

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10471

研究課題名(和文) p21発現制御による変形性関節症に対する治療への挑戦

研究課題名(英文) p21 deficiency was susceptible to osteoarthritis with inflammation.

研究代表者

西山 隆之(Nishiyama, Takayuki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10379373

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)：P21は細胞周期を調整しているが、それ以外にp21は炎症を抑制する機能を持つと報告されている。また変形性関節症の進行過程で炎症が関与するとの報告も散見される。本研究の目的は変形性膝関節症の進行においてp21の機能を、炎症の制御という観点から明らかにすることである。本研究の結果、DMM surgeryによって生じた変形性膝関節症変化は、p21欠損マウスで進行しており、炎症が全身的にも局所的にもp21欠損マウスで増悪していた。その機序としてはマクロファージの浸潤、軟骨基質分解酵素の発現の増加、IL-1 によるNF- Bの経路の活性化が影響を及ぼしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：P21 was identified as cell cycle regulator which its induction by p53 during a DNA damage-induced G (1)-phase checkpoint response inhibits both Cyclin-dependent kinase activities. We evaluated synovitis with H-E stain section. At postoperative 1week, both p21(-/-) and WT showed synovial membrane outgrowth. At 8week, synovial inflammation was postponed only in p21(-/-) mice. Macrophage invasion to synovium was analyzed with F4/80 immunohistochemistry showed that. surface linier of synovial membranes were strongly stained in p21(-/-) mice compared with WT at1 or 8week. We evaluated and found that synovial membrane of p21(-/-) mice were strongly stained compared with Wt. Safranin O staining in joint cartilage tissues were evaluated by OARSI histopathology classification. P21(-/-) mice post DMM surgery at 8 weeks showed severe cartilage degeneration. We demonstrated that the p21 deficiency was susceptible to osteoarthritis change with macrophage infiltration to synovial tissues.

研究分野：整形外科

キーワード：p21 軟骨 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。P21cip1(以下 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(Cell, 1993)。その後 p21 が細胞のアポトーシスを調節(Oncogene, 1998)、また p21 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 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 p21cip1 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、p21 と炎症に関連して新たな知見が報告された。Maversらは p21 ノックアウトマウスに関節炎を誘発させると、炎症性サイトカインの発現上昇を介して早期に関節破壊を引き起こすことを報告している(Arthritis Rheum, 2012)。一方、変形性関節症の発症機序に炎症性サイトカインの関与が報告されている。関節症軟骨組織と正常軟骨組織との炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 など)の発現を比較すると変形性関節症患者でのサイトカイン発現量が上昇しており(Osteoarthritis Cartilage, 2001)、炎症性サイトカインの制御が変形性関節症の発症、進行を防止することが分かっている。(Osteoarthritis Cartilage, 2013) 我々は、これまでに軟骨細胞にメカニカルストレスが加ると p53 を介したアポトーシスが亢進し、p53 の発現を抑制することによりストレス応答性のアポトーシスを制御できたことを報告してきた(Arthritis Rheum, 2007)。そこで p53 の下流シグナルである p21 に着目し、変形性軟骨組織において p21 の機能解析を行ってきた。p21 ノックアウトマウスに変形性関節症モデルを作成するとノックアウトマウス群では関節症の

進行がワイルドタイプ群に比較して亢進した。

In vitro で機能解析を行うと、STAT3 を介して細胞外基質分解酵素である MMP13 の発現が増加し関節症の進行がより起こることが解明された。さらに我々の検討で人の変形性関節症では p21 の発現が正常群と比較して低下していることが分かった。すなわち軟骨組織においては p21 が恒常性維持に働いているが変形性関節症では p21 の発現が低下しており、そのことが軟骨組織の変性に関与していることが示唆された。これらの成果は、現在英文雑誌に投稿中である。しかしながら p21 の発現抑制により MMP3, アグリカンなどの分子も制御されるが、これらの regulation は STAT3 だけでは説明できず、他の経路が関与すると考えられる。実際の臨床応用を考えると、p21 の発現抑制で関節症が進行する機序をより詳細に解明する必要がある。

