合磁気粒子に反応させ、磁気分離システムにかけて、陰性分画(MC-RF; THY-1-, CD3-, CD14-, CD19-, CD235-)と陽性分画(MC-PF; THY-1+, CD3+, CD14+, CD19+, CD235+)に分離した。その後、MC-RFをPE標識抗CD88抗体と $4^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させた。PBSで2回洗浄後、細胞を抗PE磁気粒子と反応させ、CD88陰性分画(CD88(-)MC-RF)と陽性分画(CD88(+)MC-RF)に分離した。MC-RFおよびCD88(-)MC-RFの細胞は、qPCRによりNMU/NMURの発現を調査した。REはMC-PFの平均値に基づいて決定した。

統計解析はSPSS 25.0を使用して実施した。すべてのデータはShapiro-Wilk検定を使用して正規性を検定した。3つのBMIグループ間で遺伝子発現を比較するために、クラスカル-ウォリス検定を使用した。NWおよびOB OA患者の一致コホートを作成するために、各個人の年齢およびケルグレン・ローレンス(KL)グレード2-4の割合などの基礎臨床変数に基づいて傾向スコアを計算した。カテゴリ変数の解析にはフィッシャー検定を使用し、NMU/NMURとCPA3の関係はスピアマンの相関係数を使用して決定した。また、MC-RFとMC-PF間の遺伝子発現の比較にはマン-ホイットニー-U検定を使用した。P $<0.05$ を統計的有意差とした。

### 4. 研究成果

#### 4.1 肥満OA患者の特徴

患者の臨床的特徴は表1に示した。過体重(OB)および肥満(OB)に分類された患者は、正常体重(NW)群の患者よりも有意に若かった(それぞれP=0.023およびP=0.010)。対照的に、KLグレード2、3、4(P=0.675)の変形性膝関節症(KOA)の患者の割合は、BMIグループ間で差は見られなかった。

表1 患者情報

Normal	Overweight	Obese	P
--------	------------	-------	---

	(n=79)	(n=87)	(n=40)	
Age (years)	76.4 ± 6.5	72.8 ± 7.2 <sup>a</sup>	72.1 ± 7.1 <sup>a</sup>	0.004
KL (2/3/4), n	3/14/62	5/21/61	1/7/32	0.675
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.3 ± 1.8	27.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	33.2 ± 2.6 <sup>a,b</sup>	<0.001

#### 4.2 BMI 別の滑膜における NMU/NMUR および CPA3 の発現レベル

NW、OW、および OB グループにおける NMU/NMUR および CPA3 mRNA の発現は qPCR を用いて検討した (図 1A-D)。BMI グループ間で NMU (P=0.948、図 1A) の発現に有意差は観察されなかった。一方、NMUR1 レベルは OW および OB で NW 個体よりも有意に高かった (OW、P=0.023; OB、P=0.010、図 1B)。しかし、NMUR2 は BMI グループ間で同等であった (P=0.327、図 1C)。CPA3 発現は OB 患者で NW 患者と比較して有意に高かった (P=0.020; 図 1D) が、NW と OW 患者の間では差は認められなかった (P=0.872、図 1D)。

