

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17998

研究課題名（和文）p21をターゲットとした関節リウマチにおける関節破壊の制御機能の解析

研究課題名（英文）Susceptibility of cyclin-dependent kinase inhibitor 1 deficient mice to joint destruction of rheumatoid arthritis

研究代表者

福田 康治（Fukuda, Koji）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70579325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：RA滑膜細胞のp21の発現抑制がIL-1 の刺激に対するIL-6、IL-8の上昇、IKK / 、I B のリン酸化の活性化、MMP-3、MMP-9の有意な増加を起こしており、Vivoの実験と同様にヒト滑膜細胞においてもp21ノックダウンによりNF- κ B経路を介した炎症の増悪が起こることが示唆された。さらに、RA滑膜細胞におけるp21の発現はOA滑膜細胞と比較し有意に低値であり、RAにおいてp21の発現低下が滑膜炎の増悪に寄与していることが示唆された。p21発現はRAの滑膜炎と関節破壊を抑制する可能性が示唆され、p21発現のコントロールがRAの新たな治療につながる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAは、滑膜組織が異常増殖しパンヌスを形成して、関節軟骨・骨を破壊する炎症性疾患である。RA治療は早期からのタイトコントロールを目標とされ、生物学的製剤や分子標的薬などが導入されたことにより飛躍的に進歩した。しかし、免疫系を強力に抑制するこれらの治療薬は生体防御に必要な免疫も抑制してしまう。そこで、免疫系を抑制せずに関節炎を制御し、関節軟骨・骨の破壊を抑制する新しいRA治療法の開発が期待されている。我々は、RAにおいてp21の発現低下が滑膜炎の増悪に寄与しており、RAの滑膜炎と関節破壊を抑制する可能性を発見し、p21発現のコントロールがRAの新たな治療につながる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The severity of arthritis was evaluated; histological and immunohistological analyses were performed at days 7, 14, and 28 after injection with a cocktail of five monoclonal antibodies recognizing conserved epitopes on various type II collagen species. The response of p21 siRNA-treated human RA FLSs to IL-1 stimulation was also determined. Arthritis score was higher in p21^{-/-} mice than in p21^{+/+} mice. More severe and prolonged synovitis of the knee joints and earlier loss of staining and cartilage destruction were observed in p21^{-/-} mice than in p21^{+/+} mice. p21^{-/-} mice expressed higher levels of IL-1, F4/80, p-IKK /, and MMPs in cartilage and synovial tissues at each time point, except for the control, via IL-1-induced NF- κ B signaling. IL-1 stimulation significantly increased MMP expression and enhanced IKK / phosphorylation in human FLSs.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：p21 関節リウマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RA は、滑膜組織が異常増殖しパンヌスを形成して、関節軟骨・骨を破壊する炎症性疾患である。RA 治療は早期からのタイトコントロールを目標とされ、生物学的製剤や分子標的薬などが導入されたことにより飛躍的に進歩した。しかし、免疫系を強力に抑制するこれらの治療薬は生体防御に必要な免疫も抑制してしまう。そこで、免疫系を抑制せずに関節炎を制御し、関節軟骨・骨の破壊を抑制する新しい RA 治療法の開発が期待されている。我々は、p21 に着目して変形性関節症の治療に関する研究を行ってきた。p21 ノックアウトマウスに変形性関節症 (OA) モデルを作成すると、STAT3 や IKK の活性を介した炎症により軟骨破壊、関節炎の増強を来し関節症が進行することを報告している (Hayashi, et al. Arthritis Res Ther. 2015) (Kihara, Hayashi, et al. J Bone Miner Res. 2017)。P21 は cyclin dependent kinase 2/4 を阻害して細胞周期を調整するが、RA においては RA 滑膜線維芽細胞における炎症性サイトカイン産生や細胞増殖能を低下させること (Nonomura, et al. J Immunol. 2003)、マクロファージにおける炎症性サイトカイン産生を抑制すること (Maveers, et al. Arthritis & Rheumatism. 2012) が報告されている。また関節炎モデルに p21 を強制発現させると炎症性サイトカインが低下し、滑膜線維芽細胞の増殖能が低下すること (Nasu, et al. J Immunol. 2000) が報告されている。