そこで今回 p21 の発現制御により変形性関節症が進行する原因を、近年 p21 と炎症性サイトカインとの関連が報告されていることに着目し (Arthritis Rheum, 2012) 変形性関節症における p21 と炎症性サイトカインとの関連を検討することに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、変形性関節症患者における変性した軟骨組織に対し、p21 の発現を調節することで軟骨組織の恒常性を維持させ、関節症の進行を予防することを目的とする。

## 3. 研究の方法

10 週齢の p21 欠損マウスと野生型マウスに、変形性関節症モデル (DMM) を作成した。手術後膝関節を摘出し、滑膜、軟骨について Hematoxylin-eosin (H-E) 染色、Safranin-O (Saf-O) 染色を行った。DMM 手術後 8 週での骨形態学的変化について micro-CT を用いて評価した。全身的な炎症の推移を知るべく、DMM 手術後血清を採取し ELISA 法で IL-1 の発現量を評価した。免疫染色で F4/80、IL-1、phosphorylated-Inhibitor of NF- $\kappa$ B Kinase (p-IKK)、Matrix Metalloproteinase (MMP)-3、MMP-13、Cathepsin K の評価を行った。

Vitro では 1~3 日齢の p21 欠損マウス、野生型マウスから軟骨細胞を単離培養し、IL-1 で刺激を行った後、回収した RNA から cDNA を合成、Real time PCR を行い MMP-3、MMP-13 の発現を評価した。同時に蛋白を回収し、Western blot を用いて p-IKK / の発現を評価した。また、IKK の特異的な阻害薬である BMS-345541 を軟骨細胞に投与しその差を比較した。また Vivo で DMM surgery 後に関

節内に BMS-345541 を注射する群を作成し、p-IKK / 、MMP-3、MMP-13 の発現について免疫染色で評価した。

#### 4 . 研究成果

H-E 染色で滑膜炎を評価したところ術後 1 週、8 週ともに p21 欠損マウスで強い滑膜炎像を認めた。Saf-O 染色標本は OARSI score で評価し、術後 8 週の p21 欠損マウスにおいてより進行した軟骨変性を認めた (図 1)。micro-CT では Bone Surface density(BS/TV) 、 Trabecular Separation(Tb.Sp)が p21 欠損マウスで有意に高値であり、Trabecular Thickness(Tb.Th)、軟骨下骨厚は p21 欠損マウスが有意に低値であった。ELISA の結果、IL-1 $\beta$  は control を除く各 time point で p21 欠損マウスが有意に高い値を示した。滑膜において F4/80、IL-1 $\beta$ 、p-IKK  $\alpha/\beta$ 、軟骨において IL-1 $\beta$ 、p-IKK、MMP-3、MMP-13 のいずれも p21 欠損マウスで強い染色性を認めた (図 2)。BMS-345541 を関節内に注射することで p21 欠損マウスと野生型マウスの p-IKK  $\alpha/\beta$ 、MMP-3、MMP-13 発現量は有意に抑制された。

また、脛骨骨端部での Cathepsin K 陽性細胞を計測したところ、p21 欠損マウスで多くの陽性細胞を認めた。

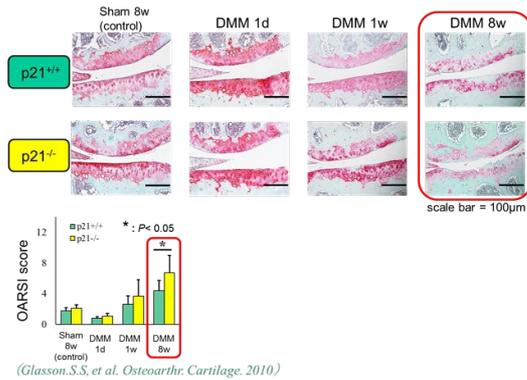
Real-time PCR の結果、MMP-3、MMP-13、ともに p21 欠損マウスで有意に強い発現を認めた。BMS-345541 で前処置を行った群では p21 欠損マウス、野生型のいずれも MMP-3、MMP-13 の発現は抑制され、p21 欠損マウス、野生型マウス群間に有意差は見られなかった (図 3)。Western blot でも BMS-345541 での前処置を行った群では、両群ともに p-IKK  $\alpha/\beta$  の発現量が抑制された。