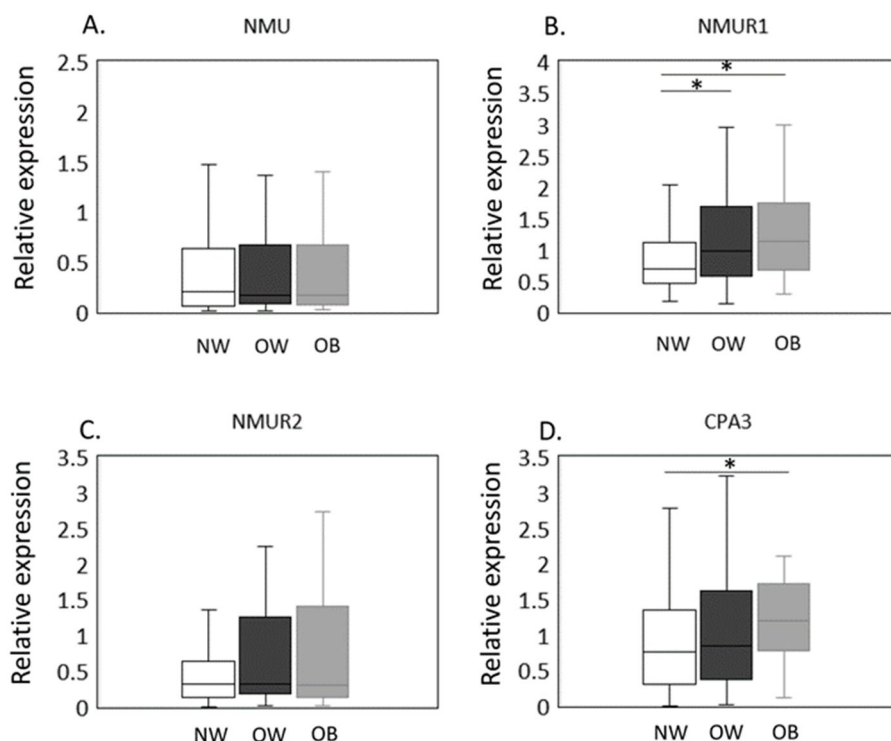


図 1. 正常、過体重、肥満患者の滑膜組織における NMU/NMURs、CPA3 の発現

#### 4.3 傾向スコアマッチコホートにおける NW および OB グループ間の NMU/NMUR および CPA3 発現の比較

傾向スコアマッチコホートにおける NW および OB グループの NMU/NMUR および CPA3 mRNA 発現は qPCR を用いて検討した (図 2A-D)。これまでの結果は、OB 患者が NMUR1 および CPA3 の発現が高く、NW 患者よりも有意に若いことを示した。遺伝子発現に対する年齢の影響を排除するために、傾向スコア分析を行い、一致コホートを作成しました。傾向スコア分析後の患者の臨床特性は表 2 に示した。NW および OB 患者間で年齢および KL グレード 2-4 の患者の割合は類似していた (年齢、P=0.429; KL グレード 2-4 の割合、P=0.432)。同様に、NMU レベルに有意差は認められなかった (P=0.448、図 2A)。対照的に、NMUR1 の発現は OB 患者で NW 患者よりも有意に高かった (P=0.012、図 2B)。NMUR2 発現は BMI グループ間で差がなく (P=0.905、図 2C)、CPA3 レベルは OB グループで NW グループよりも有意に高かった (P=0.023、図 2D)。

表 2 傾向スコアマッチング後の患者情報

	Normal (n=38)	Obese (n=38)	P
Age (years)	74.4 ± 7.2	72.9 ± 6.2	0.429
KL (2/3/4), n	2/11/25	1/7/30	0.432
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.9 ± 2.4	22.2 ± 2.1	<0.001

