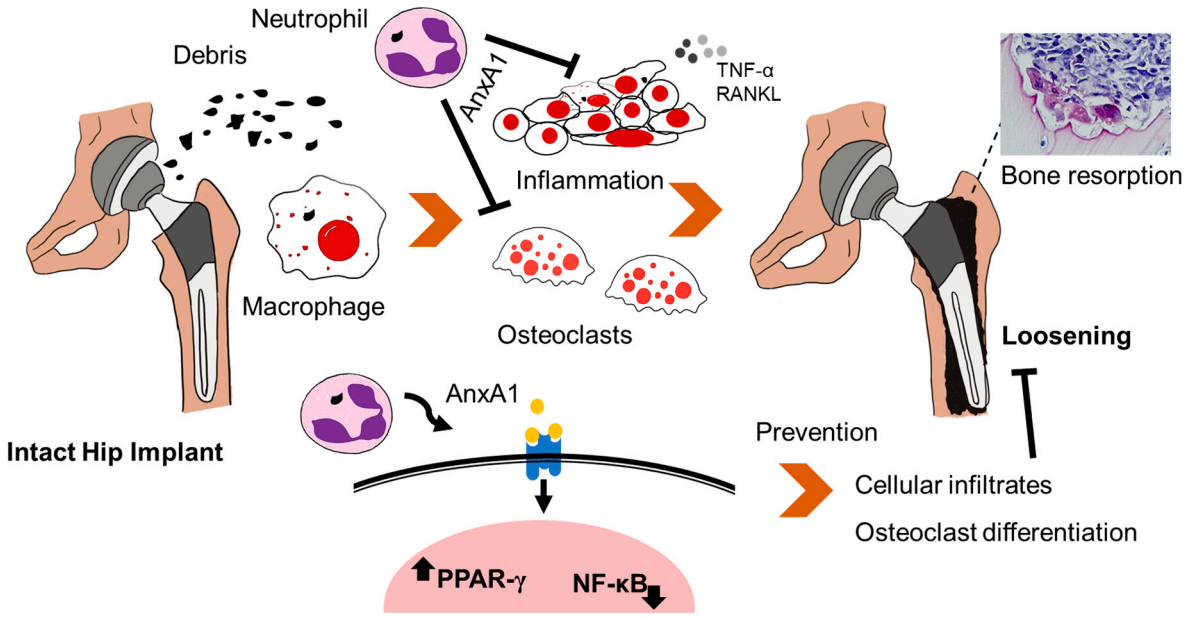
180　骨破壊疾患における好中球の機能解析と新規治療開発	清水　智弘

【目的】好中球は過剰な炎症反応に寄与する貪食細胞として機能しているものの、骨軟骨疾患における病的骨吸収においては単球／マクロファージ系細胞における機能解析・治療開発が進められているのが現状であり、病的骨吸収における好中球の機能については依然として不明な点が多く存在する。そこで本研究では、病的骨吸収（炎症性骨吸収、骨溶解）における好中球の機能解析と治療実験を行い新規治療開発することを目的とした。

【方法】人工関節術後弛みの症例の滑膜及び関節液を採取し、好中球抗体の発現を調査した。マウス頭頂骨溶解モデルを作製し、好中球抗体を投与し、骨破壊の程度を Micro-CT・組織学的検討を行い、RNA シークエンスによる関連分子の同定を行った。人工関節術後弛みの症例の滑膜において、同定した分子の発現を調査した。同定した分子を同様の頭頂骨溶解モデルを用いて外的に投与し、骨破壊の程度を検証した。同定した分子の遺伝子欠損マウスを用いて、頭頂骨溶解モデルを作製し骨破壊の程度を検証した。同定した分子を *in vitro* で破骨細胞分化の際に投与し、破骨細胞分化への影響と遺伝子発現の差異を網羅的に解析し、関連するシグナルを同定し、ウェスタンブロッティングで発現を確認した。