p21 欠損マウスは変形性関節症が進行しやすいという結果が得られた。

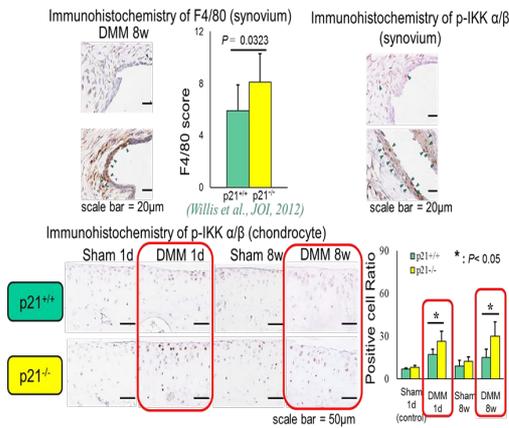
DMM 手術後の血清中の IL-1 $\beta$  は一貫して p21 欠損マウスで有意に上昇しており、手術の炎症反応、機械的なストレスのいずれに対しても p21 欠損マウスが強く反応することを示す結果となった。p21 欠損マウスでは炎症性サイトカイン担体であるマクロファージの滑膜浸潤が増多することが過去にリウマチモデルの実験で報告されており、我々の検討でも p21 欠損マウスで F4/80 強い染色性を示し、炎症反応増悪の因子と考えられた。組織学的に術後 1 日では軟骨の変性、滑膜の重層化はいずれの群でも認めなかったが、IL-1 $\beta$ 、MMP-3、MMP-13 さらに p-IKK の発現が p21 欠損マウスで有意に増加していた。よって

Vivo、Vitro いずれの実験でも IL-1 $\beta$  刺激による NF- $\kappa$ B を介した炎症が亢進し、結果として MMP-3、MMP-13 の発現により OA が進行したと考えられた。

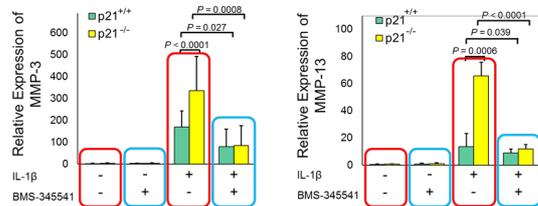
(図 1)



(図 2)



(図 3)



## 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)

Hayashi S, Fujishiro T, Hashimoto S, Kanzaki N, Chinzei N, Kihara S, Takayama K, Matsumoto T, Nishida K, Kurosaka M,

Kuroda R. p21 deficiency is susceptible to osteoarthritis through STAT3 phosphorylation. Arthritis Res Ther. 査読有 17:314. 2015

Kihara S, Hayashi S, Hashimoto S, Kanzaki N, Takayama K, Matsumoto T, Chinzei N, Iwasa K, Haneda M, Takeuchi K, Nishida K, Kuroda R. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-1-Deficient Mice are Susceptible to Osteoarthritis Associated with Enhanced Inflammation. J Bone Miner Res. 査読有 May;32(5):991-1001. 2017

[学会発表](計 3 件)

Kihara S, Hayashi S, Kanzaki N, Hashimoto S, Sakata S, Chinzei N, Haneda M, Kuroda R, Kurosaka M. p21 deficiency was susceptible to osteoarthritis with inflammation. Annual European Congress of Rheumatology Rome, Italy June 10-13 2015

木原 伸介、林 申也、藤代 高明、袖崎 至幸、橋本 慎吾、鎮西 伸顕、羽田 勝彦、黒田 良祐、黒坂 昌弘、p21 欠損は炎症による変形性関節症を加速させる、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会福岡 2016 10 月 13-14 日

Kihara S, Hayashi S, Kanzaki N, Hashimoto S, Sakata S, Chinzei N, Haneda M, Takeuchi K, Kuroda R, Kurosaka M, p21 deficiency was susceptible to osteoarthritis with inflammation. The 62th Orthopaedic Research society Florida USA, Mar 5-8 2016

[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

西山 隆之 (NISHIYAMA, Takayuki)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号: 10379373

(2)研究分担者

林 申也 (HAYASHI, Shinya)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20437487

神崎 至幸 (KANZAKI, Noriyuki)  
神戸大学・医学部附属病院・特命助教  
研究者番号： 30514632

橋本 慎吾 (HASHIMOTO, Shingo)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教  
研究者番号： 20457089