

# 高知大学学位授与記録

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第118号	團 隼兵	A novel mice model of acute flares in osteoarthritis elicited by intra-articular injection of cultured mast cells  (培養マスト細胞の関節内注射による変形性関節症フレアモデル)	1

氏名(本籍)	團 隼兵 (佐賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第118号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和3年11月30日
学位論文題目	A novel mice model of acute flares in osteoarthritis elicited by intra-articular injection of cultured mast cells  (培養マスト細胞の関節内注射による変形性関節症フレアモデル)
発表誌名	Journal of Experimental Orthopaedics 8, Article number: 75 2021年9月

<b>審査委員</b>	主査	教授	齊藤	源頭
	副査	教授	寺田	典生
	副査	教授	河野	崇

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

論文題目	氏名	團 隼兵
	A novel mice model of acute flares in osteoarthritis elicited by intra-articular injection of cultured mast cells (培養マスト細胞の関節内注射による変形性関節症フレアモデル)	
<p>(論文要旨)</p> <p><b>【目的】</b>            マスト細胞(MC)は変形性関節症(OA)の病態において様々な働きを担う。過去の報告には、OAの関節滑膜や関節液には正常な関節と比較してMC増加があることや、MC浸潤の程度が病期の重症度や進行に寄与していることが報告されているが、MC自体の働きに関する詳細なメカニズムについてはいまだ不明な部分が多い。OAの炎症所見には波があり、実臨床ではフレア(flare)と呼ばれる急性増悪をしばしば経験する。OAの治療については、現段階では関節リウマチのような疾患修飾薬はなく、対症療法が中心となっている。我々はMCの多機能性に注目し、OAフレアにMCの活性化が関連していると仮説をたてた。また、MCの働きを制御することで、新しいOA疾患修飾薬の開発に役立つ可能性があると考えた。本研究の目的は、新規OAフレアモデルを作製し、そのモデルにおけるMCの役割を明らかにすること、さらに既存のMC安定剤投与による治療効果を検証することとした。</p> <p><b>【方法】</b>            MCは8週齢雄のC57BL/6マウスの大腿骨から骨髓細胞を単離し、5週間培養して作成した。0日目に7週齢雄の同種マウスの右膝にモノヨード酢酸(MIA)(0.5mg/10<math>\mu</math>l)または同量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を注射後、14日目にMC(1<math>\times</math>10<sup>6</sup>個/20<math>\mu</math>l)または同量のPBSを注射し、OA flare(MIA+MC)、OA(MIA+PBS)、MC non-OA(PBS+MC)、PBS non-OA(PBS+PBS)の4群を作成した。またMC安定剤による治療効果を検証するため、OA flare群に対して15-21日目にトラニラスト1ml(400mg/kg/day)を腹腔内投与したT(+)群と、同量のPBSを投与したT(-)群を追加作成した。さらに、注射した外因性MCの分布を経時変化で確認するため、緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識したトランスジェニックマウスから前述の方法にてMCを培養し、OA flareモデルを作成した。MC注射後1日目、3日目、7日目にそれぞれ膝組織を取り出し、免疫蛍光染色法にてGFPで染色される外因性MCとMast cell protease-6のみで染色される内因性MCの分布を調査した。本研究の主要評価項目は、OA flare群とOA群間およびT群とC群間におけるそれぞれの組織学的変化(modified-Mankin scoreと滑膜内MC数)とし、副次評価項目は、疼痛行動(Stance Score、von Freyテスト)、膝蓋下脂肪体における炎症性サイトカインと軟骨基質分解酵素(IL-1<math>\beta</math>、IL-6、TNF-<math>\alpha</math>、ADAMTS-4、NGF)のRT-PCR法による遺伝子発現量とした。modified-Mankin scoreはトルイジンブルーで染色した膝組織の「構造の破壊」、「軟骨細胞の変性」、「軟骨基質の染色性」の程度を0-13点で定量評価したもので、点数が高いほど関節破壊が強くなる。また、滑膜内MC数は400倍視野でカウントし、画像解析ソフト(Image J)で滑膜の面積を計測し、MC数を面積(mm<sup>2</sup>)で正規化した。</p> <p><b>【結果】</b>            組織学的には、modified-Mankin scoreがOA flare群でOA群と比較して有意に高値であり、関節破壊の増悪を認めた(7.0[1.8]vs. 3.3[1.3], P &lt; 0.05)。滑膜内MC数についてもOA flare群でOA群と比較して有意に高値であった(34.5[6.3]/mm<sup>2</sup> vs. 27.2[2.3]/mm<sup>2</sup>, P &lt; 0.05)。また、OA flare群ではOA群と比較して、MCを注射した3時間後のStance scoreが有意に高値であり、疼痛行動の</p>		

急性増悪を認めた(1.0(0.5-2.0) vs. 0.5(0-1.0))。さらに、炎症性サイトカインおよびアグリカナゼの遺伝子発現量は、OA flare 群で OA 群の 1.5- 2.8 倍と有意な増加を認めた。一方、OA flare 群にトラニラストを投与した T(+) 群ではコントロールの T(-) 群と比較し、前述した組織学的変化、滑膜内 MC 数、疼痛行動および遺伝子発現量が有意に低値であった。免疫蛍光染色では、MC 注射後 1、3 日目の膝組織では GFP で標識された外因性 MC が観察されたが、7 日目には外因性 MC は観察されず、内因性 MC のみが観察された。

