

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791640

研究課題名(和文) P21発現制御による変形性関節症における関節軟骨再生への挑戦

研究課題名(英文) p21 regulate aggrecan and MMP13 expression

研究代表者

林 申也 (HAYASHI, Shinya)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：20437487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：p21 knockoutマウスを用いて変形性関節症モデルマウスを作成したところ、p21が細胞外基質であるアグリカンと、マトロプロテアーゼであるMMP13の発現を調整することがわかった。軟骨のhomeostasisを維持する働きがあることがわかった。これに関して整形外科関連での国内学会1回、国際学会で5回発表。現在英語論文を投稿中である。概ね初期の目標は達成されたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We suggest p21 maintains matrix synthesis by regulation of aggrecan and MMP-13 expression in cartilage tissue. The main function of p21 in cartilage tissue could be the regulator of transcriptional factor rather than the inhibitor of cell cycle progression. Our data imply that stabilization of p21 would be useful as a therapeutic strategy for OA treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学・関節病学

キーワード：p21 軟骨組織 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢者の増加とともに変形性関節症などの著しい関節障害を有する患者は増加の一途をたどっている。これらの患者は疼痛による歩行障害などのために重篤な肢体障害を来す。そのため、患者のADLやQOLは著しく低下し、社会的、経済的影響は甚大である。このような変形性関節症に対する手術的治療として人工関節置換術は非常に良好な成績を収め、確立されたものとなっているがその反面、人工関節ゆるみなどの合併症もあり、患者への侵襲、負担も大きい。

現在のところコンセンサスの得られた保存的治療（内服、遺伝子治療等）は無い。よって軟骨変性に対し薬物ならびに遺伝子治療を開発することは非常に社会的に重要である。P21<sup>cip1</sup>は cyclin-dependent kinase inhibitor の一種で、DNA が外界からのストレスにより損傷されると、細胞分裂周期を停止 (G2 arrest) させることにより異常な DNA 増殖を抑制する分子として同定された (Cell, 1993)。その後 P21<sup>cip1</sup> が細胞のアポトーシスを調節 (Oncogene, 1998)、また P21<sup>cip1</sup> の発現を抑制することで細胞増殖が亢進するという報告がなされた (EMBO J, 1999) (Genes Dev, 1997)。さらに P21<sup>cip1</sup> の働きとして細胞増殖以外にも血管平滑筋細胞において P21<sup>cip1</sup> が炎症性メディエーターとして重要な役割を果たしているとの報告がある (Circulation, 2004)

近年、組織損傷後の再生に関して以下のような報告がある。P21<sup>cip1</sup> ノックアウトマウスに動脈の損傷モデルを作成したところ、P21<sup>cip1</sup> ノックアウトマウス群では術後に血管平滑筋細胞の増殖再生、炎症性細胞（マクロファージ、好中球）の浸潤がワイルドタイプに比較し亢進したことが報告された (JCI, 2008)。さらに P21<sup>cip1</sup> ノックアウトマウスの耳にパンチで hole を作成するとワイルドタイプと比較して早期に hole が閉鎖し、組織学的にも修復がなされたという報告がある (Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 2010)。このように最近 P21<sup>cip1</sup> 発現の制御による組織再生という点で注目を浴びつつある

## 2. 研究の目的

P21 は cyclin-dependent kinase inhibitor の一種で、DNA が外界からのストレスにより損傷されると、細胞分裂周期を停止 (G1 arrest) させることにより異常な DNA 増殖を抑制する分子として同定された。近年 p21 のそれ以外の働きとして NFκ-B, c-Myc, C/EBP, E2F, STAT3 などの活性を調節するとの報告がなされた。我々はメカニカルストレスを軟骨に与える際に P21 の発現を調節することで軟骨細胞にどのような影響が出るのか、さらに p21 ノックアウトマウスに変形性関節症モデルを作成し軟骨変性への影響、さらにどのような因子が関与しているのかをを検討することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

