

関節運動による、滑膜を介した関節恒常性維持機構の解明

東京大学医学部附属病院 整形外科

石倉 久年

1. 要旨

関節運動による関節恒常性維持機構における滑膜の役割について解析した。まず関節へのメカニカルストレスを排除した MMS (Minimized Mechanical Stress) モデルマウスを作成し、組織学的に評価すると、滑膜炎が軟骨変性に先行した。経時的な組織および遺伝子発現解析からは、メカニカルストレスを失った滑膜では、特異的な炎症性マクロファージが増殖し、それらが滑膜線維芽細胞を活性化し、軟骨変性を引き起こすことが示された。滑膜マクロファージが関節運動を最初に感知する細胞であり、関節運動は滑膜を正常な状態に保つことで関節恒常性維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 序文

変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) は、関節軟骨の変性を主体とする最も一般的な関節疾患の一つである。痛みで日常生活に支障を来している膝の OA 患者は日本だけでも約 780 万人、X 線検査でその疑いがある潜在的患者数は約 2530 万人と推定されている (1)。OA の発症には年齢、性別 (女性) や遺伝的要因の他、肥満や外傷、関節の不安定性などの過剰な力学的ストレスが誘因になることが知られている (2)。OA に罹患すると、単純 X 線上では関節裂隙の狭小化や骨棘形成、軟骨下骨の骨硬化などの変化をきたし、関節の拘縮、疼痛を引き起こすことで、歩行障害や ADL 低下が進行する (図 1)。末期の OA に対しては主に人工関節置換術が行われ、2017

年の日本のデータでは膝関節でおよそ 8.2 万件、股関節で 5.9 万件、すべての関節を合わせると約 14.6 万件の人工関節置換術が行われており (3)、年々増加傾向にある。しかしながら、手術以外で病態を制御しうる治療は存在しない。過剰な力学的ストレスが OA の誘因になる一方で、ギプス固定や廃用などによって一定期間関節を動かさない状態であると、関節が拘縮するとともに軟骨変性に至ることも知られている (4-6)。これらの事実は、関節を健康に保つためには「適度な」力学的ストレスを与えることが重要であることを示唆している。これらの分子メカニズムについては、軟骨細胞にかかる過剰な力学的ストレスは RAC1-ROS 産生を経て Gremlin 1 を介した NF- κ B シグナルの過剰活性を引き起こし、転写因子 HIF-2 α を誘導して軟骨の変性を引き起こすことが報告されている (7)。一方、廃用関節でどのようにして軟骨変性が進んでいくのか、また、関節単位で見た場合に適度な運動がどのように関節の恒常性維持に繋がるのかは未だ不明である。

過去の報告から OA の初期病変として滑膜が重要なことが明らかになってきており、滑膜炎が OA に先行すること、滑膜炎が OA の予測因子となることが報告されている (8-10)。先行研究においても、力学的ストレスが過小になった滑膜で phenotype が最初に変わるという検討結果から、関節恒常性維持の鍵を握るのは滑膜であるという知見を得て、本研究計画を立案した。

また、近年、一細胞解析が広まるにつれて、関節組織、特に滑膜における heterogeneity が注目されている(11)。過去の報告では、関節リウマチ(RA)では滑膜マクロファージの特定のサブセットが炎症を制御しているという報告(12)や、滑膜線維芽細胞における特定のサブセットが炎症および軟骨損傷に重要な役割を果たすという報告(13, 14)がある。さらに、OA についても、滑膜細胞-軟骨細胞間の相互作用が OA の病態において重要な役割を果たすことが示されている(15)。本研究でも、一細胞ごとの解析を取り入れることで、滑膜の詳細なサブセット解析も行うこととした。

本研究では、最初に、尾部懸垂と関節固定を組み合わせ、膝関節に対する力学的ストレスを最小限とした in vivo モデルを作成した。これは尾部懸垂という関節免荷モデルとピペットチップによる関節固定を組み合わせることで外科的侵襲を加えることなく、力学的ストレスを除去する新たなモデルである。このモデルで経時的に膝関節の組織像を検討したところ、2週で線維性滑膜は著しく肥厚、膝蓋下の脂肪性滑膜も線維化を来し、lining layer の細胞も増殖・重層化することが分かった。またこれらの変化から 2-4 週遅れて関節軟骨の変性も見られた。この過程で滑膜の間質に 1 型コラーゲン (COL1A1) 陽性の結合組織が増大し、それに伴って関節拘縮も進行した。これらのデータから、廃用関節において滑膜炎が軟骨変性に先行する、すなわち、力学的ストレスを失った滑膜はその恒常性が破綻し、軟骨変性を促すと考えられた。これら分子メカニズムを詳細に検討するために、この in vivo モデル膝関節の滑膜および軟骨を採取して、組織からのバルク RNA シーケンシング (bulk RNA-seq) を行った。

滑膜および軟骨の遺伝子変化を詳細に検討し、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (16) などのデータベースを駆使し、滑膜-軟骨間の相互作用について検証した。また、滑膜内でのサブセットの変化を一細胞ごとに捉えるために、シングルセル RNA-seq (scRNA-seq) を行い、力学的ストレスを失った滑膜でどのようなサブセットが増殖し、軟骨変性を引き起こしているのかを解析した。続いて、これらの解析の妥当性を検討すべく、in vivo モデルへの介入実験も行った。

本研究の目的は、通常状態の滑膜から、力学的ストレスを失い恒常性が破綻した滑膜まで、さまざまな状態における滑膜およびその変化を理解し、滑膜が関節全体でどのように維持機構として働いているかを解析し、関節の恒常性維持・制御メカニズムを解明することである。

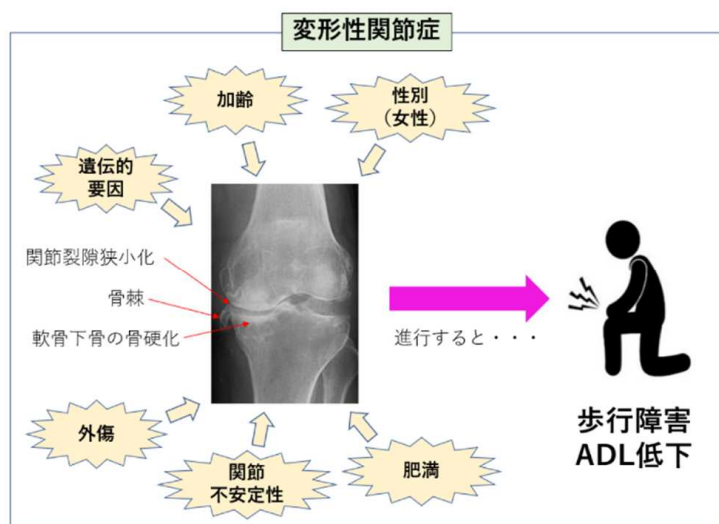


図 1. OA の概要

OA の発症には年齢、性別 (女性) や遺伝的要因の他、肥満や外傷、関節の不安定性などの過剰な力学的ストレスが誘因となる。OA に罹患すると、単純 X 線上では関節裂隙の狭小化や骨棘形成、軟骨下骨の骨硬化などの変化をきたし、関節の拘縮、疼痛を引き起こすことで、歩行障害や ADL 低下が進行する。

3. 方法

3-1. 実験動物

本研究で使用した動物はすべてマウスであり、C57BL/6 Wild Type マウスを三共ラボサービスより購入した。これら実験動物については、「動物の愛護および管理に関する法律第41条（動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等）」および「東京大学動物実験実施マニュアル第4章（動物実験等の実施）」などを基に動物実験計画書を作成し、学内の動物実験委員会に提出し、審査を受け承認を得た上で行った。本研究は、「マウスモデルを用いた運動器疾患の分子メカニズムの解析」（承認番号：医-P17-091）で承認された範囲で実施した。動物実験に際しては、動物愛護の観点に十分に配慮して行った。具体的には、動物実験を行う者は、事前に動物実験講習を受講し、講習修了証を得たうえで、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」に従い、3R (Replacement [代替実験の検討]、Reduction [動物数削減]、Refinement [動物の苦痛軽減]) を十分に考慮して実験を行った。

3-2. 最小力学的ストレス (Minimized Mechanical Stress: MMS) モデル

生後8週のWild Type マウスを用いて、尾部懸垂と関節固定を併用し、両膝関節に荷重をかけない、かつ動かさないモデルを作成した（図1）。具体的には、金属クリップ、ガムテープを用いて尾部懸垂を行い、K-wireに沿ってマウスが自由にケージ内を動けるように配慮した。また、固定については1mlのプラスチックピペットの一部を切断して使用した。



図1. Minimized mechanical stress (MMS) モデルマウスの作成
尾部懸垂と膝関節固定を組み合わせ、膝関節を免荷かつ固定するモデルを作成した。膝関節は1mlのピペットチップで固定した。

3-3. 放射線学的解析

MMSモデルの妥当性を確認するために、Control, MMS D(Day)14, MMS D42の骨サンプルを用いて μ CTによる骨評価を行った。 μ CTはinspeXio SMX-100CT(島津製作所)を使用し、大腿骨近位部を用いて評価を行った。一定の条件下 (Voltage, 75kV; current, 140 μ A; voxel size, 0.012mm/voxel; image size, 512 \times 512 pixels; slice thickness, 0.02mm) に撮像した大腿骨近位部を3D構築し、TRI/3D-BON-FCS64 (RATOC System Engineering) ソフトウェアを使用し、bone volume to total callus volume (BV/TV), the star volume of the bone marrow space (V^*m space), structure model index (SMI) の3つのパラメータを計算した。これらのパラメータは、成長軟骨を含まない大腿骨頭部分で評価した。

3-4. 組織学的検討

3-4-1. 滑膜炎および軟骨変性評価

マウスの組織サンプルは、4% paraformaldehyde/PBS に漬けて4 $^{\circ}$ Cで1日間固定したのち、100% ethanol に overnight 漬けて脱脂し、その後10% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (pH7.4) で5日間脱灰した。その後、パラフィン包埋し、矢状切片を5 μ m厚保で作成した。ヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色およびサフラニンO (Saf O) 染色は、標準的なプロトコルに従って実施した。スライドの取り

込みおよび保存にはバーチャルスライドスキャナー (NanoZoomer; 浜松ホトニクス) を使用した。滑膜炎については、H&E 染色した矢状面の切片を synovitis score(17)を用いて①後十字靭帯が明確に見えるスライス、②前十字靭帯と後十字靭帯が交差するスライス、③前十字靭帯が明確に見えるスライスの3点でスコアリングし、その平均値を算出した。また、軟骨については Saf O 染色した切片を modified Mankinscore(18)を用いて評価し、内側から切り進めて行き、半月板が前後に分かれる直前のスライスおよび、そこから 60 μ m 外側および 120 μ m 外側のスライスの計3点でスコアリングし、その平均値を算出した。(図2)

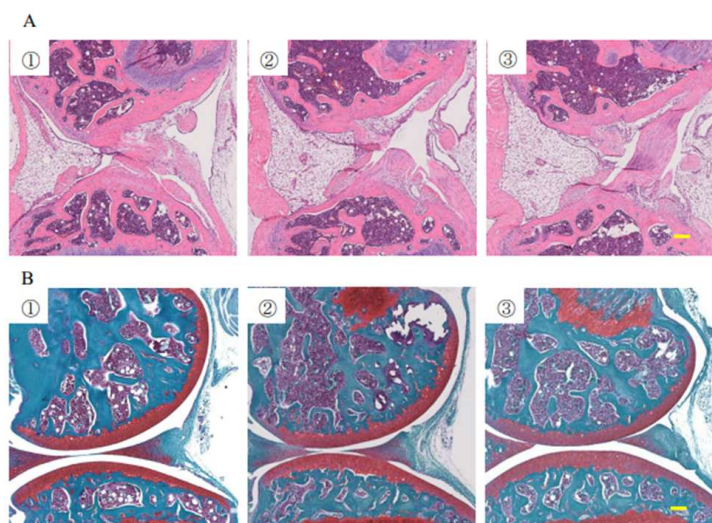


図2. 滑膜および軟骨の組織学的評価

A: 滑膜評価法。①後十字靭帯スライス、②前後十字靭帯交差スライス、③前十字靭帯スライスの3点でスコアリングし、その平均値を算出した。

(scale bar:100 μ m)

