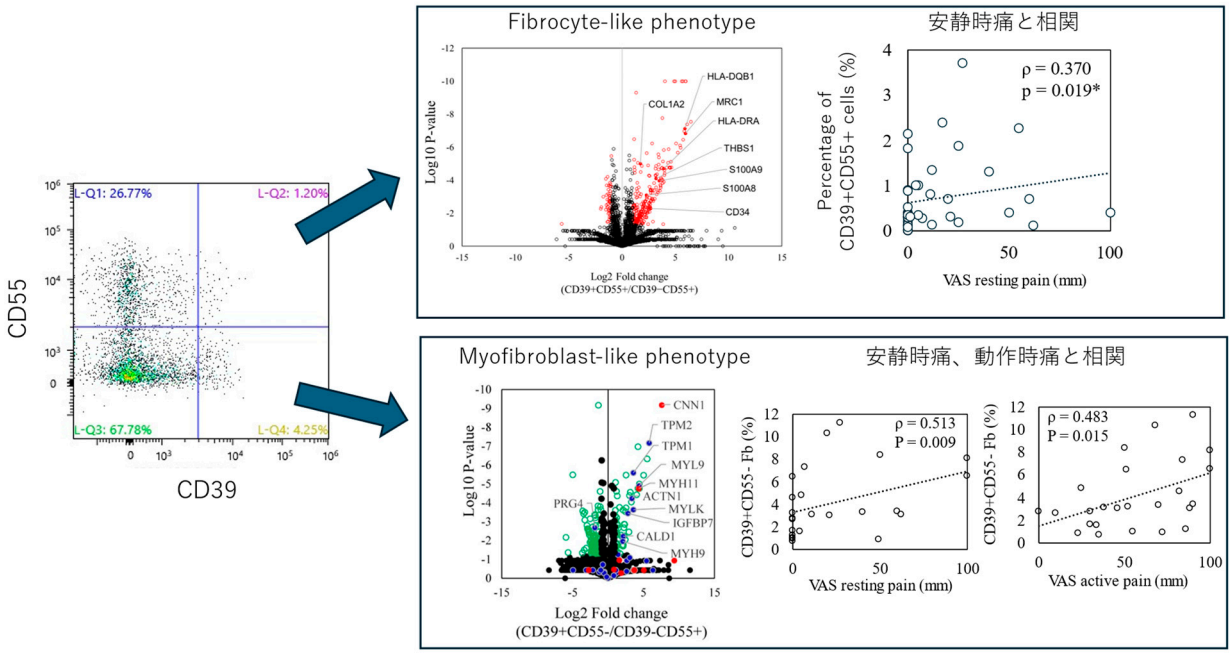
46　変形性関節症疼痛特異的線維芽細胞の同定と機能解析	内田　健太郎

【目的】変形性関節症（osteoarthritis：OA）は関節軟骨の変性に伴う関節内慢性炎症・疼痛疾患で、その数は本邦2,400 万人にのぼる。しかし、OA の疼痛メカニズムは十分に明らかになっていない。近年の滑膜組織のシングルセル解析から、滑膜組織には種々の線維芽細胞サブセットが存在することが明らかになってきた。しかし、疼痛に関与する線維芽細胞サブセットの同定には至っていない。本研究ではオミクス解析による線維芽細胞サブセットの表現型解析と疼痛関連線維芽細胞サブセットの同定を行った。

【方法】人工関節置換術を施行した Kellgren-Lawrence（KL）grades 3〜4 の変形性膝関節症患者から滑膜組織を採取した。酵素処理後、有核細胞を採取した。セルソーターを用いて線維芽細胞分画 Fb（$CD31^{-}CD45^{-}CD90^{+}$）における $CD39^{-}CD55^{-}$、$CD39^{+}CD55^{-}$、$CD39^{-}CD55^{+}$、$CD39^{+}CD55^{+}$ Fb を分離した。分離後、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析と LC-MS によるプロテオーム解析を行った。また、各サブセットの割合と関節裂隙幅、安静時、活動時疼痛スコアとの相関を検討した。