このように、RA の病態において p21 は RA 滑膜細胞に作用して関節炎を制御しうるということが明らかになってきているが、p21 と RA の関節軟骨に関する報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、p21 の発現を調節することで RA における関節軟骨破壊の抑制が可能であるかを検証する。In vitro で、RA 軟骨細胞および RA 滑膜線維芽細胞における p21 の発現を制御し、p21 が軟骨組織に与える作用を明らかにする。さらに In vivo で、p21 ノックアウトマウスに関節炎モデルを作成し、関節破壊に p21 がどのように関与するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

In Vivo

p21 欠損マウス(n = 16、p21 欠損群)と野生型マウス(n = 16、WT 群)を使用し、抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体による CAIA 関節炎モデルマウスを作成した。関節炎スコアを用いた肉眼的評価、マウス膝関節の滑膜及び関節軟骨でのヘマトキシリンエオジン(HE)染色、サフラニン O 染色による組織学的評価及び免疫学的組織評価、血清中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α の ELISA による評価を行い、免疫学的組織評価では IL-1 β 、TNF- α 、p-IKK α / β 、MMP-3、MMP-9、MMP-13、F4/80、CD86、CD206 の染色を行った。

In Vitro

RA(n = 5)及び OA 患者の(n = 5)の滑膜細胞を使用し、コントロール群と、nonspecific siRNA を導入した群(コントロール siRNA 群)と、p21 siRNA を導入した群(p21 siRNA 群)の 3 群に分け、さらに細胞を IL-1 β 刺激の有無で分けそれぞれの蛋白・RNA を採取し RT-PCR で p21、IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9 の評価を行い、ウエスタンブロッティング法にて p-IKK α / β 、p-I κ B α 、I κ B α の評価を行った。それぞれの結果を関 analysis of variance 検定を行い、各群の比較を Tukey's post hoc test で統計学的に解析した。

4. 研究成果

関節炎スコア・組織学的評価・ELISA による評価

関節炎スコアは、抗体投与後 7、10、14、28 日目に **p21** 欠損群では **WT** 群より有意に高値であった。サフラニン O 染色では、抗体投与後 7 日目で **p21** 欠損群のみ軟骨基質の染色性の低下を認め、投与後 28 日目では **p21** 欠損群で関節軟骨の破壊を認め、**OARSI cartilage OA histopathology** スコアが **WT** 群より有意に高値であった。ヘマトキシリンエオジン染色では抗体投与後 7 日目で **p21** 欠損群は表層細胞の重層化も認め滑膜炎がより高度であった。**p21** 欠損群は 14、28 日目でも **WT** 群に比較し強い滑膜炎を認め、**OARSI recommended** スコアも各タイムポイントで **WT** 群に比較し有意に高値であった。**ELISA** による全身性の炎症性サイトカインの評価でも、**IL-1 β** 、**IL-6**、**TNF- α** はいずれも各タイムポイントで **p21** 欠損群が有意に高値であった。(図 1)

免疫組織学的評価

炎症性マーカーである **IL-1 β** 、**TNF- α** 、**p-IKK α / β** は関節軟骨において抗体投与後 7、14、28 日目で **p21** 欠損群では **WT** 群より強く染色され、陽性細胞率も有意に高値であった。マクロファージのマーカーである **F4/80**、**CD86 (M1 マクロファージ)**、**CD206 (M2 マクロファージ)** は関節軟骨において抗体投与後 7、14、28 日目で **p21** 欠損群では **WT** 群より強く染色され、**F4/80** スコアと **M1/M2** 比も有意に高値であり **M1** 優位のマクロファージ浸潤の増加を認めた。基質分解酵素である **MMP-3**、**MMP-9**、**MMP-13** は滑膜組織・関節軟骨において、抗体投与後 7、14、28 日目で **p21** 欠損群では **WT** 群より強く染色され、**MMP-3**、**MMP-13** の陽性細胞率も有意に高値であった。(図 2)

PCR

単離培養した **RA** 滑膜細胞と **OA** 滑膜細胞の **RT-PCR** 結果より、**p21** の発現は **RA** 滑膜細胞で **OA** 滑膜細胞と比較して有意に低く、**IL-6**、**IL-8**、**MMP-3**、**MMP-9** の発現は有意に高値であった。**IL-6**、**IL-8**、**MMP-3**、**MMP-9** の測定結果より、コントロール群と **control siRNA** 群の間に有意差は認めず、**p21siRNA** 群のみ各項目で有意な上昇を認め、その上昇の程度は **RA** 細胞でより増強されていた。(図 3)

