



Knee Osteoarthritis Progression Is Delayed in Silent Information Regulator 2 Ortholog 1 Knock-in Mice

山本，哲也

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8209号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008209>

※ 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

Knee Osteoarthritis Progression Is Delayed in Silent Information Regulator 2 Ortholog 1 Knock-in Mice

SIRT1 導入マウスにおいて変形性膝関節症の進行が遅延する

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)

山本 哲也

【目的】

変形性関節症（OA）は、関節軟骨が摩耗することにより生じる。疾患修飾性 OA 治療薬（DMOAD）は、根本的な OA の病態生理を改善し構造的な損傷を抑制することで、長期的な障害を予防または軽減する可能性がある。

サーチュインは、クラス III ヒストン脱アセチル化酵素ファミリーのメンバーであり、加齢に伴う多様な細胞活動を制御している。Silent information regulator 2 type 1 (SIRT1)は、サーチュインのホモログであり、代謝制御・アポトーシスの抑制・DNA 修復・炎症抑制を行う。我々は以前に、*in vitro* において SIRT1 がヒト軟骨細胞でアポトーシスを抑制すること、OA に関連する遺伝子の発現を抑制することを報告してきた。また *in vivo* では、軟骨細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウスでは OA が進行すること、SIRT1 活性化薬剤の全身投与および関節内注射は OA の進行を抑制することを報告してきた。しかしながら、SIRT1 過剰発現による OA 進行抑制効果は調べられていない。

そこで本研究の目的は、SIRT1-KI マウスの OA モデルにおいて、SIRT1 過剰発現が軟骨の OA を抑制するか検討し、OA 進行の遅延に関するメカニズムを調査することである。

【方法】

SIRT1-KI マウス・genotyping

Jackson 社より購入した SIRT1-KI マウスを野生型マウス（control マウス）と交配により得た新生マウスの尾部から DNA を抽出して genotyping を行い、遺伝子型を同定した。

骨格標本・体重測定

生後 2 日の SIRT1-KI マウス・control マウスの皮膚および内臓を除去したあと、水酸化カリウムに浸して軟部組織を除去した。アルシアンブルー染色で軟骨を染色しアリザリンレッドで硬骨を染色した。上腕骨・尺骨・大腿骨・脛骨・椎体（第 1 腰椎～第 5 腰椎）の長さを計測し骨格の比較をした。体重測定は 1 ヶ月毎に生後 1 年まで計測し比較した。

Sirt1 発現量

生後 7 日および生後 3 ヶ月の SIRT1-KI マウス・control マウスを使用した。筋肉（前脛骨筋・大腿四頭筋）と膝軟骨を採取し、RNA を精製したあと cDNA を合成した。TaqMan アッセイ（Applied Biosystems 社）を用いて Real-time PCR 解析を行い、筋肉および軟骨における Sirt1 の発現量を比較した。

OA モデルマウス

OA モデルマウスは、生後 12 週齢のマウスの内側脛骨半月韌帯を切離し、半月板を不安定化させて作成した。

軟骨細胞培養・Real-time PCR

生後 7 日の SIRT1-KI マウス・control マウス膝軟骨を採取し、軟骨細胞を分離して培養した。各マウスの軟骨細胞において IL-1 β 刺激あり・なしの 4 群に分け、24 時間後に細胞を回収して RNA を採取。Real-time PCR にて *Sirt1*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Mmp-3*, *Mmp-13*, *Aggrecan*, *Adamts-5*, *Xist* mRNA の発現量を比較した。

関節軟骨の組織学的評価・免疫組織化学染色

生後 3 週、術後 4、8、12、16 週の各マウスの膝関節を回収し、サフラニン O 染色を行った。Osteoarthritis Research Society International (OARSI) cartilage OA histopathology grading system を用いて OA の進行を評価した。免疫学的組織評価として SIRT1, type-II collagen, MMP-13, ADAMTS-5, cleaved caspase-3, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) p85, acetylated NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6 の陽性細胞率を計測した。

マイクロアレイ解析

生後 7 日の SIRT1-KI マウス・control マウスの膝由来軟骨細胞を IL-1 β 刺激あり・なしの 4 群に分け、RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析は倉敷紡績株式会社に委託した。Affymetrix GeneChipTM Mouse Gene 2.0 ST Array を使用した。