【結果】$CD39^{-}CD55^{+}$ Fb は PRG4 mRNA およびタンパク質を高発現しており、滑膜表層細胞の表現型を示した。OA 疼痛との関連性は認められなかった。$CD39^{+}CD55^{-}$ Fb は CNN1、MYH11 などの筋線維芽細胞（Myofibroblast）関連遺伝子およびタンパク質を高発現していた。滑膜組織における $CD39^{+}CD55^{-}$ Fb の割合は安静時および動作時の疼痛スコアと正の相関を示した。$CD39^{+}CD55^{+}$ Fb は HLA-DRA、S100A8、S100A9 など Fibrocyte マーカーを発現していた。その割合は安静時疼痛スコアと相関した。本研究結果から $CD39^{+}CD55^{-}$ Fb、$CD39^{+}CD55^{+}$ Fb は OA 疼痛サブセットである可能性が示唆された。

変形性関節症疼痛特異的線維芽細胞の同定



46. 変形性関節症疼痛特異的線維芽細胞の同定と機能解析

内田　健太郎

北里大学 医学部 整形外科学

Key words：変形性関節症，滑膜，線維芽細胞，疼痛，オミクス解析

緒　言

変形性関節症（osteoarthritis：OA）は関節軟骨の変性に伴う関節内慢性炎症・疼痛疾患で、その数は本邦2,400万人にのぼる。OAの疼痛は生活の質、日常生活動作を著しく損ね、健康寿命延伸には疼痛治療が必須となる。関節の構成要素である滑膜組織には自由神経終末が存在し、種々の侵害受容器を介し疼痛刺激を受容する。我々は、これまでに滑膜組織に存在する線維芽細胞が神経成長因子やカルシトニン遺伝子関連ペプチドなどの疼痛関連因子を発現していることを明らかにしてきた［1，2］。他方、近年の滑膜組織のシングルセル解析から、滑膜組織には種々のサブセットが存在することが明らかになってきた［3，4］。しかし、疼痛に関与する線維芽細胞サブセットの同定には至っていない。また、機能解析には表面マーカーを用いたセルソーターによる生細胞の分離が必須であるが、表面マーカーによるサブセットの分離はなされていない。本研究では表面マーカーCD39を指標として種々の線維芽細胞の同定とその表現型解析、疼痛との関連性の検討を行った。

方法および結果

1. 線維芽細胞集団の表現型解析とOA病態との関連性の検討

研究は北里大学医学部・病院倫理委員会の承認を得て行った（承認番号：B22–044）。北里大学病院で人工関節置換術を施行したKellgren–Lawrence（KL）grades 3〜4の変形性膝関節症患者から滑膜組織を採取した。関節リウマチ患者を含む自己免疫疾患患者は除外した。滑膜組織を37℃のコラゲナーゼ溶液で2時間酵素処理後、有核細胞を採取した。有核細胞と抗CD31（Brilliant Viollet 421）、CD39（APC/Cy7）、CD45（FITC）、CD55（PE）、CD90（PE/Cy7）、CD235（FITC）抗体を反応させたのちに、セルソーターを用いて40名のOA患者の滑膜組織から線維芽細胞分画（$CD31^{-}CD45^{-}$）における$CD39^{-}CD55^{-}$、$CD39^{+}CD55^{-}$、$CD39^{-}CD55^{+}$細胞を分離した。分離後、RNA-Seq解析及びLC-MS解析を行った（各 n＝3）。また、各サブセットの割合と関節裂隙の幅（Joint space width：JSW、患者疼痛スコア（Visual analog scale：VAS）との相関を検討した（n＝40）。ドットプロット解析により、ヘテロ集団な線維芽細胞集団（$CD45^{-}CD31^{-}CD90^{+}$）が同定され、$CD39^{-}CD55^{-}$、$CD39^{+}CD55^{-}$、および$CD39^{-}CD55^{+}$ Fbの割合はそれぞれ31.2±11.7、4.1±3.0、および6.0±4.3であった。$CD39^{-}CD55^{-}$集団には、$CD39^{-}CD55^{+}$ Fbに比べ、好中球細胞（CD163、VSIG4、C1QC）マーカーを高発現していた。したがって、$CD39^{-}CD55^{+}$および$CD39^{+}CD55^{-}$ Fbを線維芽細胞集団として解析した。RNA-seqデータに基づくDEG解析では、$CD39^{+}CD55^{-}$と$CD39^{-}CD55^{+}$ Fbの間で1,727個の遺伝子が有意に異なって発現していることが明らかになった（図1A）。$CD39^{+}CD55^{-}$ Fbで1,251個の上昇した遺伝子のうち、43個の遺伝子（Selected genes：SG）がKey driver gene（KDG）を推定するために選択され、10個のKDGが同定された（図1B）。これらの遺伝子のKEGGパスウェイ解析の結果、血管平滑筋収縮、アペリン経路、およびcGMP-PKGシグナル伝達に関与する遺伝子が含まれていることが示された（図1C）。$CD39^{-}CD55^{+}$細胞で上昇している476個のDEGのうち34のSGがKDG推定するために選択され、10個のKDGが同定された。これらの遺伝子のKEGGパスウェイ解析の結果、関節リウマチ、TNF-αシグナル伝達経路、およびIL-17経路に関与する遺伝子が豊富であることが示された。プロテオミクス解析により、$CD39^{+}CD55^{-}$と

