



## Attenuation of osteoarthritis progression in mice following intra-articular administration of simvastatin-conjugated gelatin hydrogel

Tanaka, Toshikazu

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7476号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007476>

※ 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

Attenuation of osteoarthritis progression in mice following intra-articular administration of simvastatin-conjugated gelatin hydrogel

シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル関節内投与によるマウス変形性関節症の進行抑制効果

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)

田中 聰一

### 【背景】

変形性関節症（OA）は、関節痛や変形を引き起こし、日常生活に障害をもたらす最も一般的な関節疾患である。OAの病態として軟骨細胞からの細胞外マトリックス合成を超える軟骨分解酵素の産生上昇、軟骨細胞のアポトーシスの増加およびオートファジーの低下を含む様々な生物学的変化がみとめられる。OAに対する治療薬として様々な薬剤の研究が行われてきたが、その有効性や安全性は十分でなく、未だ、OAの進行を抑制する疾患修飾性OA薬は開発されていない。そのため、OAに対する新たな治療法が早急に必要とされている。

HMG-CoA還元酵素の阻害剤であるシンバスタチンは、高脂血症の治療や心血管疾患の予防に広く使用されている。シンバスタチンは、コレステロール低下特性に加えて軟骨形成の促進、骨形成の促進、抗炎症作用などの多種多様な生物学的活性を有することが報告されている。さらに、スタチンは様々な細胞においてオートファジーを活性化することが報告されている。これまでにヒト軟骨細胞においてシンバスタチンは異化遺伝子の発現を抑制し、同化遺伝子の発現を促進させることや動物モデルにおいてスタチン投与によるOAの進行抑制効果が報告されている。スタチンは臨床現場で広く使用されており、新しいOA薬として臨床的に応用しやすい有望な候補である一方、高用量全身投与により横紋筋融解症、急性腎不全、および肝機能障害などの重篤な副作用が報告されている。従って、有効量で起これ得る副作用を避けるためには局所投与が望ましいと考えられる。ゼラチンハイドロゲルは、動物およびヒトにおいて安全に使用され得る薬物送達システムであり、近年、シンバスタチンを含有する生分解性ゼラチンハイドロゲルを使用する持続的薬物送達システムが開発されている。本研究の目的はマウスOAモデルにおいてシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル投与の関節内投与によるOA進行抑制効果について調べることとした。

### 【方法】

まず、*in vitro* でシンバスタチンの軟骨細胞に及ぼす影響を調べた。5~6日齢のマウス (C57BL6/J) より関節軟骨細胞を単離し、6穴プレートに  $1.0 \times 10^5/\text{well}$  の密度で播種して培養を行った。細胞は継代を行っていない初代細胞を実験に使用した。まず、0.1または  $1 \mu\text{M}$  のシンバスタチン含有培養液で24時間培養した後にRNAを抽出して遺伝子発現変化を調べた。シンバスタチンは活性化処理をして使用し、シンバスタチン非含有培養液で培養した細胞を対照群とした。次に、IL-1 $\beta$ によって誘発される異化ストレスに対するシンバスタチンの中和効果を調べるために、 $1 \mu\text{M}$  シンバスタチン含有培地もしくは非含有培地中で培養して24時間前処理した後に  $0.1 \text{ ng/mL}$  の IL-1 $\beta$  投与もしくは vehicle の投与を行い、24時間後にRNAもしくはタンパクを抽出した。Real-time PCRにて *Mmp-13*、*Col2a1*、*Adamts-5*、*aggrecan*、*Il-1 $\beta$*  の発現を評価し、Western blotting法にて LC3、mTOR、phosphorylated mTORのタンパク量を評価した。また、上記実験系での軟骨細胞中における LC3 の発現変化を Alexa Fluor 488 を用いた免疫蛍光化学染色にて評価した。

次に、*in vivo* でシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル投与の関節内投与によるOA進

行抑制効果を調べた。10 過齢野生型マウス C57BL6/J の膝関節を切開し、内側半月板不安定化にて OA を誘発した。手術時に(1)コントロール群 (DMSO 投与)、(2)薬剤非含有ゼラチンハイドロゲル群、(3)シンバスタチン溶液群、(4)シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル群の 4 群に分けて関節内投与を行った。術後 4 週および 8 週で膝関節を採取して組織学的解析を行った。各時点での OA の進行は、サフラン O 染色にて Osteoarthritis Research Society International (OARSI) スコアを用いて評価した。また、術後 4 週の免疫組織染色にて LC3、HMGCR、MMP-13、ADAMTS-5、Collagen II(COL2)、IL-1 $\beta$  の発現を調べた。

#### 【結果】

マウス初代培養軟骨細胞において  $0.1\mu\text{M}$  および  $1\mu\text{M}$  シンバスタチン刺激により *aggrecan* および *Col2a1* mRNA の発現は有意に増加し、一方、*Mmp-13* および *Il-1\beta* の発現は有意に減少した。*IL-1\beta* の投与は、*Mmp-13* の発現を有意に促進したが、 $0.1\mu\text{M}$  シンバスタチンによる前処理は *IL-1\beta* 投与による *Mmp-13* の発現上昇を有意に減少させた。また、*IL-1\beta* 投与は *aggrecan* および *Col2a1* の発現を有意に低下させたが、シンバスタチン前処理群ではその発現低下の効果が有意に減弱した。