B: 軟骨評価法。①半月板が前後に分かれる直前のスライス、②①から 60 μ m 外側のスライス、③②からさらに 60 μ m 外側のスライス、の3点でスコアリングし、その平均値を算出した。

(scale bar: 100 μ m)

3-4-2. 免疫組織化学染色

上記パラフィン固定したマウス膝関節切片を用いて、免疫組織化学染色を行った。一次

抗体は CD68(1:500, abcam, ab125212), COL1A1(1:500, abcam, ab6308)を用いた。いずれについてもキシレンを用いて脱パラフィン後、0.3%H₂O₂/MeOHを用いて内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。CD68についてはその後一次抗体に 4 $^{\circ}$ Cで反応させながら overnight したのち、Tween-20 入り PBS(T-PBS)で3回洗浄し、対応する horseradish peroxidase(HRP)付き 2次抗体(ヒストファイン シンプルステイン MAXPO; ニチレイバイオサイエンス)に常温で30分反応させ、3,3'-diaminobenzidine(DAB)(ヒストファイン シンプルステイン DAB; ニチレイバイオサイエンス社)を使用して発色した。COL1A1についてはプロテアーゼ(ニチレイバイオサイエンス社)を用いて賦活化したのち、ブロッキング(Blocking Histo One; nacalai tesque 社)を常温で10分間行い、一次抗体に 4 $^{\circ}$ Cで反応させながら overnight したのち、T-PBSで3回洗浄し、対応する HRP 付き 2次抗体に常温で30分反応させ、DABを使用して発色した。対比染色にはヘマトキシリンを使用した。蛍光多重免疫染色の際には、同様の一次抗体を使用し、DAPI入り水溶性封入剤(Fluoro-KEEPER Antifade Reagent with DAPI;nacalai tesque 社)を用いて封入した。蛍光多重免疫染色の撮影には共焦点顕微鏡(LSM800, ZEISS 社)を使用した。

3-5. Bulk RNA-seq による遺伝子発現解析

マウスの滑膜および軟骨組織を採取し、ホモジナイズしたのち、TRI Reagent(Molecular Research Center)を用いてRNAを抽出した。その後、Direct-zol RNA MicroPrep Kit(Zymo Research 社)を使用して totalRNAを精製した。RNAのクオリティチェックには Agilent Bioanalyzer2100 を用い、シー

クエンスのプラットフォームは DNBseq(BGI 社)を使用し、100bp のペアエンドリードで行った。読み取ったデータはマウスゲノム(m m10) にマッピングした。得られた遺伝子発現のデータは、iDEP(19), TCC-GUI(20), IPA のソフトウェアを用いて解析した。

3-6. scRNA-seq

3-6-1. 細胞単離

control, MMS D14 マウス滑膜をそれぞれ 20 膝ずつ採取し、剪刀を用いて細かく刻んだのち、0.2mg/ml の Liberase TL(Sigma-Aldrich 社) および 0.1mg/ml DNase I (Roche 社) 入りの RPMI-1640(Nacal tesque 社)へ移し、時々シリンジホモジナイズを行いながら、37°C, 20 分間インキュベーションし、細胞を単離した。その後、100 μ m のセルストレーナーおよび 40 μ m の Flowmi(Bel-Art 社)でフィルタリングを行った。

3-6-2. Droplet-based scRNA-seq

10x Genomics Chromium のプラットフォームを用いて scRNA-seq のデータ作成を行った。Chromium Single Cell System v3.1(Ghromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kitsv3.1)を使用し、単離細胞を 1000-1500 細胞/ μ l の濃度となるように調整したのち、サンプルあたり約 16000 細胞をチップにロードした。13 サイクルで cDNA 増幅を行いライブラリーを作成したのち、得られた fastq ファイルを 10x Genomics Cell Ranger(version 2.1.0)で処理し、統計ソフト R の Seurat パッケージ(v 4.0.0)を用いて後述の通り解析した。

3-6-3. scRNA-seq のデータ解析

品質が保たれたトランスクリプトームを解析するため、まず、ミトコンドリア由来遺伝

子の割合が 10 %以下のものを選択し、また、それぞれの細胞内で発現している遺伝子の数が 1000 以上で 8000 未満のものを選択した。さらに、G2M 期、S 期の既知のマーカー遺伝子を用いて、細胞周期による違いも補正した。

Control 群と MMS D14 群は merge 関数を用いて統合した。続いて、NormalizeData 関数を用いて標準化を行った。クラスタリングについては Louvain アルゴリズムを選択し、dimension, resolution の決定を行った。これらは Elbow plot および Clustering tree(21)を作成し、それぞれのクラスターが安定していると思われる値を選択し、dimension =1:10, resolution = 0.3 とし、UMAP を作成した。

リガンドレセプター解析には統計ソフト R のパッケージである Nichenet(22)を使用し、sender を炎症性マクロファージ、receiver を活性化線維芽細胞として解析を行った。

3-7. Clodronate liposome 関節内投与

マクロファージを枯渇した系を検討するため、図 3 のような時間軸で定期的に Clodronate liposome(HYGIEIA BIOSCIENCE 社)を関節内に投与する群を作成した。対象群には Control liposome(HYGIEIA BIOSCIENCE 社)を投与し、それぞれハミルトンシリンジおよび 30G 針を用いて経皮的に 1 回あたり 5 μ l を関節内に投与した。

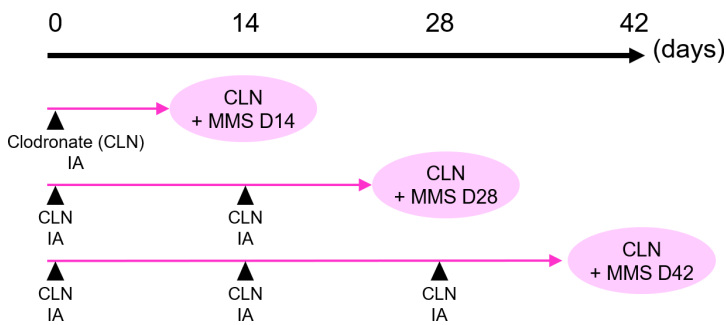


図 3. Clodronate liposome の関節内投与時期

尾部懸垂を開始する直前に Clodronate liposome を関節内に 5 μ l 投与した。Clodronate liposome は 2 週間おきに投与し、MMS D14 の系では 1 回、D28 の系では 2 回、D42 の系では 3 回投与した。対象群には Clodronate liposome の代わりに Control liposome を投与した。

3-8. リアルタイム RT-PCR

滑膜における特定の遺伝子発現を検証するためにリアルタイム PCR を使用した。滑膜からの RNA の採取は章 3-5. と同様の方法で行った。精製した RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix without gDNA Remover (TOYOBO 社) を使用して逆転写を行い、cDNA を得た。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) および 0.3mM の各種プライマーを用いて、PCR を行った。マウス β -Actin をハウスキーピング遺伝子とし、遺伝子の mRNA コピー数の比を $\Delta\Delta$ CT 法を用いて測定した。各サンプルの測定値は、3 well での計測値の平均値とした。

用いたプライマーは以下の通りである。

β -Actin

forward primer: 5'-AGATGTGGATCAGCAAGCAG-3'
reverse primer: 5'-GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'

Coll1a1

Forward primer: 5'-ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC-3'
reverse primer: 5'-CAGGGAAGCCTCTTCTCCT-3'

Spp1

forward primer: 5'-ACACTTCACTCCAATCGTCC-3'
reverse primer: 5'-TGCCCTTCCGTTGTTGTC-3'

Cdh11

forward primer: 5'-TGTCACGACAACCCACCAA-3'
reverse primer: 5'-CGGGACAGCTGCTTCTGATA-3'

Fap

forward primer: 5'-ACAAGTGGATTTCCAGCGCAT-3'
reverse primer: 5'-TGCTTGAGGAAGTGCAT-3'

4. 結果

4-1. MMS モデルの妥当性の検証

MMS D14 マウスの膝関節は強い拘縮を生じた。また、本モデルにおいて下肢に軽度腫脹は見られたが、潰瘍形成や壊死などの皮膚障害はなかった (図 4A)。骨評価のために μ CT で大腿骨近位部を撮像した。MMS D42 では、Control 群に比べて大腿骨頸部で皮質骨が菲薄化しており、また、大腿骨頭の骨梁が顕著に減少していた (図 4B)。ソフトウェアを用いて各骨パラメータを測定した。骨量の指標である BV/TV (Bone volume/Tissue volume) は経時的に減少し、また、骨髓腔体積の指標である V*m Space (Star volume of the bone marrow space) は経時的に増加し、骨梁形態の指標である SMI (Structure model index) は経時的に上昇した (図 4C)。これらのデータから、MMS モデルにおいて、外科的侵襲を加えることなく、膝関節の免荷、固定がともに目的通り遂行できていることが確認できた。

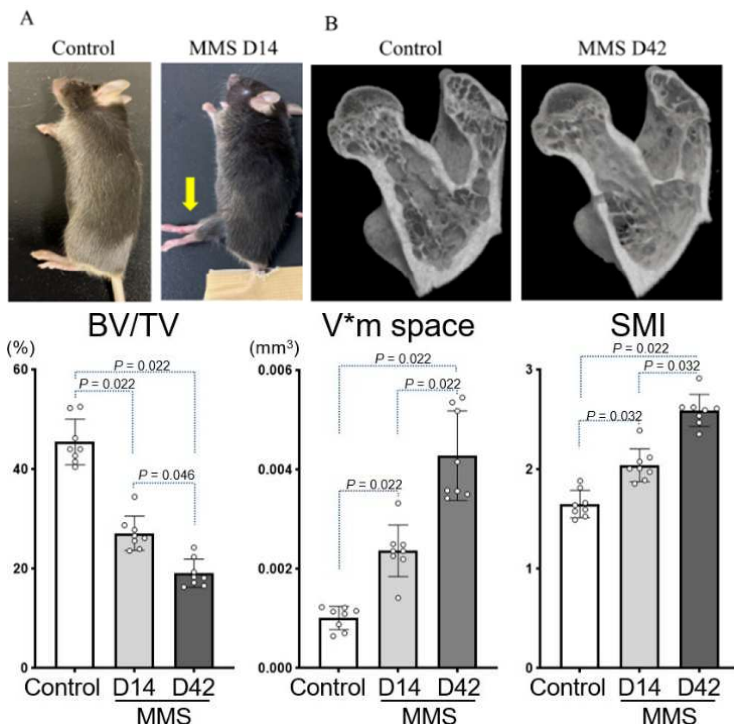


図 4. MMS モデルでは関節の拘縮、骨梁構造の変化が生じた。

A: MMS D14 では顕著な膝関節拘縮が生じた (矢印)。

B: μ CT の大腿骨近位部像。MMS D42 では皮質骨が菲薄化し、骨梁も減少していた。

C: 各種骨パラメータも MMS モデルによって経時的に脆弱な方向に変化した (n=8, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel-Dwass 検定)。

4-2. MMS モデルにおける組織学的変化

MMS モデルによる関節内の変化を評価するために、滑膜、軟骨それぞれを経時的に評価した。MMS モデル滑膜では、lining layer の肥厚、炎症細胞浸潤、線維化が生じ、滑膜炎の所見と矛盾しなかった。滑膜炎は2週をピークに生じる一方、軟骨は滑膜炎より遅れる傾向にあり、6週まで軟骨変性は進行した (図 5A-C, F)。