CD39^{-}CD55^{+} Fb の間で有意に発現が異なる 193 個の蛋白質が同定された（図 2）。CD39^{+}CD55^{-} Fb で上昇が認められた SG、KDG のうち、ACTN1、CALD1、CNN1、IGFBP7、MYH11、MYH9、MYL9、MYLK、TPM1、および TPM2 によってコードされる 10 個の蛋白質は、CD39^{-}CD55^{+} Fb よりも有意に高かった。また、CD39^{-}CD55^{-} Fb で上昇が認められた SG、KDG のうち、PRG4 遺伝子によってコードされるルブリシンタンパク質は、CD39^{+}CD55^{-} Fb よりも有意に高かった。滑膜組織における CD39^{+}CD55^{-} Fb の割合と関節裂隙幅（JSW）との間に有意な差は認められなかったが（CD39^{+}CD55^{-} : ρ=0.268、P=0.206 ; Spearman's correlation coefficient）（図 3A）、CD39^{+}CD55^{-} Fb の割合と安静時（resting pain）、動作時（active pain）の疼痛スコア（Visual analog scale : VAS）は正の相関を示した（resting pain : ρ=0.513、P=0.009 ; active pain : ρ=0.483、P=0.015 ; Spearman's correlation coefficient）（図 3B、C）。一方、CD39^{-}CD55^{+}の割合と JSW、VAS との間に相関は認められなかった（JSW : ρ=0.206、P=0.335 ; resting pain : ρ=0.283、P=0.170 ; resting pain : ρ=0.335、P=0.101 ; Spearman's correlation coefficient）。

