

## 論文の内容の要旨

論文題目 血友病性関節症における骨破壊メカニズムの解析

氏名 占部 秀典

血友病性関節症 (hemophilic arthropathy, HA) は、関節内出血によって生じる骨破壊性の関節障害である。無治療重症血友病患者の 44%が生後 1 年以内に最初の出血を経験し、たった 1 回の関節内出血あるいは不顕性な関節内出血であっても、滑膜肥厚や不可逆的な血管新生を誘発する炎症プロセスが開始されると考えられている。そのため、生後早期から予防的治療を開始することが HA の発症予防において重要であるが、不顕性な出血も含めて完全に出血を予防することは難しく、重症血友病患者は適切な予防的治療を行っていても、関節内出血とそれに引き続く HA を合併することが知られている。HA に対する治療は、滑膜切除術等の姑息的な治療しかないのが現状であり、HA は血友病患者にとって依然として非常に重大な合併症の一つである。

HA の発症には、関節腔内に放出された赤血球や、赤血球中に含まれる鉄が関与していると考えられている。関節腔内に放出された赤血球や damage-associated molecular patterns (DAMPs) を除去するため、単球/マクロファージや好中球といった免疫細胞が浸潤する。集積した免疫細胞は炎症性サイトカインやその他の液性因子を分泌し、これらが軟骨・骨破壊に関与することが知られている。しかし、HA においてどの免疫細胞がどのようなサイトカインを分泌し、骨破壊において中心的な役割を担っているのか、ということの詳細に解析したものはほとんどない。そこで本研究では、血友病 A モデルマウスの膝関節を穿刺し関節内出血を誘導する HA モデルを用い、関節症発症部位を経時的に観察し、骨破壊と同時に変動する細胞およびサイトカインを解析することで、HA における免疫細胞・骨破壊の関連性について検討した。

まず、骨破壊を引き起こす破骨細胞が出血誘導後どの段階で検出できるかを組織学的に

検討したところ、穿刺後1週の水腫周囲に出現することが明らかとなった。水腫周囲の組織から細胞を単離し、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) ligand (RANKL) を加えて培養すると破骨細胞が形成された。このことから、HA モデルマウスでは、出血誘導により破骨細胞前駆細胞が水腫周囲組織内に浸潤し、破骨細胞が形成されることが判明した。また、水腫周囲に検出できた破骨細胞は水腫の吸収と共に消失したが、水腫に近接していた領域の大腿骨皮質骨を裏装する破骨細胞は穿刺後時間が経過するにつれて増加することが組織学的に明らかとなった。この結果は、出血が収束して水腫が吸収された後においても、長期的に破骨細胞分化が誘導され続ける局所環境が形成されていることを示唆している。

出血誘導によって誘発される破骨細胞分化に関連する遺伝子の発現の変化や免疫応答を調べるために、出血誘発前および誘発後の水腫周囲組織を回収し、RNA-seq および quantitative-polymerase chain reaction (q-PCR) 解析を行ったところ、interleukin (IL)-1 $\beta$ や IL-6 といった炎症性サイトカインや RANKL をはじめとした破骨細胞分化に関する遺伝子群の発現上昇が認められた。また、好中球や単球/マクロファージの遊走を促進するケモカインやケモカイン受容体の発現の上昇がみられた一方、リンパ球の動員を促進する因子については発現上昇がみられなかった。これらの炎症性サイトカインおよび RANKL の産生細胞を同定するために、単球/マクロファージ、好中球、リンパ球、線維芽細胞、血管内皮細胞を採取し、発現遺伝子を解析したところ、主要な産生細胞はそれぞれ、IL-1 $\beta$ は好中球、IL-6 は単球/マクロファージと線維芽細胞、RANKL は線維芽細胞であることが判明した。HA モデルマウスにおいて IL-1 $\beta$ の関与を検討した報告はなかったため、抗 IL-1 $\beta$ 抗体投与による骨破壊抑制効果について検討したところ、有意な骨破壊抑制効果は認められなかった。従って、HA 病態形成における好中球の関与は低いと考えられた。

