



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、Col1a1、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ったが、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的に増加していった。各時点で骨棘成熟度に有意差は認めなかったが、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った。

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った。

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った。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	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		
審 査 委 員 Examiner	主 査 掛 地 昌 弘 Chief Examiner 副 査 寺 師 浩 人 Vice-examiner 副 査 大 野 良 治 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 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ったが、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的に増加していった。各時点で骨棘成熟度に有意差は認めなかったが、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った。

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った。

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った。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- 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。

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。