

## マクロファージを基盤とした関節リウマチに生じる性差機構の解明

佐伯法学

愛媛大学プロテオサイエンスセンター 病態生理解析部門

## 【研究の背景】

関節リウマチは病態に女性優位な性差が認められる代表的な自己免疫疾患である。関節リウマチ病態の性差構築には女性ホルモンであるエストロゲンが大きく関与していると考えられているが、詳細な分子機構は不明である。また、近年、滑膜の組織在在マクロファージ(滑膜 M $\phi$ )が関節炎病態制御の観点から注目されているが<sup>1)</sup>、病態性差に及ぼす影響は不明である。

## 【目 的】

本研究では、関節リウマチにおける病態性差を、滑膜 M $\phi$  に発現するエストロゲン受容体(ER $\alpha$ )の機能に着目して解析し、関節炎病態をどのように制御するか関節炎モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

## 【方 法】

関節リウマチ病態モデルとして汎用される K/BxN serum transfer arthritis (STA) マウスの関節炎組織を用いて、独自に確立した手法で滑膜 M $\phi$  を初代培養した<sup>2)</sup>。初代培養滑膜 M $\phi$  の性ホルモン受容体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ , Gpr30, PR, AR)の mRNA 発現を RT-qPCR で解析した。myeloid cell 特異的 ER $\alpha$  欠損マウス(cKO, *LysMCre; ER $\alpha$ <sup>fllox/fllox</sup>*)を作出し STA 誘導後、後肢の厚みを測定して対照(Control, *ER $\alpha$ <sup>fllox/fllox</sup>* および *LysMCre; ER $\alpha$ <sup>fllox/+</sup>*)と比較した。STA を誘導後の Control と cKO の抹消血液中の単球の割合を Flow cytometry で解析した。Control と cKO を皮膚で縫合したパラバイオーシスを作出し、両マウスに STA 誘導後、後肢の厚みを測定した。STA 誘導 3 日目の滑膜組織を用いて single cell (sc) RNA-seq を行い、クラスタリング解析による各クラスタ間の細胞数の比較および遺伝子発現解析による各クラスタ間の発現変動遺伝子の比較を行った。各クラスタ間の発現変動遺伝子を用いて Gene ontology (GO) 解析および Pathway 解析を行った。Flux analyzer を用いて、Control と cKO から採取した骨髄由来 M $\phi$  の細胞外酸化速度と酸素消費速度を解析した。

## 【結 果】

初代培養滑膜 M $\phi$  の性ホルモン受容体の mRNA 発現を RT-qPCR で解析したところ、ER $\alpha$  の mRNA 発現が最も高いことが判明した。そこで、M $\phi$  における ER $\alpha$  の病態生理機能を明らかにする目的で、myeloid cell 特異的 ER $\alpha$  欠損マウス(cKO)を作出し、STA を誘導したところ、雌でのみ Control と比較して cKO で関節炎病態が有意に抑制された。Flow cytometry 解析で Control と cKO の末梢血単球の割合に変化が認められなかった。また、Control と cKO のパラバイオーシスを作出し両マウスに STA を誘導したところ、同様に cKO で関節炎病態の抑制が認められた。このことから、滑膜 M $\phi$  の ER $\alpha$  シグナルが関節炎病態制御に寄与することが示唆された。そこで、STA 誘導後 3 日目の滑膜組織を用いて scRNA-seq 解析を実施したところ、Control と比較して cKO では滑膜 M $\phi$  クラスタの割合が増加することが明らかとなった。さらに、滑膜 M $\phi$  クラスタで発現変動していた遺伝子群の GO 解析では、cKO で細胞内代謝や細胞死の関連遺伝子が有意に減少していた。そこで、ER $\alpha$  シグナルが M $\phi$  の代謝機能に及ぼす影響を明らかにするため、骨髄由来 M $\phi$  を用いて M1(炎症型)及び M2(抗炎症型)に分極させ、Flux analyzer で細胞内代謝を解析した。その結果、Control 由来細胞と比較して cKO 由来細胞で、M1 分極条件

で細胞外酸化速度の減少、M2 分極条件で酸素消費速度の減少を認めた。

### 【考 察】

これまでの報告で、滑膜 M $\phi$  は関節組織内の恒常性の維持に重要であると考えられている<sup>1)</sup>。我々の研究成果により、滑膜 M $\phi$  に発現する ER $\alpha$  シグナルは、関節炎下において細胞内代謝の異常亢進を呈することでアポトーシスを起こすことが示唆された。エストロゲンの存在により滑膜 M $\phi$  が欠落しやすいことが女性で関節リウマチの多い一因になると考えられる。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

疾患に性差が生じる分子機構はほとんどが不明なまま停滞している。本研究により、女性で関節リウマチの多い一因を示す根拠が得られたため、今後、女性を対象としたテーラーメイド医療への展開、性差を考慮した治療ガイドラインの制定など多岐に渡り発展性が期待できる。近年は女性の健康を維持し能力を発揮できる社会構築が望まれていることから、本研究構想に期待できる社会的意義は非常に高いと考えられる。

### 【参考・引用文献】

- (1) Saeki N\* and Imai Y\*(\*, co-corresponding author), Crosstalk between synovial macrophages and fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Histology and Histopathology*, 2023 May 12;18628. doi: 10.14670/HH-18-628.
- (2) Saeki N\* and Imai Y\*(\*, co-corresponding author), Isolation and culture of both primary synovial macrophages and fibroblasts from murine arthritis tissue. *Journal of Visualized Experiments*, 2023 Feb 24;(192). doi: 10.3791/65196.