また、MMS D14 の時点で、尾部懸垂による免荷は継続しながら膝関節の固定を解除して2週が経過した群 (R1 群) と、尾部懸垂と固定をともに解除し、通常の生活に戻り2週が経過した群 (R2 群) を作成すると、滑膜炎は R1 群、R2 群ともに同等の改善傾向を示した。軟骨変性は R2 群において改善が顕著で

あったが、R1 群についても、MMS D28 と比較して優位に改善していた (図 5A, B, D, G)。

さらに、最初から膝関節を固定せず、尾部懸垂で免荷のみとした Half mechanical stress: HMS 群を作成し、組織学的検討を行うと、HMS 群では MMS 群と比較して滑膜炎、軟骨変性が有意に抑制された (図 5A, B, E, H)。

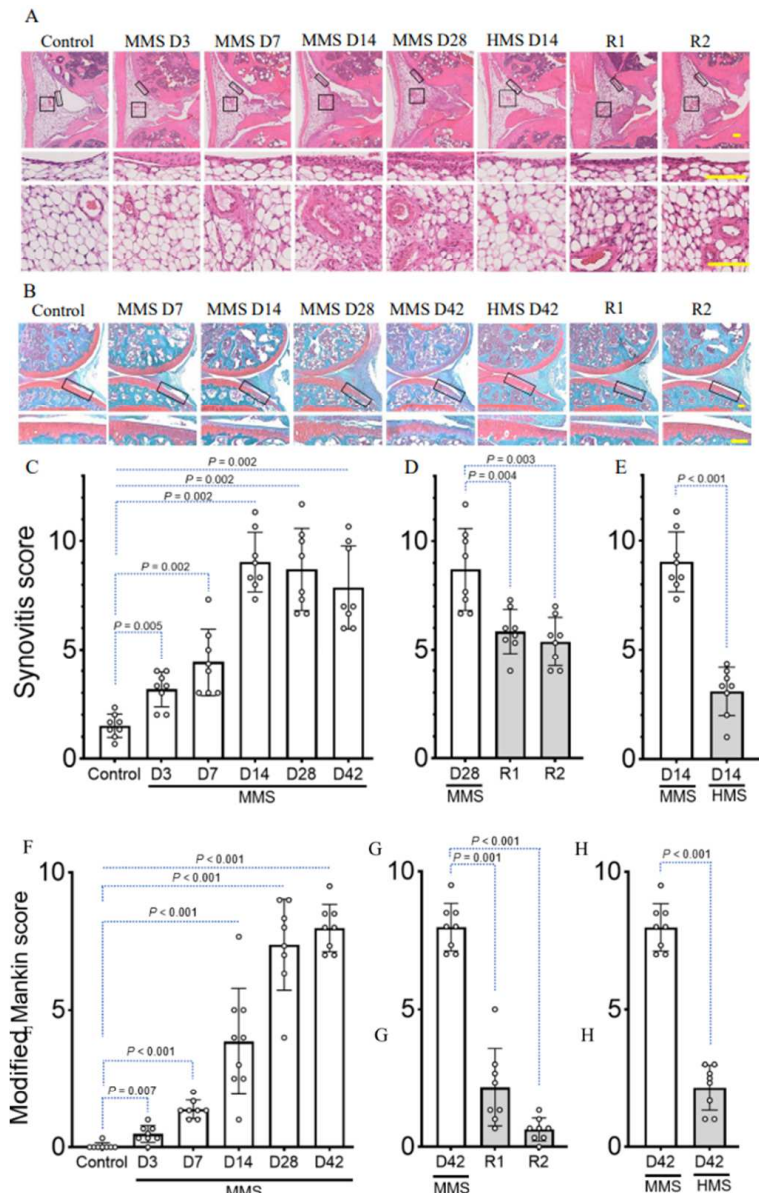


図 5. MMS モデルでは滑膜炎が生じ、続いて軟骨変性が進行した。固定をしない群および固定を途中で解除した群では滑膜炎、軟骨変性がともに抑制された。

A, C-E: MMS モデル滑膜では D14 をピークに滑膜炎が生じた (A, C, scale bar: 100 μ m, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel 検定)。MMS D14 の時点で固定を解除すると、免荷を継続した群 (R1 群) でも免荷を解除した群 (R2 群) と同等に滑膜炎が改善した (D, Mann-Whitney の u 検定)。最初から固定をせず免荷した群 (HMS 群) でも D14 の時点で滑膜炎は抑制された (E, Mann-Whitney の u 検定)。
 B, F-H: MMS モデル軟骨では 6w まで軟骨の変性が進行した (B, F, scale bar: 100 μ m, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel 検定)。MMS D14 の時点で固定を解除すると、免荷を継続した群 (R1 群) でも軟骨変性はある程度抑制された (G, Mann-Whitney の u 検定)。最初から固定をせず免荷した群 (HMS 群) でも D42 の時点で軟骨変性は抑制された (H, Mann-Whitney の u 検定)。

4-3. MMS モデルにおける遺伝子発現変化

4-3-1. 滑膜の遺伝子発現変化

Bulk RNA-seq で得られた Control, MMS D3, MMS D7, MMS D14, R1, R2 群 (それぞれ n=3) における滑膜の遺伝子発現の全体像をヒートマップで表示し、クラスタリングすると、Control → MMS D3 → MMS D7 → MMS D14 と経時的に遺伝子発現が変化していく一方、R 群および R2 群は Control に近いクラスターに分類された (図 6A)。それらを主成分分析で 2 次元マップ上にプロットすると、同様の経時的変化が明らかとなった (図 6B)。MMS 群滑膜では各種コラーゲンや Spp1, Postn, Fap などの線維化関連遺伝子の他、MMPs などの細胞外基質分解酵素、Tnfsf11, Ctsk などの破骨細胞関連遺伝子が顕著に上昇しており、炎症細胞が浸潤し線維化が進行している組織像と合致する結果であった (図 6C)。また、変動上位 1500 遺伝子を抽出し、その遺伝子発現パターンから 3 つにクラスタリングすると、MMS モデルで低下する遺伝子群は脂肪を含めた代謝関連 pathway が多く、上昇する群では細胞外基質やコラーゲン合成に関わるものが主であった (図 7)。

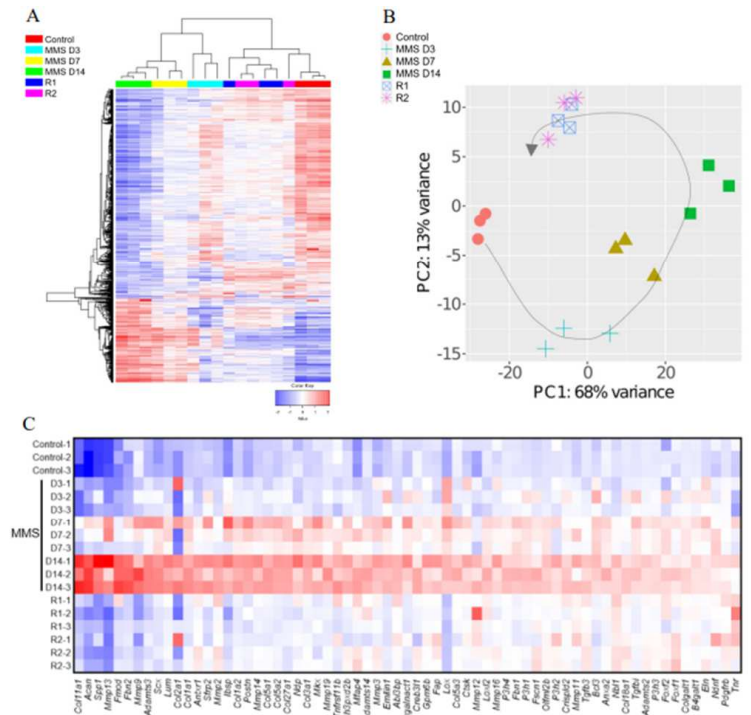


図 6. 滑膜の遺伝子発現変化

A: 滑膜の遺伝子発現の全体像を示したヒートマップ。MMS 群で時間経過とともに遺伝子発現が変化していく一方、固定のみを解除した R1 群、固定および免荷とともに解除した R2 群は、control 群に近い遺伝子発現パターンを示すことが分かった。
 B: 滑膜の遺伝子発現の全体像を示した主成分分析。経時的な変化および関節運動による可逆的な変化が良好な視認性を持って示された。
 C: MMS 群滑膜で上昇した主な遺伝子を示したヒートマップ。コラーゲンをはじめとする細胞外基質関連遺伝子の他、Spp1, Postn, Fap など、線維化関連遺伝子が上昇していた。また、これらの変化は R1, R2 群で control に近い状態まで戻っていた。

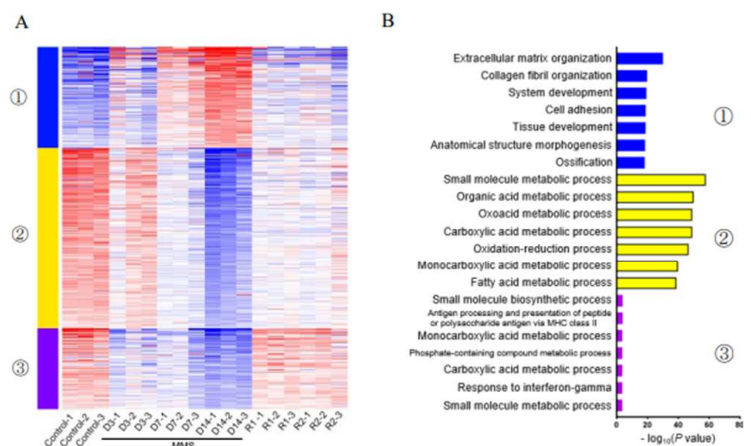


図 7. 滑膜遺伝子発現変化のクラスタリング

A: 滑膜の遺伝子発現のパターンによってクラスタリングを行い、① MMS 群で上昇する遺伝子、② MMS 群で徐々に低下する遺伝子、③ MMS 群で早期から低下する遺伝子の 3 つのパターンにクラスタリングした。

B: それぞれのクラスターで特徴的な GO pathway を列挙した。①では基質合成に関するものが多く、②③では脂肪を含めた代謝に関するものが上位を占めた。

4-3-2. 軟骨の遺伝子発現変化

Bulk RNA-seq で得られた Control, MMS D3, MMS D7, MMS D14, MMS D28, R1, R2 群 (それぞれ n=2) における軟骨の遺伝子発現の全体像をヒートマップで表示し、クラスタリングすると、Control→MMS D3→MMS D7→MMS D14→MMS D28 と経時的に遺伝子発現が変化していく一方、R2 群は control に近いクラスターに分類された。R1 群は MMS D14, MMS D28 に近いクラスターに分類されたが、これらを主成分分析で 2 次元マップ上にプロットすると、Control→MMS D3→MMS D7→MMS D14→MMS D28 と経時的に遺伝子発現し、R1→R2 と段階的に control 群に近づいていく結果であり、これは図 5B で示した軟骨の組織学的所見とも一致する結果であった (図 8A, B)。変化した代表的な遺伝子を見てみると、MMS 群軟骨では、Col2a1, Acan, Comp などの細胞外基質遺伝子の他、軟骨のマスター転写因子である Sox9 が顕著に低下していた (図 8C)。また、変動上位 1000 遺伝子を抽出し、その遺伝子発現パターンから 3 つにクラスタリングすると、MMS モデル軟骨で晩期に顕著に発現が低下する遺伝子群は結合組織や軟骨合成に関わる pathway が主であり、MMS 群で軟骨変性が起こる組織学的所見と矛盾しない結果であった (図 9)。