【結果】好中球抗体を投与すると骨溶解が促進し、好中球を外的に投与すると骨溶解が抑制された。このことから好中球が骨溶解に対して抑制的に作用することが明らかとなった。さらに、RNA シークエンスを行い網羅的な解析を行ったところ、好中球由来骨吸収抑制因子として、Annexin A1（AnxA1）を同定した。AnxA1 抗体投与を行うと、骨溶解が亢進しており、定量的評価においても、骨溶解領域の有意な上昇があった。*AnxA1* 遺伝子欠損マウスにおいても、AnxA1 抗体投与時と同様に、骨溶解が亢進しており、定量的評価においても、骨溶解領域の有意な上昇があった。AmxA1 を投与することにより、破骨細胞分化は抑制された。また、網羅的遺伝子解析の結果、NF κ B 経路を抑制し PPAR γ 経路を亢進させることが明らかとなった。ヒトマクロファージの細胞株に AnxA1 の刺激を加えて、PPAR γ 経路の蛋白発現をウェスタンブロッティングにより検証したところ。AnxA1 刺激により、PPAR γ、β-actin の発現の上昇が確認された。

AnxA1 は人工関節弛みに代表される骨溶解疾患の新規治療候補因子である



180. 骨破壊疾患における好中球の機能解析と新規治療開発

清水　智弘

北海道大学病院 整形外科

Key words：好中球，人工関節術後弛み，骨溶解，Annexin A1

緒　言

我々は、平成 30 年度上原記念生命科学財団研究奨励金「骨、関節破壊を引き起こす炎症の慢性化機構の解明」を拝受し、主に急速破壊型股関節症（RDC）および特発性大腿骨頭壊死症（ONFH）の病態メカニズムの解明に関する研究を行ってきた。RDC は、NF-κB 及び STAT-3 の発現が亢進する「炎症回路の亢進」が起こりサイトカインの発現が上昇することが明らかとなり、炎症回路の亢進を引き起こすメカニズムとしてインフラマソーム依存的に好中球遊走能に異常をきたす事を見出した［1］。また ONFH が血栓の形成と自己免疫疾患が関連することに着目し、好中球のクロマチン網（NETs）の形成が病態に関わる事を見出した［2］。以上のことから運動器疾患において好中球の機能異常が重要な役割を果たすことが示唆された。

好中球は過剰な炎症反応に寄与する貪食細胞として機能しているものの、骨軟骨疾患における病的骨吸収においては単球／マクロファージ系細胞における機能解析・治療開発が進められているのが現状であり、病的骨吸収における好中球の機能については依然として不明な点が多く存在する。そこで本研究では、病的骨吸収（炎症性骨吸収、骨溶解）における好中球の機能解析と治療実験を行い新規治療開発することを目的とした。

方法および結果

1. 骨溶解における好中球の役割と Annexin A1（AnxA1）の同定

骨溶解により弛みを来した人工関節置換術後の症例の骨溶解周囲組織の滑膜と関節液の免疫染色を行ったところ、好中球（Ly6G）の発現を確認した（図 1）。マウス頭頂骨溶解モデルを作製し、Ly6G 抗体および好中球の外的投与を行い、マイクロ CT による画像評価と組織学的検討を行った。好中球抗体を投与すると骨溶解が促進し（図 2）、好中球を外的に投与すると骨溶解が抑制された（図 3）。このことから好中球が骨溶解に対して抑制的に作用することが明らかとなった。さらに、RNA シークエンスを行い網羅的な解析を行ったところ、好中球由来骨吸収抑制因子として、AnxA1 を同定した。