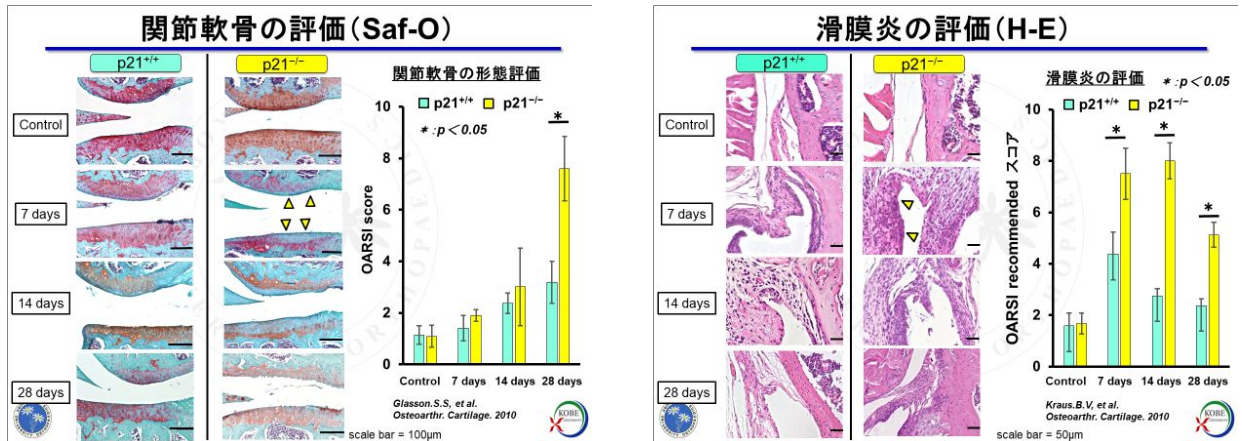
Western blotting

p-IKK α / β 、**p-I κ B α** 、**I κ B α** の測定結果より **RA** 及び **OA** 滑膜細胞ではコントロール群に比較して **p21siRNA** 群で **p-IKK α / β** 、**p-I κ B α** の有意な上昇と **I κ B α** の有意な低下を認めた。さらに、**IL-1 β** 刺激に対する **p-IKK α / β** 、**p-I κ B α** の上昇もしくは **I κ B α** の低下も **RA** 細胞で有意に大きく、**p21** ノックダウンにより **IKK α / β** 、**I κ B α** のリン酸化と **I κ B α** の分解が **OA** 細胞と比較し **RA** 細胞で有意に増強されていた。(図 4)