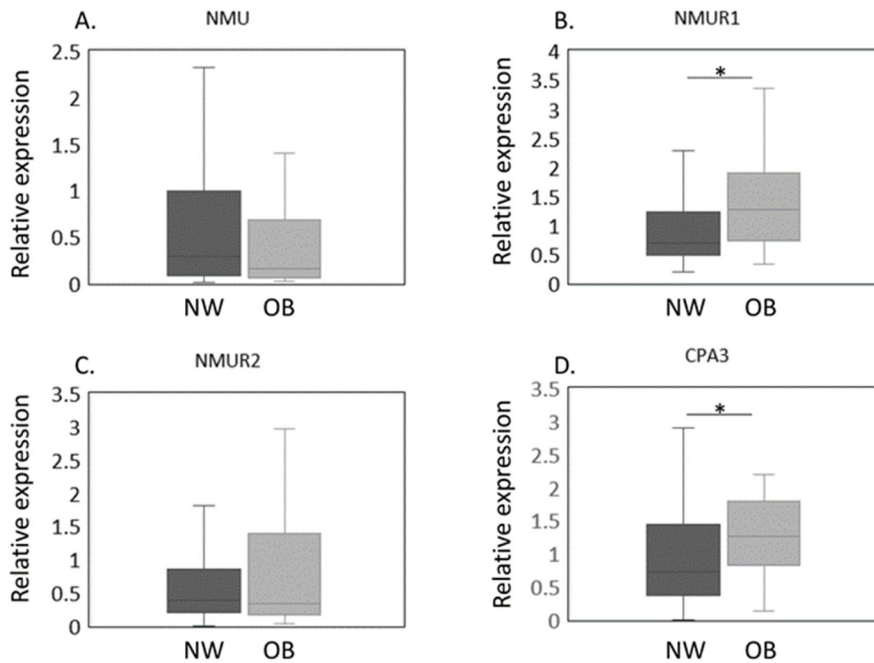


図2. 傾向スコアマッチング後の正常体重および肥満群の滑膜組織における NMU/NMURs、CPA3 の発現

#### 4.4 非 MC および MC 分画における滑膜の NMU/NMUR および CPA3 発現

非 MC および CD88(-) および CD88(+) MC 分画における NMU/NMUR および CPA3 mRNA 発現は qPCR により推定されました(図 3A-F)。OB 患者の滑膜において NMUR1 および CPA3 が上昇していたため、次に MC における NMU/NMUR 発現を、肥満 KOA 患者から分離した CD88(-) MC リッチ分画 (MC-RF) (図 3A) および CD88(+) MC-RF と MC プアー分画 (MC-PF) を比較することで検討した(図 3B-F)。CD88(+) MC-RF が CD88(-) MC-RF よりも有意に高い CD88 発現を示すことを確認しました (P=0.011、図 3B)。分画間で NMU 発現に差は認められなかった (P=0.247、図 3C)。CD88(-) MC-RF および CD88(+) MC-RF の両方が MC-PF よりも有意に高いレベルの NMUR1 を発現した (それぞれ P=0.011 および P=0.027、図 3D)。さらに、NMUR2 レベルは CD88(-) MC-RF が MC-PF よりも有意に高かった (P=0.004、図 3E)。CD88(-) および CD88(+) MC-RF の両方が MC-PF よりも有意に高いレベルの CPA3 を発現していた (それぞれ P=0.011 および P=0.027、図 3F)。

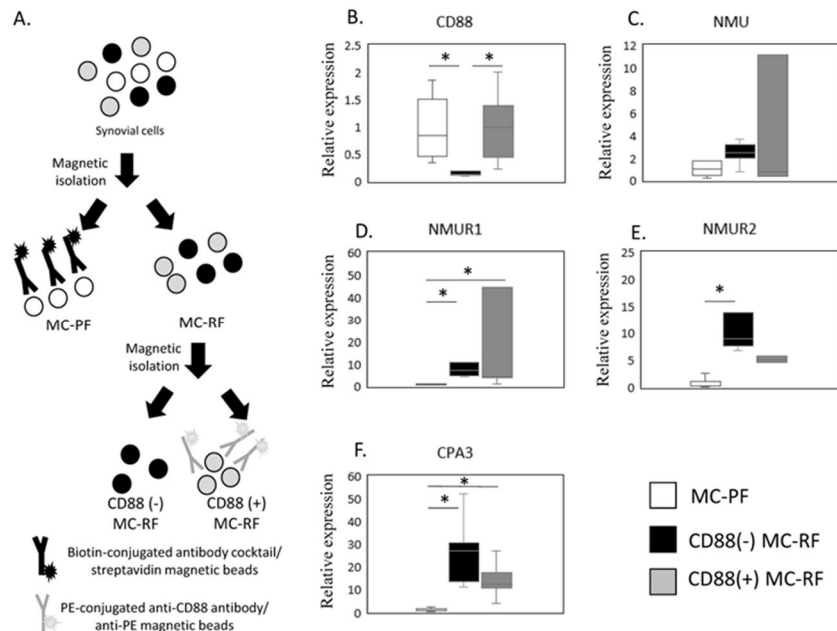


図3. 肥満細胞サブセットにおける NMU/NMURs の発現

本研究では、肥満 (OB) 患者の滑膜において NMUR1 の発現が正常体重 (NW) の患者に比べて上昇していることが明らかになった。さらに、NMUR1 の発現が肥満患者の滑膜で検出され、これは

滑膜肥満患者における NMU/NMUR システムへの関与を示唆している。最近の報告によれば、低度の炎症（メタインフラメーション）が肥満や肥満関連疾患の病態に関与しているとされている。肥満および過体重（OW）の KOA 患者は、NW 患者に比べて滑膜の炎症が強いことが示されている。NMU が炎症状態に役割を果たすことが示唆されており、例えば、NMU 欠損マウスではマクロファージからのインターロイキン（IL）-6 分泌が低下することが報告されている。また、NMU と NMUR1 の相互作用がマウスのヘルパー T 細胞株において IL-4、-5、-6、-10、-13 の放出を誘導することが示されています。OW および OB 患者の滑膜で NUMR1 の mRNA レベルが上昇していることが発見され、滑膜の NUMR1 発現の増加が肥満関連の滑膜病理に寄与する可能性が示唆されている。一方で、NMU はマウスのコラーゲン誘発性関節炎モデルにおいて自己抗体媒介性関節炎を抑制することが示されている。NMU の投与は、自然リンパ球の増殖を引き起こし、関節内での好酸球、IL-4、IL-5、IL-13 の発現を上昇させることが知られている。MC はサイトカイン分泌により関節炎に寄与するため、NMU 刺激による MC から分泌されるタンパク質のさらなる調査が、肥満と KOA の病理との関連を明らかにする可能性がある。

