

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K09278

研究課題名(和文) KLF15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) Kruppel-like factor 15 deficiency exacerbates osteoarthritis through reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mice

研究代表者

林 申也 (Shinya, Hayashi)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：20437487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節症スコアは術後8週でKO群が有意に高かった。陽性細胞率は全てのタイムポイントでKO群がpIKK /、MMP-13、ADAMTS5は有意に増加し、PPAR、FOXO1、LC3bは有意に減少を認めた。TUNEL染色の陽性細胞率は全てのタイムポイントでKO群が有意に増加した。術後4週および8週のKO群と術後8週のWT群でShamと比較しPPAR、FOXO1、LC3bの有意な減少と、pIKK /、MMP-13、ADAMTS5、TUNEL染色での有意な増加を認めた。KLF15欠損はPPARの発現減少を介して変形性関節症を増悪させると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症に対する新規治療薬の開発で現在のところ効果的な治療法は無い。我々は炎症の制御という観点から変形性関節症の治療法解明に現在までアプローチしてきた。KLF-15が炎症、アポトーシスを制御することは過去の報告で散見されるが、骨も含めて整形外科的領域のin vivo研究は皆無である。よってこの変形性関節症におけるKLF-15の抗炎症作用、抗アポトーシス作用に着目した本研究は非常に独創的であり意義がある。将来KLF-15の発現調節により新たな変形性関節症治療の一つになる可能性を探索する研究であり社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Introduction: We aimed to investigate the function of KLF15 in osteoarthritis progression.

Result: Our results indicated that KLF15 KO DMM mice exhibited significant cartilage degradation compared with WT mice. Immunohistochemistry results revealed KLF15 KO mice susceptibility to OA changes accompanied by reduced PPAR expression. KLF15 KO DMM mice exhibited enhanced pIKK / , ADAMTS5 and MMP13 expression through IL-1 -induced NF- κ B signaling. Furthermore, KLF15 KO mice exhibited induced chondrocyte apoptosis through reduced FOXO1 and LC3B expression. Conclusion: Our results indicated that KLF15 KO DMM mice were susceptible to alterations in OA phenotype through PPAR signaling, including enhanced pIKK / , ADAMTS5 and MMP13 expression induced chondrocyte apoptosis through reduced FOXO1 and LC3B expression, suggesting that KLF15 regulation may constitute a possible therapeutic strategy for OA treatment.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：KLF-15

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は高齢者において代表的な変性疾患である。関節内での同化作用と異化作用のバランスが崩れることで ADAMTS や MMP などの軟骨基質分解酵素が過剰発現し、関節軟骨基質が減少して関節破壊が進行する。近年高齢者の増加とともに OA 患者が増加しているが、現在のところ明確な保存治療はない。Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) は脂肪組織などに分布し、脂肪分化を制御する転写因子として知られているが、近年 PPAR の抗炎症作用や抗酸化作用が報告され、OA 治療のターゲットとして注目されている。また Krüppel-like factor (KLF) 15 が PPAR の制御を介して脂肪細胞分化を制御しているとの報告がある。しかし、KLF15 と OA との関連については不明である。

2. 研究の目的

軟骨特異的 KLF15 ノックアウト (KO) マウスを用いて OA モデルを作成し、炎症およびアポトーシスに KLF15 が及ぼす影響について調べることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

OA モデルの作成には内側半月板不安定化 (DMM) モデルを用いた。タモキシフェン誘導性軟骨特異的 KLF15 KO マウスを作成し、10 週齢の雄の KO マウスおよび WT マウスに、DMM 手術または Sham 手術を行った。術後 1 日、1 週、4 週、8 週で膝関節を回収し各群 6 匹ずつ評価した。組織学的評価としてサフラニン O 染色を行い関節軟骨破壊の評価を行った。免疫組織化学染色にて関節軟骨における KLF15、PPAR、pIKK / 、ADAMTS5、MMP13、FOXO1、LC3B の発現を評価した。アポトーシス細胞の観察のため TUNEL 染色を行った。また妊娠中の母体腹腔内に 4-OH タモキシフェンを投与した後、帝王切開により KO マウスおよび WT マウスを摘出し軟骨細胞を採取した。選択的 PPAR アゴニスト (INT131) または PPAR アンタゴニスト (GW9662) の存在下または非存在下に、IL1 の刺激ありまたは刺激なしで 24 時間後に細胞を回収した。RT-PCR で KLF15、PPAR、ADAMTS5、MMP13、FOXO1、LC3B の mRNA 発現量を測定した。ウェスタンブロット法により pIKK / 、cleaved caspase 3 の発現を評価した。統計解析として各時期の比較にはフリードマン検定およびウィルコクソンの符号順位検定を用いた。群間比較には Mann-Whitney U 検定を用い、必要に応じてボンフェローニ補正を適用した。P < 0.05 で統計学的に有意とした。

