

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09040

研究課題名（和文）体内時計と関節炎の包括的研究

研究課題名（英文）comprehensive study for circadian clock and arthritis

研究代表者

藤原 浩芳（Fujiwara, Hiroyoshi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：90381962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでわれわれは、骨・軟骨において体内時計が存在することを明らかにしてきた。

本研究では、関節における体内時計の包括的な研究を行い、体内時計の役割と関節を構成する半月板における体内時計の存在について明らかにした。

体内時計は関節炎や変形性関節症との関わりがすでに報告されており、本研究の結果と合わせて、さらなる病態解明や治療法の開発にむけた応用が期待できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内の様々な生理現象は日内変動を示し、これは体内時計によってもたらされる。体内時計は、時計遺伝子と呼ばれる複数の遺伝子によって構成される。

これまで軟骨に体内時計が存在することを明らかにしてきたが、半月板にも組織自律的な体内時計が存在することを明らかにした。さらに、時計遺伝子の一つであるREV-ERBが体内時計の出力因子として、生理現象の日内変動に関与していることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have identified that the circadian clock exists in bone and cartilage.

In this study, we conducted a comprehensive study of the circadian clock in joints. We clarified the role of the circadian clock and the existence of the circadian clock in the meniscus.

The relationships between the circadian clock and arthritis have already been reported, and together with the results of this study, it is expected that it will be applied to further elucidation of pathological conditions and development of therapy.

研究分野：関節外科

キーワード：関節リウマチ 関節炎 体内時計

1. 研究開始当初の背景

体内では様々な生理現象が約 24 時間の周期 (概日リズム) をもっており、これらを作り出しているメカニズムを「体内時計」という。体内時計は、Per2 や Cry1、Bmal1、Clock などの「時計遺伝子」と呼ばれる一群の遺伝子で構成されている。体内時計の中核は視床下部の視交叉上核に存在し、末梢組織でも体内時計が存在することが知られている。

2013 年、われわれは、ホタルルシフェラーゼを融合した PER2 タンパク質を発現するマウス (PER2::Luc マウス) の大腿骨器官培養系を用いて他の末梢器官と同様に軟骨にも体内時計が存在することを明らかにした¹。

代表的な関節炎である関節リウマチ (RA: rheumatoid arthritis) の症状 (こわばりや関節痛) には日内変動がみられることが広く知られている。長期間にわたって昼夜のリズムを変化させた慢性時差ぼけモデルマウスにおいて、血中の白血球が増加するなど、炎症反応が上昇することを報告された²。

これらから関節炎と体内時計の密接な関わりが推測されるが、どのように体内時計が炎症を引き起こすのか、そのメカニズムについては不明であった。

文献

1. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, et al, Prolonged bioluminescence monitoring in mouse ex vivo bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates. PLoS One. 8(11):e78306. 2013
2. Minami Y, Ohashi M, Hotta E, et al, Chronic inflammation in mice exposed to the long-term un-entrainable light-dark cycles. Sleep and Biological rhythms. 2018.

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、関節における体内時計が炎症にどのように関与するのかを明らかにすることを本研究の最終的なゴールとして設定した。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、*vivo* からのアプローチ、*vitro* からのアプローチにより総合的に研究を行った。

関節内における体内時計の存在

これまで軟骨における体内時計の存在が明らかされており、その役割に関する研究は広く行われてきた。一方で、RA における主病変は軟骨ではなく滑膜と考えられており、軟骨以外に関する研究も重要であることが推測された。

そこで、PER2::Luc ノックインマウスから半月板組織を取りだし、35mm dish 内で器官培養を行った。発光顕微鏡による経時的発光観察を行った。

時計遺伝子ノックアウトによる下流遺伝子の発現解析

時計遺伝子 REV-ERB ノックアウト細胞を用いることとした。この遺伝子に着目した理由としては、REV-ERB が炎症応答に関与する遺伝子であることと、軟骨代謝において最も研究が進んでいる時計遺伝子 BMAL1 の発現調節に関与していることや REV-ERB が炎症応答に関与しているとの報告があったことが挙げられる。

REV-ERB / の二重欠損マウスは致死であり、REV-ERB / の完全欠損が概日時計機能に与える影響は明らかになっていない。関節内には軟骨細胞だけでなく、滑膜細胞や線維芽細胞など多岐にわたる細胞が存在することから、普遍的な発現解析を行うためにマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて検討した。