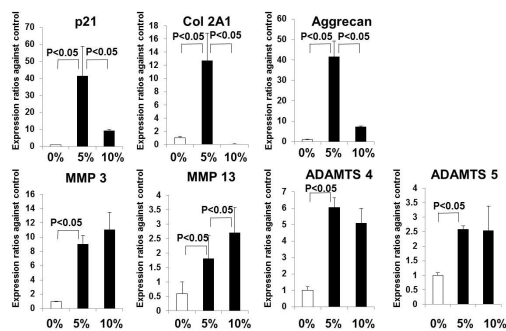
軟骨細胞として正常人軟骨細胞 (NHAC-kn; cell line derived from human normal chondrocyte) を用いた。軟骨細胞に伸展ストレス (0-10%, 24h, 0.25Hz) を STREX 社製の伸展装置で加え、p21, Col2, Aggrecan, MMP-3, 13, の発現変化を realtime PCR で検討した。次に p21 siRNA を transfection または p21 siRNA を transfection した状態で STAT3 の inhibitor を添加し 5% stress 下に上記分子発現を検討した。同時に STAT3 のリン酸化を western blotting で検討した。次に生後 10 週の p21 ノックアウトマウスに変形性関節症モデルである DMM モデルを作成し 8 週後に屠殺、safraninO 染色、各種免疫染色を行い関連因子の検索を行った。

## 4. 研究成果

(1) p21, col2, Aggrecan は 5% ストレスで上昇、10% で低下した。MMP-3, 13 は 5%, 10% とともに

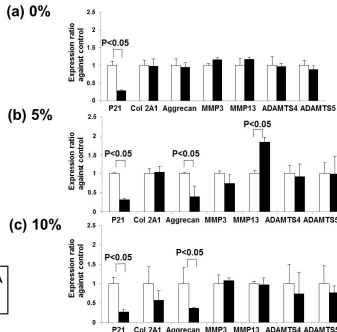
上昇した。(Figure 1)

Figure 1



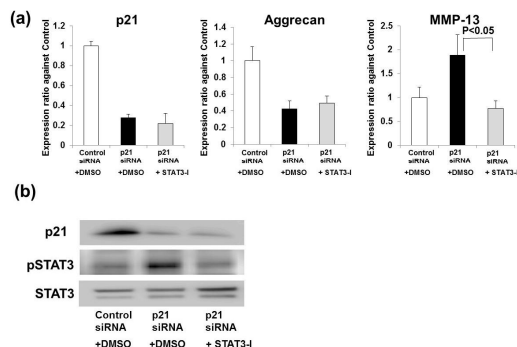
(2) P21 の発現を knock down すると、5% ストレス下に MMP-13 の発現はコントロールに比べ上昇、Aggrecan の発現は低下した。一方 0%、10% では MMP-13 の発現は変化なかった。(Figure 2)

Figure 2 (a) 0%



(3) Knock down 後に STAT3 inhibitor を投与しストレスをかけた群で MMP-13 の発現は低下した。P-STAT 3 は 5% ストレス下に蛋白レベルで上昇した。(Figure 3)

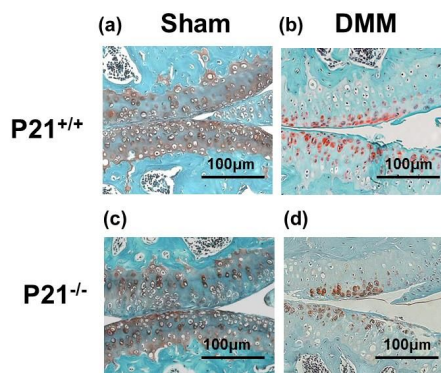
Figure 3



(4) In vivo で変形性関節症モデル (DMM model) を作成し 8 週後に屠殺し safranin O 染色で確認すると p21 ノックアウトマウスの軟骨変性がワイルドタイプに比べて抑制され