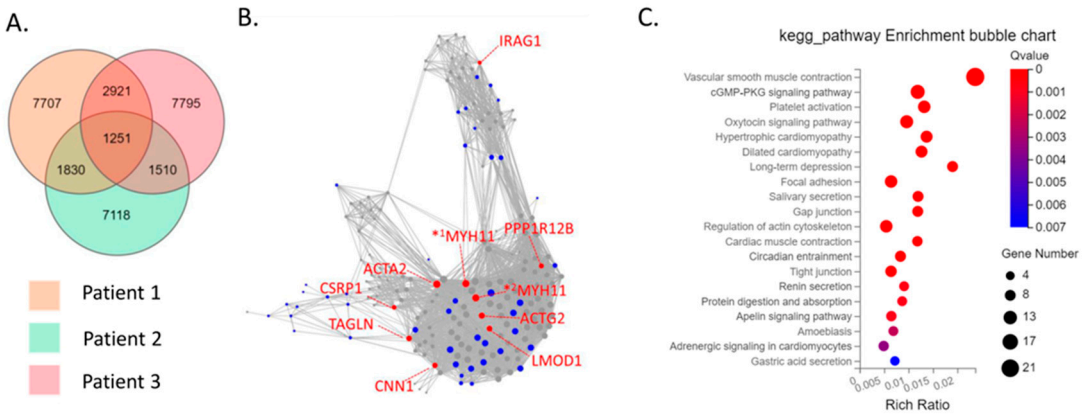


図 1. CD39^{+}CD55^{-}、CD39^{-}CD55^{+}線維芽細胞（Fb）の RNA-Seq 解析

A) CD39^{-}CD55^{+} Fb に比べて CD39^{+}CD55^{-} Fb で高発現していた遺伝子の数。

B) CD39^{+}CD55^{-} Fb で高発現していた遺伝子群のキードライバー遺伝子の分析。

C) KEGG 解析。

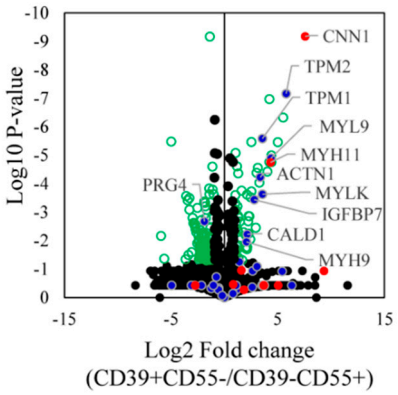


図 2. CD39^{+}CD55^{-}、CD39^{-}CD55^{+}線維芽細胞における発現変動タンパクの volcano blot

赤いドットは Key deriver gene、青いドットは Selected gene によってコードされるタンパク質である。Log 2 Fold change≧1 かつ統計的に有意な値（p＜0.05、t-test）は緑の円で示され、有意でない値は黒い点で示されている。

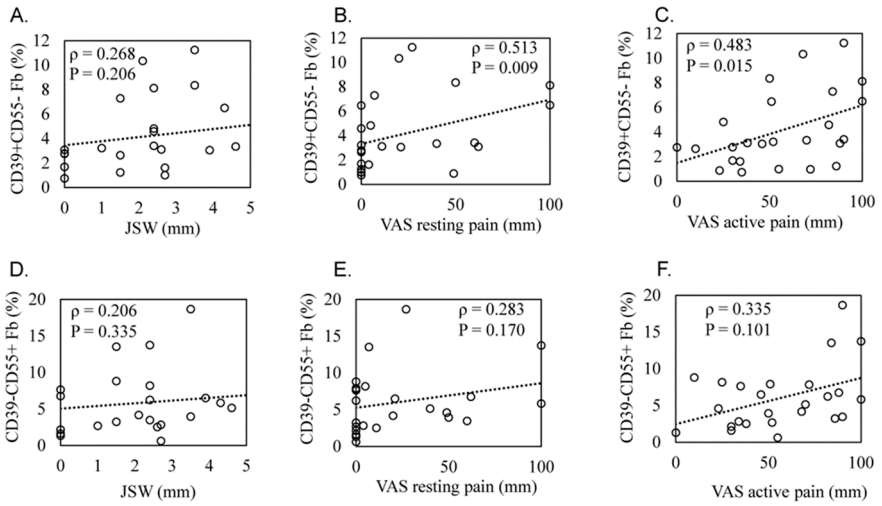


図 3. 滑膜組織における CD39⁺CD55⁻線維芽細胞（Fb）と CD39⁻CD55 Fb の割合と関節裂隙幅、安静時 VAS、動作時 VAS との関連性

CD39⁺CD55⁻ Fb の割合と（A）関節裂隙幅（JSW）、（B）安静時痛 （VAS resting pain）、（C）活動時痛（VAS active pain）との相関。CD39⁻CD55⁺ Fb の割合と（D）JSW、（B）VAS resting pain、（C）VAS active pain との相関。 P<0.05 を有意差ありとした（Spearman's correlation coefficient）。

