

人工股関節全置換術の長期耐性を可能とする補助療法開発のための分子生物学的研究

北海道大学病院 整形外科
清水智弘

研究の背景

インプラントおよびマテリアルの技術の発展により THA の寿命が延長しているものの、依然として再手術(再置換術)の最大の要因は無菌性緩みであり、THA 術後再置換術の原因の 55%を占める[1]。無菌性緩みはマクロファージがポリエチレンライナーの摩耗粉を貪食し、TNF α などの炎症性サイトカインが分泌されることに起因する炎症性骨吸収であるが、生物学的製剤の効果はこれまで証明されていない。インプラントの不安定性による症状が顕在化すれば再置換術以外に治療方法がないが、再置換術後の患者満足度は低く[2]、内科合併症を有する高齢者では手術侵襲との兼ね合いで手術不能例も多く存在するのが現状である。そのため、緩みの原因となる炎症性骨吸収に直接的に効果がある薬物療法の確立が求められている。

我々は THA 術後無菌性緩み症例の滑膜・滑液を分析し、炎症性骨吸収に関与する候補物質として Annexin A1(AnxA1)を同定した。AnxA1 は自然免疫における重要な制御因子としてマクロファージや好中球から分泌されるタンパクであり、脳卒中モデルや筋損傷モデルにおける治療薬としての有用性が近年報告されている[3, 4]。以上の背景から、我々は「AnxA1 は THA 術後無菌性緩みの治療ターゲットとなる」と仮説を立てた。本研究の目的は、無菌性緩みの骨溶解における AnxA1 の機能を解析することであり、これを達成する

ために、以下の実験を行った。

- ① *in vitro* での AnxA1 の骨吸収抑制効果の検証
- ② ②RNA シークエンス解析を用いた AnxA1 に関連した遺伝子発現解析
- ③ ③モデルマウスを用いた AnxA1 の炎症性骨吸収抑制効果の *in vivo* 検証。

実験 1 *in vitro* での AnxA1 の骨吸収抑制効果の検証

健常ボランティアから採取した血液からヒト単球を分離し、MCSF を添加しヒトマクロファージに分化させた。このマクロファージとポリエチレン摩耗粉(Ultra High Molecular Weight Polyethylene; UHMWPE)とを共培養し、AnxA1 の破骨細胞分化抑制効果を検討した。また同様に、RANKL および AnxA1 を添加したヒトマクロファージを牛皮質骨切片上で培養し、骨吸収量を比較した。

マクロファージと UHMWPE の共培養では、AnxA1 の添加によって TRAP 陽性細胞数が減少した(図 1A)。Western Blotting によりタンパク発現を比較すると、NF κ B の発現が抑制されていた(図 1B)。RANKL 添加による骨吸収アッセイにおいても、AnxA1 は牛皮質骨切片の骨吸収を有意に抑制した(図 2)。

実験 2 RNA シークエンス解析を用いた AnxA1 に関連した遺伝子発現解析

実験 1 の結果から、AnxA1 が破骨細胞の分化を抑制し骨吸収量を減少させることが明らかとなった。続いて、その詳細な分子メカ

ニズムを同定するため、RANKL および AnxA1 で刺激したヒトマクロファージについて RNA シークエンス解析を行った。KEGG pathway 解析の結果、AnxA1 は NF κ B シグナルの抑制および PPAR γ 経路の活性化に参与していることが明らかとなった(図 3A)。実際に、ヒトマクロファージを AnxA1 で刺激し Western Blotting によりタンパク発現を比較すると、180 分の刺激により PPAR γ の発現が上昇した(図 3B)。

実験 3 モデルマウスを用いた AnxA1 の炎症性骨吸収抑制効果の in vivo 検証

8 週齢の雄性マウス(C57BL/6)に対して、麻酔下に頭頂部を 5mm 切開し頭頂骨上に UHMWPE を移植することでマウス頭頂骨骨吸収モデルを作成した。このモデルに対して、以下の 3 つの介入を行い AnxA1 の炎症性骨吸収抑制効果を検証した(図 4)。