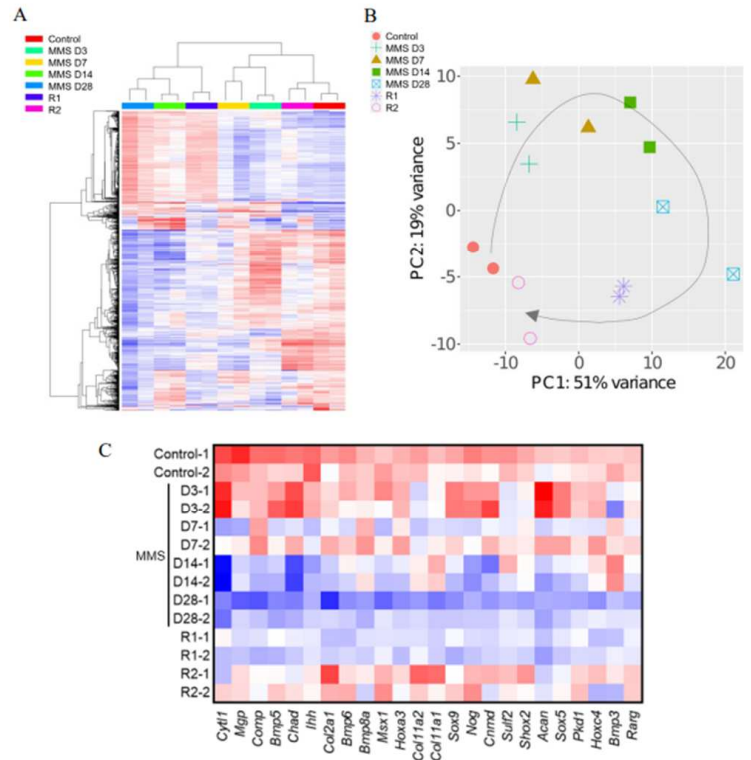


図 8. 軟骨の遺伝子発現変化

A: 軟骨の遺伝子発現の全体像を示したヒートマップ。MMS 群で時間経過とともに遺伝子発現が変化していく一方、固定および免荷とともに解除した R2 群は、Control 群に近い遺伝子発現パターンを示すことが分かった。

B: 滑膜の遺伝子発現の全体像を示した主成分分析。経時的な変化および関節運動による可逆的な変化が良好な視認性を持って示された。R2 群が Control と非常に近い遺伝子発現パターンなのに対して R1 群が Control と若干異なる遺伝子発現パターンを示した。C: MMS 群で減少した代表的な遺伝子を示したヒートマップ。Col2a1, Acan, Comp などの細胞外基質遺伝子の他、軟骨のマスター転写因子である Sox9 が顕著に低下していた。

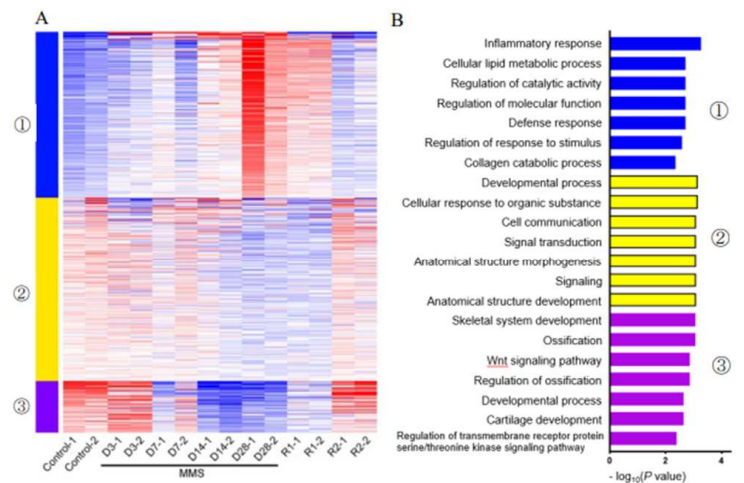


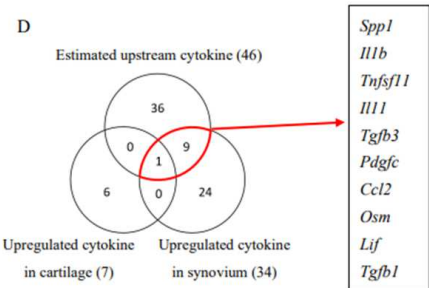
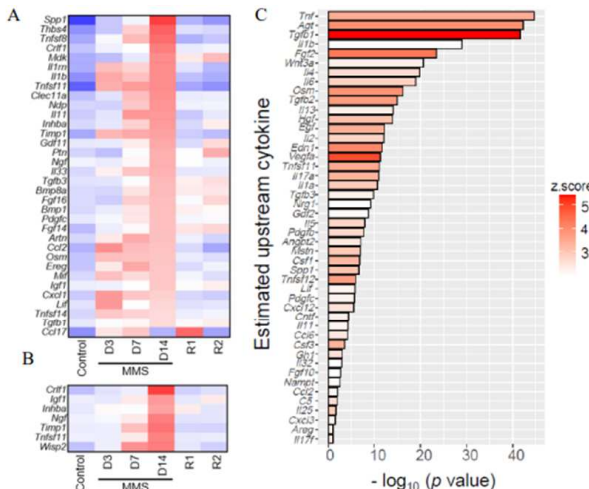
図 9. 軟骨遺伝子発現変化のクラスタリング

A: 軟骨の遺伝子発現のパターンによってクラスタリングを行い、①MMS 群で上昇する遺伝子、②MMS 群で緩徐に低下する遺伝子、③MMS 群で晩期に顕著に低下する遺伝子の 3 つのパターンにクラスタリングされた。

B: それぞれのクラスターで特徴的な GO pathway を列挙した。①では炎症反応や Catabolic な pathway が、②③では基質合成に関するものが上位にあがった。

4-3-3. 軟骨の遺伝子発現変化を引き起こす上流液性因子の探索

OA ではサイトカインや成長因子などの液性因子が軟骨変性に関わることが知られているが、本研究でも液性因子に注目して解析を進めた。MMS D14 滑膜で Control と比較して発現が上昇 (fold change>2) していた液性因子を抽出してヒートマップを作成すると、MMS 群滑膜では *Il1b* や *Osm*, *Tgfb1* など、OA 関連因子としても有名な液性因子が多数上昇していた (図 10A)。MMS D14 軟骨で同様に発現が上昇していた液性因子は滑膜と比較すると顕著に少ない数であった (図 10B)。Bulk RNA-seq で得られた MMS D14 軟骨の遺伝子変化を元に、IPA を用いて上流液性因子を探索した。Z score>2, p value<0.05 をともに満たす予測上流液性因子は 46 個存在し、そのうち 10 個は MMS 群の滑膜で実際に遺伝子発現が上昇しており、また、MMS 群の軟骨でも実際に遺伝子発現が上昇しているものは 1 個 (*Tnfsf11*) のみであった (図 10C, D)。これら 10 個の遺伝子が MMS モデルの軟骨変性に寄与していると考えられた。



10. 滑膜で分泌される液性因子が、軟骨変性に寄与していると考えられた

A: MMS モデル滑膜で上昇した液性因子のヒートマップ。
 B: MMS モデル軟骨で上昇した液性因子のヒートマップ。
 C: MMS D14 軟骨の遺伝子発現を元に、IPA が予測した上流因子 46 個
 D: 予測上流因子のうち、10 遺伝子は実際に MMS 滑膜で発現が上昇していた。

4-4. scRNA-seq

4-4-1. 滑膜全体のクラスタリング

Control および MMS D14 群の滑膜を merge し、全体の UMAP を作成し、遺伝子発現パターンを元に 15 個のクラスターに分類した。また、それぞれのマーカー遺伝子の発現から、Lining fibroblast, Sublining fibroblast, Immune cell, Endothelial cell, Smooth muscle cell の 5 つの大分類を設定した (図 11)。

Cluster Profiler を用いて、15 個それぞれのクラスターで上昇している GO pathway を示すと、MMS 特異的な cluster4 では connective tissue development, collagen metabolic process, collagen fibril organization などの pathway が上昇しており、強い線維化を伴う組織学的所見と矛盾しないものであった。また、MMS 特異的なもう一つの cluster10 では、白血球や免疫応答に関する pathway が上昇しており、免疫細胞の中でも炎症性のクラスターであることが示唆された (図 12)。

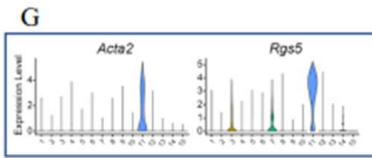
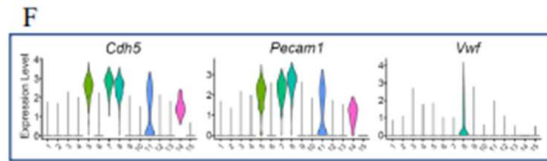
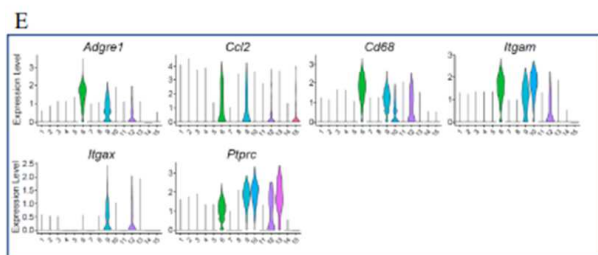
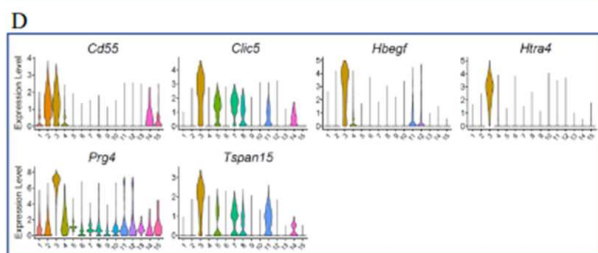
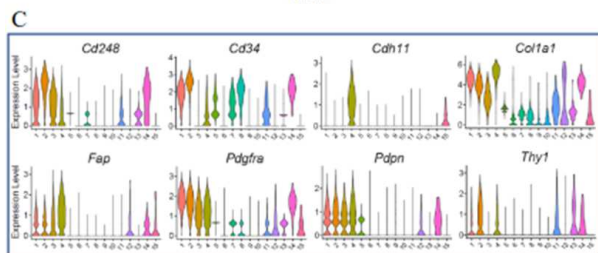
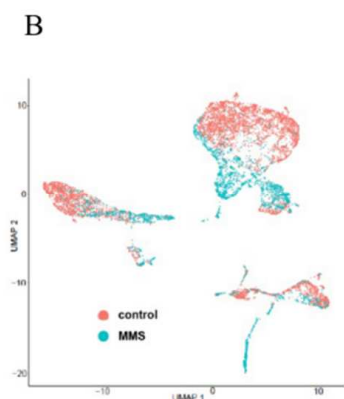
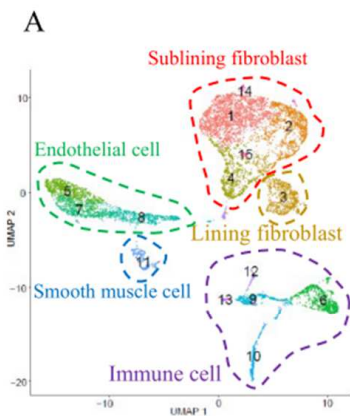


