

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591934

研究課題名（和文） 関節軟骨代謝における老化制御因子 S I R T 1 の機能解析

研究課題名（英文） Investigation of the molecular mechanisms through which SIRT1 modulates osteoarthritis progression.

## 研究代表者

麻生 義則 (ASO YOSHINORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：50345279

## 研究成果の概要（和文）：

変形性関節症の発症において、加齢は重要な要素であるが、加齢と軟骨変性を結びつける分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では軟骨代謝における、老化制御因子SIRT1の機能を検証している。本年度は四肢特異的Sirt1欠損マウスを作成しその表現型を解析するとともに、Sirt1の相同遺伝子であるSirt6欠損マウスの骨格の表現型を解析した。出生直後においてSirt6<sup>-/-</sup>マウスは、四肢長管骨が野生型よりも短縮していた。パターンニングには明らかな異常は認められなかった。成長とともに四肢の短縮は明らかとなり、骨端部においては、二次骨化中心の成熟が遅延した。生後2週の脛骨成長板軟骨ではSirt6<sup>-/-</sup>マウスにおいて増殖層が短縮し、増殖マーカーPCNA陽性細胞が著明に減少していた。また一次骨梁の形成は著明に減少していた。一方、TUNEL法ではアポトーシス陽性細胞数に明らかな差は認められなかった。生後1週のSirt6<sup>-/-</sup>マウスから採取した初代軟骨細胞では、軟骨分化マーカーCol2a1, Col10a1の発現が野生型よりも低下していた。ATDC5および野生型初代軟骨細胞にてSirt6をノックダウンすると、Col2a1, Col10a1およびCyclinD1, CyclinD2の発現が低下した。一方、培養軟骨細胞におけるIGF-1の発現はSirt6ノックダウンの影響を受けなかった。現在論文投稿中である。

## 研究成果の概要（英文）：

Members of the sirtuin (SIRT) family of NAD-dependent deacetylases promote longevity in multiple organisms. Deficiency of mammalian Sirt6 leads to growth retardation, shortened life span (die around p24) and an aging-like phenotype in mice. SIRT6<sup>-/-</sup> mice fail to thrive and exhibit osteopenia, with 30% reduction in bone mineral density and lordokyphosis at 3.5 weeks of age. However, the roles of Sirt6 in bone and cartilage metabolism are unclear. The aim of this study is to investigate the Sirt6 signal pathway in the maintenance of cartilage. For this purpose, histological evaluation was performed in Sirt6<sup>-/-</sup> mice and WT littermates. Sirt6 was expressed in articular chondrocyte and growth plate chondrocyte. At birth, the length of tibiae and femur was 10-20% shorter in Sirt6<sup>-/-</sup> compared to wild-type littermates. In the growth plate (GP), PCNA expression was reduced in Sirt6<sup>-/-</sup> mice. The number of TUNEL positive cells was comparative between Sirt6<sup>-/-</sup> and littermate at this stage. At two weeks after birth, growth retardation was apparent in Sirt6<sup>-/-</sup>, with reduced proliferating zone in GP, delayed formation of secondary ossification center and decreased primary spongiosa. Col2 mRNA expression was reduced in Sirt6<sup>-/-</sup> primary

chondrocyte, indicating chondrocyte differentiation was retarded by Sirt6 deficiency. Sirt6<sup>-/-</sup> mice is reported to exhibit severe metabolic defects with precipitous drops in serum glucose and IGF-1 levels. Thus, to evaluate the involvement of exogenous glucose and IGF-1 in the prevention of chondrocyte differentiation, Sirt6 was knocked-down by siRNA in primary chondrocyte and chondrocyte-like cell line ATDC5. Real time PCR analysis revealed the expression of chondrocyte marker genes, including Col2, Col10 and aggrecan, were reduced in vitro. Interestingly, autologous IGF-1 expression in chondrocyte was not affected by Sirt6 deficiency. Our data indicate that Sirt6 controls cell growth and differentiation in embryonic and postnatal chondrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1200000	360000	1560000
2010年度	1100000	330000	1430000
2011年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：Sirt1、老化、軟骨