2. レアポピュレーション CD39⁺CD55⁺集団の表現型解析と OA 病態との関連性

CD39⁺CD55⁺ Fb は当初アーチファクトと考えていたが、症例を重ねる中 10%程度存在する患者も存在していたため、解析に着手した。CD39⁻CD55⁺ Fb および CD39⁺CD55⁺ Fb を採取し、LC-MS 解析を行った（n=3）。また、JSW と VAS との相関を検討した（n=50）。LC/MS 解析により、CD39⁺CD55⁺ Fb は CD39⁻CD55⁺線維芽細胞を比較して、250 のタンパク質が有意（p<0.05；t-test）に上昇していることが明らかになった（図 4A）。発現変動タンパクには、HLA-DRA、S100A8、S100A9、および CD34 など、Fibrocyte と関連するものが含まれていた（図 4A）。LC/MS の結果を確認するために、qPCR 解析を施行した。LC/MS の結果と一致して、CD39⁺CD55⁺細胞は CD39⁻CD55⁺細胞を比較して HLA-DRA、S100A8、および S100A9 の遺伝子発現が有意（それぞれ P=0.046、P=0.028、P=0.028；Wilcoxon-test）に高いことが示された（図 4B～D）。また、CD39⁺CD55⁺ Fb の割合と安静時 VAS は正の相関を示した（ρ =0.370、P=0.019；Spearman's correlation coefficient）。

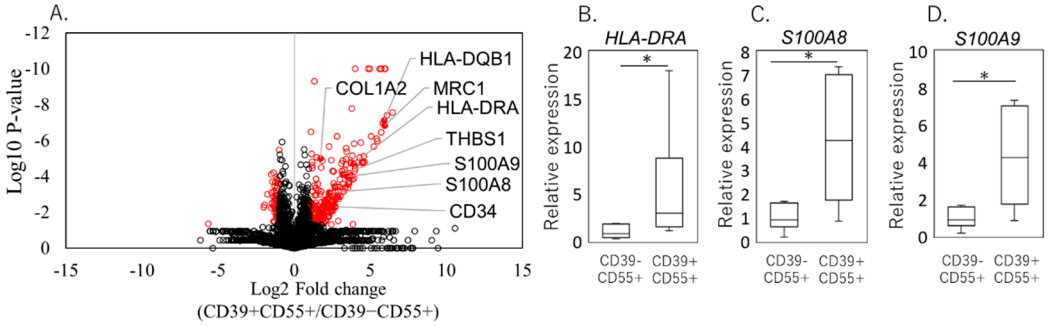


図 4. CD39⁺CD55⁺、CD39⁻CD55⁺線維芽細胞（Fb）の表現型解析

A） CD39⁺CD55⁺、CD39⁻CD55⁺ Fb の LC/MS 解析。赤い点は Fibrocyte マーカーを示している。Log 2 Fold change≧1 かつ統計的に有意な値（p=0.05；t-test）は赤の円で示され、有意でない値は黒い点で示されている。

B～D） Fibrocyte マーカーHLA-DRA（B）、S100A8（C）、S100A9（D）の遺伝子発現。

考　察

本研究において $CD39^+CD55^-$ Fb は CNN1、MYH11 などを高発現する筋線維芽細胞様細胞の表現型を示した。また、$CD39^+CD55^-$ Fb は $CD39^-CD55^+$ Fb に比べ PRG4 の発現が低かった。また、$CD39^+CD55^-$ Fb の割合は OA 疼痛スコアと相関を示した。線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化は種々の臓器の線維化に関与することが報告されている［3，4］。また、線維化環境における PRG4 の減少は OA の進行や疼痛と関連することが報告されている［5，6］。$CD39^+CD55^-$細胞は線維化関連 Fb サブセットであり、線維化を介して OA の疼痛に関与する可能性が示唆された［7］。