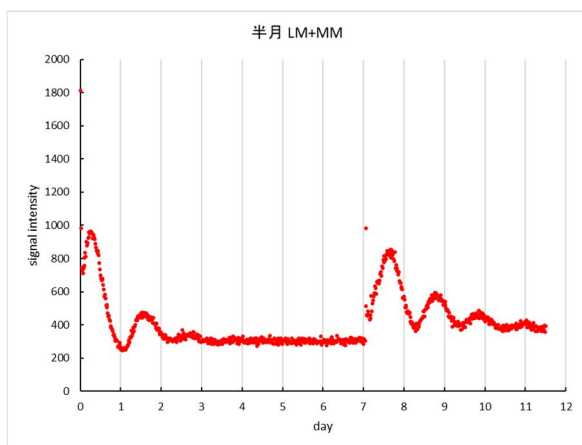
Per2::Luc ノックインマウス由来 ES 細胞株から CRISPR-Cas9 システムを用いて Rev-erb / をダブルノックアウト (DKO と略) した細胞株を作製した。DKO 株からゲノム DNA を抽出し、CRISPR-Cas9 システムの標的とした Rev-erb の第 3 エクソンおよび Rev-erb の第 4 エクソンが欠失されていることを PCR 産物のダイレクトシーケンス法で確認した。また、欠失エクソンの領域にプライマーを設計してリアルタイム定量 PCR 法で mRNA の発現量を測定した。

野生型株と DKO 株をそれぞれ浮遊培養し、胚葉体形成法による分化誘導を行った。播種 2 日後に接着培養し、播種 28 日後にデキサメタゾンを用いて概日時計を同調させた。同調 12 時間後から 60 時間後まで 4 時間ごとに WT および DKO それぞれの細胞を経時的に回収した。経時的に回収した検体から RNA を抽出しそれぞれを WT 群、DKO 群とした。経時的遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

関節内における体内時計の存在

PER2::Luc ノックインマウスから採取した半月板組織（内側半月板、外側半月板）を器官培養し経時的発光観察を行ったところ、発光は約 24 時間周期のリズムで増減を繰り返すことが明らかとなった。さらに採取後 7 日で体内時計を同調させたところ、発光が再び増加し、約 24 時間周期のリズムを取り戻した。軟骨組織と比較して発光量は少ない傾向にあるが、同調能、自立能を持つ発光リズムを認めたことから、半月板組織に体内時計が存在することが明らかになった。



(図) PER2::Luc マウスから採取した半月板の経時的発光解析
培養開始後 7 日目に、デキサメタゾンによる体内時計の同調を行った。

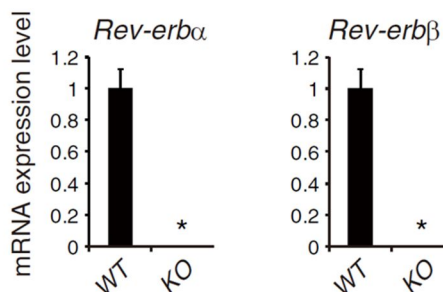
以上の結果から、関節内において軟骨のみならず、半月板にも組織自立的な体内時計が存在していることを示し、軟骨のみならず普遍的な研究の重要性が示唆された。

時計遺伝子ノックアウトによる下流遺伝子の発現解析

欠失エクソンの領域にプライマーを設計してリアルタイム定量 PCR 法で mRNA の発現量を測定したところ、欠失したエクソンを含む Rev-erb α および Rev-erb β の mRNA が検出されないことを確認した（右図）。

