

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16630

研究課題名（和文）軟骨細胞のストレス応答におけるSIRT1の役割の解明

研究課題名（英文）Investigation of the role of SIRT1 in the stress response of chondrocytes

研究代表者

井上 裕章（Inoue, Hiroaki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60457968

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）：OAの病態として加齢が重要であり、長寿遺伝子SIRT1の発現低下による細胞老化が関与している。HeLa細胞においてSIRT1の過剰発現は軟骨保護効果のあるHSP70の発現を増加させることが報告されている。軟骨細胞においてもSIRT1の過剰発現させることでHSP70の発現は増加した。SIRT1の過剰発現と温熱ストレスを組み合わせることでHSP70の増加を強化することができた。またSIRT1の導入により温熱ストレスによるCell Viabilityの低下と細胞毒性の増加をキャンセルすることができた。加齢によるSIRT1の発現や機能低下を改善できればHSP70を介して軟骨保護につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的はSIRT1の軟骨細胞におけるストレス応答機構への関与を明らかにすることである。軟骨細胞におけるSIRT1とHSP70を介したストレス応答の変化を解析することで、SIRT1の発現量に応じてストレス刺激を調節するテラーメイドOA治療の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Aging is an important factor in the pathogenesis of osteoarthritis, and cellular senescence due to decreased expression of SIRT1 has been implicated. It has been reported that overexpression of SIRT1 increases the expression of HSP70, which has chondroprotective effects, in HeLa cells. Overexpression of SIRT1 also increased the expression of HSP70 in chondrocytes. The combination of SIRT1 overexpression and thermal stress enhanced the increase of HSP70. In addition, the transfection of SIRT1 could cancel the decrease in cell viability and increase in cytotoxicity caused by Heat stress. If we can improve the expression and function of SIRT1 in aging, it may lead to cartilage protection via HSP70.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：軟骨 SIRT1 温熱ストレス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis ; OA) は関節軟骨の退行性変化により関節変形と機能障害をきたす疾患であり、高齢者に多く発生する。OA の病態には長寿遺伝子 SIRT1 の発現低下による細胞老化が関与していることが明らかにされている。一方、われわれはこれまで分子シャペロンである heat shock protein (HSP) 70 を中心に軟骨細胞におけるストレス応答機構の解析を継続してきた。また、HeLa 細胞において SIRT1 は HSP70 の転写因子である heat shock factor (HSF) の活性化を制御していることが報告されている。

このため、軟骨細胞におけるストレス応答機構において SIRT1 が HSP70 を制御している可能性がある。さらに加齢によりさまざまなストレスに対する軟骨細胞の SIRT1 の反応性が低下し、軟骨細胞保護に必要な HSP70 産生が得られにくくなると仮説を立てた。SIRT1 を効率的に活性化できれば、HSP70 産生亢進を介して細胞保護に働き、軟骨変性の予防が可能となる。

2. 研究の目的

OA に対する治療としてストレス応答機構を強化する方法があり、運動療法や物理療法が有効な手段である。特に運動療法はエビデンスレベル、推奨グレードともに最高ランクであり、安全面、経済面において優れた治療法である。しかし、加齢により SIRT1 の反応性が低下している場合には運動刺激や物理刺激を加えても十分なストレス応答機構が働かない可能性がある。本研究で SIRT1 の機能が明らかになれば、従来の運動療法に加えて SIRT1 の機能を上げることで十分な治療効果が得られる可能性がある。

そのため本研究の目的は SIRT1 の軟骨細胞におけるストレス応答機構への関与を明らかにすることで、加齢に応じた軟骨保護作用を賦活する治療の基礎データを蓄積することである。

3. 研究の方法

SIRT1 の HSP70 を介した軟骨保護効果について *in vitro* で検討した。6 週齢雄性の wistar 系ラットから軟骨組織を採取し、軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞を単層培養し、実験に使用した。

(1) SIRT1 賦活剤を用いた SIRT1 過剰発現による軟骨細胞への影響

SIRT1 賦活剤を用いて軟骨細胞における SIRT1 を賦活化した。SIRT1 賦活剤として Resveratrol, SRT1720, SRT2104, CAY10591 について検討した。各種賦活剤には細胞毒性があるため、適切な濃度を決定した後、賦活剤による SIRT1, HSP70 の発現を遺伝子レベルで検討した。