遺伝子発現解析で好中球とマクロファージの遊走に関するケモカイン発現が上昇していたこと、両免疫細胞が炎症性サイトカインを高いレベルで産生していることを踏まえ、好

中球、単球/マクロファージに着目し、出血誘導後これらの細胞の割合および細胞数がどのように変化するかフローサイトメトリー解析により経時的に評価した。その結果、好中球、単球/マクロファージ共に全細胞中の割合は穿刺後2日目に、数は5日目にピークに達し、その後、両免疫細胞の割合は時間経過と共に減少していった。興味深いことに穿刺後8週における割合と数を検討したところ、好中球は穿刺前と有意差がない程度まで減少したのに対し、単球/マクロファージは穿刺前よりも高い水準であった。穿刺後後期に残存する単球/マクロファージを調査するために、穿刺後3-7週の検体で組織学的解析を行ったところ、ヘモジデリン貪食マクロファージ (hemosiderin-laden macrophages, HLMs) が多数認められた。以上より、マクロファージがHAの病態形成に影響している可能性が示唆された。また、遷延する破骨細胞の発生にHLMsが関与している可能性も考えられた。

単球/マクロファージのHAに対する影響を調べるために、クロドロン酸投与により単球/マクロファージ除去実験を実施した。クロドロン酸を投与したマウスでは、血腫周囲に出現する破骨細胞の数が減少した。また、血腫周囲組織から調整した細胞をM-CSFおよびRANKLを加え培養しても破骨細胞分化は観察されなかった。遺伝子発現解析ではIL-6のみならず、RANKLやIL-1 $\beta$ もクロドロン酸投与により発現が抑制された。このことは、出血後に患部に浸潤した単球/マクロファージが、線維芽細胞によるRANKL産生や好中球のIL-1 $\beta$ 産生を間接的に増強している可能性を示唆するものである。

最後に血腫周囲に浸潤する単球/マクロファージおよびRANKLを発現する細胞のさらなる解析のために、穿刺後1週の血腫周囲組織を採取し、シングルセルRNA-seq (scRNA-seq) 解析を実施した。遺伝子発現パターンの差異により、単球/マクロファージ系の細胞は、破骨細胞、炎症を促進する単球・マクロファージの集団、赤血球の貪食・免疫抑制・組織修復に関連する遺伝子を発現するマクロファージの集団に分けることができた。RANKLはpodoplanin (*Pdpn*) およびcollagen type VI alpha 1 chain (*Col6a1*) を発現する一部の線維芽細胞に発現上昇が見られた。

予防的治療法の進歩により、血友病患者の予後は改善されてきている。しかし、既存の予防療法では、不顕性な出血を含めた全ての出血を制御することは困難であるため、出血を来したとしても関節破壊を抑制できる治療法の開発が望まれる。今回実施した scRNA-seq のデータから、出血により誘導される破骨細胞に特異的に発現する遺伝子・タンパク質を同定し、それらを標的とした治療法を開発することで、骨リモデリングを維持しつつ、効率的に骨破壊を抑制できる可能性がある。赤血球の処理に関与するマクロファージに着目し、これらの機能や分化を促進する方法を検討するのも有用である。また、穿刺後長期間残存するヘモジデリン貪食マクロファージ (hemosiderin-laden macrophages, HLMs) の機能は依然として不明である。HLMs が慢性炎症環境形成や破骨細胞分化に寄与している場合、HLMs の発生を制御する方法を検討することで、出血後に遷延する関節破壊の抑制に繋がるかもしれない。

本研究によって、HA では出血後に関節腔内に集積する単球/マクロファージが炎症反応を惹起し、骨破壊の促進に関わる因子の発現を増強することが明らかになった。HA の患部で観察される単球/マクロファージは、破骨細胞に分化するタイプや、炎症を促進するタイプ、赤血球処理や組織を修復するタイプ、鉄を貪食するタイプなど、複数のタイプの単球/マクロファージが存在していると考えられる。各タイプの HA 病態形成における関連性・機能をさらに解析することで、関節内出血によって誘導される善玉マクロファージ・悪玉マクロファージを同定し、これらの発生を制御するメカニズムを解明できるかもしれない。そして、これらのマクロファージを標的とした治療法を検討することで、HA ひいてはその他の出血性疾患における骨破壊を制御できるようになることが期待される。