図 11. 滑膜全体のクラスタリング

A: 滑膜全体を 15 個にクラスタリングした。さらに、5 つの大分類を表示した。

B: Control 群と MMS 群で分けて UMAP で表示した。Cluster4 と 10 は MMS 群に特異的であった。

C: 線維芽細胞マーカーでの violin plot。

D: 表層線維芽細胞マーカーでの violin plot。

E: 免疫細胞マーカーでの violin plot。

F: 血管内皮細胞マーカーでの violin plot。

G: 平滑筋細胞マーカーでの violin plot。

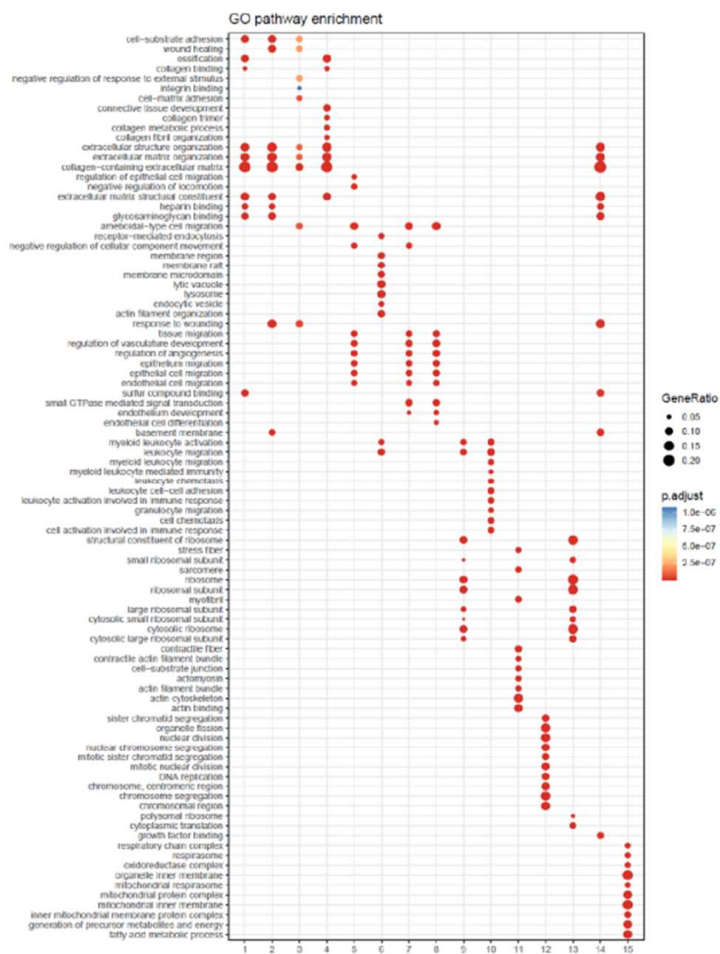


図 12. 滑膜それぞれのクラスターで上昇している GO pathway

MMS 特異的な cluster4 では connective tissue development, collagen metabolic process, collagen fibril organization などの pathway が上昇しており、強い線維化を伴う組織学的所見とも矛盾しないものであった。また、MMS 特異的なもう一つの cluster10 では、白血球や免疫応答に関する pathway が上昇しており、免疫細胞の中でも炎症性のクラスターであることが示唆された。

4-4-2. 線維芽細胞のサブクラスタリング

滑膜細胞の中から線維芽細胞のクラスターを抽出し、遺伝子発現の結果から、Col15a1+fibroblast, Pi16+fibroblast, Myofibroblast, Lining fibroblast の4つのサブクラスターに分類した (図 13A)。その中で、Myofibroblast が MMS 群で特異的であり、そのクラスターは Spp1, Cthrc1, Clqtnf3 など、線維化関連遺伝子を一時的に発現していた (図 13A-C)。章 4-3-3. 前述した、IPA が上流液性因子として予測した 10 遺伝子のうち、Spp1, Tnfsf11, Tgfb1, Tgfb3, Pdgfc, Il11 は滑膜線維芽細胞から強く発現しており、中でも MMS 群特異的な Myofibroblast で特に強く発現していた。このクラスターは線維芽細胞の中でも特に活性化が顕著なクラスターで、軟骨変性に寄与していると考えられた (図 14)。

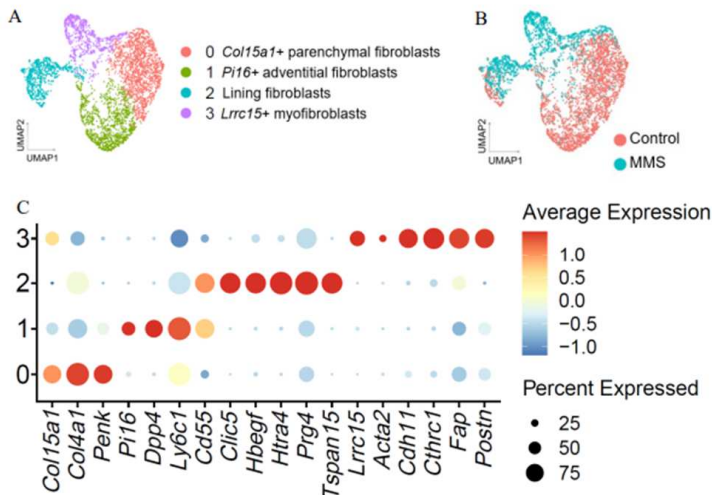
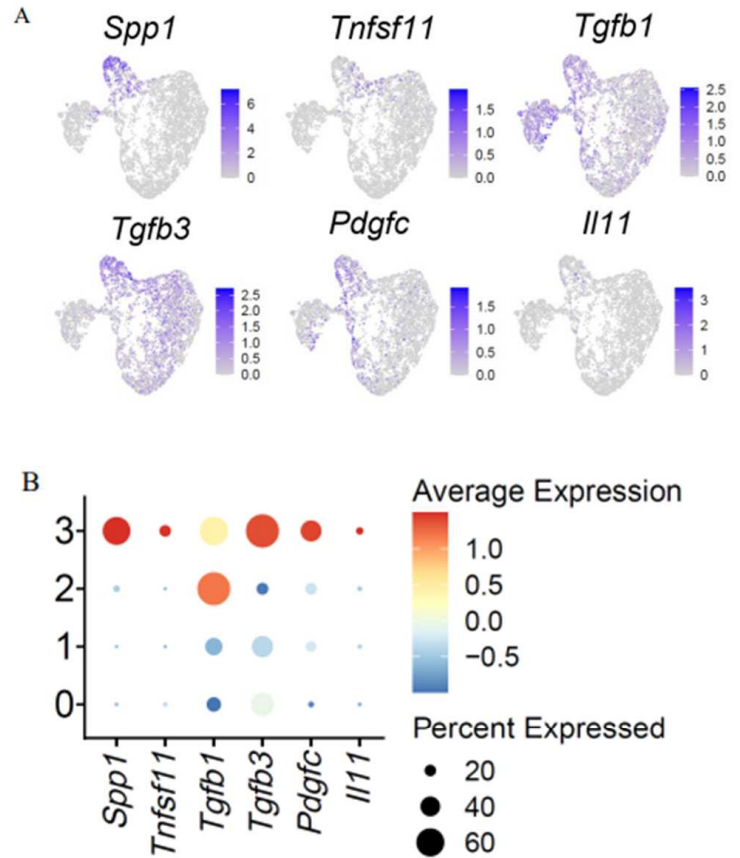


図 13. 滑膜線維芽細胞のサブクラスタリング

A: 滑膜線維芽細胞を抽出、サブクラスタリングした。(Dimension:1:10, resolution:0.1)
 B: 滑膜線維芽細胞を control, MMS 群に分けて UMAP で表示した。Cluster3 は MMS 群で特異的であった。
 C: 各クラスターで代表的な遺伝子発現を dot plot で表示した。



14. 滑膜線維芽細胞の中で、MMS 群特異的なクラスターは、軟骨変性を促す液性因子を多く発現していた。

A: それぞれの液性因子の発現を feature plot 上で表示した。
 B: それぞれの液性因子の発現を dot plot で表示した。図 11 で IPA が予測した、軟骨変性の原因となり得る上流液性因子 10 個のうち、Spp1, Tnfsf11, Tgfb1, Tgfb3, Pdgfc, Il11 は、主に cluster3 で強く発現していた。

4-4-3. 免疫細胞のサブクラスタリング

次に、滑膜細胞の中から免疫細胞のクラスターを抽出し、さらに 6 つにサブクラスタリングした。その遺伝子発現をもとに、cluster1: Resident-like macrophage, cluster2: MHC II+ macrophage, cluster3: Inflammatory macrophage, cluster4: Stmn1+ macrophage, cluster5: Lymphocyte, cluster6: Monocyte と分類した (図 15A)。その中で、Inflammatory macrophage であるクラスター3 が MMS 群で特異的であり、そのクラスターは Cxcl2, S100a9 など、一般的に炎症性マクロフ

ァージで発現している遺伝子を特異的に発現していた (図 15A-C)。IPA が上流液性因子として予測した 10 遺伝子のうち、*Tgfb1*, *Il1b*, *Ccl2*, *Osm* はマクロファージから強く発現しており、中でも *Il1b*, *Osm* は MMS 群特異的なクラスター3 で特に強く発現している傾向にあった (図 16A, B)。

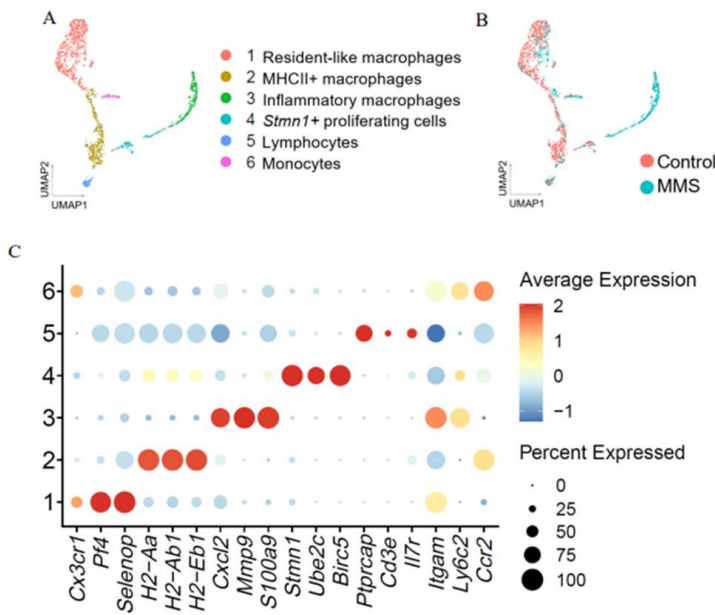


図 15. 免疫細胞のサブクラスタリング

A: 免疫細胞を抽出、サブクラスタリングした。
(Dimension:1:10, resolution:0.1)
B: Control 群と MMS 群で分けて UMAP で表示した。
C: 各クラスターで代表的な遺伝子発現を dot plot で表示した。

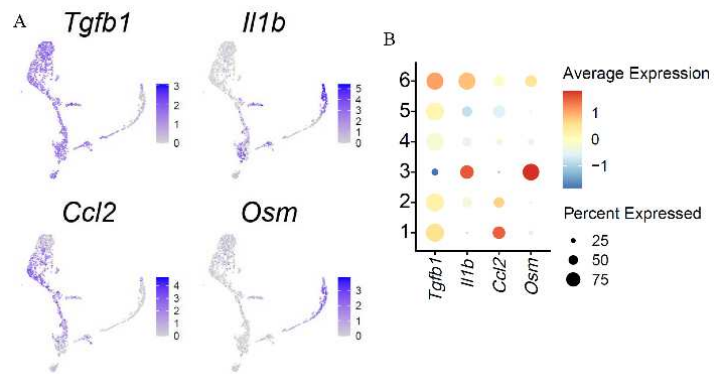


図 16. 滑膜免疫細胞の中で、MMS 群に特異的なマクロファージのクラスターは、軟骨変性を促す液性因子を発現していた。

A: それぞれの液性因子の発現を UMAP 上で表示した。
B: それぞれの液性因子の発現を dot plot で表示した。図 11 で IPA が予測した、軟骨変性の原因となり得る上流液性因子 10 個のうち、*Il1b*, *Osm* は主に cluster3 で、*Tgfb1*, *Ccl2* は、滑膜の複数のクラスターで広く発現していた。

4-5. マクロファージおよび線維芽細胞の経時的変化

前述の活性化線維芽細胞と炎症性マクロファージのどちらが先に誘導されてくるのかを調べるために、より細かい時間軸で、遺伝子発現およびタンパク発現を評価する方針とした。