- A : AnxA1 抗体を投与する阻害実験
- B : 野生型マウスと *AnxA1*^{-/-}マウスとで比較する遺伝子欠損実験
- C : AnxA1 を投与する治療実験

UHMWPE 移植後 7 日で頭頂骨を採取し、 μ CT による骨量評価および組織学的評価を行った。

阻害実験では、AnxA1 の阻害によって骨吸収は促進され、TRAP 陽性面積および炎症細胞の浸潤が増加した(図 5A, B)。遺伝子欠損実験においても同様に、*AnxA1*^{-/-}マウスは野生型マウスと比較して骨吸収量および TRAP 陽性面積は増加した(図 5C, D)。治療実験では、AnxA1 が UHMWPE により惹起される骨吸収を抑制する結果であった(図 5E, F)。

考察

手術インプラントや概念の発展により THA の寿命は延伸しているが、conventional な

手法で行われてきた手術症例に対しても最善の術後フォローを行うべきである。そのような症例群では炎症性骨吸収による無菌性緩みは避けて通れない可能性があり、その発症及び進行を予防する必要があると考えた。我々は AnxA1 の炎症性骨吸収抑制効果を検討し、THA 術後無菌性緩みモデルマウスにおける治療薬としての可能性を評価した。その結果、AnxA1 が NF κ B シグナルの抑制および PPAR γ 経路の活性化を介して破骨細胞分化を抑制し、炎症性骨吸収を抑制することを明らかにした。

AnxA1 は元来、グルココルチコイドのセカンドメッセンジャーとして発見されたタンパクであり抗炎症作用を有し、種々の疾患に対する治療薬としての可能性が検討されている。しかしながら骨系統疾患と AnxA1 との関連については渉猟し得た限りでは本研究が初めてのものである。PPAR γ 経路の活性化により、抗炎症型の M2 マクロファージへの分化が促進され、破骨細胞分化は抑制されることが報告されており、本研究の結果を支持するものである[5]。AnxA1/PPAR γ 経路は THA 術後無菌性緩みにおける炎症性骨吸収を制御する役割をはたしており、無菌性緩みに対する薬物治療開発のきっかけとなる可能性が示唆された。今後は臨床応用にむけて、AnxA1 を有効に炎症性骨吸収の部位へ輸送するための手段の検討など、さらに研究をすすめていきたい。

なお本研究の成果は Nature Communications 誌に英語論文報告を行った[6]。

謝辞

本研究の一部は令和3年度日本股関節財団研究助成によるサポートによって施行することができた。この場を借りて御礼を申し上げます。

文献

- [1] Sadoghi et al., Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *J Arthroplasty*. 2013 Sep;28(8):1329-32.
- [2] Eisler et al., Patient expectation and satisfaction in revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2002 Jun;17(4):457-62.
- [3] Gavins et al., Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J*. 2007 Jun;21(8):1751-8.
- [4] McArthur et al., Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *J Clin Invest*. 2020 Mar 2;130(3):1156-1167.
- [5] Kao et al., A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. *Br J Pharmacol*. 2014 Sep;171(17):4087-96.

- [6] Alhasan et al., Inhibitory role of Annexin A1 in pathological bone resorption and therapeutic implications in periprosthetic osteolysis. *Nat Commun*. 2022 Jul 7;13(1):3919.