免疫蛍光染色を用いた解析では、シンバスタチンを投与した軟骨細胞では LC3 の発現の増強をみとめた。また、Western blotting による解析では、シンバスタチン投与により  $0.1\text{ ng}/\text{mL}$  の *IL-1\beta* の存在下または非存在下共に LC3-II /LC3-I 比が増加と、リン酸化 mTOR の減少をみとめた。一方 mTOR の総タンパク量は、シンバスタチン投与によって明らかに変化しなかった。これらの結果は、シンバスタチン投与が正常および OA 様の条件下で mTOR のリン酸化を阻害してオートファジーを活性化することが示唆された。

マウス OA モデルにおける OA の進行は、術後 8 週でシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル群の OARSI スコアが他 3 群と比較して有意に低値で、OA の進行が抑制される傾向を認めた。術後 4 週の組織を用いた免疫染色による解析では、シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル投与群では、コントロール群と比較して関節軟骨中の MMP-13、ADAMTS-5、IL-1 $\beta$  それぞれの陽性細胞率が低下し、COL2 や LC3 陽性細胞率の上昇をみとめた。

#### 【考察】

マウス OA モデルにおいて、シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの膝関節内投与により OA 進行が抑制された。一方で、シンバスタチンの関節内単回投与では OA の進行は抑制されなかったことから、ゼラチンハイドロゲルからのシンバスタチンの徐放により OA 抑制効果が得られたことが示唆された。過去の報告においてスタチンは、ヒト軟骨細胞に対し保護的な作用を持つと報告されているが、本研究でもシンバスタチン投与はマウス軟骨細胞において軟骨分解酵素の減少と細胞外マトリックス産生の増加を認め、シンバスタチンは軟骨に保護的に作用すると考えられた。また、我々は、これまでにオートファジー活性化剤であるラパマイシン投与により、マウス OA モデルにおいて OA 進行を抑制したことを報告したが、本研究においては、シンバスタチン投与による軟骨細胞中のオートファジーの活性化を示唆する所見が *in vitro* および *in vivo* でみとめられた。従って、シンバスタチン含有

ゼラチンハイドロゲルの OA 進行抑制効果の一部はオートファジーの活性化を介した可能性も考えられた。

#### 【結論】

マウス OA モデルにおいて、シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの膝関節内投与により OA 進行が抑制された。その効果は、軟骨分解酵素の減少、細胞外マトリックス産生の上昇やオートファジーの活性化が関与していることが示唆された。シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの関節内投与は、OA に対する新たな治療アプローチとなり得る。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2875 号	氏名	田中 聰一
論文題目 Title of Dissertation	<p>Attenuation of osteoarthritis progression in mice following intra-articular administration of simvastatin-conjugated gelatin hydrogel</p> <p>シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル関節内投与による マウス変形性関節症の進行抑制効果</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 石田 達郎</p> <p>副査 Vice-examiner 村上 卓道</p> <p>副査 Vice-examiner 和氣 みのる</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

## 【目的】

変形性関節症(OA)は関節痛や変形を引き起こし日常生活に障害をもたらす関節疾患である。シンバスタチンはコレステロール低下特性に加えて軟骨形成の促進、抗炎症作用などを有することが報告されている。近年、シンバスタチンを含有するゼラチンハイドロゲルを使用する持続的薬物送達システムが開発された。本研究は、マウス OA モデルにおいてシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの関節内投与による OA 進行抑制効果について調べることを目的とした。

## 【方法】

マウスの初代関節軟骨細胞をシンバスタチンで刺激し、軟骨分解酵素および細胞外マトリックス、オートファジーマーカーの発現量を評価した。また、シンバスタチンと共に培養した後に IL-1 $\beta$  で刺激し、軟骨細胞中における LC3 の発現変化を免疫蛍光化学染色にて評価した。

マウスの膝関節内側半月板不安定化による OA モデルを作製し、手術時に(1)コントロール群、(2)薬剤非含有ゼラチンハイドロゲル群、(3)シンバスタチン溶液群、(4)シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル群の 4 群に分けて関節内投与を行った。膝関節をサフラニン O 染色し、Osteoarthritis Research Society International (OARSI)スコアを用いて病変を評価した。また、免疫組織染色で軟骨分解酵素および細胞外器質の発現を評価した。

## 【結果】

マウス初代培養軟骨細胞においてシンバスタチン刺激により aggrecan、Col2a1 mRNA などの細胞外器質が増加し、軟骨分解酵素 Mmp-13 や IL-1 $\beta$  の発現が減少した。シンバスタチンは IL-1 $\beta$  による Mmp-13 の発現上昇を減少し、aggrecan、Col2a1 の発現低下を減弱した。また、オートファジーマーカーである LC3 の発現の増強と、LC3-II/LC3-I 比が増加し、リン酸化 mTOR の減少を認めた。

マウス OA モデルにおいて、術後 8 週でシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル群の OARSI スコアが他 3 群と比較して低値であり、コントロール群と比較して関節軟骨中の MMP-13、ADAMTS-5、IL-1 $\beta$  の陽性細胞率が低下し、COL2 や LC3 陽性細胞率の上昇を認めた。

## 【考察】

シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの膝関節内投与により、マウス OA モデルにおける OA 進行が抑できることが示された。その機序として、シンバスタチが軟骨細胞における軟骨分解酵素の減少と細胞外マトリックス産生の増加による軟骨保護作用をもつことが考えられた。さらに、シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの OA 進行抑制効果の一部はオートファジーの活性化を介した可能性も考えられた。

以上の知見から、シンバスタチンの OA に対する進行抑制効果と軟骨細胞におけるオートファジー活性化作用が初めて証明された。本研究は、OA に対するシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルを用いた新たな治療アプローチの重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認めめる。したがって、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。