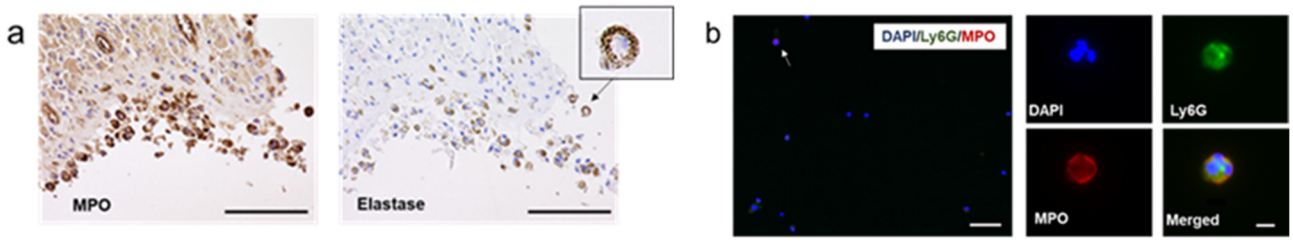


図 1. 弛みを来した滑膜組織、関節液の免疫組織学的検討

a) 滑膜組織には MPO 抗体と Elastase 抗体陽性細胞が存在。スケールバー：100μm。

b) 関節液中の MPO 抗体および好中球抗体 Ly6G 抗体陽性細胞が存在。スケールバー：左パネル 200μm、右パネル 10μm。

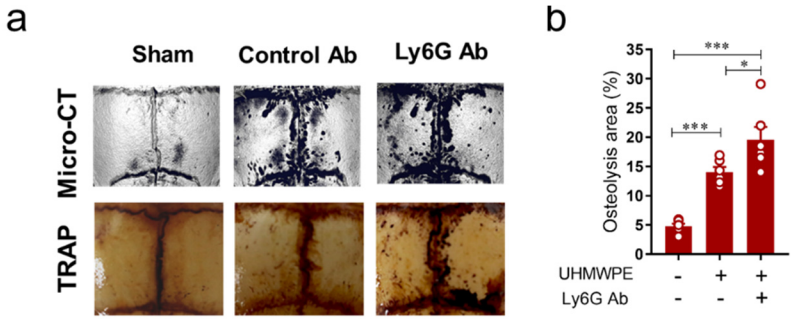


図 2. マウス頭頂骨溶解モデルに対して好中球抗体（Ly6G Ab）を投与

a) 上パネル マイクロ CT 像、下パネル TRAP 染色。

b) 骨溶解エリアの占有率の定量比較。* P＜0.05、*** P＜0.001、One-away ANOVA、Post hoc Turkey test による検定。

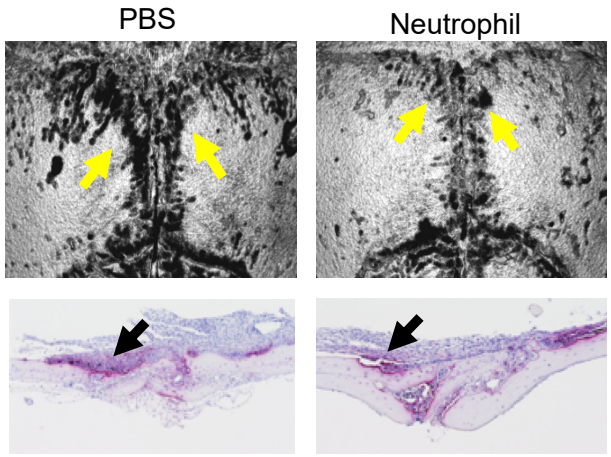


図 3. マウス頭頂骨溶解モデルに対して好中球を外的に投与

上パネル：マイクロ CT 像、下パネル：TRAP 染色。矢印は骨溶解領域。

2. 人工関節の弛みを来した症例における AnxA1 の発現

骨溶解により弛みを来した人工関節置換術後の症例の骨溶解周囲組織の滑膜の AnxA1 の免疫染色を行った。マクロファージのマーカーである CD68 と好中球のマーカーである Elastase に一致して AnxA1 の発現が確認された。加えて、関節液をウェスタンブロッティングで AnxA1 の発現していることを確認した（図 4）。