(2) plasmid vector を用いた SIRT1 過剰発現状態における温熱ストレスの影響

SIRT1 を搭載した plasmid vector を開発し、軟骨細胞に transfection することで SIRT1 を強制発現させ、SIRT1 の発現をより上昇させた後に遺伝子発現を検討した。軟骨細胞への transfection には electroporation 法を用いて plasmid を導入し SIRT1 を一過性発現させた。SIRT1 を過剰発現させた状態での SIRT1, HSP70 の遺伝子発現を検討した。その後、SIRT1 を導入した軟骨細胞に温浴槽を用いて温熱ストレスを加えた後に SIRT1, HSF, HSP70 の遺伝子発現について評価した。

(3) SIRT1 導入による温熱ストレスに対する軟骨保護効果の検討

軟骨細胞に同様の plasmid vector を electroporation で導入した。72 時間の平板培養後に 37, 40, 42 の温浴槽で 30 分間温熱ストレスを加えた。24 時間後に LDH release assay を用いて細胞毒性、CellTiter-Glo assay を用いて cell viability について評価した。

4. 研究成果

(1) 各種 SIRT1 賦活剤 (Resveratrol, SRT1720, SRT2104, CAY10591) によって SIRT1 は遺伝子レベルで濃度によっては発現が亢進する傾向にあったが有意な変化は認めなかった。本実験では 6 週齢と若年ラット由来の軟骨細胞を使用しており、加齢によって発現が減少する SIRT1 では賦活剤の影響が少ないのではないかと考えた。

(2) 軟骨細胞への transfection には蛍光タンパクを搭載した同様の plasmid を electroporation 法を用いて導入して確認した。軟骨細胞において、SIRT1 遺伝子を導入することで、SIRT1 の過剰発現に伴い、HSP70 の発現が増加した (図 1)。SIRT1 を導入した軟骨細胞へ温熱ストレスを加えると、transfection により増加した SIRT1 の発現は 43 の温熱ストレスでさらに増加した。HSF の発現は 43 のみ SIRT1 の transfection によって増加していた。HSP70 の発現は温度依存性に増加し、その増加は SIRT1 の導入でより強化されていた (図 2)。以上から軟骨細胞においても SIRT1 が HSP70 を下流遺伝子として制御しており、SIRT1 の発現を増加させることで温熱ストレスによる HSP70 を効率的に増加させることが可能であった。