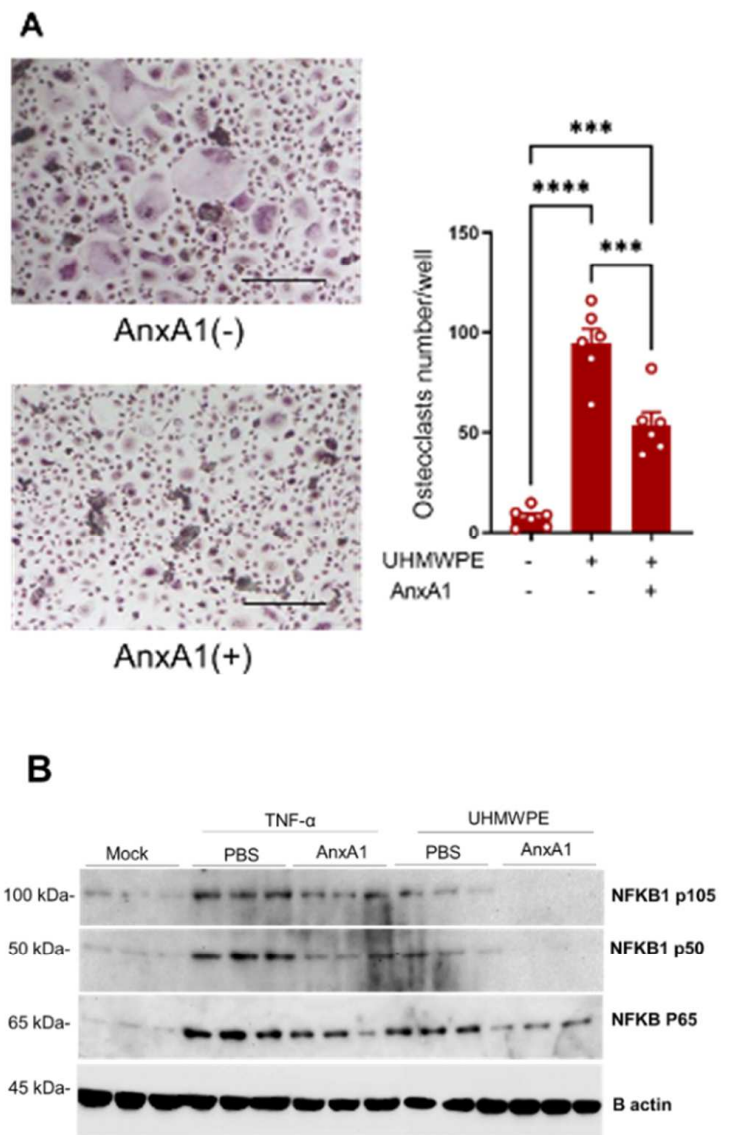


図 1. in vitro における AnxA1 の破骨細胞分化抑制効果

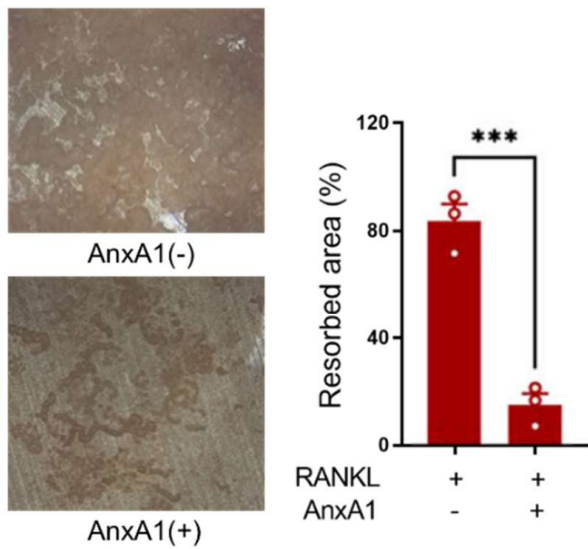


図 2. in vitro における AnxA1 の骨吸収抑制効果