4-5-1. 免疫染色での経時的変化

CD68 および COL1A1 の抗体を用いて免疫組織染色を行うと、MMS D3 の時点で CD68 陽性細胞 (マクロファージ) は lining layer を中心に増殖した (図 17A, B)。Sublining layer のマクロファージは D3 の時点で増加していたが、D14 まで経時的に増加する傾向にあった (図 17A, C)。COL1A1 陽性領域 (線維化) は MMS D3 の時点で Control と著変ないが、MMS D14 になると陽性領域が顕著に増加し、特に深層まで広がった (図 17A, D)。

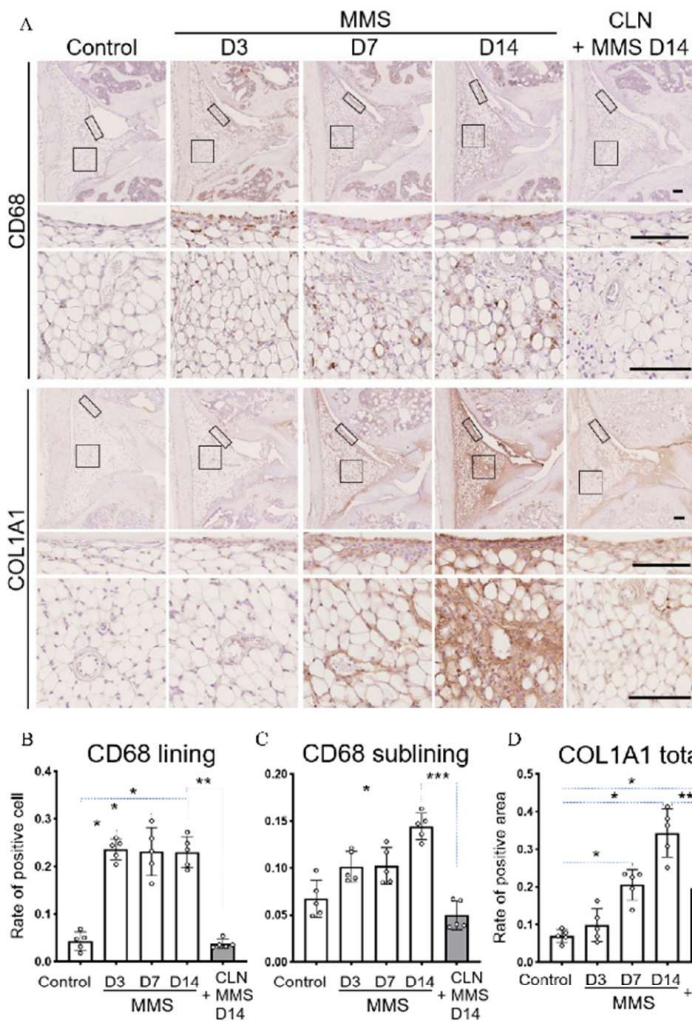


図 17. MMS モデル滑膜では、早期から特に Lining layer でマクローファージが強く増殖し、線維化は遅れて進行した。

A: マウス膝滑膜の CD68 免疫染色組織像 (上段) および COL1A1 免疫染色像 (下段)。CD68 免疫染色では、特に Lining layer のマクローファージの時点で顕著に増殖した。Clodronate liposome (4-6 章) により、および sublining のマクローファージはいずれも大部分が除去された。COL1A1 免疫染色では、D3 の時点で明らかな線維化の進行はなかった。D7, D14 と経時的に徐々に線維化が進行した。(Scale bar: 100 μ m)

B: Lining layer における CD68 の陽性細胞率の棒グラフ (n=5, *P<0.05, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel 検定。 **P<0.01, Mann-Whitney の u 検定。)

C: Sublining layer における CD68 の陽性細胞率の棒グラフ (n=5, *P<0.05, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel 検定。 ***P<0.001, Mann-Whitney の u 検定。)

D: 滑膜全体における COL1A1 の陽性領域率の棒グラフ (n=5, *P<0.05, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel 検定。 **P<0.01, Mann-Whitney の u 検定。)

4-5-2. Bulk RNA-seq での経時的変化

MMS D3 滑膜および MMS D14 滑膜のそれぞれの群 (n=3) で Control 群と比較して発現変動した遺伝子たちを Volcano Plot で表示し、顕著に上昇した 20 遺伝子を記名した。MMS D3 滑膜では *Lcn2*, *Slpi*, *Ptx3*, *Wfdc17*, *Ccl8* など、自然免疫応答に関わり、GO pathway でも innate immune response に含まれる遺伝子群が顕著に増加していた。一方、MMS D14 滑膜では、*Col11a1*, *Col12a1*, *Cthrc1*, *Spp1*, *Postn* など、線維芽細胞および線維化関連遺伝子の上昇が顕著であった (図 18)。

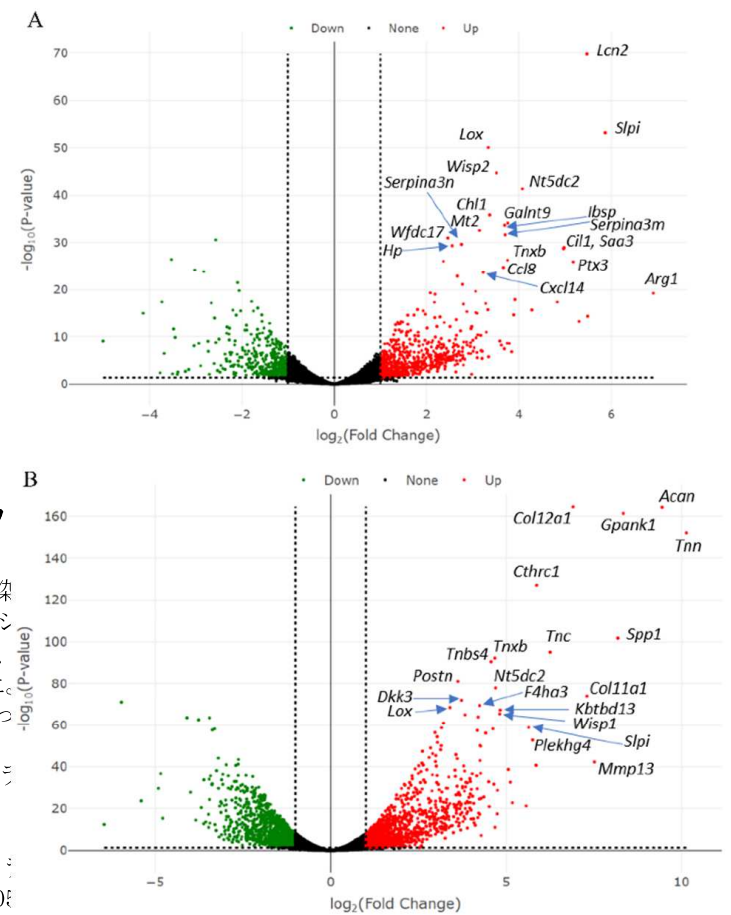


図 18. MMS モデル滑膜の遺伝子発現も、マクローファージの早期での増殖を示唆した

A: control を基準とした MMS D3 の遺伝子発現を示した volcano Plot。 *Lcn2*, *Slpi*, *Ptx3*, *Wfdc17*, *Ccl8*, *Arg1* など、自然免疫応答に関わる遺伝子が顕著に増加していた。

B: control を基準とした MMS D14 の遺伝子発現を示した volcano Plot。 *Col11a1*, *Col12a1*, *Cthrc1*, *Spp1*, *Postn* など、線維化関連遺伝子の上昇が目立った。

4-5-3. リガンド-レセプター解析によるマクロファージと線維芽細胞の関係

scRNA-seq による各細胞のリガンドおよびレセプター、その下流遺伝子の発現を元に、Nichenet を用いたリガンド-レセプター解析を行った。マクロファージから活性化線維芽細胞に向かう活発なリガンド-レセプター関係が存在した (図 19)。

これら免疫染色や遺伝子発現の時間経過からは、MMS モデル滑膜ではまず炎症性マクロファージが増殖し、それが線維芽細胞を活性化すると考えられたため、引き続いてマクロファージを枯渇する介入実験を行う方針とした。

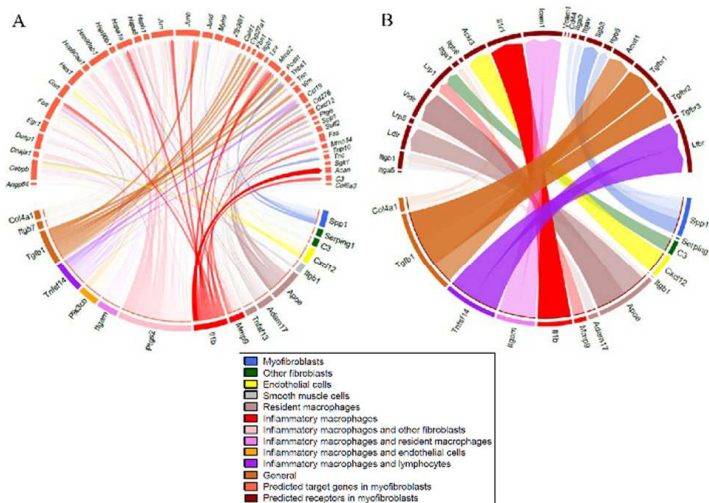


図 19. Nichenet を用いたリガンド-レセプター解析

A: receiver を myofibroblast としたリガンド-ターゲット遺伝子解析を circos plot で視覚化したもの。特に Inflammatory macrophage から myofibroblast に向かう活発な ligandtarget gene の関係があった。

B: receiver を myofibroblast としたリガンド-レセプター解析を circos plot で視覚化したもの。特に Inflammatory macrophage から myofibroblast に向かう活発な ligandreceptor の関係があった。

4-6. Clodronate liposome 関節内注射によるマクロファージ枯渇効果の検証

MMS モデルにおいて、マクロファージを枯

渇させることで線維化および軟骨変性にどのような変化が起こるかを検証した。まず関節内注射によりマクロファージの減少効果が得られていることを組織学的に確認した。免疫染色の陽性細胞率を利用して計測した一度の関節内注射における滑膜でのマクロファージ除去効果は、注射後 2 週間の時点で lining layer で 84%, sublining layer で 66%であった (図 17A-C)。この結果

および、Clodronate liposome 関節内投与におけるマクロファージ枯渇効果は投与後 7 日で最も強く、30 日経過するとマクロファージが 60%程度回復するという過去の報告 (23) から、本実験では Clodronate liposome を図 3 に示す通りに 2 週間おきのスケジュールで関節内に局所投与し、その組織学的検討および遺伝子発現の検討を行った。

Clodronate liposome 投与群では、control liposome 投与群と比較して、蛍光多重免疫染色でもマクロファージが顕著に減少しているとともに、線維化の指標である COL1A1 の発現領域も顕著に減少していた (図 20A)。また、MMS D14 の時点で Col1a1, Spp1, Cdh11, Fap などの線維芽細胞関連遺伝子の発現が有意に低下していた (図 20B)。Saf 0 染色で軟骨損傷を評価すると、MMS D28, D42 いずれの時点においても軟骨損傷は抑制された (図 20C, D)。