4. 研究成果

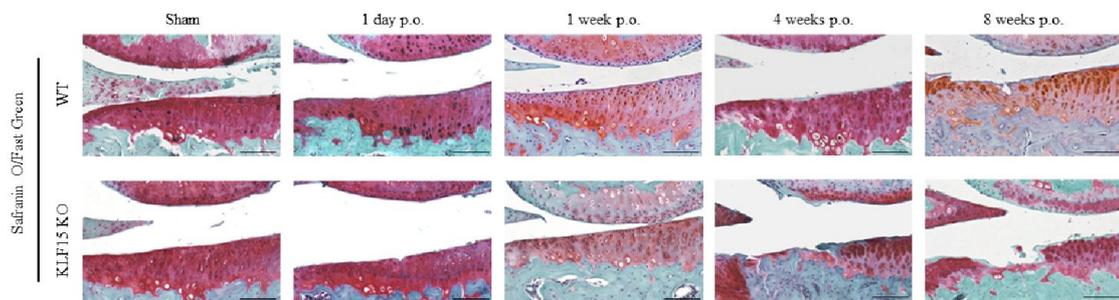
KO 群および WT 群とも術後 4 週、8 週でサフラニンの染色性低下を認め、KO 群でより軟骨の変性を認めた (図 1)。KO 群は WT 群と比較して全ての time point で脛骨プラトーでの KLF15、PPAR、FOXO1、LC3B の発現低下、pIKK / 、ADAMTS5、MMP13 の発現増加を認めた。また KO 群は WT 群と比較して全ての time point で TUNEL 陽性細胞の増加を認めた (図 2)。RT-PCR の結果、IL1 で刺激した KO 軟骨細胞では WT 軟骨細胞と比較して、KLF15、PPAR、FOXO1、LC3b の mRNA 発現量減少、ADAMTS5、MMP13 の mRNA 発現量増加を認めた。GW9662 の存在下では KO 軟骨細胞および WT 軟骨細胞の ADAMTS5 および MMP13 mRNA 発現量は増加し、FOXO1 および LC3B mRNA 発現量は減少し、いずれも INT131 の存在

下で IL1 による発現量の変化はキャンセルされた。ウェスタンブロット法により IL-1 で刺激した KO 軟骨細胞では WT 軟骨細胞と比較して pIKK / 、cleaved caspase 3 の発現増加を認めた(図 3)。

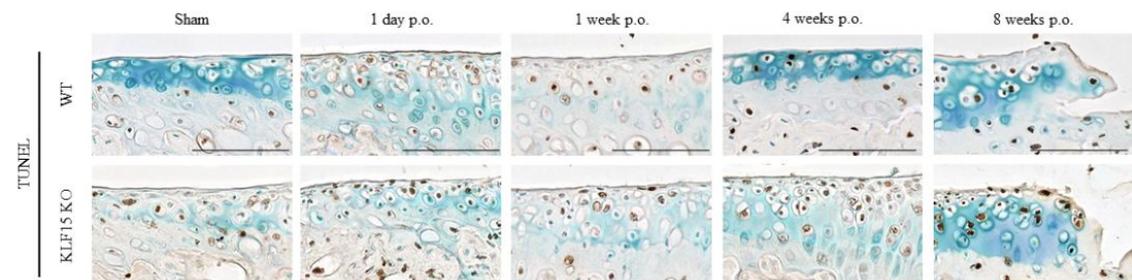
今回の研究により、軟骨特異的 KLF15 KO マウスではコントロールマウスと比較して OA 変化がより進行し、PPAR の発現低下、pIKK / 、ADAMTS5、MMP13 の発現増加、FOXO1、LC3 の発現減少およびアポトーシス増加を認めた。また PPAR リン酸化の阻害が IL1 誘導異化作用を加速し、PPAR 発現の活性化が IL1 誘導異化作用を抑制することを認めた。KLF15 の欠損により PPAR の発現低下を介した IKK の活性化、基質分解酵素の上昇による軟骨変性の促進、オートファジーの減少、アポトーシスの促進により OA 変化が増悪することが示唆された(図 4)。