先行研究では、NW 個体と比較して、OW および OB 患者はより若い年齢で TKA を受けることが報告されている。これと一致して、OB グループの患者は NW グループよりも有意に若いことが確認された。さらに、ほぼすべての滑膜サンプルは TKA を受ける末期 OA 患者から採取された。個人の遺伝子発現プロファイルは年齢とともに変化する可能性があるため、年齢の影響を排除するために傾向スコア分析を実施し、傾向スコアマッチング前と同様に、OB 患者で NUMR1 および CPA3 の発現が有意に高いことを確認した。したがって、我々の結果は、NMUR1 および CPA3 の発現増加が肥満に関連しており、年齢には関連していないことを示唆している。

肥満 OA 病理に関与する多くの免疫細胞タイプが滑膜に存在する。NMU および NMUR1 の発現は、単球や樹状細胞などの抗原提示細胞、T 細胞、ナチュラルキラー細胞、好酸球、MC を含むいくつかの免疫細胞タイプで観察されている。肥満 KOA 患者の滑膜で MC マーカー CPA3 のレベルが上昇しているため、MC における NMU/NMUR の発現を調査した。我々の結果は、NMUR1 が滑膜 MC で発現しており、NMUR1 の上昇が滑膜の MC 増加を反映している可能性を示唆している。さらに、先行研究で滑膜、皮膚および肺において CD88(+) および CD88(-) MC サブセットが特定され、RA 患者の滑膜で CD88(+) MC のレベルが OA 患者よりも高いことが示されている。KOA 患者の滑膜から分離した CD88(+) および CD88(-) MC-RF の NMU/NMUR 発現を比較した。CD88(+) および CD88(-) MC-RF の両方が高い CPA3 および NMUR1 発現を示しました。マウスの研究では、MC における NMU/NMUR1 経路の活性化が脱顆粒および好中球浸潤を引き起こすことが示されている。また、MC とその脱顆粒産物は KOA 患者の滑膜および滑液で観察されている。さらに、滑膜 MC の数は KOA 患者の滑膜炎スコアと相関する。MC における CD88 の発現は脱顆粒に寄与するため、この証拠は、特に CD88(+) MC サブセットの NMU/NMUR1 媒介による MC の活性化が、肥満 KOA 患者の滑膜病理に寄与する可能性を示唆している。

NMUR1 の発現は主に末梢組織で報告されているが、NMUR2 は主に中枢神経系で観察されている。特に、視床下部、海馬および脊髄で高濃度で存在する。マウス海馬の星状細胞およびミクログリアにおける NMUR2 発現を報告した先行研究では、NMU が CNS の炎症を調節できることを示唆している。しかし、NMUR2 は消化管および泌尿生殖器系を含む末梢組織でも報告されており、精巣で高濃度に観察されている。本研究では、滑膜で NMUR2 mRNA が確認され、特に CD88(-) MC で高いレベルが認められた。しかし、BMI グループ間で NMUR2 の違いは観察されなかったため、NMUR2 は肥満関連の滑膜病理に限定的な役割を果たしていると考えられる。

結論として、肥満の OA 患者の滑膜において NMUR1 の発現が増加しており、NMUR1 の発現が肥満患者の滑膜肥満患者の滑膜 MC に認められた。MC における NMU/NMUR1 経路のさらなる調査は、肥満と変形性膝関節症の病理との関連を明らかにする可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsukada A, Takata K, Takano S, Ohashi Y, Mukai M, Aikawa J, Iwase D, Inoue G, Takaso M, Uchida K	4. 巻 23
2. 論文標題 Increased NMUR1 Expression in Mast Cells in the Synovial Membrane of Obese Osteoarthritis Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 11237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231911237	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 Tsuchiya M, Fukushima K, Takata K, Ohashi Y, Uchiyama K, Takahira N, Saito H, Tsukada A, Inoue G, Takaso M, Uchida K	4. 巻 24
2. 論文標題 Increase in TPSB2 and TPSD1 Expression in Synovium of Hip Osteoarthritis Patients Who Are Overweight	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 11532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241411532	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田 研、内田健太郎、迎 学、高野昇太郎、相川 淳、岩瀬 大、塚田亜裕美、大貫裕子、井上 玄、高相晶士
2. 発表標題 変形性関節症患者の滑膜組織に存在する肥満細胞サブセットの表現型の検討
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 土屋 真穂、内田 健太郎、大橋 慶久、高田 研、福島 健介、内山 勝文、高平 尚伸、塚田 亜裕美、大貫 裕子、井上 玄、高相 晶士
2. 発表標題 過体重の変形性股関節症患者の滑膜組織では肥満細胞が増加している
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

〔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
---------	---------