

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462294

研究課題名(和文) 長寿因子SIRT1による変形性関節症の治療の試み

研究課題名(英文) An experiment study for the treatment of osteoarthritis by longevity factor, SIRT1

研究代表者

松下 雄彦 (MATSUSHITA, Takehiko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症は、発症の進行を遅延させる薬剤はなく、その開発が必要とされる。本研究では長寿因子SIRT1の活性化が変形性関節症の進行を遅延させるかを調べた。マウスに変形性関節症モデルを作成して、SIRT1の活性化薬剤であるSRT1720を全身投与した。4 - 16週間投与の後、組織を採取して変形性関節症の進行について比較した。SRT1720を投与した群では投与していない群と比較して8、12週では変形性関節症の進行が抑制されていた。また、SRT1720投与群では軟骨の分解酵素少や軟骨細胞死、滑膜炎の減少がみとめられ、SIRT1活性化薬剤による変形性関節症に対する治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To date, no drugs to delay progression of osteoarthritis have been developed. The current study examined whether SIRT1 can prevent progression of osteoarthritis. Osteoarthritis model was surgically created in mice and SRT1720 was administered systemically for 4-16 weeks. Osteoarthritis progression was examined by histology. Osteoarthritis progression was delayed at 8 and 12 weeks after surgery. Decreased cartilage degrading enzymes, chondrocyte death and synovitis were associated with the delayed osteoarthritis progression in the mice treated with SRT1720. Our observations suggested a potential treatment of osteoarthritis by SIRT1 activators.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 SIRT1

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、関節変形及び疼痛により日常生活において著しい機能低下をもたらす疾患であるが、関節疾患では最も多い疾患で、国内でも有症状患者は 2000 万人と推定されている。その発症要因としては外傷、遺伝、老化などが示唆されてきたが、未だその詳細な制御機構は解明されていない。病態としては関節軟骨の変性、消失に伴って進行していくことが知られているが、発症の予防や進行を遅延させる薬剤や治療法はなく、その開発が必要とされる。

NAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素である silent information regulator 2 (Sir2) は多くの種間で保存され、寿命制御因子として報告されている。一方哺乳類において Sir2 の相同体である SIRT1 は、近年、老化や代謝などの制御に関わっていることが様々な臓器および細胞レベルにおいて報告されており、特に、変性疾患において SIRT1 の活性化や過剰発現は症状改善につながる新しい治療方法として注目されている。これまでに我々は、軟骨細胞の変性疾患である変形性関節症において SIRT1 が重要な制御因子であるという知見を得た。

### 2. 研究の目的

そこで SIRT1 の過剰発現や活性化が軟骨細胞変性を抑制して変形性関節症の進行を抑制すると我々は仮説をたてた。本研究の目的は、SIRT1 の過剰発現による変形性関節症変化が抑制効果を調べることにより、新しい治療方法を開発する手がかりをつくることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) SIRT1 活性化薬剤 SRT1720 投与群の OA 進行抑制効果の検討

週齢 8 週野生型マウス (C57BL/6J) の膝関節に内側半月板不安定化にて OA モデルを作成。術後 SRT1720 投与群 (SRT 群; SRT1720 25mg/kg, 0.2ml, i.p.) と 10% DMSO 投与群 (コントロール群; 0.2ml, i.p.) に分け、週 2 回腹腔内投与を行い、術後 4、8、12、16 週で膝関節を採取。各時点で Osteoarthritis Research Society International (OARSI) スコアを用いて OA の進行を評価した。また、免疫染色にて Sirt1、Mmp-13、Adams-5、cleaved caspase 3、PARP p85、acetylated NF- $\kappa$ B p65 の発現を調べた。さらに、組織学的評価 (synovitis score)。IL-1 の免疫染色を行い、滑膜炎の評価を行った。

#### (2) SRT1720 投与による軟骨細胞に対する影響

生後 5 - 7 日のマウスの骨端より軟骨細胞を採取。2 × 10<sup>5</sup>/well で播種して培養し、

subconfluent に達したところで、0.1 ng/ml IL-1 を添加する群と添加しない群にま

分けた。24 時間培養した後に SRT1720 (0.5 $\mu$ M) と投与し、48 時間後に RNA を採取して、以下の群間で遺伝子発現の変化を比較検討した。 IL-1 $\beta$ -, SRT1720-(コントロール群)

IL-1 $\beta$ -, SRT1720 + IL-1 $\beta$ -, SRT1720 - IL-1 $\beta$ +, SRT1720 +

#### (3) SIRT1 トランスジェニックマウスにおける OA の進行の解析

SIRT1 配列を  $\beta$ -actin locus にノックインし SIRT1 を過剰に発現するマウス SIRT1-KI マウスにおける加齢に伴った変形性関節症の進行を解析。また、内側半月板不安定化による OA モデルを作成し、OA の進行の違いを調べる。

