



## Krüppel-like factor 15 deficiency exacerbates osteoarthritis through reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mice

生田, 健明

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8787号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490012>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Krüppel-like factor 15 deficiency exacerbates osteoarthritis through reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mice

KLF15 の欠損は PPAR $\gamma$  の発現低下を介して変形性関節症を増悪させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

整形外科学

(指導教員：黒田 良祐教授)

生田 健明

## 【目的】

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、2型コラーゲンやアグリカンなどの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  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) 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  $\gamma$  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  $\gamma$  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。

そこで本研究では、軟骨特異的 KLF15 ノックアウト (KO) マウスを用いて変形性関節症モデルを作成し、より OA が進行すると仮説を立て、炎症およびアポトーシスに KLF15 が及ぼす影響について解析を行った。

## 【対象と方法】

神戸大学糖尿病内分泌内科より提供いただいた Klf15-flox マウスと野生型マウス (C57BL/6) との間で 6 世代以上の戻し交配を行い、Col2-CreERT トランスジェニックマウスと交配してタモキシフェン誘導性軟骨特異的 KLF15 KO マウスを作成した。Wild-type (WT) 群には Cre を持たない flox マウスである同腹仔を用いた。6 週齢のマウスに 4-OH タモキシフェン (40 mg/kg) を 5 連日腹腔内投与した。

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。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 (皮膚と関節包のみを切開) を行った。DMM 群は術後 1 日、1 週、4 週、8 週で、Sham 群は術後 8 週で膝関節を回収し、各群 6 匹ずつ評価した。組織学的評価では、サフラニン O 染色を行い Osteoarthritis Research Society International (OARSI) cartilage OA histopathology scoring を用いて関節軟骨破壊の評価を行った。骨の形態学的变化は  $\mu$  CT を用いて評価した。免疫組織化学染色にて関節軟骨における KLF15、PPAR  $\gamma$ 、phospho-I  $\kappa$  B kinase (pIKK)  $\alpha / \beta$ 、a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motif (ADAMTS) 5、matrix metalloproteinases (MMP) 13、forkhead box O (FOXO) 1、light chain (LC) 3B 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 12.5 日および 13.5 日の母体腹腔内に 4-OH タモキシフェン (40 mg/kg) を投与し、18.5 日齢の KO マウスおよび WT マウスを帝王切開にて摘出した。軟骨細胞を採取し、6 well plate に播種した。KO マウスと WT マウス由来の軟骨細胞のオートファジーを評価するために、蛍光プローブ DAPGreen を用いて蛍光免疫染色を行った。また選択的 PPAR  $\gamma$  アゴニスト (INT131) または PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト (GW9662) の存在下または非存在下に、IL1  $\beta$  (10 ng/ml) 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。quantitative reverse-transcription (RT) -PCR で KLF15、PPAR  $\gamma$ 、ADAMTS5、MMP13、FOXO1、LC3B の mRNA 発現量を測

定した。ウェスタンプロット法により pIKK  $\alpha/\beta$ 、cleaved caspase 3 の発現を評価した。

統計解析には R software version 4.3.0.を使用した。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。

### 【結果】

サフラニン O 染色では、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。OARSI スコアは、両群とも術後 4 週、8 週で Sham と比較して有意な増加を認め、KO 群は WT 群と比較して術後 4 週、8 週で有意なスコア増加を認めた。 $\mu$  CT 解析では、KO 群および WT 群は Sham と比較して DMM 後の BV/TV、Tb.Th、軟骨下骨厚が有意に高値であった。さらに、KO 群は WT 群と比べて DMM 後の Tb.Th が有意に高かった。

KO 群は WT 群と比較して脛骨プラトーでの KLF15、PPAR  $\gamma$  の発現低下を認めた。陽性細胞率も KO 群は WT 群と比較して全ての time point で有意な減少を認めた。また KO 群は WT 群と比較して、全ての time point で脛骨プラトーでの pIKK  $\alpha/\beta$ 、ADAMTS5、MMP13 の有意な発現増加を認め、FOXO1、LC3B の有意な発現減少を認めた。TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の評価では、KO 群は WT 群と比較して、全ての time point で TUNEL 陽性細胞の有意な増加を認めた。