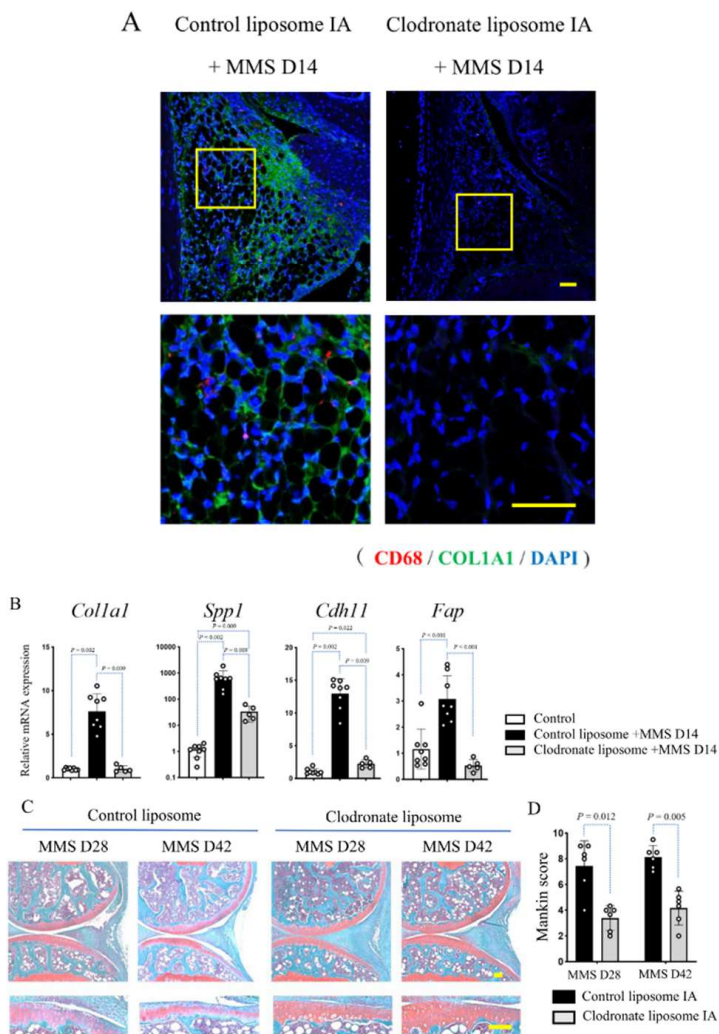


図 20. Clodronate liposome 関節内投与すると、線維化および軟骨変性は抑制された。

A: マウス滑膜の蛍光免疫化学染色。Clodronate 投与群で COL1A1 沈着が減少した (Scale bar: 100 μ m)。
 B: Clodronate 投与群滑膜で線維化関連遺伝子の発現が低下した (n=5-8, Kruskal-Wallis 検定の後に Steel-Dwass 検定)。
 C: マウス軟骨の代表組織像 (Saf O 染色, scale bar: 100 μ m)。
 D: Clodronate 投与群で軟骨損傷が改善した (n=6, Mann-Whitney の u 検定)。

5. 考察

本研究では、関節への荷重および運動を排除した MMS モデルを独自に作成した。関節を免荷するモデルとして、尾部懸垂は過去にも広く使用されている方法で、廃用による筋骨格や心血管機能などの全身の評価として用いられてきた (24)。また、関節を固定する方

法として、過去には K-wire を大腿骨および脛骨に挿入した創外固定が報告されている (25)が、マウスに経皮的に挿入することは困難であり、皮膚を大きく切開し、マウスにとって比較的太い K-wire を少なくとも 2 本挿入する処置は非常に侵襲が大きく、全身および関節への影響が無視できないと考えられた。本研究で作成した MMS モデルは、外科的侵襲を加えることなく関節への荷重および運動を排除できるという点で、関節内の評価に適していると考えられた。

MMS モデルの期間として、本研究では 3 日～6 週間という期間を設定した。ヒトの指関節において 3-5 週間で拘縮が生じるという報告 (26) や、マウスの膝関節で免荷および固定を 4 週間以上継続すると軟骨変性が生じるという報告 (25) を参考にし、事前検討を行ったうえでモデルの期間を決定した。

MMS モデルにおいて関節内を組織学的に評価すると、滑膜炎が軟骨損傷に先行することが明らかとなった。滑膜炎は 2 週間でピークに達したが、軟骨損傷は 6 週まで徐々に進行した。滑膜炎は 2 週以降、MMS モデルを継続しても悪化傾向が見られなかった。これは、滑膜炎が 2 週の時点で末期まで進行したことに加え、何らかの保護的作用が関節に働いた可能性があるが、解明にはさらなる検証が必要である。

さらに、途中で関節の固定を解除すると滑膜炎が改善した。また、軟骨に関しては、免荷を継続し固定のみを解除した群でも、ある程度軟骨変性が抑制されることが分かった。これは、廃用による滑膜炎が可逆的であり、関節運動が滑膜を正常に保つのに非常に重要であり、滑膜を正常に保つことが軟骨変性を抑制させることを示唆していると考えられた。

本研究では、これらの組織学的知見に加えて、網羅的な RNA-seq および一細胞ごとの RNA-seq を組み合わせることで、詳細な分子メカニズムについて検討した。Bulk RNA-seq では、MMS モデル滑膜において MMPs などの細胞外基質分解酵素や Spp1 などの線維化関連遺伝子の他に、Col2a1 や Acan などの軟骨基質を構成する遺伝子の上昇があり、軟骨への分化傾向が見られた(図 7C)。もともと滑膜、軟骨はともに中胚葉から分化した組織であるが、動かさなくなった関節では滑膜-軟骨間の遺伝子発現パターンにおける境界が曖昧になり、滑膜の遺伝子発現パターンが軟骨に似通っていくという興味深い結果であった。これは、滑膜が本来の滑膜としての遺伝子発現パターンを維持するために、関節運動が必要であるということを示唆していると考えられた。また、MMS モデルにおける滑膜の遺伝子発現変化は可逆的であり、MMS 群で変化した滑膜の遺伝子パターンは関節を動かすことでコントロール群に近い状態に戻った。また、軟骨では、関節を動かし、かつ荷重も開始した R2 群ではコントロール群に近い状態に戻ったが、関節を動かして免荷は継続した R1 群ではある程度戻ったものの、R2 群ほどではなかった。この事実は、軟骨にとっては可動とともに、荷重も重要な要素であることを示唆していると考えられた。また、MMS 群滑膜で低下していた遺伝子は脂肪関連 pathway に属するものが多く、MMS 群滑膜で上昇していた遺伝子が基質合成関連 pathway に属するものが多いという RNA-seq の知見は、実際に MMS 群滑膜で脂肪組織が減少し線維化が進行している組織学的所見と強く合致するものであった。

滑膜の scRNA-seq では、線維芽細胞、免疫細胞がともに過去の報告と矛盾しないクラ

スターにそれぞれ分類された(27, 28)。線維芽細胞およびマクロファージで共に MMS 群特異的なクラスターを同定した。これらのクラスターでは IPA で予測された上流液性因子を多く発現しており、bulk RNA-seq と scRNA-seq の間の良好な整合性を示しており、これらの結果の妥当性を裏付けるものであった。これらの液性因子のうち、Tgfb は関節恒常性維持に重要なサイトカインであることは古くから知られており、OA においては Tgfb の発現亢進により線維化、骨棘形成や軟骨下骨の変化をもたらすとされている(29-32)。また、Il-1 β や Osm, Cc12, LIF などのサイトカインも、OA の病態生理に強く関わっている(15, 33, 34)。また、関節リウマチなどの炎症性関節炎では Tnfsf11(RANKL)の発現が著増し骨吸収に関わり(13, 14, 35)、滑膜マクロファージの Spp1 陽性クラスターは炎症性および骨吸収を促す傾向が強いとされている(12)。さらに Il11 は Osm, LIF とともに Il-6 ファミリーに属するサイトカインであり、RA の線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージで産生される炎症性サイトカインとしての一面を持つ(36)。Pdgfc は Pdgf ファミリーの一つで、Pdgfa や Pdgfb と比較して最近発見されたものであり関節症についての報告は少ないが、RA および OA の滑膜細胞で強く発現しているという報告(37)があるほか、Pdgfc トランスジェニックマウスが線維芽細胞の強い増殖を伴う心肥大があるなどの報告(38)や、腎線維症で Pdgfc の発現が増殖しており、Pdgfc アンタゴニストが腎線維化を改善するなどの報告(39)から、線維化に重要な役割を果たすとされる。このように、力学的ストレスを失った関節は、OA や RA を誘導する炎症性サイトカインや線維化関連因子など、さまざまな液性因子を滑膜マ

クロファージや線維芽細胞から分泌し、軟骨変性を促すことが分かった。これら液性因子は、関節リウマチへの抗 IL-6 抗体や抗 TNF- α 抗体などと同様に、廃用関節の今後の治療標的となる可能性がある。しかしながら、多因子が寄与する変形性関節症に対する抗体治療のエビデンスが乏しいのと同様に、その効果については今後さらなる検討が必要である。

さらに本研究では、線維芽細胞およびマクロファージの特異的なクラスターがどのような順序で出てくるのか、力学的ストレスをまず感知するのはどちらなのかという疑問に対して、細かく経時的に遺伝子発現およびタンパク発現を追った。免疫組織染色からは、MMS モデル滑膜ではまずマクロファージが増殖し、続いて線維芽細胞が増殖、活性化すると考えられた。特に、lining layer に存在するマクロファージが炎症性マクロファージとして増殖し、経時的に sublining layer に移行していくことが示唆された。この結果は、過去の報告で滑膜 lining layer では Cx3cr1 陽性のマクロファージが関節を保護するバリアを形成しており、炎症性関節疾患ではバリアが破綻し、深層に移行するという報告(28)と矛盾しないものであった。さらに、4-5-1. に示した経時的な遺伝子発現からは、MMS D3 の滑膜では免疫応答に関与する遺伝子が上昇していた。特に Lcn2 は炎症状態でマクロファージにおいて強く発現し、マクロファージの polarization を調整することで炎症状態を制御するアディポカインであることが示されており(40, 41)、Slpi もマクロファージの活性をコントロールし、創傷治癒において重要な役割を果たすことが知られている(42)。一方、MMS D14 の滑膜では、Spp1, Tnn, Col11a1, Col12a1, Postn, Cthrc1

など、線維化関連、細胞外基質関連の遺伝子が上昇していた。これらの bulk RNA-seq の遺伝子発現の経時的変化は、MMS モデル滑膜で早期に炎症性マクロファージが増殖し、その後線維芽細胞の活性が進行していくという免疫染色の結果に沿うものであった。また、scRNA-seq のデータを用いて行った解析でも、マクロファージから活性化線維芽細胞に向かう活発なリガンド - レセプター関係があり、マクロファージ→線維芽細胞の順序を裏付けるものであった。過去の研究でも、RA において炎症性マクロファージが線維芽細胞の浸潤性を高めることがヒト検体滑膜の scRNA-seq および in vitro で報告されている(43)が、本研究においても最初に力学的ストレスの消失を感知し増殖した炎症性マクロファージが、線維芽細胞を活性化していると考えられた。そこで、この仮説の妥当性を検証すべく、MMS モデルマウスで関節内のマクロファージを枯渇させるために Clodronate liposome を関節内投与すると、組織学的に線維化が抑制されるとともに、線維化関連遺伝子の発現も低下した。さらに、このマウスでは MMS モデルによる軟骨変性も抑制された。これは、炎症性マクロファージと、それに伴って活性化した線維芽細胞が、協同して軟骨変性を促すという、経時的組織学的所見や bulk RNA-seq および scRNA-seq から導き出された仮説を支持するものであった。

これらのことから、力学的ストレスを失った関節は、最初に滑膜マクロファージがそれを感知し、炎症性マクロファージが増殖することで滑膜線維芽細胞を増殖、活性化し、マクロファージと線維芽細胞が協同して軟骨変性を促すことが示された。これら一連の結果から、関節運動を最初に感知する細胞は滑膜マクロファージであり、適度な関節運動は

滑膜を正常な状態に保つことで、関節恒常性維持に寄与していることが示唆された(図22)。本研究における、力学的ストレス消失による滑膜炎という生体反応は、「関節を動かさなければならない」という合図を自分自身の体にする、いわゆる防御機構の一つであると思われた。

本研究の limitation として、まず、本モデルにおいて、関節運動と荷重を完全には分離できていない点、また、血流による影響を排除できない点が挙げられる。前者については、関節を動かすことで大腿四頭筋などの周囲筋による関節への圧迫力がかかると考えられる。また、後者については、関節を固定すると、関節を動かす場合と比較して血流が悪くなると考えられ、この影響を排除できない点も limitation の一つである。