#### 【考察および結論】

我々が作成した新しい OA フレアモデルは、既存の OA モデルと比較して、組織レベルでの軟骨障害の増悪と MC 浸潤の増加、疼痛行動の急性増悪、および膝関節における炎症性サイトカイン、軟骨基質分解酵素の遺伝子発現の増加を認めた。さらに、OA フレアモデルに対するトラニラストの投与は、PBS 投与群と比較して上述の組織学的変化、疼痛行動、および遺伝子発現を有意に抑制した。免疫蛍光染色による外因性 MC の経時的変化からは、OA 関節内に注射された MC の脱顆粒が OA フレアの引き金となり、これに内因性 MC の活性化が相まって局所の炎症性サイトカインの産生、軟骨基質分解酵素の発現が惹起され、軟骨障害が増悪することが推察された。また、MC 安定剤であるトラニラストの投与により、OA フレア発症メカニズムが抑制され、組織学的な関節破壊が抑制される事が示唆された。我々の新しいモデルは、実臨床での OA のフレア状態を模倣したものであり、MC が有する多面的な機能を制御することに焦点を当てた、新しい OA の疾患修飾治療開発への手がかりになると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	團 隼兵
審 査 委 員	主 査 氏 名      齊 藤 源 頭	
	副 査 氏 名      寺 田 典 生	
	副 査 氏 名      河 野 崇	

題 目 A novel mice model of acute flares in osteoarthritis elicited by intra-articular injection of cultured mast cells  
(培養マスト細胞の関節内注射による変形性関節症フレアモデル)

著 者 Junpei Dan, Masashi Izumi, Hiroko Habuchi, Osami Habuchi, Shogo Takaya, Yusuke Kasai, Ryuzo Hayashi, Koji Aso, Takahiro Ushida and Masahiko Ikeuchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Journal of Experimental Orthopaedics 8, Article number: 75  
2021年9月

### 要 旨

#### 【背景・目的】

マスト細胞(MC)は変形性関節症(OA)の病態において様々な働きを担う。筆者らは、OAフレアにMCの活性化が関連していると仮説をたてた。OAフレアを模した新規マウスモデルを作製し、そのモデルにおけるMCの役割を明らかにすること、さらに既存のMC安定剤投与による治療効果を検証した。

#### 【方法】

MCは8週齢雄のC57BL/6マウスの大腿骨から骨髓細胞を単離培養した。1日目に7週齢雄の同種マウスの右膝にMIAまたはPBSを注射後、14日目にMCまたは同量のPBSを注射し、OA flare (MIA+MC)、OA (MIA+PBS)、MC non-OA (PBS+MC)、PBS non-OA (PBS+PBS)の4群を作成した。またトラニラスト(MC安定剤)の治療効果を検証するため、OA flare群に対して15-21日目にトラニラスト投与したT群と、同量のPBSを投与したC群を追加作成した。さらに、注射した外因性MCの分布を経時変化で確認するため、GFP(green fluorescent protein)で蛍光標識したトランスジェニックマウスからMCを培養し、OA flareモデルを作成した。MC注射後1日目、3日目、7日目にそれぞれ膝組織を取り出し、免疫蛍光染色法にてGFPで染色される外因性MCとMCP-6 (mast cell protease-6)のみで染色される内因性MCの分布を調べた。OA flare

群と OA 群間および T 群と C 群間におけるそれぞれの組織学的変化、疼痛行動、膝蓋下脂肪体における炎症性サイトカインと軟骨基質分解酵素(IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ ,ADAMTS-4,NGF)の遺伝子発現量を比べた。

#### 【結果・考察】

組織学的には、OA flare 群で OA 群と比較して有意に高値であり、関節破壊の増悪を認めた。滑膜内 MC 数についても OA flare 群で OA 群と比較して有意に高値であった。また、OA flare 群では OA 群と比較して、疼痛行動の急性増悪を認めた。炎症性サイトカインおよびアグリカナーゼの遺伝子発現量は、OA flare 群で OA 群の 1.5- 2.8 倍と有意な増加を認めた。一方、OA flare 群にトラニラストを投与した T 群ではコントロールの C 群と比較し、前述した組織学的変化、滑膜内 MC 数、疼痛行動および遺伝子発現量が有意に低値であった。免疫蛍光染色では、MC 注射後 1、3 日目の膝組織では GFP で標識された外因性 MC が観察されたが、7 日目には外因性 MC は観察されず、内因性 MC のみが観察された。我々が作成した新しい OA フレアモデルは、従来の MIA OA モデルと比較して、組織レベルでの軟骨障害の増悪と MC 浸潤の増加、疼痛行動の急性増悪、および膝関節における炎症性サイトカイン、軟骨基質分解酵素の遺伝子発現が増加を認めた。OA フレアモデルに対するトラニラストの投与は、上述の組織学的変化、疼痛行動、および遺伝子発現を有意に抑制した。免疫蛍光染色による外因性 MC の経時的変化からは、OA 関節内に注射された MC の脱顆粒が OA フレアの引き金となり、これに内因性 MC の活性化が相まって局所の炎症性サイトカイン産生、軟骨基質分解酵素の発現が惹起され、軟骨障害が増悪することが推察された。トラニラストの投与により、上記のメカニズムが一様に抑制され、組織学的な関節破壊が抑制される事が示唆された。

#### 【結論】

筆者らの新しいモデルは、実臨床での OA のフレア状態を模倣したものであり、新しい OA の疾患修飾治療開発への手がかりになると考えられる。

以上のように、本論文は OA のフレア状態を模倣したものであり、トラニラストが新規治療法となりうる可能性を示し、OA に対する新薬の開発が期待される。以上を総合的に判断し、審査員一同は申請者の学力および研究遂行能力が高知大学博士（医学）の学位を授与されるに相応するものと判断した。