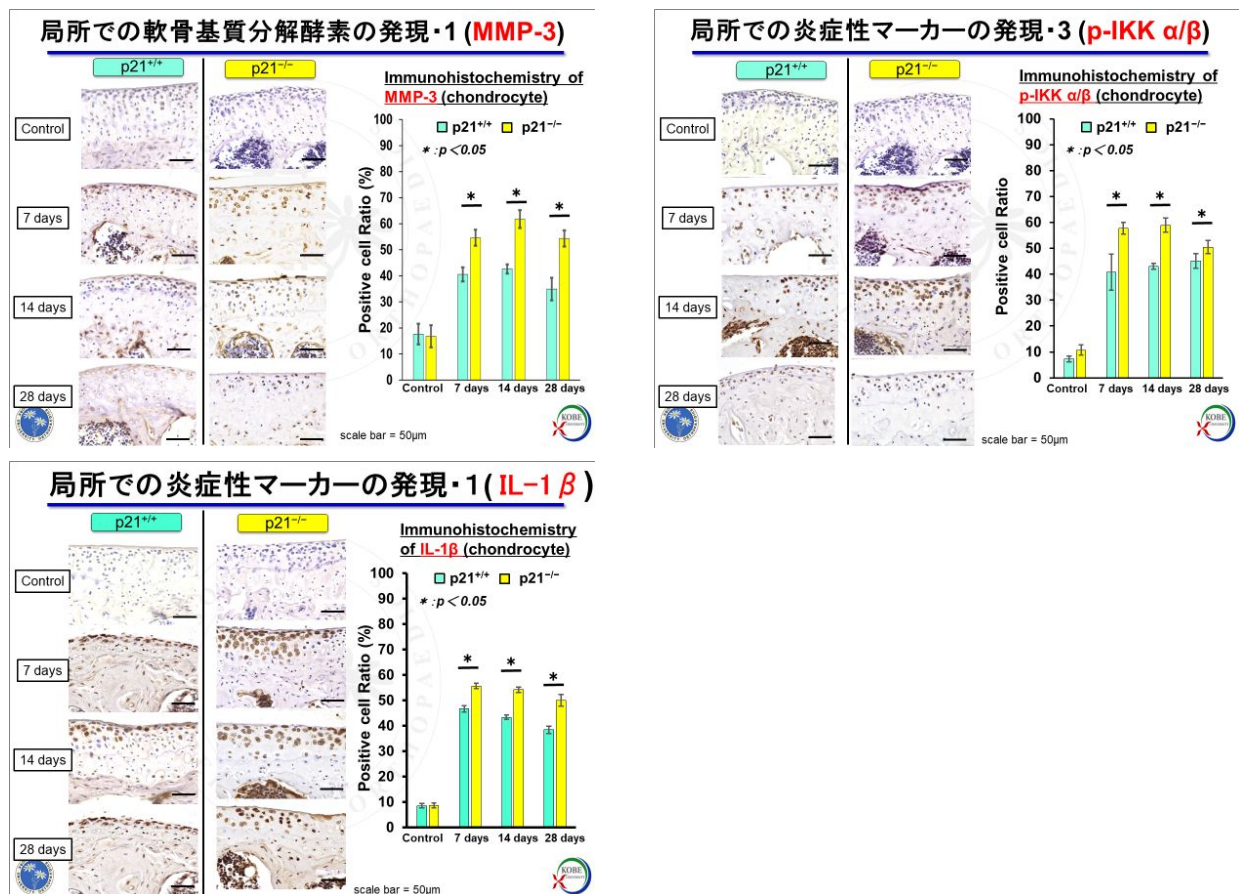
我々の研究により、**p21** 欠損マウス関節炎モデルの滑膜炎の増悪と関節軟骨の破壊や **M1** 優位のマクロファージ浸潤の増加、全身及び関節局所での **IL-1 β** 、**TNF- α** 、**IL-6** の上昇、局所での **p-IKK α / β** 、**MMP-3**、**MMP-9**、**MMP-13** の発現の有意な上昇を認めており、**p21** 欠損関節炎モデルマウスでは **NF- κ B** 経路を介した全身及び局所の炎症の増悪および軟骨の破壊が起こることが示唆された。**Vitro** の実験でも、以前より **p21** が抗炎症効果や細胞増殖能の

低下作用が示唆されているが、本研究では **RA** 滑膜細胞の **p21** の発現抑制が **IL-1 β** の刺激に対する **IL-6, IL-8** の上昇、IKK α/β 、I κ B α のリン酸化の活性化、**MMP-3**、**MMP-9** の有意な増加を起こしており、**Vivo** の実験と同様にヒト滑膜細胞においても **p21** ノックダウンにより **NF- κ B** 経路を介した炎症の増悪が起こることが示唆された。さらに、**RA** 滑膜細胞における **p21** の発現は **OA** 滑膜細胞と比較し有意に低値であり、**RA** において **p21** の発現低下が滑膜炎の増悪に寄与していることが示唆された。**p21** 発現は **RA** の滑膜炎と関節破壊を抑制する可能性が示唆され、**p21** 発現のコントロールが **RA** の新たな治療につながる可能性が示された。

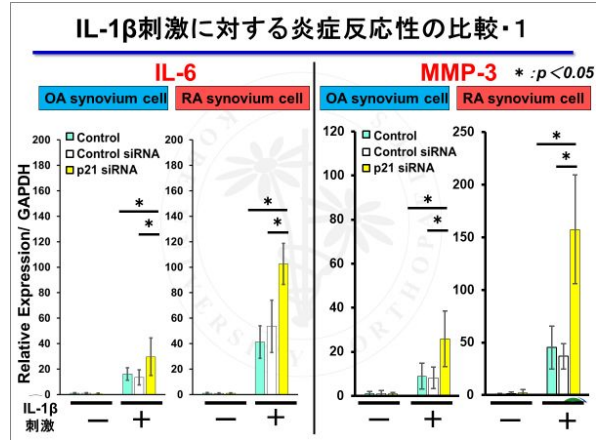
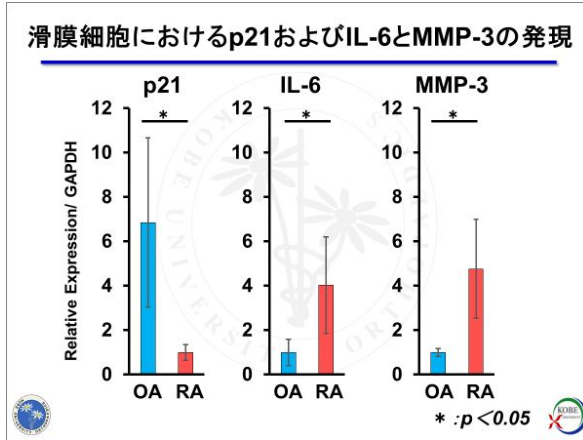
(図 1)