DAPGreen を用いた蛍光免疫染色では、飢餓状態の WT 軟骨細胞ではオートファジー誘導を認めたが、未処理の KO 軟骨細胞および WT 軟骨細胞ではオートファジーの誘導は認めなかつた。RT-PCR の結果、IL1  $\beta$  で刺激した KO 軟骨細胞では WT 軟骨細胞と比較して、KLF15、PPAR  $\gamma$ 、FOXO1、LC3b の mRNA 発現量減少を認め、ADAMTS5、MMP13 の mRNA 発現量増加を認めた。さらに、KO 軟骨細胞および WT 軟骨細胞の ADAMTS5 および MMP13 mRNA 発現量は、GW9662 (PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト) の存在下で増加し、IL1  $\beta$  による発現量の増加は INT131 (PPAR  $\gamma$  アゴニスト) の存在下でキャンセルされ、FOXO1 および LC3B mRNA 発現量は、GW9662 の存在下で減少し、IL1  $\beta$  による発現量の減少は INT131 の存在下でキャンセルされた。またウェスタンプロット法により、IL-1  $\beta$  で刺激した KO 軟骨細胞では WT 軟骨細胞と比較して pIKK  $\alpha/\beta$ 、cleaved caspase 3 の発現増加を認めた。

### 【考察】

本研究では、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  $\gamma$  の発現低下、pIKK  $\alpha/\beta$ 、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。また本研究により KLF15 KO 軟骨細胞および WT 軟骨細胞の両方において、PPAR  $\gamma$  リン酸化の阻害が IL1  $\beta$  誘導異化作用を加速し、PPAR  $\gamma$  発現の活性化が IL1  $\beta$  誘導異化作用を抑制することを認めた。

PPAR  $\gamma$  は IKK の活性を抑制することで抗炎症作用を持つ。軟骨特異的 PPAR  $\gamma$  KO マウスの OA モデルでは、MMP13 や COX2 の発現を伴う軟骨の変性、OA 変化の進行を認めることが過去に報告されている。またコラーゲン誘導性関節炎マウスに PPAR  $\gamma$  アゴニストを投

与すると、MMP13 および IL-1 $\beta$  の発現抑制を介して関節炎の重症度が低下することが報告されている。本研究では PPAR $\gamma$  の発現が低下したことで pIKK $\alpha/\beta$ 、ADAMTS5、MMP13 の発現が増加したと考える。

老化軟骨細胞では ALK5 の発現低下により SMAD3 シグナルの活性化が抑制され、FOXO1、LC3 の発現が減少しオートファジーが抑制された結果、細胞死を起こすことや、PPAR $\gamma$  は FOXO1 の活性を抑制してアポトーシスを抑制することが報告されている。本研究では PPAR $\gamma$  の発現が低下したことで、FOXO1、LC3b の発現が減少しアポトーシスが増加したと考える。

これらのことから、KLF15 の欠損は PPAR $\gamma$  の発現低下を介して以下の経路（①IKK の活性化、基質分解酵素の上昇を誘導して軟骨変性を促進する、②FOXO1、LC3B の発現低下によりオートファジーを減少させる、③FOXO1 の発現低下、caspase 3 の増加により軟骨細胞のアポトーシスを促進する）により OA 変化を増悪させることが示唆された。

### 【結語】

本研究の結果より、軟骨特異的 KLF15 KO マウスの OA モデルでは OA がより進行した。KLF15 の発現調節が OA の新たな治療法になりうると考える。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3358 号	氏名	生田 健明
論文題目 Title of Dissertation	<p>Krüppel-like factor 15 deficiency exacerbates osteoarthritis through reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mice</p> <p>KLF15 の欠損は PPAR<math>\gamma</math> の発現低下を介して変形性関節症を 増悪させる</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 <i>竹内千鶴子</i> Chief Examiner</p> <p>副査 <i>吉田也哉子</i> Vice-examiner</p> <p>副査 <i>木村 信子</i> Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

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  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) 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  $\gamma$  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  $\gamma$  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。今回研究者らは、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解析を行った。

## 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  $\gamma$ 、pIKK  $\alpha / \beta$ 、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  $\gamma$  アゴニスト(INT131)または PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト(GW9662)の存在下または非存在下に、IL1  $\beta$  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  $\gamma$ 、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  $\alpha / \beta$ 、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 wilcoxon 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。

## 結果

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。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  $\gamma$ 、FOXO1、LC3B の発現低下、pIKK  $\alpha / \beta$ 、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。RT-PCR の結果、IL1  $\beta$  で刺激した KO 軟骨細胞では WT 軟骨細胞と比較して、KLF15、PPAR  $\gamma$ 、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  $\beta$  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  $\beta$  で刺激した KO 軟骨細胞では WT 軟骨細胞と比較して pIKK  $\alpha / \beta$ 、cleaved caspase 3 の発現増加を認めた。

## 考察、及び結論

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  $\gamma$  の発現低下、pIKK  $\alpha / \beta$ 、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  $\gamma$  リン酸化の阻害が IL1  $\beta$  誘導異化作用を加速し、PPAR  $\gamma$  発現の活性化が IL1  $\beta$  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  $\gamma$  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。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 との関連性につい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り、価値のある業績であることを認める。本研究、及び、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。