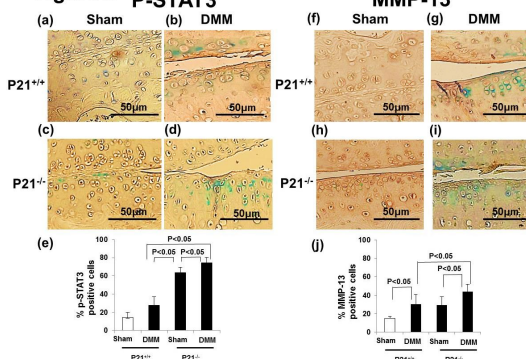
た (Figure 4)

Figure 4



(5) さらに変形性関節症モデル (DMM model) を作成し 8 週後に屠殺し MMP-13、p-STAT3 の免疫組織化学染色を行うと、染色性が増強していることが示唆された (Figure 5)

Figure 5 P-STAT3



結論：メカニカルストレス存在下で P21 は MMP-13, aggrecan の発現を調節していることが in vivo, in vitro で解明された。このことは生体内において P21 が軟骨組織恒常性維持に関与していることが示唆される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Iwasa K, Hayashi S, Fujishiro T, Kanzaki N,

- Hashimoto S, Sakata S, Chinzei N, Nishiyama T, Kuroda R, Kurosaka M. PTEN regulates matrix synthesis in adult human chondrocytes under oxidative stress. J Orthop Res. 査読有 2014 ;32:231-7
2. Kawakita K, Nishiyama T, Fujishiro T, Hayashi S, Kanzaki N, Hashimoto S, Takebe K, Iwasa K, Sakata S, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M: Akt phosphorylation in human chondrocytes is regulated by p53R2 in response to mechanical stress: Osteoarthritis Cartilage. 査読有 2012;20:1603-9.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Shinya Hayashi, Shuhei Sakata, Takayuki Nishiyama, Takaaki Fujishiro, Noriyuki Kanzaki, Kohei Kawakita, Kenjiro Iwasa, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka  
 題目 p21 regulates MMP-13 expression via STAT3 signaling in chondrocytes.  
 OARSI meeting 2013 April 20, Philadelphia, USA
2. Shinya Hayashi, Shuhei Sakata, Takayuki Nishiyama, Takaaki Fujishiro, Noriyuki Kanzaki, Kohei Kawakita, Kenjiro Iwasa, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka  
 題目 p21 regulates MMP-13 expression via STAT3 signaling in chondrocytes.  
 ORS annual meeting , January 27, 2013. San Antonio, USA
3. Shinya Hayashi, Shuhei Sakata, Takayuki Nishiyama, Takaaki Fujishiro, Noriyuki Kanzaki, Kohei Kawakita, Kenjiro Iwasa, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka  
 題目 p21regulates MMP-13 expression and decreased aggrecan expression via STAT3/SDF-1 pathway : (Poster) OARSI meeting ,April 26-26, 2012. Barcelona, Spain
5. 林 申也, 西山隆之、藤代高明、橋本慎吾、岩佐賢二郎、川北晃平、坂田周平、黒田良

祐、黒坂昌弘  
 題目 メカニカルストレス応答性に p21<sup>cip1</sup> は MMP13 の発現を調節する  
 日本軟骨代謝学会 2012.3.9 名古屋

4. Shinya Hayashi, Shuhei Sakata, Takayuki Nishiyama, Takaaki Fujishiro, Noriyuki Kanzaki, Kohei Kawakita, Kenjiro Iwasa, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka  
 題目 Mechanical stress increased p21cip1 expression in chondrocytes (Poster)  
 OARSI meeting September 15-18, 2011. San Diego, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 申也 (HAYASHI, Shinya)  
 神戸大学・医学部附属病院・特命助教  
 研究者番号 : 2 0 4 3 7 4 8 7