さらに、本研究はマウスのみの実験であり、ヒトの検体を用いていないことが挙げられる。ヒトの廃用関節については、OA や RA と異なり手術適応になることが少なく、検体を得られないことが障壁となっており、今後の課題と考えられる。また、今回の研究から、最初に力学的ストレスを感知する細胞が滑膜マクロファージであることが示唆されたが、実際にマクロファージのどの受容体がどのように力学的ストレスを感知しているか、という細胞レベルのメカノトランスダクション機構を検討していないことも本研究の limitation である。本研究の免疫染色の結果からは力学的ストレスを感知する細胞は特に滑膜の lining layer に存在する組織在住マクロファージであると考えられる。また、bulk RNA-seq および scRNA-seq からは、実際に軟骨変性を促す炎症性マクロファージのクラスターは Ly6c2 を発現しており、単球由来のマクロファージであると推測される。

しかしながら、力学的ストレスの消失がどのような機構で lining layer のマクロファージを増殖させ、単球由来のマクロファージを呼び寄せるのか、具体的なメカノトランスダクション機構の検証については今後の課題である。

また、リガンド-レセプター解析は解析者自身で sender および receiver を設定できる点から、恣意的な要素を排除できるものではないが、組織学的および bulk RNA-seq でもマクロファージから線維芽細胞への作用が示唆されるため、これらの仮説を立証する一助になり得ると考える。

また、Clodronate liposome のマクロファージ除去効果が 100%ではない点、さらにマクロファージ以外への影響を除外できないことも、介入実験の limitation であると思われた。

OA の症状を改善するために適度な関節運動が大切であることは、様々な研究で示されており(44-46)、整形外科医としても臨床的にしばしば経験することであるが、どうして適度な関節運動が大切なのか、なぜ関節を動かさないことが関節にとって悪いのかについての詳細な分子メカニズムは現在まで未知であった。本研究で得られた知見は、関節恒常性維持機構のメカニズムについて一石を投じ、今後様々な関節の変性疾患に対する病態解明および治療戦略の一助になることが期待される。

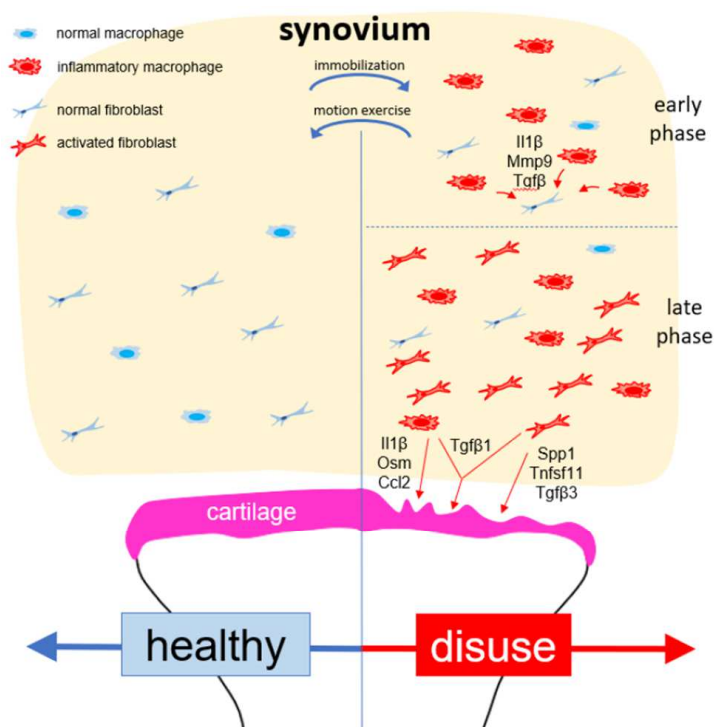


図 22. 力学的ストレスから見た関節恒常性維持機構

関節において、適度な力学的ストレスがかかった環境 (healthy state) ではマクロファージおよび線維芽細胞が正常な状態に保たれているが、力学的ストレスを失った環境 (disuse state) では、まずマクロファージが感知し、炎症性マクロファージが増殖し、IL1 β などを介して線維芽細胞を活性化する。炎症性マクロファージと活性化線維芽細胞は、協同してさまざまな液性因子を介して軟骨変性を促していく。Healthy/disuse 間の滑膜の状態はある程度の可逆性を示し、disuse state にある関節でも軟骨変性が顕著でない段階であれば関節運動を行うことで healthy state に近い状態に戻ることが可能である。

引用文献

1. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, et al. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: there search on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(5):620-8.
2. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2021.
3. Katano H, Ozeki N, Kohno Y, Nakagawa Y, Koga H, Watanabe T, et al. Trends in arthroplasty in Japan by a c

omplete survey, 2014-2017. *J Orthop Sci.* 2021 Sep;26(5):812-822.

4. Hinterwimmer S, Krammer M, Krotz M, Glaser C, Baumgart R, Reiser M, et al. Cartilage atrophy in the knees of patients after seven weeks of partial load bearing. *Arthritis Rheum.* 2004;50(8):2516-20.
5. Tunç H, Oken O, Kara M, Tiftik T, Doğu B, Unlü Z, et al. Ultrasonographic measurement of the femoral cartilage thickness in hemiparetic patients after stroke. *International journal of rehabilitation research Internationale Zeitschrift für Rehabilitationsforschung Revue internationale de recherches de readaptation.* 2012;35(3):203-7.
6. Yilmaz B, Demir Y, Özyörük E, Kesikburun S, Güzelküçük Ü. The effect of knee joint loading and immobilization on the femoral cartilage thickness in paraplegics. *Spinal cord.* 2016;54(4):283-6.
7. Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, et al. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1-NF- κ B pathway. *Nat Commun.* 2019;10(1):1442.
8. Baker K, Grainger A, Niu J, Clancy M, Guermazi A, Crema M, et al. Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(10):1779-83.
9. Felson DT, Niu J, Neogi T, Goggins J, Nevitt MC, Roemer F, et al. Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the MOST Study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(3):458-64.
10. Atukorala I, Kwok CK, Guermazi A, Roemer FW, Boudreau RM, Hannon MJ, e

- t al. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? *Ann Rheum Dis.* 2016;75(2):390–5.
11. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol.* 2019;20(7):928–42.
 12. Alivernini S, MacDonald L, Elmesmarri A, Finlay S, Tulusso B, Gigante MR, et al. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2020;26(8):1295–306.
 13. Croft AP, Campos J, Jansen K, Turner JD, Marshall J, Attar M, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature.* 2019.
 14. Mizoguchi F, Slowikowski K, Wei K, Marshall JL, Rao DA, Chang SK, et al. Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nat Commun.* 2018;9(1):789.
 15. Chou CH, Jain V, Gibson J, Attarian DE, Haraden CA, Yohn CB, et al. Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Sci Rep.* 2020;10(1):10868.
 16. Krämer A, Green J, Pollard J, Jr., Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2014;30(4):523–30.
 17. Cake MA, Smith MM, Young AA, Smith SM, Ghosh P, Read RA. Synovial pathology in an ovine model of osteoarthritis: effect of intraarticular hyaluronan (Hyalgan). *Clinical and experimental rheumatology.* 2008;26(4):561–7.
 18. van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyer R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 1992;10(1):58–61.
 19. Ge SX, Son EW, Yao R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC bioinformatics.* 2018;19(1):534.
 20. Su W, Sun J, Shimizu K, Kadota K. TCC-GUI: a Shiny-based application for differential expression analysis of RNA-Seq count data. *BMC research notes.* 2019;12(1):133.
 21. Zappia L, Oshlack A. Clustering trees: a visualization for evaluating clusterings at multiple resolutions. *GigaScience.* 2018;7(7).
 22. Browaeys R, Saelens W, Saeys Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nature methods.* 2020;17(2):159–62.
 23. van Lent PL, van den Bersselaar L, van den Hoek AE, van de Ende M, Dijkstra CD, van Rooijen N, et al. Reversible depletion of synovial lining cells after intra-articular treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Rheumatol Int.* 1993;13(1):21–30.
 24. Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat*

- Med. 2013;19(1):93-100.
25. Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Kohara Y, Takano S, Wakimoto Y, et al. Thinning of articular cartilage after joint unloading or immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(5):727-36.
 26. Yoon SH, Cha J, Lee E, Kwon B, Cho K, Kim S. Acupotomy treatment for finger joint contracture after immobilization: Case report. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Mar 12;100(10):e24988.
 27. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurthy AT, Cox C, Calviello AK, Wang A W, Yang YA, Tam L, Caothien R, Roose-Girma M, Modrusan Z, Arron JR, Bourgon R, Müller S, Turley SJ. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*. 2021 May;593(7860):575-579.
 28. Culemann S, Grüneboom A, Nicolás-Ávila J, Weidner D, Lämmle KF, Rothe T, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature*. 2019;572(7771):670-5.
 29. Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, et al. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(2):128-36.
 30. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, vanden Berg WB. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(1):507-14.
 31. Xie L, Tintani F, Wang X, Li F, Zhen G, Qiu T, et al. Systemic neutralization of TGFβ attenuates osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1376(1):53-64.
 32. Jiao K, Zhang M, Niu L, Yu S, Zhen G, Xian L, et al. Overexpressed TGF-β in subchondral bone leads to mandibular condyle degradation. *Journal of dental research*. 2014;93(2):140-7.
 33. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42.
 34. Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):47-57.
 35. Papadaki M, Rinotas V, Violitzi F, Thireou T, Panayotou G, Samiotaki M, et al. New Insights for RANKL as a Proinflammatory Modulator in Modelled Inflammatory Arthritis. *Front Immunol*. 2019;10:97.
 36. Elshabrawy HA, Volin MV, Essani AB, Chen Z, McInnes IB, Van Raemdonck K, et al. IL-11 facilitates a novel connection between RA joint fibroblasts and endothelial cells. *Angiogenesis*. 2018;21(2):215-28.
 37. Pohlers D, Huber R, Ukena B, Kinne RW. Expression of platelet-derived growth factors C and D in the synov

- ial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):788-94.
38. Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nature cell biology.* 2000;2(5):302-9.
 39. van Roeyen CRC, Martin IV, Drescher A, Schuett KA, Hermert D, Raffetser U, et al. Identification of platelet-derived growth factor C as a mediator of both renal fibrosis and hypertension. *Kidney international.* 2019;95(5):1103-19.
 40. Du H, Liang L, Li J, Xiong Q, Yu X, Yu H. Lipocalin-2 Alleviates LPS-Induced Inflammation Through Alteration of Macrophage Properties. *Journal of inflammation research.* 2021;14:4189-203.
 41. Shen H, Wang Z, Huang A, Zhu D, Sun P, Duan Y. Lipocalin 2 Is a Regulator During Macrophage Polarization Induced by Soluble Worm Antigens. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2021;11:747135.
 42. Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med.* 2000;6(10):1147-53.
 43. Kuo D, Ding J, Cohn IS, Zhang F, Wei K, Rao DA, et al. HBEGF(+) macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness. *Science translational medicine.* 2019;11(491).
 44. de Matos Brunelli Braghin R, Libardi EC, Junqueira C, Rodrigues NC, NogueiraBarbosa MH, Renno ACM, et al. The effect of low-level laser therapy and physical exercise on pain, stiffness, function, and spatiotemporal gait variables in subjects with bilateral knee osteoarthritis: a blind randomized clinical trial. *Disability and rehabilitation.* 2019;41(26):3165-72.
 45. Chen H, Zheng X, Huang H, Liu C, Wan Q, Shang S. The effects of a home-based exercise intervention on elderly patients with knee osteoarthritis: a quasi-experimental study. *BMC musculoskeletal disorders.* 2019;20(1):160.
 46. Ojoawo AO, Olaogun MO, Hassan MA. Comparative effects of proprioceptive and isometric exercises on pain intensity and difficulty in patients with knee osteoarthritis: A randomized control study. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine.* 2016;24(6):853-63..