

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20035

研究課題名(和文)概日リズム遺伝子の発現異常が関節軟骨に及ぼす影響に関する検討

研究課題名(英文)The effect of dysregulated circadian rhythm gene expression on articular cartilage homeostasis

研究代表者

赤木 龍一郎(Akagi, Ryuichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10638315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変性し摩耗しつつある関節軟骨においては体内時計をコントロールする概日リズム遺伝子の機能が異常をきたしている。本研究では、この中でも代表的なBMAL1遺伝子とNR1D1遺伝子に注目し、マウスにおいて変形性関節症が進行する過程で概日リズム遺伝子発現は低下することを示した。また、培養軟骨細胞を用いた実験で概日リズム遺伝子の発現を低下させると、細胞機能の恒常性維持に重要な役割を果たす経路が異常をきたすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症はいまだに病態が解明されておらず、予防することも根本的に治療することもできないため、疼痛を緩和するなどの対症療法しかないのが現状である。これまで関節軟骨において概日リズム遺伝子の担う役割はほとんど解明されていなかったが、本研究によりなぜ軟骨が変性し摩耗していくのかという病態の解明に一步近づけることができた。こうした成果の蓄積により、変形性膝関節症の原因が明らかとなれば治療法の開発につながる可能性があり、さらなる研究の成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：The expression of circadian rhythm genes, which controls the internal clock, is dysregulated in osteoarthritic cartilage. We focused on two major genes of the circadian rhythm pathway; BMAL1 and NR1D1 and showed that the expression pattern of these genes diminishes with the progression of osteoarthritis in mouse knees. Furthermore, when circadian rhythm gene expression was inhibited in cultured chondrocytes, the function of pathways that maintain homeostasis of the cell activity was altered.

研究分野：膝関節疾患の病態と治療

キーワード：軟骨細胞 変形性膝関節症 概日リズム NR1D1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨の変性、摩耗から進行とともに骨の変形や関節の破壊に至る変形性膝関節症は我が国でも 2500 万人の患者がいると推計されており、高齢者の生活の質を低下させる大きな要因の一つとなっている。関節軟骨の限局した損傷や欠損に対しては自家培養軟骨移植などの治療が実用化されつつある一方で、関節軟骨が広範に変性し摩耗する上に靭帯や滑膜といった関節内の組織全体に病態が及ぶ変形性膝関節症に対しては有効な治療法がない。疼痛や関節可動域制限に対する対症療法を行うほかに現状において目指すべき治療としては関節軟骨を再生させることだけでなく、軟骨変性の予防が重要であり、そのためには軟骨が変性する原因の解明が不可欠である。我々はこれまでの研究により、健康者と変形性膝関節症患者の膝関節軟骨を採取し、抽出した RNA を次世代シーケンシングにより解析した結果、変形性膝関節症の関節軟骨においては正常と比べて概日リズムを司る遺伝子の発現が低下していることを明らかにした。また、ほぼ同時期に海外の研究グループからも概日リズム遺伝子の変容により変形性膝関節症が進行する可能性を示唆する動物実験の結果が報告されたが、概日リズム遺伝子が膝関節軟骨において果たす機能的意義は明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、概日リズム遺伝子の低下が軟骨細胞に与える影響をさらに解明し、生体内での軟骨における概日リズム遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養軟骨細胞における遺伝子・タンパク発現の解析

培養細胞は一つ一つの細胞がそれぞれの概日リズムをもっており、周期的に遺伝子発現を繰り返していることが知られている。培養細胞の集団にステロイドを負荷することで細胞一つ一つのもつ周期的な活動が同期される。そこで、軟骨細胞でも同様の周期的な遺伝子発現がみられることを確認するために、関節軟骨から単離・培養した軟骨細胞をステロイド負荷により同期した後に、4 時間毎にサンプルを採取した。採取した培養軟骨細胞から RNA を抽出し、概日リズムを制御する機構において中心的な役割を果たし、また互いに抑制的な制御をしていることが知られる NR1D1 遺伝子と BMAL1 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量的に解析を行った。さらに、同培養軟骨細胞から抽出したタンパクをウェスタンブロット法により解析し、タンパク発現についても解析を行った。