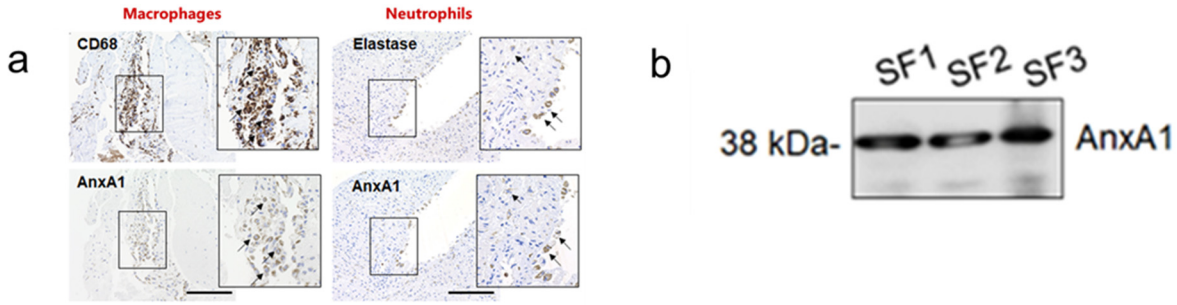


図 4. 人工関節緩み症例の AnxA1 の発現

a）滑膜組織に存在するマクロファージ、好中球に一致して AnxA1 が発現していることを確認（矢印）。スケールバー：100 μm。

b）関節液中の AnxA1 の発現を確認。

3. AnxA1 抑制による骨溶解の評価

野生型マウスに対してマウス頭頂骨溶解モデルを作製し、AnxA1 抗体の投与を行った。加えて、*AnxA1* 遺伝子欠損マウスに対して同様にマウス頭頂骨溶解モデルを作製し、マイクロ CT による画像評価と組織学的検討を行った。好中球抗体投与と同様に、AnxA1 抗体投与を行うと、骨溶解が亢進しており、定量的評価においても、骨溶解領域の有意な上昇があった（図 5）。*AnxA1* 遺伝子欠損マウスにおいても、AnxA1 抗体投与時と同様に、骨溶解が亢進しており、定量的評価においても、骨溶解領域の有意な上昇があった（図 6）。