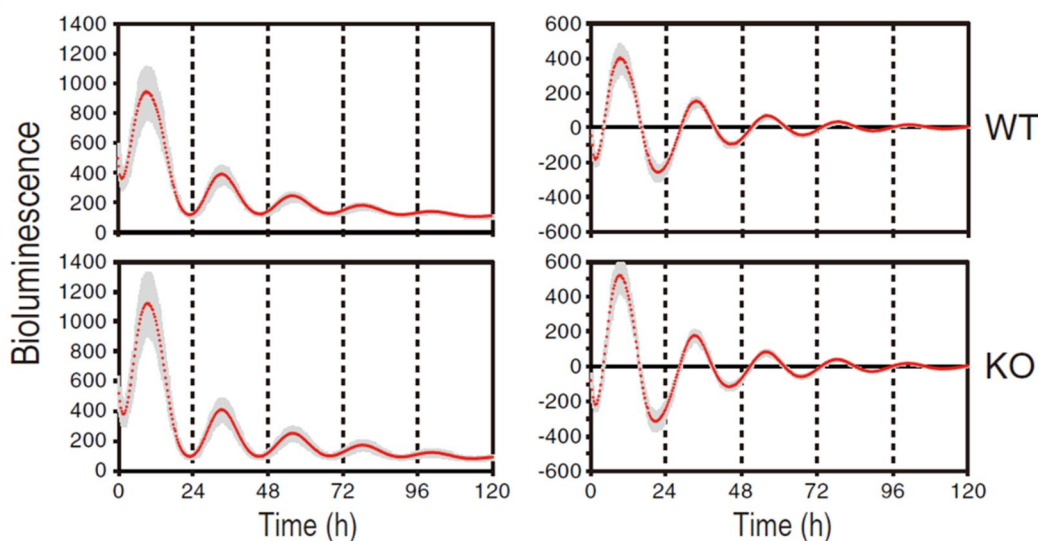
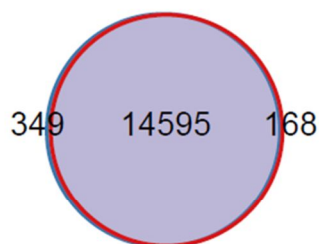
さらに、経時的に回収した検体から遺伝子発現解析を行い、発現している遺伝子を比較した。WT 群と DKO 群では各胚葉のマーカー遺伝子の発現量を比較したところ有意な差はなく、分化の方向性に大きな差はないと考えた。

分化誘導後の WT および DKO 細胞の PER2::LUC 発光リズムを測定したところいずれも概日リズムを示し、その周期、振幅には有意差がなかった。このことは、REV-ERB α および REV-ERB β が ES 細胞分化系における PER2 発現リズムの形成に必須ではないことを示していた。



Expressed genes

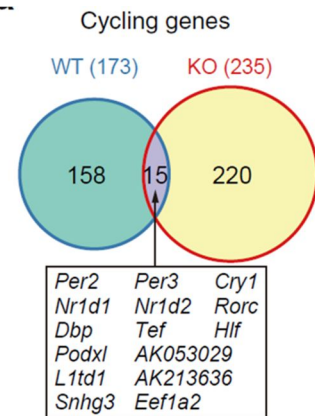
WT (14944) KO (14763)



(図) 経時的発光量測定

WT 群、DKO 群それぞれの時計遺伝子の発現量は Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、および Clock では有意な差はなかったが、REV-ERB / が直接転写制御することが知られている Bmal1、Npas2 は DKO 群で上昇していた。発現振動解析の結果、WT 群で 173 遺伝子、DKO 群で 235 遺伝子が概日発現振動していた。このうち WT 群、DKO 群で共通して振動していたのは主要な時計遺伝子及び時計関連遺伝子である Per2、Per3、Cry1、Rev-erb / 、Rorc、Dbp、Tef、Hlf を含む 15 遺伝子のみであり、REV-ERB / の欠損により概日振動する遺伝子が大きく変化することが明らかになった。また、REV-ERB / が直接転写制御する Bmal1、Npas2 については WT 群では発現振動が見られたが DKO 群では振動せず恒常的に高発現していた。

以上の結果から、REV-ERB / が概日時計の発振系そのものよりもむしろ概日時計の出力系として多くの遺伝子の発現リズムを制御することによって様々な生理機能を調節していることが示唆された。本実験系は REV-ERB / が関与する多様な細胞生理機能の解析系として有用であると考えた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Ryosuke, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Ono Ryutaro, Inoue Maho, Sasawaki Yuh, Grieten Tess, Okubo Naoki, Ikoma Kazuya, Fujiwara Hiroyoshi, Kubo Toshikazu, Yagita Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 REV-ERB and REV-ERB function as key factors regulating Mammalian Circadian Output	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46656-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bekki H., Duffy T., Okubo N., Olmer M., Alvarez-Garcia O., Lamia K., Kay S., Lotz M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Suppression of circadian clock protein cryptochrome 2 promotes osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 966 ~ 976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2020.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大久保 直輝 (Okubo Naoki) (60816578)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	小田 良 (Oda Ryo) (80516469)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	池田 亮介 (Ikeda Ryosuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関