(2) 加齢および変形性膝関節症の進行に伴う概日リズムタンパク発現の変化に関する解析

加齢および変形性膝関節症の進行が概日リズム遺伝子の発現に与える影響を評価するために、健康マウスを自然に加齢させた場合およびマウス膝の半月板を外科的に不安定化させることで変形性膝関節症を誘導した場合において、膝関節組織に発現する NR1D1 と BMAL1 の概日リズムタンパクの発現を免疫組織化学染色により解析した。加齢マウスは生後 6 ヶ月、18~24 ヶ月、30~36 ヶ月の三群に分けて組織を採取し、手術モデルマウスは生後 6 ヶ月時点で手術を行い、術後 6 週（生後 7.5 ヶ月）で組織を採取した。

(3) 概日リズム遺伝子の抑制によって軟骨細胞に生じる影響の解析

NR1D1 遺伝子と BMAL1 遺伝子の発現が低下した場合に生じる影響を解析するために、培養軟骨細胞においてこれらの遺伝子発現を small interfering RNA により抑制した。概日リズム遺伝子そのものおよび細胞の恒常性維持に関わる遺伝子の発現に着目し、NR1D1 遺伝子と BMAL1 遺伝子の発現を抑制することによって生じる変化を、リアルタイム PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 培養軟骨細胞において NR1D1 と BMAL1 遺伝子は約 24 時間を一周期とする周期的な発現パターンを示すことが確認され、タンパクの発現も同じ周期で変動することが確認された（図 1）。

このことから、軟骨細胞においても他の細胞と同様に周期的な細胞活動が営まれていることが示された。さらに、NR1D1 と BMAL1 はほぼ反対の周期で変動しており、互いに抑制的に制御していることが示唆された。

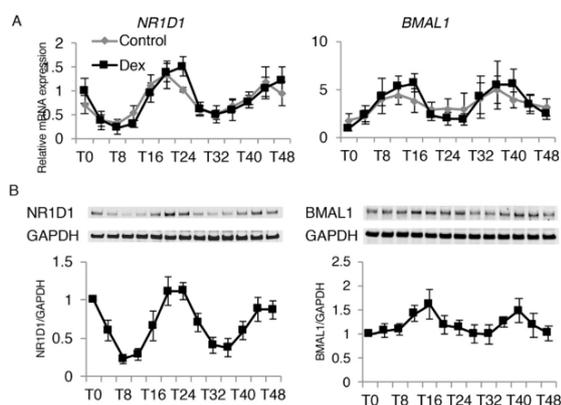


図 1

(2) 健常マウスから採取した膝関節組織標本の免疫組織学的解析において、NR1D1 および BMAL1 タンパクを発現する細胞数は生後 6 ヶ月から生後 30~36 ヶ月にかけて加齢とともに減少した。さらに、外科的に半月板を不安定化させて変形性膝関節症を誘導したマウスにおいては、生後 7.5 ヶ月でありながら加齢マウスにおける生後 30~36 ヶ月齢と同等かそれ以下の発現量であった (図 2)。この結果から、加齢および変形性膝関節症によって NR1D1 および BMAL1 の発現は低下することが示され、加齢や軟骨変性と概日リズム異常との関連が示唆された。

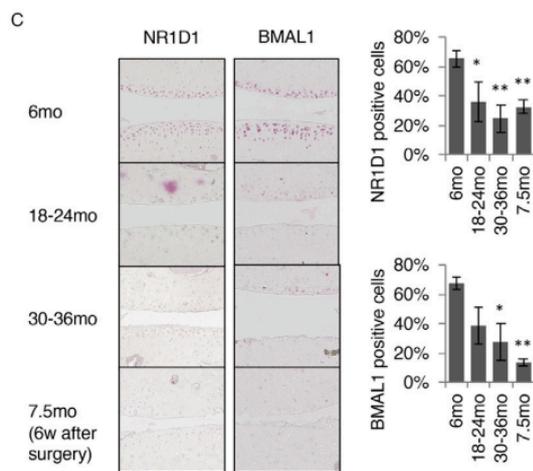


図 2

(3) NR1D1 遺伝子あるいは BMAL1 遺伝子の発現を small interfering RNA で抑制することにより、まず NR1D1 および BMAL1 の概日リズム遺伝子そのものの周期的発現が阻害されることが示された。これにより概日リズム遺伝子の相互制御が確認された (図 3)。