Fibrocyte は骨髄球系細胞と線維芽細胞の両方の特性を併せ持つ細胞であり、炎症や線維化など多様な病態に関与することが報告されている［8］。これまでに関節リウマチ患者における Fibrocyte の増加が報告されているが［9］、OA での動態や病態との関連性は明らかになっていなかった。$CD39^+CD55^+$ Fb のプロテオミクス解析の結果、本サブセットは Fibrocyte 様の表現型を示すことが明らかになった。また、本サブセットの割合と安静時痛との間に相関が認められた。Collagen、THBS などの細胞外マトリックスの発現がみとめられたことから、$CD39^+CD55^+$ Fb は OA 滑膜の線維化を介して疼痛に関与しているものと考えられた［10］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北里大学大学院医療系研究科分子遺伝学研究室の藤岡正人、北里大学大学院医療系研究科臨床免疫学研究室の太田悦朗、北里大学大学院理学研究科の小寺義男である。

文　献

1） Takano S, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Aikawa J, Iwase D, Iwabuchi K, Matsumoto T, Satoh M, Mukai M, Minatani A, Takaso M. Nerve growth factor regulation and production by macrophages in osteoarthritic synovium. Clin Exp Immunol. 2017 Nov;190(2):235-243. doi: 10.1111/cei.13007. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28677145

2） Takano S, Uchida K, Inoue G, Minatani A, Miyagi M, Aikawa J, Iwase D, Onuma K, Mukai M, Takaso M. Increase and regulation of synovial calcitonin gene-related peptide expression in patients with painful knee osteoarthritis. J Pain Res. 2017 May 10;10:1099-1104. doi: 10.2147/JPR.S135939. PMID: 28546767

3） Nanus DE, Badoume A, Wijesinghe SN, Halsey AM, Hurley P, Ahmed Z, Botchu R, Davis ET, Lindsay MA, Jones SW. Synovial tissue from sites of joint pain in knee osteoarthritis patients exhibits a differential phenotype with distinct fibroblast subsets. EBioMedicine. 2021 Oct;72:103618. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103618.. PMID: 34628351

4） Knights AJ, Farrell EC, Ellis OM, Lammlin L, Junginger LM, Rzeczycki PM, Bergman RF, Pervez R, Cruz M, Knight E, Farmer D, Samani AA, Wu CL, Hankenson KD, Maerz T. Synovial fibroblasts assume distinct functional identities and secrete R-spondin 2 in osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 2023 Feb;82(2):272-282. doi: 10.1136/ard-2022-222773. PMID: 36175067

5） Remst DF, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness. Rheumatology (Oxford). 2015 Nov;54(11):1954-63. doi: 10.1093/rheumatology/kev228. PMID: 26175472

6） Waller KA, Zhang LX, Elsaid KA, Fleming BC, Warman ML, Jay GD. Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 9;110(15):5852-7. doi: 10.1073/pnas.1219289110. PMID: 23530215

7) Tsuchiya M, Ohashi Y, Kodera Y, Satoh M, Matsui T, Fukushima K, Iwase D, Aikawa J, Mukai M, Inoue G, Takaso M, Uchida K. CD39+CD55- Fb Subset Exhibits Myofibroblast-Like Phenotype and Is Associated with Pain in Osteoarthritis of the Knee. Biomedicines. 2023 Nov 14;11(11):3047. doi:10.3390/biomedicines11113047. PMID: 38002046
8) Reinhardt JW, Breuer CK. Fibrocytes: A Critical Review and Practical Guide. Front Immunol. 2021 Dec 17;12:784401. doi: 10.3389/fimmu.2021.784401. PMID:34975874
9) Just SA, Nielsen C, Werlinrud JC, Larsen PV, Hejbøl EK, Tenstad HB, Daa Schrøder H, Barington T, Torfing T, Humby F, Lindegaard H. Fibrocytes in early and long-standing rheumatoid arthritis: a 6-month trial with repeated synovial biopsy, imaging and lung function test. RMD Open. 2021 Mar;7(1):e001494. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001494. PMID: 33674419
10) Tsuchiya M, Ohashi Y, Fukushima K, Okuda Y, Suto A, Matsui T, Kodera Y, Sato M, Tsukada A, Inoue G, Takaso M, Uchida K. Fibrocyte Phenotype of ENTPD1+CD55+ Cells and Its Association with Pain in Osteoarthritic Synovium. Int J Mol Sci. 2024 Apr 6;25(7):4085. doi: 10.3390/ijms25074085. PMID: 38612896