統計解析

2 群間の比較は t 検定で解析し、3 群間以上の比較は one-way ANOVA 検定を行い、各群間の比較は Bonferroni's post hoc test を用いた。

【結果】

SIRT1-KI マウスの特徴

Genotyping の結果、SIRT1-KI マウスの出産割合は約 40% であった。SIRT1-KI マウスは同胞の control マウスと比較して、骨格および体重に有意な差は見られなかったが、二次骨化中心の出現はやや遅れていた。*Sirt1* mRNA の発現は、SIRT1-KI マウスでは control マウスに比べて有意に高かった。膝関節軟骨では、筋肉組織に比べて *Sirt1* が有意に発現しており、成長に伴う *Sirt1* 発現の有意な減少は見られなかった。

SIRT1-KI マウスにおける OA の進行遅延

OA モデル作成後、SIRT1-KI マウスおよび control マウス共に経時的に関節軟骨の OA は徐々に進行した。術後 4 週の時点で 2 群間に有意差はみられなかったが、術後 8、12、16 週の時点では SIRT1-KI マウスの方が、OARSI スコアが有意に低く OA の進行が遅延していた。

SIRT1-KI マウスにおける軟骨マトリックス分解酵素・アポトーシス・炎症性サイトカインの発現

低下

免疫組織化学的解析の結果、術後 8、12、16 週目において、SIRT1-KI マウスでは control マウスに比べて SIRT1 陽性軟骨細胞の割合が有意に高値であった。Type-II コラーゲン陽性軟骨細胞の割合は、術後 8 週目において、SIRT1-KI マウスで control マウスに比べて有意に高値であった。MMP-13, ADAMTS-5, cleaved caspase 3, PARP p85 fragment, NF- κ B P65, IL-1 β , IL-6 陽性軟骨細胞の割合は、術後 8 週目において、SIRT1-KI 群では control 群に比べて有意に低値であった。

SIRT1-KI 軟骨細胞における、細胞外マトリックスの発現上昇と軟骨分解酵素の発現低下

Real-time PCR 解析では、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では、control マウスの軟骨細胞に比べ、*Sirt1*, *Col2a1*, *Aggrecan* の mRNA 発現が有意に高く、*Col10a1* の発現は低かった。IL-1 β による刺激は、SIRT1-KI マウスと control マウスの軟骨細胞における *Sirt1*, *Col2a1*, *Aggrecan* の mRNA の発現を有意に減少させたが、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では、control マウスの軟骨細胞に比べて、これらの遺伝子の発現が有意に高かった。また、IL-1 β による刺激は、両群の軟骨細胞において *Mmp-3*, *Mmp-13*, *Adamts-5* の mRNA の発現を有意に増加させたが、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では control マウスに比べてその増加が抑制されていた。

マイクロアレイ解析による SIRT1 過剰発現に関連する 21 の遺伝子の同定

SIRT1-KI マウスの軟骨細胞は、control マウスの軟骨細胞と比較して、IL-1 β 刺激なしでは、75 の遺伝子が 2 倍以上に発現上昇し、45 の遺伝子が元の発現量の 50% 以下に低下していた。IL-1 β 刺激下では、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞は、control マウスの軟骨細胞と比較して、119 の遺伝子が 2 倍以上に発現上昇し、104 の遺伝子が元の発現量の 50% 以下に低下していた。SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では、IL-1 β 刺激の有無にかかわらず、control マウスの軟骨細胞と比較して、11 の遺伝子が一貫して 2 倍以上高く、10 の遺伝子が 50% 以下に低下していた。21 の遺伝子の中で OA に関連している可能性がある *Xist* について real-time PCR を行った。マイクロアレイの結果と同様に SIRT1-KI マウスの軟骨細胞において、control マウスの軟骨細胞と比して *Xist* の発現の低下が確認された。