### 4. 研究成果

(1) OARSI スコアは、術後 4 週では両群間に有意差を認めなかったが、術後 8、12 週で SRT1720 投与群のスコアが有意に低値で、OA の進行遅延が認められた (図 1、2)。術後 16 週では有意差をみとめなかった。Sirt1 の発現陽性細胞は術後 8、12 週で SRT 群がコントロール群に比べ有意に増加し、術後 16 週では有意差は認めなかった。

図 1

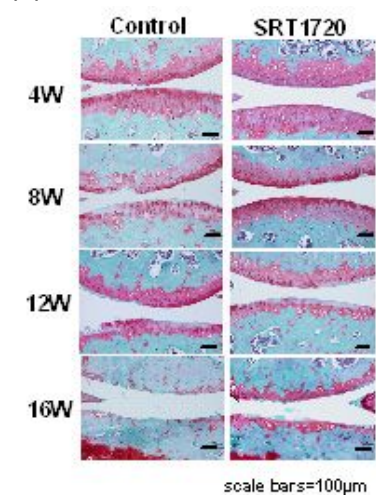
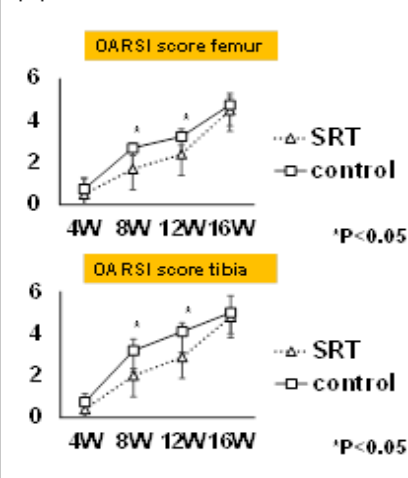
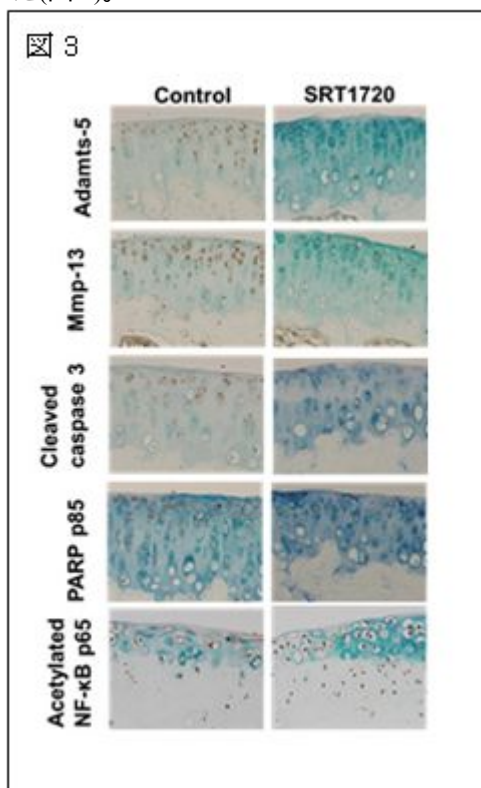


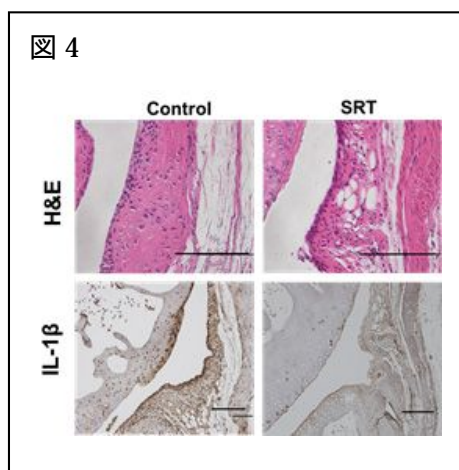
図 2



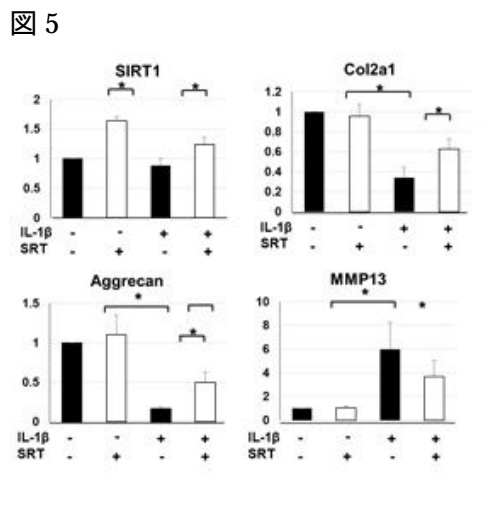
術後 8 週では 2 型コラーゲンの発現を SRT1720 投与群では強く認める一方、Mmp-13、Adamts-5、cleaved caspase 3、PARP p85、acetylated NF- $\kappa$ B p65 の発現は SRT 群で低下し、また陽性細胞数の割合は有意に減少していた(図 3)。



