Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

# Cyclin-dependent Kinase Inhibitor-1-deficient Mice are susceptible to Osteoarthritis Associated with Enhanced Inflammation

Kihara, Shinsuke

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2017-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6894号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006894

※ 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。

# 学位論文の内容要旨

## Cyclin-dependent Kinase Inhibitor-1-deficient Mice are susceptible to Osteoarthritis Associated with Enhanced Inflammation

## サイクリンディペンデントキナーゼインヒビター1欠損マウスは炎症の増悪を伴い変形性関節症が進行する

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）

木原　伸介

【目的】

変形性関節症(Osteoarthritis; OA)は様々な要素が複雑に関わる病態である。近年 cyclin dependent kinase(CDK)を阻害して細胞周期を調整する CDK inhibitor の一つである p21 が、OA の発症に関与しているとことが報告されている。我々は過去に p21 欠損マウスに変形性関節症モデルを作成すると、Signal Transducers and Activator of Transcription-3 の活性化を介して OA が進行すると報告した。

しかしながら、なぜ p21 欠損マウスでは OA が進行するのか、その機序については未だに明らかではない部分が多い。今回我々は p21 欠損が、変形性関節症の進行において生じる炎症反応にどのように影響するかについて検討した。

【方法】

10 週齢の p21 欠損マウスと野生型マウスに、Destabilization of the medial meniscus (DMM) surgery を行い、変形性関節症モデルを作成した。手術後 1 週と 8 週で膝関節を摘出し、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 週間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 1 日、3 日、1 週間、2 週間、4 週間、8 週間で血清を採取し ELISA 法で IL-1β の発現量を評価した。免疫染色を行って、マクロファージのマーカーである F4/80、炎症反応に関連する IL-1β、phosphorylated-Inhibitor of NF-κB Kinase(p-IKK)、軟骨基質の分解酵素である Matrix Metalloproteinase(MMP) -3、MMP-13、破骨細胞のマーカーである Cathepsin K についての評価を行った。

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-1β で 24 時間刺激を行った後、回収した RNA から cDNA を合成、real time PCR を行い MMP-3、MMP-13 の発現を検討した。また、同時に蛋白を回収し、Western blot を用いて p-IKK α/β の発現を検討した。

また、IKK の特異的な阻害薬である BMS-345541 を単離した軟骨細胞に 30 分前処置を行った後 IL-1β で刺激を行い、MMP-3、MMP-13、p-IKK α/β の発現を検討、Vivo では DMM surgery 後に関節内に BMS-345541 を関節注射し、p-IKK α/β、MMP-3、MMP-13 について免疫染色で確認した。

【結果】

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。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。これらの結果は骨梁が細く疎であり、軟骨化骨が菲薄化していることを意味し、いずれも変形性関節症の進行を示唆するものである。ELISA の結果、IL-1β 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。

滑膜は F4/80、IL-1β、p-IKK α/β の、軟骨は IL-1β、p-IKK、MMP-3、MMP-13 の免疫染色を行った。滑膜の F4/80 染色については F4/80 score を用いて評価し、軟骨の IL-1β、p-IKK α/β、MMP-3、MMP-13 については陽性細胞率を計測したところ、いずれも p21 欠

損マウスで強い染色性を認めた。また、脛骨骨端部での Cathepsin K 陽性細胞を計測したところ、p21 欠損マウスが多くの陽性細胞を認めた。

BMS-345541 の関節内注射については、100μg の投与で p-IKK α/β の発現が有意に抑制されるという結果が得られたため、p21 欠損マウス、野生型マウスに DMM surgery を行った後、BMS-345541 を 100μg 投与して、術後 1 日で組織を回収し、p-IKK、MMP-3、MMP-13 の染色を行った。その結果、p-IKK α/β、MMP-3、MMP-13 いずれも BMS-345541 を関節内に注射することで野生型と同程度の発現量に抑制できることが示された。

Real-time PCR の結果、MMP-3、MMP-13、ともに p21 欠損マウスで強い発現を認めた。BMS-345541 で前処置を行った後に IL-1β 刺激を行った群では 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。Western blot では軟骨細胞に IL-1β で刺激を加えた際の p-IKK α/β の発現を評価したところ、p21 欠損マウスで強い発現を認めた。さらに、BMS-345541 での前処置を行ったところ、10μM 以上の濃度で前処置を行うことで両群ともに p-IKK α/β の発現量が抑制され、両群間の発現量の有意差も消失した。