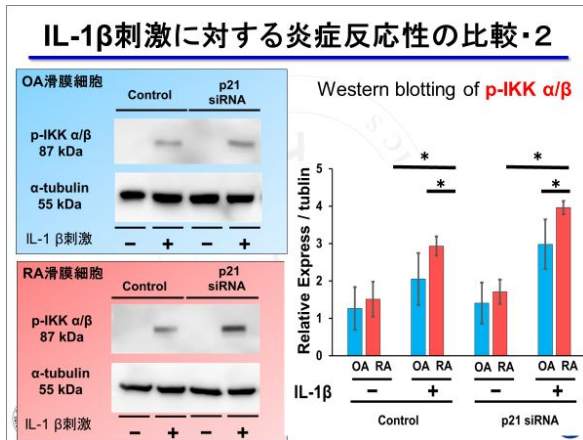
(図 2)



(図 3)



(図 4)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Takashima Yoshinori, Hayashi Shinya, Fukuda Koji, Maeda Toshihisa, Tsubosaka Masanori, Kamenaga Tomoyuki, Kikuchi Kenichi, Fujita Masahiro, Kuroda Yuichi, Hashimoto Shingo, Nakano Naoki, Matsumoto Tomoyuki, Kuroda Ryosuke | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Susceptibility of cyclin-dependent kinase inhibitor 1-deficient mice to rheumatoid arthritis arising from interleukin-1 -induced inflammation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 12516 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92055-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 高島 良典、福田 康治、林 申也、菊池 健一、藤田 雅広、亀長 智幸、壺坂 正徳、橋本 慎吾、高山 孝治、松本 知之、黒田 良祐 |
| 2. 発表標題 関節リウマチの関節軟骨におけるp21の機能解析 |
| 3. 学会等名 第36回 日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshinori Takashima, Koji Fukuda, Shinya Hayashi, Tomoyuki Kamenaga, Kenichi Kikuchi, Masahiro Fujita, Masanori Tsubosaka, Yuichi Kuroda, Shingo Hashimoto, Naoki Nakano, Tomoyuki Matsumoto, Ryosuke Kuroda |
| 2. 発表標題 Susceptibility of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor-1-deficient Mice to Rheumatoid Arthritis from IL-1 -induced Inflammation |
| 3. 学会等名 Annual meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高島 良典、福田 康治、林 申也、橋本 慎吾、高山 孝治、松本 知之、黒田 良祐 |
| 2. 発表標題 関節リウマチの関節軟骨におけるp21の機能解析 |
| 3. 学会等名 第134中部日本整形外科災害外科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高島 良典、福田 康治、林 申也、菊池 健一、藤田 雅広、亀長 智幸 壺坂 正徳、黒田 雄一、橋本 慎吾、高山 孝治、松本 知之、黒田 良祐 |
| 2. 発表標題 関節リウマチの関節軟骨におけるp21の機能解析 |
| 3. 学会等名 第93日本整形外科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高島 良典、福田 康治、林 申也、菊池 健一、藤田 雅広、亀長 智幸 壺坂 正徳、橋本 慎吾、高山 孝治、松本 知之、黒田 良祐 |
| 2. 発表標題 関節リウマチの関節軟骨におけるp21の機能解析 |
| 3. 学会等名 第35日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高島 良典、福田 康治、林 申也、菊池 健一、藤田 雅広、亀長 智幸 壺坂 正徳、橋本 慎吾、高山 孝治、松本 知之、黒田 良祐 |
| 2. 発表標題 関節リウマチの関節軟骨におけるp21の機能解析 |
| 3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshinori Takashima, Koji Fukuda, Shinya Hayashi, Tomoyuki Kamenaga, Kenichi Kikuchi, Masahiro Fujita, Masanori Tsubosaka, Yuichi Kuroda, Shingo Hashimoto, Naoki Nakano, Tomoyuki Matsumoto, Ryosuke Kuroda |
| 2. 発表標題 Susceptibility of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor-1-deficient Mice to Rheumatoid Arthritis from IL-1 -induced Inflammation |
| 3. 学会等名 Annual meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|