



Intraperitoneal injection of the SIRT1 activator SRT1720 attenuates the progression of experimental osteoarthritis in mice

Nishida, Kyohei

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7161号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007161>

※ 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

Intraperitoneal injection of the SIRT1 activator SRT1720
attenuates the progression of experimental osteoarthritis
in mice

マウス変形性関節症モデルに対するSIRT1活性化剤SRT1720腹腔内投与による関節症進行抑制効果

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)

西田 京平

【目的】

変形性関節症(osteoarthritis; OA)は関節軟骨の変性と破壊、関節辺縁や軟骨下骨の増殖性変化、滑膜炎を伴う関節内の局的な炎症によって特徴付けられる疾患で、最終的には不可逆的な関節変形へ進展してゆく。OAの病態には遺伝的要因に加え、加齢による軟骨基質の構造的、組成的な変化、機械的な負荷、炎症性変化など様々な要因が複雑に関与していると考えられている。OAの進行と構造変化を抑制する根本的な治療薬はなく、対症療法が主体であるのが現状であり、新たな治療法の確立が望まれる分野である。

SIRT1はヒストン脱アセチル化酵素であり、タンパク質の機能や遺伝子の発現を制御している。これまでに我々は、*in vitro*で、SIRT1が軟骨細胞においてアポトーシスを抑制すること、軟骨細胞内のSIRT1抑制によりOA関連遺伝子の発現が増加すること、*in vivo*では、軟骨細胞特異的SIRT1コンディショナルノックアウトマウスではOA進行が加速したことを報告してきた。すなわち、SIRT1がOA進行に抑制的に働き、OAの病態に関与していることが示唆される。しかしながら、*in vivo*においてSIRT1活性化によるOA進行の抑制効果については十分に調べられていない。そこで本研究の目的は、SIRT1活性化剤であるSRT1720(Selleck Chemicals; Houston, Texas, USA; 分子量469)のOA進行抑制効果についてマウスを用いて検討することである。

【方法】

週齢8週の野生型雄マウス(C57/BL6J)の膝関節の内側半月板不安定化することによりOAモデルを作成した。術後SRT1720投与群(SRT群; SRT1720 25mg/kg、0.2ml、i.p.)と0.2%DMSO投与群(コントロール群; 0.2ml、i.p.)に分け週2回腹腔内投与を行い、術後4、8、12、16週で膝関節を採取した。腹腔内投与はsacrificeまで継続した。膝関節を採取の後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定した後にパラフィン切片を作成(n=5 for each time point/group)。各時点でのOsteoarthritis Research Society

International (OARSI) スコアを用いて OA の進行を評価した。加えて、骨棘の成熟度・サイズについての評価も行った。また、免疫染色にて Sirt1、Mmp-13、Adamts-5、cleaved caspase 3、PARP p85、acetylated NF- κ B p65、Col II の発現を調べた。また、滑膜の組織学的評価 (synovitis score)・IL-1 β の免疫染色を行い、滑膜炎の評価を行った。

また、in vitro の実験として、日齢 5-7 のマウスの大腿骨遠位部・脛骨近位部の骨端軟骨を採取、培養の後、IL-1 β (0.1ng/ml) 単独で添加した群、SRT1720 (0.5 μ M) 単独で添加した群、IL-1 β (0.1ng/ml) と SRT1720 (0.5 μ M) をともに添加した群、いずれも添加しない control 群の計 4 群作成した。48 時間培養後に real time PCR で Sirt1、Colla1、Col2a1、aggrecan、Adamts-5、および Mmp-13 の発現を評価した。

【結果】

両群ともに各時点での体重に有意差は認めなかった。

まず、SRT1720 の OA に対する治療効果を検討した。両群ともに経時に関節軟骨の変性が進行していた。OARSI スコアは、術後 4 週・16 週では両群間に有意差を認めなかつたが、術後 8・12 週では SRT 群のスコアが有意に低値であった。骨棘評価においては、成熟度・サイズともに両群とも経時に増加していった。各時点で骨棘成熟度に有意差は認めなかつたが、骨棘サイズは術後 4 週・8 週において SRT 群が有意に低値であった。