【考察】

本研究の結果、micro-CT では軟骨化骨の破壊が p21 欠損マウスで進行していたが、軟骨下骨の破壊は変形性膝関節症進行の原因となり得ることが報告されている。p21 欠損マウスでは骨端部での破骨細胞の数が増加しており、この結果は軟骨化骨破壊の機序の一つと考えられた。

DMM 手術後の血清中の IL-1β は p21 欠損マウスで有意に上昇しており、このことは DMM 手術後 1 日目に生じる炎症反応、術後 1 週程度で生じてくる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。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-1β、MMP-3、MMP-13 の発現は p21 欠損マウスで有意に増加していた。一方で sham 群では術後 8 週でも両群ともに軟骨変性は軽微であり、MMP-3、MMP-13 の発現にも差がなかったことから、p21 欠損マウスでの炎症反応の増悪は侵襲や関節の不安定性により惹起されるものと推察される。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し、炎症反応が強く生じることがリウマチモデルの実験で過去に報告されており、今回我々も F4/80 の免疫染色で評価したところ、過去の報告と同様に p21 欠損マウスで有意に増加していた。

IL-1β の発現と MMP-3、MMP-13 の発現を結ぶ経路を調べるために、IL-1β 刺激の下流、NF-κB の経路を制御する IKK について評価したところ、活性型である p-IKK の発現が p21 欠損マウスで増加していることが明らかとなり、さらに Vitro の実験で IL-1β 刺激に対して p-IKK の発現が増加し、MMP-3、MMP-13 の発現も上昇していることより、IL-1β 刺激による NF-κB を介した炎症が亢進し、結果として MMP-3, MMP-13 の発現による OA 変化が進行したと考えられた。

これらの機序について p-IKK の影響を図るため、IKK の特異的な阻害薬である BMS-345541 を用いて、vitro、vivo での変化を検討したところ、p21 欠損マウスでの MMP-3、MMP-13 の発現は野生型に比してより強く抑制された。しかしながら、vivo では術後 1 日までしか変化を確認できておらず、長期的な変化については今後の検討が必要である。

【結論】

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-1β による NF-κB の経路の活性化が影響を及ぼしていると考えらえた。p21 は炎症や変形性関節症に抗する重要な役割を持つと考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

# 論文審査の結果の要旨

| 受付番号 | 甲 第2688号 | 氏　名 | 木原伸介 |
|---|---|---|---|
| 論文題目<br>Title of Dissertation | サイクリンディペンデントキナーゼインヒビター1欠損マウスは炎症の増悪を伴い変形性関節症が進行する<br><br>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor-1-deficient Mice are susceptible to Osteoarthritis Associated with Enhanced Inflammation | | |
| 審査委員<br>Examiner | 主　査<br>Chief Examiner<br>副　査<br>Vice-examiner<br>副　査<br>Vice-examiner | 小川 琢<br>石田達郎<br>味木 徹夫 | |

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

変形性関節症(Osteoarthritis; OA)は様々な要素が複雑に関わる病態である。近年cyclin dependent kinase(CDK)を阻害して細胞周期を調整するCDK inhibitorの一つであるp21が、OAの発症に関与するとの報告がなされている。しかしながら、その機序については未だに明らかではない。本研究はp21欠損が、変形性関節症の進行において生じる炎症反応にどのように影響するかについて検討したものである。

本研究の実験手法は以下の通りである。まず、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-1βの発現量を評価した。免疫染色でF4/80、IL-1β、phosphorylated-Inhibitor of NF-κB Kinase (p-IKK)、Matrix Metalloproteinase (MMP)-3、MMP-13、Cathepsin Kの評価を行った。また、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-1β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 α/β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 α/β、MMP-3、MMP-13の発現について免疫染色で評価した。

本研究の主要な結果は以下の通りである。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。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-1β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-1β、p-IKK α/β、軟骨においてIL-1β、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。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 α/β、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の結果では、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。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 α/βの発現量が抑制された。

以上より、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、そのメカニズムとしてIL-1βを介した炎症が関与する可能性が示唆された。

本研究はp21欠損マウスと野生型マウスにおける変形性関節症の進行を比較したものであるが、従来行われていない変形性関節症モデルにおける炎症反応に着目して評価した研究である。p21欠損マウスでは局所、全身共に炎症が増悪しており、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-1βによるNF-κBの経路の活性化が影響していると考えらえた。p21は炎症や変形性関節症に抗する重要な役割を持つと考えられ、この知見は変形性関節症治療に関する新たなアプローチの礎として価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。