【考察】

本研究により、マウス OA モデルにおいて、SIRT1-KI マウスは control マウスに比べて OA の進行が遅延することが分かった。SIRT1-KI マウスでは、II 型コラーゲンと SIRT1 陽性軟骨細胞が増加し、MMP-13, ADAMTS-5, cleaved caspase 3, PARP p85 fragment, アセチル化 NF- κ B P65, IL-1 β , IL-6 陽性軟骨細胞が control マウスに比べて減少していた。また、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では、IL-1 β による刺激にかかわらず、細胞外マトリックス遺伝子の発現が control マウスに比べて高かった。さらに、IL-1 β 刺激誘発 *Mmp-3*, *Mmp-13*, *Adamts-5* の発現上昇は、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では control マウス由来の軟骨細胞と比して抑制されていた。

過去には SIRT1 は P53 の脱アセチル化を介して細胞のアポトーシスを制御していることと注目されたが、SIRT1-KI マウスでは、アポトーシス様軟骨細胞が減少していることより、アポトーシスの抑制が SIRT1-KI マウスにおける OA 進行遅延に一部寄与している可能性があることが示唆される。

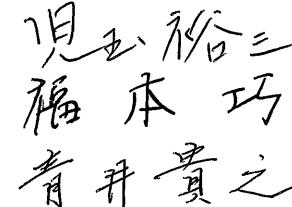
SIRT1 は、細胞外マトリックス遺伝子のポジティブな制御因子として機能していると報告されている。本研究では、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞において、IL-1 β 刺激に関わらず、Col2a1 と aggrecan の発現が増加していた。本研究の結果は、先行研究の結果と一致し、SIRT1 の過剰発現を介した細胞外マトリックス遺伝子の発現上昇が、SIRT1-KI マウスにおける OA の進行遅延のメカニズムに関与している可能性が示唆された。

SIRT1-KI マウスでは、アセチル化 NF- κ B p65 や、MMP-3、MMP-13、ADAMTS-5 などの軟骨分解酵素の発現が control マウスに比べて減少していた。また、SIRT1-KI マウスでは IL-1 β 、IL-6 の発現が control マウスに比べて減少していた。これらの結果は、SIRT1 活性化剤を投与マウスにおいて、MMP-13 およびアセチル化 NF- κ B p65 陽性軟骨細胞の割合の減少し、一方、軟骨特異的 Sirt1 ノックアウトマウスでは増加したという以前の我々のこれまでの知見と矛盾しない結果であった。SIRT1-KI マウスでは、NF- κ B 経路の調節を介して軟骨細胞の軟骨分解酵素の発現を低下させることで、OA の発症が抑制された可能性があると考えられた。

マイクロアレイ解析の結果、IL-1 β 刺激に関わらず、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞では control マウスの軟骨細胞に比べ、11 遺伝子が一貫して 2 倍以上に発現上昇し、10 遺伝子が 50% 以下に発現低下していた。その中でも Xist は、SIRT1-KI マウスの軟骨細胞で一貫して発現が低下していることがわかった。近年、OA のプロセスにおいて long cording (lnc) RNA と miRNA が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。XIST は、X 連鎖染色体の不活性化を制御する lncRNA で、OA の病因へ関与していることが示唆されている。OA の軟骨では XIST の発現が増加しており、XIST のノックダウンは M1 マクロファージに作用して OA の炎症性微小環境を改善したと報告されている。したがって、XIST は、SIRT1-KI マウスにおける OA の進行遅延に関与している可能性もあると考えられた。

【結語】

本研究の結果より、SIRT1 を過剰発現させた SIRT1-KI マウスでは、軟骨細胞において軟骨分解酵素、アポトーシスマーカー、アセチル化 NF- κ B p65 のレベルが低下し、OA の進行が遅延することが明らかになった。SIRT1 の過剰発現は、OA の新たな治療につながる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3141 号	氏名	山本 哲也
論文題目 Title of Dissertation	SIRT1 導入マウスにおいて変形性膝関節症の進行が遅延する Knee Osteoarthritis Progression Is Delayed in Silent Information Regulator 2 Ortholog 1 Knock-in Mice		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