Sirt1 の発現陽性細胞の割合は術後 4 週では両群間に差はなく、術後 8・12 週で SRT 群がコントロール群に比べ有意に増加し、OA の進行に伴って術後 16 週では両群ともに徐々に減少し有意差は認めなかつた。

軟骨基質分解酵素である Mmp-13、Adamts-5 の発現陽性細胞の割合は術後 4・8 週でコントロール群が有意に高値であったが、術後 12 週では両群間に差は認めなかつた。

術後 8 週における Cleaved caspase 3、PARP p85、acetylated NF- κ B p65 の発現は SRT 群で低下し、また発現陽性細胞の割合も有意に低下していた。一方で術後 8 週にお

ける Col2 の発現・発現陽性細胞の割合は SRT 群で有意に増加していた。

術後 4・8 週の Synovitis score は SRT 群で有意に低下していたが、術後 12・16 週では両群間に差は認めなかつた。術後 4 週・8 週における滑膜中の IL-1 β の発現も SRT 群で低下していた。

次に軟骨細胞に対する SRT1720 の作用を real time PCR にて検討した。SRT1720 投与により、Sirt1 の発現は有意に上昇していた。IL-1 β による pretreatment を行った軟骨細胞では、SRT1720 投与により Col2a1・aggrecan の発現が有意に上昇し、Mmp-13 の発現が有意に低下していた。

【考察および結論】

本研究ではまず、マウス OA モデルに対して SIRT1 活性化剤である SRT1720 の腹腔内投与により、関節症変化の進行が抑制されることを報告した。これに関与する因子として、関節軟骨での Col2・Sirt1 の発現増加、軟骨基質分解酵素である Mmp-13・ADAMTS-5 の発現低下、アポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3・PARP p85 の発現低下、NF- κ B 経路の調節、滑膜炎の抑制が示唆された。

SIRT1 は長寿因子として知られ、その活性化剤である SRT1720 の in vivo においては寿命延長効果・運動機能改善・代謝改善・インスリン抵抗性の改善が報告され、in vitro では抗炎症効果・抗酸化効果・抗アポトーシス効果が報告されている。SRT1720 は過去には、SIRT1 の酵素活性を上昇させるものとして報告されているが、本研究では SRT1720 の投与により、術後 8・12 週では SIRT1 の発現の増加も認められた。SIRT1 の発現増加により Col2 や aggrecan といった軟骨基質の発現増加の報告があり、本研究の結果を支持するものである。SIRT1 とアポトーシスの関連についてはこれまでわれわれが in vitro・in vivo で報告しているが、本研究では SRT1720 による SIRT1 発現増加が軟骨細胞内でのアポトーシスを抑制し、OA 進行を抑制した可能性が示唆された。SIRT1 が NF- κ B p65 の脱アセチル化を介して NF- κ B 経路を抑制する事、NF- κ B 経路は軟骨細胞

内でMmpsやADAMTSsの発現をpositiveに調整していることが報告されている。本研究では、SRT1720によるSIRT1の活性化でNF- κ B経路が抑制されてMmp-13やADAMTS-5の発現が低下し、OA進行抑制につながった可能性がある。また、滑膜炎とOA進行の関連については、ヒト・動物OAモデルともに過去に報告されている。本研究では、術後4・8週においてSRT1720投与群では滑膜炎が有意に減少しており、OA進行抑制に関与した可能性が示唆された。

結論として本研究では、マウスOAモデルに対してSIRT1活性化剤であるSRT1720の腹腔内投与により、関節症変化の進行が抑制されることを報告した。軟骨基質分解酵素の産生低下、アポトーシスの抑制、NF- κ B経路の調節、滑膜炎の抑制が関与している可能性が示唆された。SRT1720がOAに対する新たな治療となりうることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 2785 号	氏名	西田 京平
論文題目 Title of Dissertation	<p>Intraperitoneal injection of the SIRT1 activator SRT1720 attenuates the progression of experimental osteoarthritis in mice</p> <p>マウス変形性関節症モデルに対するSIRT1活性化剤SRT1720 腹腔内投与による関節症進行抑制効果</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 斎藤 京弘</p> <p>副査 Vice-examiner 寺井 信人</p> <p>副査 Vice-examiner 大野 良治</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