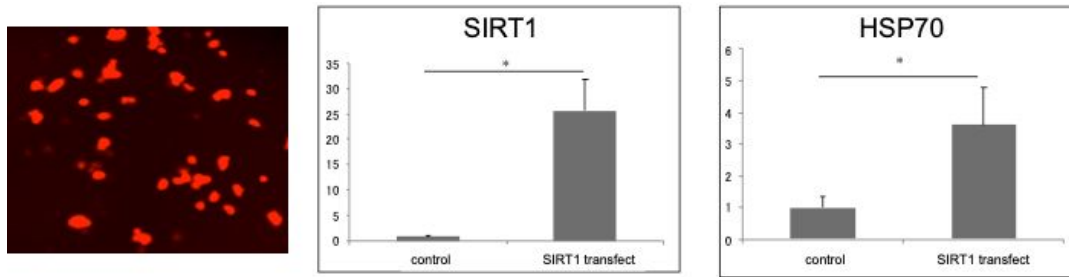


図 1 . 軟骨細胞への transfection と SIRT1 過剰発現による HSP70 への影響

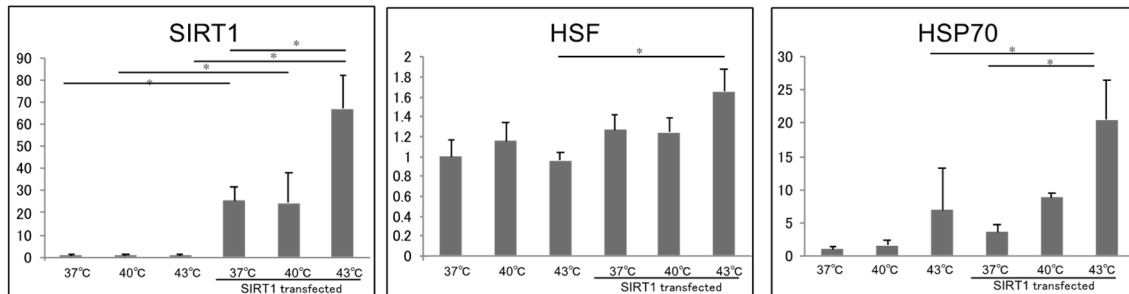


図 2 . SIRT1 過剰発現による温熱ストレスの影響

(3)生細胞試験である CellTiter-Glo assay では 42 温熱ストレスで生細胞が減少し, SIRT1 の導入によりその cell viability の減少は抑制された. また細胞毒性を評価する LDH release assay でも 42 温熱ストレスで細胞毒性が増加し, SIRT1 導入によりその細胞毒性の増加は抑制された(図 3). 以上の結果は SIRT1 の導入により誘導された HSP70 が温熱ストレスに対する細胞保護効果を有していると考えた. 加齢によって発現や機能が低下した SIRT1 を賦活化することで, HSP70 を介して OA の進行を抑制できる可能性がある.

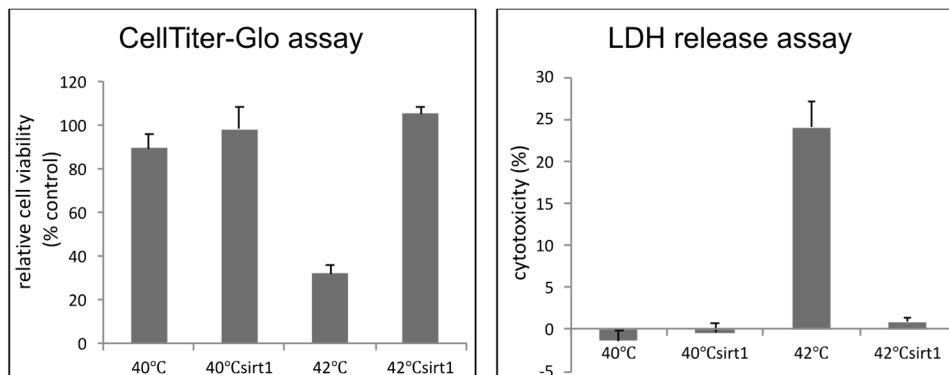


図 3 . 温熱ストレスに対して SIRT1 導入がもたらす軟骨保護効果

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakagawa S, Arai Y, Inoue H, Fujii Y, Kaihara K, Mikami Y	4. 巻 99
2. 論文標題 Relationship of alignment in the lower extremity with early degeneration of articular cartilage after resection of the medial meniscus: Quantitative analysis using T2 mapping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000022984	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 貝原健太, 井上裕章, 中川周士, 新井祐志, 藤井雄太, 松田 修, 高橋謙治
2. 発表標題 SIRT1導入細胞に対する温熱ストレスの検討
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaihara K, Inoue H, Nakagawa S, Arai Y, Fujii Y, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Influence of heat stress on SIRT1-transfected chondrocytes
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貝原健太, 井上裕章, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 下村征史, 藤井雄太, 松田 修, 久保俊一
2. 発表標題 CIAラットを用いたtreadmill走行の骨破壊へ与える影響の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaihara K, Nakagawa S, Arai Y, Fujii Y, Inoue H, Tsuchida S, Kamada Y, Mazda O, Mikami Y
2. 発表標題 Effect of HIF-1 stabilization by deferoxamine on chondrocyte and articular cartilage
3. 学会等名 2020 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Ichimaru S, Fujii Y, Mazda O, Kubo T
2. 発表標題 The relationship between treadmill running and HIF-2 on rat knee articular cartilage
3. 学会等名 21st World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujii Y, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Shimomura S, Mazda O, Kubo T
2. 発表標題 Treadmill running ameliorates articular cartilage destruction and synovitis in a rheumatoid arthritis rat model
3. 学会等名 65th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------