【背景と目的】

サーチュインは、クラス III ヒストン脱アセチル化酵素ファミリーのメンバーであり、加齢に伴う多様な細胞活動を制御している。Silent information regulator 2 type 1 (SIRT1)は、サーチュインのホモログであり、代謝制御・アポトーシスの抑制・DNA 修復・炎症抑制を行う。研究者らのグループは SIRT1 の活性化が変形性関節症(OA)を抑制することを過去に報告してきた。今回研究者らは、SIRT1-KI マウスを用いて SIRT1 過剰発現が軟骨の OA を抑制するか検討し、OA 進行の遅延に関連するメカニズムを検討した。

【方法】

生後 12 週齢の SIRT1-KI マウスと野生型マウスの半月板を不安定化させ、OA モデルマウスを作製した。術後 4、8、12、16 週の各マウスの膝関節を回収し、サフラニン O 染色を行った。Osteoarthritis Research Society International (OARSI) cartilage OA histopathology grading system を用いて OA の進行を評価した。免疫学的組織評価として SIRT1、type-II collagen、MMP-13、ADAMTS-5、cleaved caspase-3、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) p85、acetylated NF- κ B p65、IL-1 β 、IL-6 の陽性細胞率を計測した。生後 7 日の SIRT1-KI マウス・control マウスの膝由来軟骨細胞を IL-1 β 刺激あり・なしの 4 群に分け、RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。統計学的解析には、2 群間の比較は t 検定で解析し、3 群間以上の比較は one-way ANOVA 検定を行い、各群間の比較は Bonferroni's post hoc test を用いた。

【結果】

1) SIRT1-KI マウスにおける OA の進行遅延

術後 4 週の時点で 2 群間に有意差はみられなかったが、術後 8、12、16 週の時点では SIRT1-KI マウスの方が、OARSI スコアが有意に低く OA の進行が遅延していた。

2) SIRT1-KI マウスにおける軟骨マトリックス分解酵素・アポトーシス・炎症性サイトカインの発現低下

術後 8、12、16 週目において、SIRT1-KI マウスでは control マウスに比べて SIRT1 陽性軟骨細胞の割合が有意に高値であった。Type-II コラーゲン陽性軟骨細胞の割合は、術後 8 週目において、SIRT1-KI マウスで control マウスに比べて有意に高値であった。MMP-13、ADAMTS-5、cleaved caspase 3、PARP p85 fragment、NF- κ B P65、IL-1 β 、IL-6 陽性軟骨細胞の割合は、術後 8 週目において、SIRT1-KI 群では control 群に比べて有意に低値であった。

3) マイクロアレイ解析による SIRT1 過剰発現に関連する 21 の遺伝子の同定

マイクロアレイの結果から新たに 21 の遺伝子を同定し、その中で OA に関連している可能性がある XIST について real-time PCR を行った。SIRT1-KI マウスの軟骨細胞において、control マウスの軟骨細胞と比して XIST の発現の低下が確認された。

【考察および結論】

本研究により、マウス OA モデルにおいて、SIRT1-KI マウスは control マウスに比べて OA の進行が遅延することが分かった。SIRT1-KI マウスでは、アポトーシス様軟骨細胞が減少していることより、アポトーシスの抑制が SIRT1-KI マウスにおける OA 進行遅延に一部寄与している可能性があることが示唆された。また、先行研究の結果と一致し、SIRT1 の過剰発現を介した細胞外マトリックス遺伝子の発現上昇が、SIRT1-KI マウスにおける OA の進行遅延のメカニズムに関与している可能性が示唆された。さらに、SIRT1-KI マウスでは、NF- κ B 経路の調節を介して軟骨細胞の軟骨分解酵素の発現を低下させることで、OA の発症が抑制された可能性があると考えられた。

XIST は、X 連鎖染色体の不活性化を制御する lncRNA で、OA の病因へ関与していることが示唆されている。OA の軟骨では XIST の発現が増加しており、XIST のノックダウンは M1 マクロファージに作用して OA の炎症性微小環境を改善したと報告されている。したがって、XIST は、SIRT1-KI マウスにおける OA の進行遅延に関与している可能性もあると考えられた。

本研究は、SIRT1-KI マウスにおいて control マウスと比較し OA の進行が遅延することを明らかにした研究であるが、従来解明されていなかった SIRT1 過剰発現による OA 抑制作用を示した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。