本研究は、OA における炎症やアポトーシスについて KLF15 が及ぼす影響を研究したものであるが、従来解明されていなかった KLF15 と OA との関連性に関してマウスの組織を使用して初めて証明した報告である。KLF15 の発現調節によって OA の新たな治療法に繋がる可能性がある。

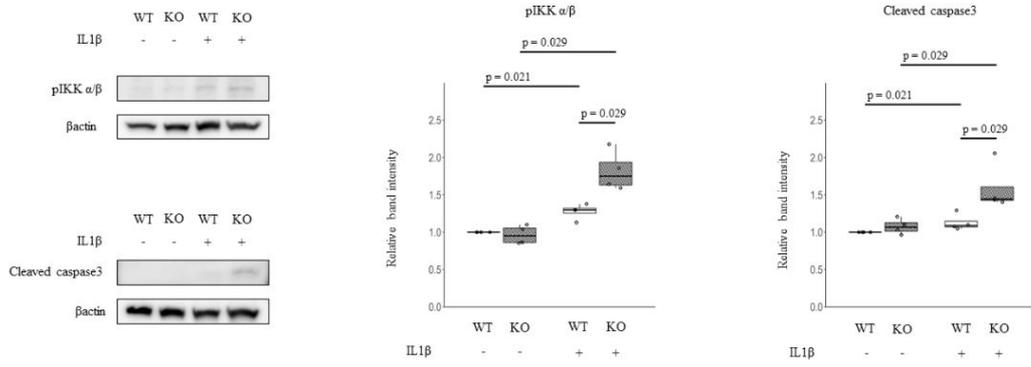
(図 1)



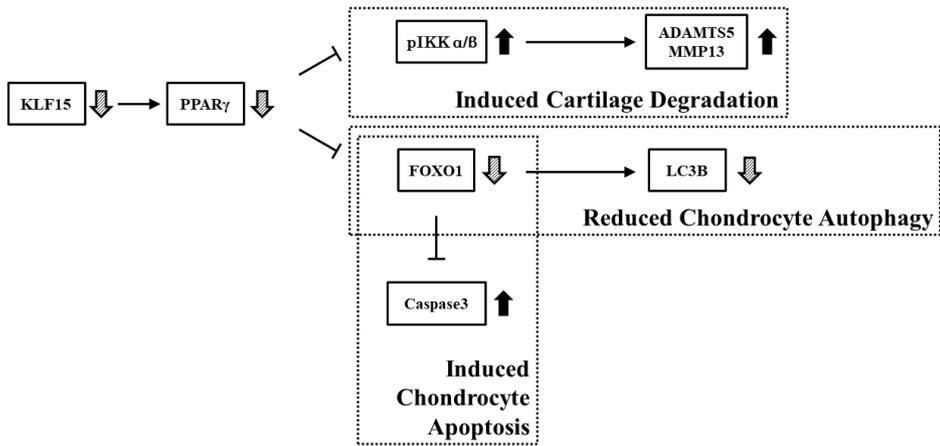
(図 2)



(3)



(4)



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ikuta Kenmei, Hayashi Shinya, Kikuchi Kenichi, Fujita Masahiro, Anjiki Kensuke, Onoi Yuma, Tachibana Shotaro, Suda Yoshihito, Wada Kensuke, Kuroda Yuichi, Nakano Naoki, Maeda Toshihisa, Matsumoto Tomoyuki, Hosooka Tetsuya, Ogawa Wataru, Kuroda Ryosuke	4. 巻 32
2. 論文標題 Kruppel-like factor 15 deficiency exacerbates osteoarthritis through reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 28 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2023.08.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 生田 健明
2. 発表標題 KLF15の欠損はPPAR の発現低下を介して変形性関節症を増悪させる
3. 学会等名 第140回中部日本整形外科災害外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生田健明、林申也、菊池健一、藤田雅広、安喰健祐、栖田慶仁、和田健佑、黒田雄一、中野直樹、前田俊恒、松本知之、黒田良祐
2. 発表標題 KLF15欠損マウスの変形性膝関節症モデルにおける機能解析
3. 学会等名 第35回 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	橋本 慎吾 (Shiingo Hashimoto) (20457089)	神戸大学・医学研究科・特命助教 (14501)	
研究分担者	中野 直樹 (Naoki Nakano) (40884458)	神戸大学・医学部附属病院・特命助教 (14501)	
研究分担者	松本 知之 (Tomoyuki Matsumoto) (50546588)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	黒田 雄一 (Yuichi Kuroda) (90884461)	神戸大学・医学部附属病院・医員 (14501)	

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