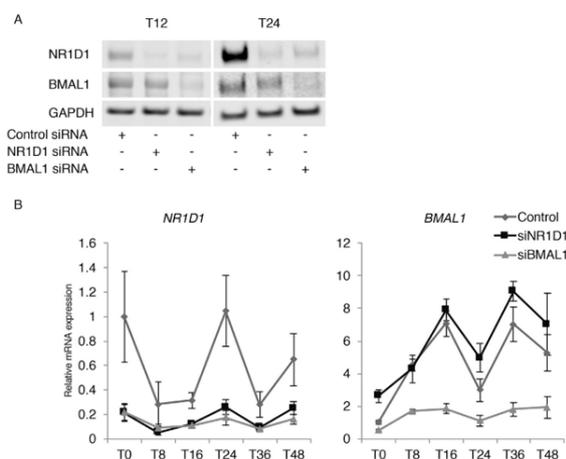


図 3

さらに、軟骨細胞の恒常性維持に重要な役割を示す TGF- β 経路の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析したところ、複数の遺伝子発現が影響を受けることが示された。このことから、概日リズム遺伝子の発現異常が軟骨の恒常性維持に影響をおよぼしていることが示唆された (図 4)。

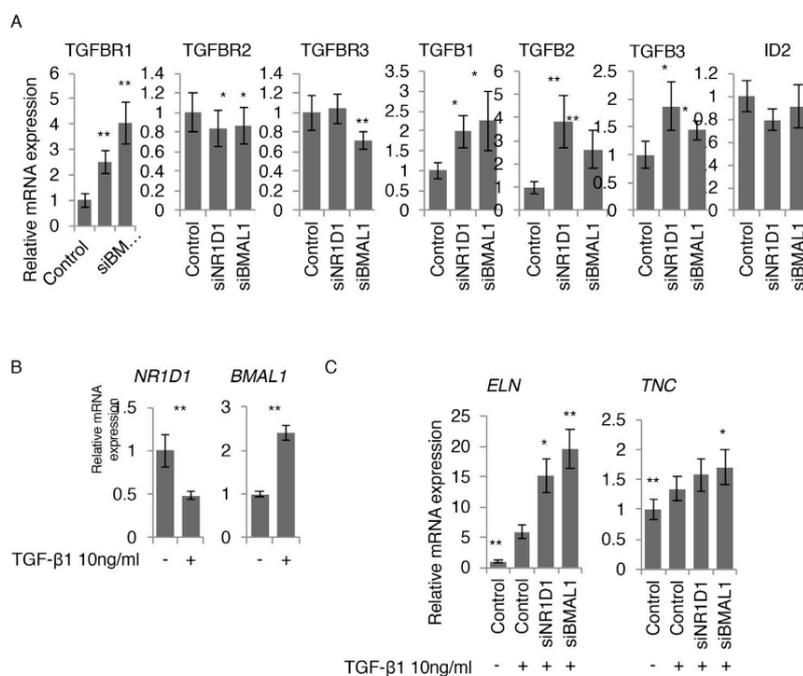


図 4

これらの一連の研究結果から、軟骨細胞においても概日リズム遺伝子に制御される周期的な細胞活動がみられることが示された。さらに、加齢や外傷に伴う軟骨の変性によって軟骨細胞における NR1D1 や BMAL1 の遺伝子およびタンパク発現が低下することが確認された。概日リズム制御機構の中心的役割を担う遺伝子発現の低下は細胞の恒常性維持に重要な役割を果たす TGF- β 経路の変容につながる可能性があり、軟骨変性の病態に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

著者：Fisch KM, Gamini R, Alvarez-Garcia O, **Akagi R**, Saito M, Muramatsu Y, Sasho T, Koziol JA, Su AI, Lotz MK.

論文表題：Identification of transcription factors responsible for dysregulated networks in human osteoarthritis cartilage by global gene expression analysis.

雑誌名：Osteoarthritis Cartilage

査読の有無：有り

巻：26 (11)

発行年：2018

ページ数：1531-1538

著者：**Akagi R**, Akatsu Y, Fisch KM, Alvarez-Garcia O, Teramura T, Muramatsu Y, Saito M, Sasho T, Su AI, Lotz MK.

論文表題：Dysregulated circadian rhythm pathway in human osteoarthritis: NR1D1 and BMAL1 suppression alters TGF- β signaling in chondrocytes.

雑誌名：Osteoarthritis Cartilage

査読の有無：有り

巻：25 (6)

発行年：2017

ページ数:943-951

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Lotz K. Martin

ローマ字氏名：LOTZ K. martin

研究協力者氏名：榎本 隆宏

ローマ字氏名：ENOMOTO, takahiro

研究協力者氏名：佐藤 祐介

ローマ字氏名：SATO, yusuke

研究協力者氏名：中川 量介

ローマ字氏名：NAKAGAWA, ryosuke

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。