変形性関節症 (osteoarthritis; OA) は関節軟骨の変性と破壊、関節辺縁や軟骨下骨の増殖性変化、滑膜炎を伴う関節内の限局的な炎症によって特徴付けられる疾患で、最終的には不可逆的な関節変形へ進展してゆく。OAの進行と構造変化を抑制する根本的な治療薬ではなく、対症療法が主体であるのが現状であり、新たな治療法の確立が望まれる分野である。SIRT1はヒストン脱アセチル化酵素であり、タンパク質の機能や遺伝子の発現を制御している。研究者らのグループはこれまでに、SIRT1がOA進行に抑制的に働いていることを報告してきた。今回研究者らはSIRT1活性化剤であるSRT1720のOA進行抑制効果について検討した。

方法

週齢8週の野生型雄マウスの膝関節に内側半月板を不安定化することによりOAを作成。術後SRT1720投与群(SRT群; SRT1720 25mg/kg、0.2ml、i.p.)と0.2%DMSO投与群(コントロール群; 0.2ml、i.p.)に分け週2回腹腔内投与を行い、術後4、8、12、16週で膝関節を採取した。各時点でのOsteoarthritis Research Society International (OARSI)スコアを用いてOAの進行を評価した。加えて、骨棘の成熟度・サイズについての評価も行った。また、免疫染色にてSirt1、Mmp-13、Adamts-5、cleaved caspase 3、PARP p85、acetylated NF-κB p65、Col IIの発現を調べた。また、滑膜の組織学的評価(synovitis score)・IL-18の免疫染色を行い、滑膜炎の評価を行った。

結果

SRT1720のOAに対する治療効果を検討した。両群ともに経時的に関節軟骨の変性が進行していた。OARSIスコアは、術後4週・16週では両群間に有意差を認めなかつたが、術後8・12週ではSRT群のスコアが有意に低値であった。骨棘評価においては、成熟度・サイズとともに両群とも経時に増加していく。各時点で骨棘成熟度に有意差は認めなかつたが、骨棘サイズは術後4週・8週においてSRT群が有意に低値であった。

Sirt1の発現陽性細胞の割合は術後4週では両群間に差はなく、術後8・12週でSRT群がコントロール群に比べ有意に増加し、OAの進行に伴って術後16週では両群ともに徐々に減少し有意差は認めなかつた。

軟骨基質分解酵素であるMmp-13、Adamts-5の発現陽性細胞の割合は術後4・8週でコントロール群が有意に高値であったが、術後12週では両群間に差は認めなかつた。

術後8週におけるCleaved caspase 3、PARP p85、acetylated NF-κB p65の発現はSRT群で低下し、また発現陽性細胞の割合も有意に低下していた。一方で術後8週におけるCol2の発現・発現陽性細胞の割合はSRT群で有意に増加していた。

術後4・8週のSynovitis scoreはSRT群で有意に低下していたが、術後12・16週では両群間に差は認めなかつた。術後4週・8週における滑膜中のIL-18の発現もSRT群で低下していた。

考察および結論

SIRT1は長寿因子として知られ、その活性化剤であるSRT1720のin vivoにおいては寿命延長効果・運動機能改善・代謝改善・インスリン抵抗性の改善が報告され、in vitroでは抗炎症効果・抗酸化効果・抗アポトーシス効果が報告されている。今回の研究で、マウスOAモデルに対してSIRT1活性化剤であるSRT1720の腹腔内投与により、関節症変化の進行が抑制されることを報告した。軟骨基質分解酵素の産生低下、アポトーシスの抑制、NF-κB経路の調節、滑膜炎の抑制が関与している可能性が示唆された。

本研究では、SIRT1の関節症変化の進行抑制効果について研究したものであるが、従来行われていない、マウスOAモデルに対してSIRT1活性化剤であるSRT1720の腹腔内投与により、関節症変化の進行が抑制されることを証明した報告である。対症療法が主体であるOAにおいて、SRT1720が新たな治療アプローチとなり得るとした点で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。