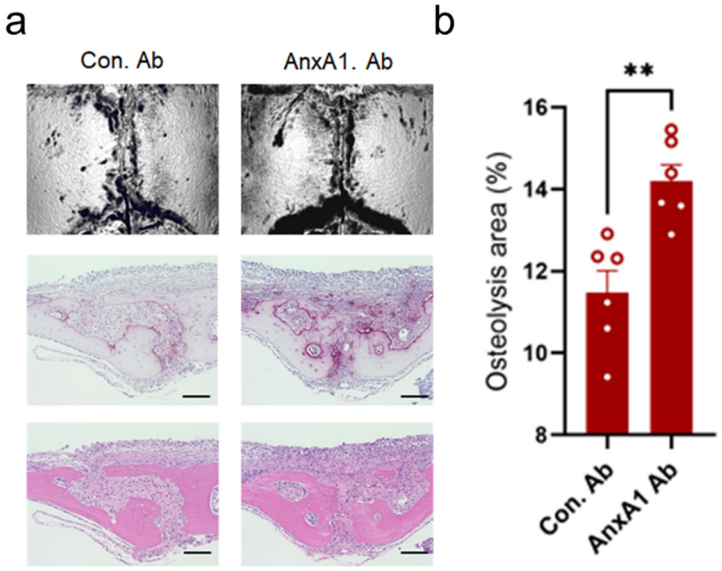


図 5. マウス頭頂骨溶解モデルに対して AnxA1 抗体を外的に投与（野生型マウス）

a）上パネル マイクロ CT 像、中パネル TRAP 染色、下パネル HE 染色。

b）骨溶解エリアの占有率の定量比較。**P＜0.001、One-away ANOVA、Post hoc Turkey test による検定。

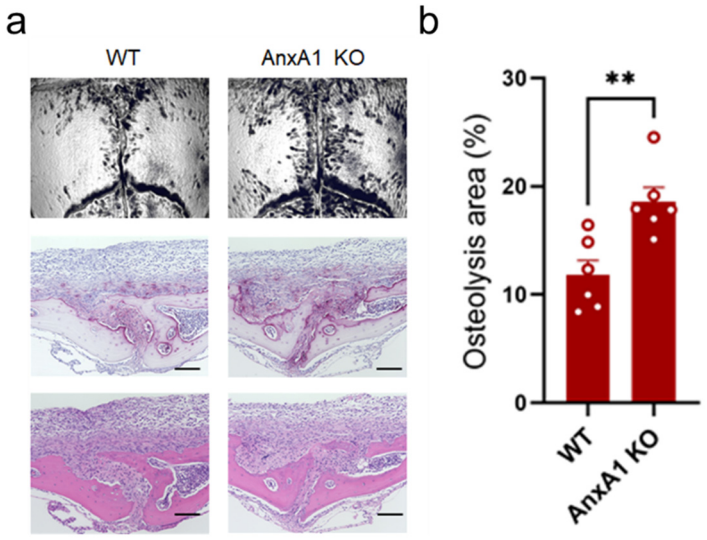


図 6. マウス頭頂骨溶解モデルに対して AnxA1 抗体を外的に投与（*AnxA1* 遺伝子欠損マウス）

a）上パネル マイクロ CT 像、中パネル TRAP 染色、下パネル HE 染色。

b）骨溶解エリアの占有率の定量比較。**P＜0.001、One-away ANOVA、Post hoc Turkey test による検定。

4. AnxA1 と破骨細胞分化の関連

骨溶解を担う破骨細胞は、マクロファージが分化し融合することで形成される。このことから、AnxA1 とヒトマクロファージを共培養したものから RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行うことで、AnxA1 から誘導される破骨細胞分化関連因子を抽出した。解析は、遺伝子発現解析と、Gene Ontology エンリッチメント解析を組み合わせて行った。AmxA1 を投与することにより、破骨細胞分化は抑制された（図 7a）。また、網羅的遺伝子解析の結果、NF κ B 経路を抑制し PPAR γ 経路を亢進させることが明らかとなった（図 7b）。ヒトマクロファージの細胞株に AnxA1 の刺激を加えて、PPAR γ 経路の蛋白発現をウェスタンブロッティングにより検証したところ。AnxA1 刺激により、PPAR γ 、β-actin の発現の上昇を確認した（図 7c）。

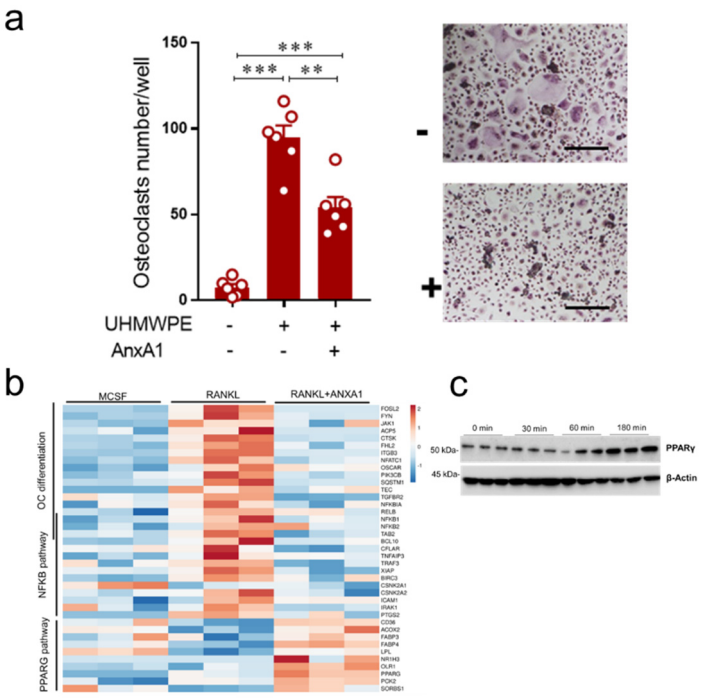


図 7. AnxA1 と破骨細胞分化の関連

a) 左パネル、破骨細胞数の定量評価。** P＜0.01、*** P＜0.001（One-away ANOVA、Post hoc Turkey test による検定）。右パネル、TRAP 染色。＋は AnxA1 投与群。

b) RNA シークエンスによる遺伝子発現のヒートマップ。

c) ヒトマクロファージ細胞株に対して AnxA1 投与後の PPAR γ 、β-Actin 蛋白発現。

考　察

AnxA1 は炎症性滲出液に発現し、抗炎症性のメディエーターとして機能することが知られている。本研究では、AnxA1 は炎症が起こっている場所において、マクロファージと好中球の浸潤を抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制させることが明らかとなった。PPAR-γ の活性は NF κ B p65 転写活性の抑制することにより、炎症性疾患や癌の治療に対する治療ターゲットして報告されてきたが、本研究は人工関節ゆるみとそれに類似するモデル動物を用いて検証を行い、AnxA1 が炎症性骨破壊疾患の新規治療ターゲットとなりうることを示した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院整形外科学研究室の照川アラである。

文　献

1） Yokota S, Shimizu T, Matsumae G, Ebata T, Alhasan H, Takahashi D, Terkawi MA, Iwasaki N. Inflammasome Activation in the Hip Synovium of Rapidly Destructive Coxopathy Patients and Its Relationship with the Development of Synovitis and Bone Loss. Am J Pathol. 2022 May;192(5):794-804. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.02.003. Epub 2022 Mar 12. PMID: 35292262 DOI: 10.1016/j.ajpath.2022.02.003

2） Nonokawa M, Shimizu T, Yoshinari M, Hashimoto Y, Nakamura Y, Takahashi D, Asano T, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Iwasaki N, Ishizu A.. Association of Neutrophil Extracellular Traps with the Development of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head. Am J Pathol. 2020 Nov;190(11):2282-2289. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.07.008. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32702358 DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.07.008