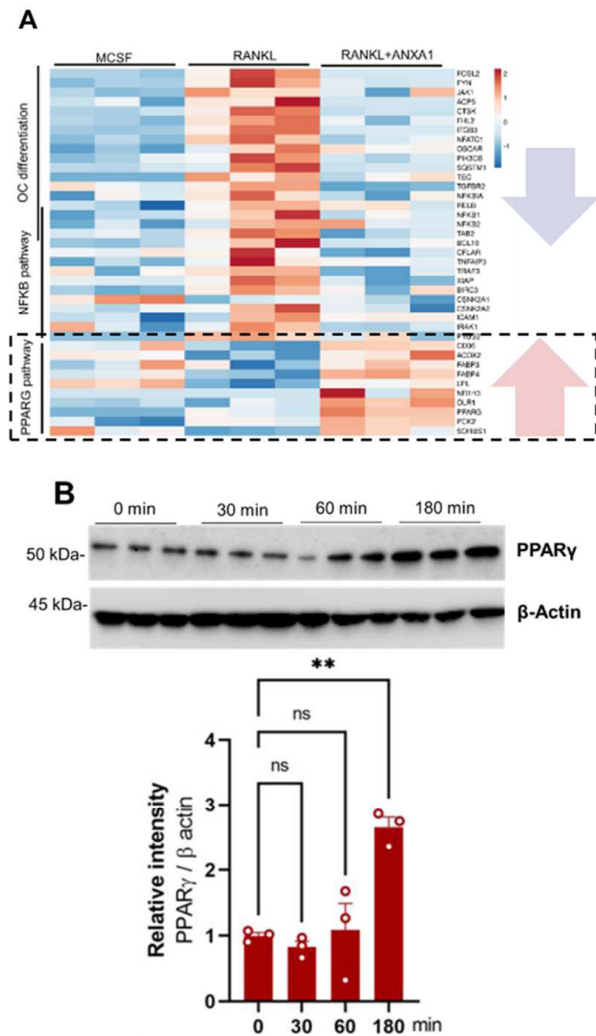
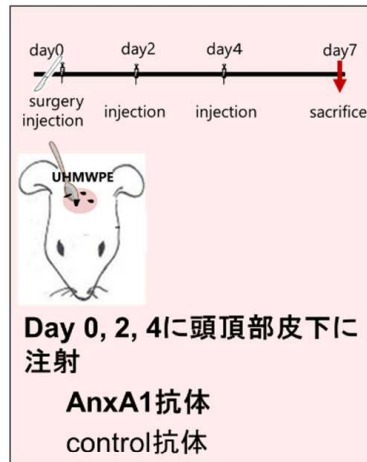
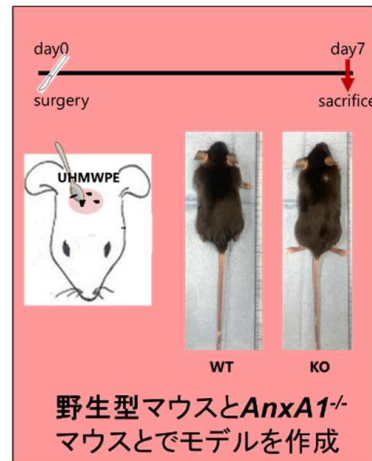