滑膜組織における滑膜炎スコアや滑膜中の IL-1 $\beta$  の発現は SRT1720 群で低下していた。



(2) IL-1 $\beta$  非添加の細胞で SRT1720 投与した群ではコントロール群と比較して SIRT1 の発現は上昇したが、Col2a1、aggrecan の有意な発現変化はみとめなかった。IL-1 $\beta$  投与群では Col2a1、aggrecan の発現はコントロール群と比して有意に低下していた一方、Mmp-13 の発現は上昇していた。SRT1720 投与群では低下した Col2a1、aggrecan の発現は部分的に回復し、一方 Mmp-13 の発現上昇は抑制されていた(図 5)。



(3) SIRT1 過剰発現マウスと野生型マウスの交配から生まれくるマウスは通常の野生型同士のマウスと比して産出数が少なく、交配による、必要マウスの確保に長期を要した。このため、現在老化に伴った、マウスの OA の進行と外傷に伴った OA の進行において、トランスジェニックマウスと野生型で違いがあるかについて解析途中であり引き続き解析を行っていく予定である。

#### まとめ

本研究の結果からは SRT1720 の投与により、マウス OA モデルにおいて OA の進行が抑制されていた。この OA 進行抑制は軟骨分解酵素や軟骨細胞のアポトーシスの減少を伴っていた。また、炎症サイトカインなどの発現を制御するアセチル化 NF- $\kappa$ B p65 の発現は低下しており、SRT1720 による NF- $\kappa$ B 経路の制御を介して軟骨分解基質酵素の発現を抑制することが示唆された。また、SRT1720 の投与により、滑膜炎も抑制されたことにより、滑膜炎の制御も OA 進行の抑制のメカニズムの一つとして考えられた。以上の結果からは SRT1720 や SIRT1 活性化薬剤による OA に対する新たな治療となりうることを示唆された。現在さらに詳細なメカニズムやヒトで投与可能な SIRT1 活性化薬剤による OA 進行抑制効果について調べている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 西田京平、松下雄彦、高山孝治、井口貴雄、張樹蓉、桐月伸輔、田中聡一、荒木大輔、松本知之、黒田良祐、黒坂昌弘、マウス変形性関節症モデルに対する SRT1720 腹腔内投与による関節症進行抑制効果. 第 29 回日本軟骨代謝学会, 2016.2.19-20 広仁会館(広島県・広島市)
2. 松下雄彦、西田京平、松崎時夫、高山孝治、松本知之、荒木大輔、黒坂昌弘、黒

田良祐, SIRT1 による軟骨変性と変形性関節症の抑制. 第 31 回日本整形外科基礎学術集会, 2016.10.13-14 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

3. 西田京平、松下雄彦、高山孝治、井口貴雄、張樹蓉、桐月伸輔、田中聡一、荒木大輔、松本知之、黒田良祐、黒坂昌弘. マウス変形性関節症モデルに対する SRT1720 腹腔内投与による関節症進行抑制効果. 第 31 回日本整形外科基礎学術集会, 2016.10.13-14 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
4. Nishida K, Matsushita T, Takayama K, Tanaka T, Miyaji N, Matsumoto T, Araki D, Kurosaka M, Kuroda R. Intraperitoneal injection of the SIRT1 activator SRT1720 attenuates the progression of experimental osteoarthritis in mice. 13th World congress of the International Cartilage Repair Society. 2016.9.24-27, Sorrento, (Italy)
5. Nishida K, Matsushita T, Takayama K, Tanaka T, Miyaji N, Ibaraki K, Araki D, Kanzaki N, Kuroda R. Intraperitoneal injection of the SIRT1 activator SRT1720 attenuates the progression of experimental osteoarthritis in mice. 63rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2017. 3.19-22. 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

<http://www.kobe-seikei.com/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松下 雄彦 (MATSUSHITA, Takehiko)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：4 0 4 6 7 6 5 0

### (2)研究分担者

黒田 良祐 (KURODA, Ryosuke)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：8 0 3 7 9 3 6 2

松本 知之 (MATSUMOTO, Tomoyuki)  
神戸大学医学部・附属病院・助教  
研究者番号：5 0 5 4 6 5 8 8

高山 孝治 (TAKAYAMA, Koji)  
神戸大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：8 0 5 4 6 4 9 0

黒坂 昌弘 (KUROSAKA, Masahiro)  
神戸大学医学部・医学研究科・名誉教授  
研究者番号：7 0 1 7 0 1 1 5  
(平成 27 年度まで研究分担者)

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

西田 京平 (NISHIDA, Kyohei)  
井口 貴雄 (INOKUCHI, Takao)  
張 樹蓉 (SHURONG, Zhang)