図 3. RNA シークエンス解析結果と PPAR γ 発現

A. AnxA1阻害



B. AnxA1遺伝子欠損



C. AnxA1外的投与

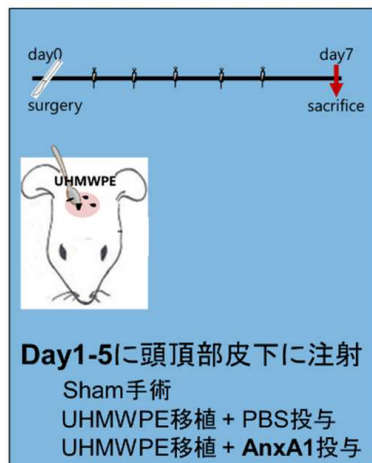


図 4. 実験 3 の概略

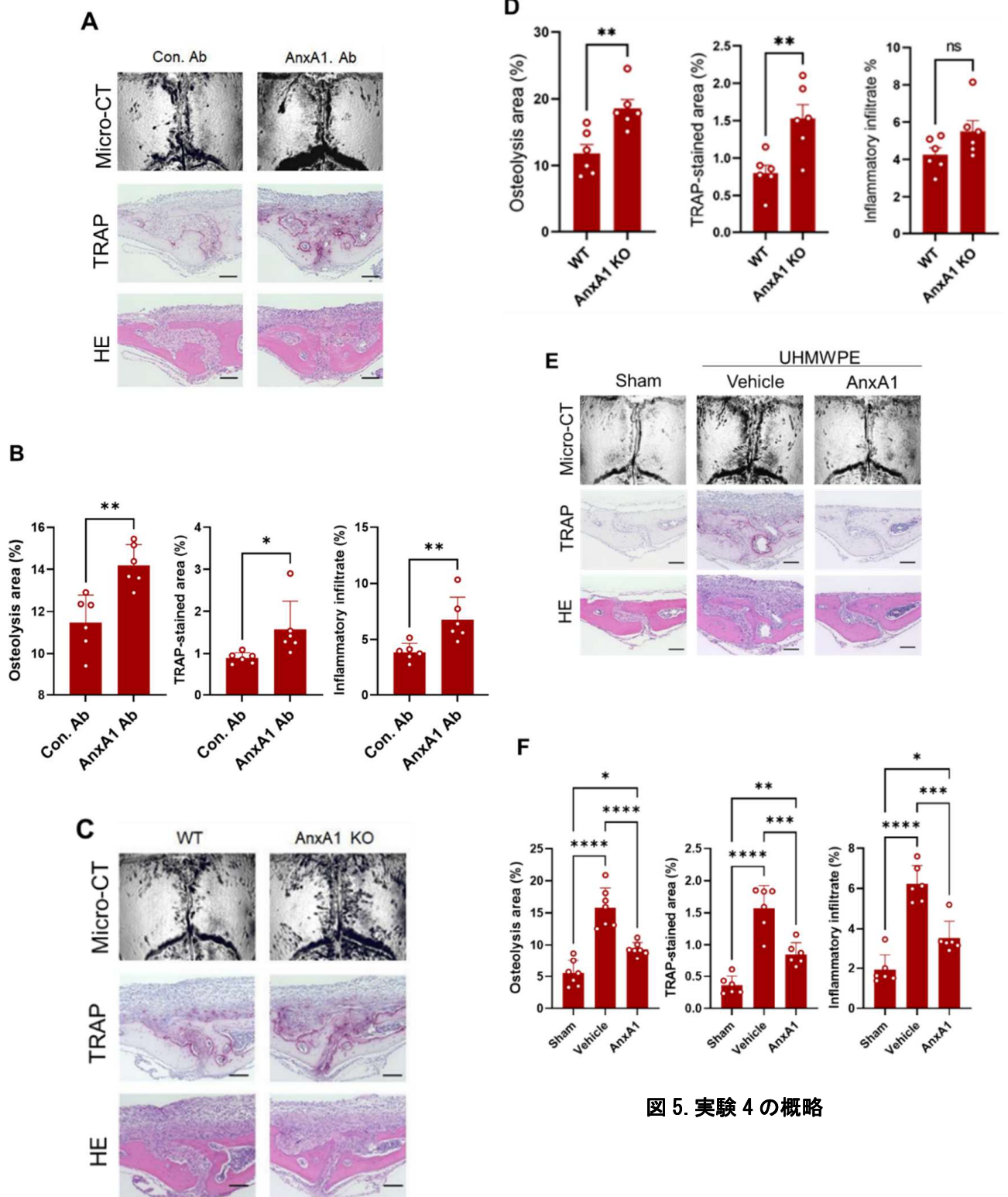


図5. 実験4の概略