#### 1. 研究開始当初の背景

世界に先駆けて日本が超高齢者社会に突入しつつある現在、日本整形外科学会では、「加齢に伴い運動器の障害のために要介護となる危険の高い状態」を「ロコモティブシンドローム」と提唱し、高齢者の運動器障害を予防するべく啓蒙を行っている。骨粗鬆症と変形性関節症は、共にロコモティブシンドロームの原因疾患として克服すべき疾患に挙げられるが、加齢と骨軟骨代謝の分子メカニズムは十分に解明されていない。老化の分子メカニズムは最近までほとんど未開拓の分野であったが、近年線虫や酵母などの下等な生物から哺乳類に至るまで、種を超えて共通の老化制御メカニズムが保存されていることが明らかとなった。

サーチュイン遺伝子は近年同定された老化制御因子であり、バクテリアから哺乳類まで広く保存されている。カロリー制限は酵母から少なくともマウスに至るまで、種に関係なく生体の寿命を延長するが、遺伝子操作によってサーチュイン遺伝子を欠損させると、カロリー抑制による寿命延長効果は失われる(Fabrizioら 2005年)。酵母サーチュインの Sir2 は NAD (nicotinamide adenine

dinucleotide) 加水分解酵素であると同時に、ヒストン脱アセチル化酵素であり、クロマチンの構造構築を通してゲノムのサイレンシングを行う。NAD は細胞の栄養が枯渇すると発現が増加するが、それに伴い Sir2 活性が増加し、ヒストン脱アセチル化を介してクロマチン構造を操作し、転写抑制を行う。つまり Sir2 は細胞のエネルギー状態をゲノムの制御状態へと変換する能力を持ったエネルギーセンサーとして機能していて、その結果老化、寿命を制御している。哺乳類ではサーチュイン相同遺伝子は S I R T 1 ~ S I R T 7 まで 7 種類が同定されている。SIRT1、SIRT6、SIRT7 は核に、SIRT3~SIRT5 はミトコンドリアに、SIRT2 は細胞質と核に発現しており、それぞれの機能も異なる。このように、単純な生物である酵母などにおいて Sir2 が担っていた寿命制御機能は、高等動物においては複数の遺伝子により分担されている。近年、遺伝子改変マウスなどを用いた精力的な研究が展開された結果、数多くのサーチュイン標的因子が同定されつつあり、現在サーチュインを中心としたシグナリング解析は最もホットな領域の一つである。サーチュインファミリーは様々な種、および細胞

において老化のみならず糖代謝、尿素回路、脂肪分化など様々な代謝経路を制御しているが、骨・軟骨代謝、特に加齢変性におけるサーチュインファミリーの機能に関する報告は少ない。

## 2. 研究の目的

長寿遺伝子サーチュインファミリーに着目して、加齢に伴う軟骨変性の背景にある加齢制御分子メカニズムを明らかとすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

①生後1週のマウスから初代骨端軟骨細胞を採取し、リアルタイムPCR法にてサーチュイン遺伝子の発現を検証した。

②Sirt1ノックアウトマウスは出生直後に死亡するため、四肢特異的に発現するプロモーターPrx-1にてcre遺伝子をドライブするマウスを用いて、四肢特異的Sirt1ノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。

③Sirt6<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスを免疫組織学的に評価した。生後1週の長管骨骨端部から採取された初代軟骨細胞、および軟骨細胞様細胞株ATDC5を用いてsiRNAによるSirt6ノックダウンの効果を実時間RT-PCR法により検証した。

## 4. 研究成果

real-time RT-PCR法による解析では、マウス初代軟骨細胞においてSirt1-7の7種類のサーチュイン遺伝子の発現が認められた。

我々は四肢特異的Sirt1欠損マウスを作成し、現在、骨、軟骨の表現型を解析中である。

一方、我々はSirt1の相同遺伝子であるSirt6欠損マウスの骨格の表現型を解析した。出生直後においてSirt6<sup>-/-</sup>マウスは、四肢長管骨が野生型よりも短縮していた。パターンニングには明らかな異常は認められなかった。成長とともに四肢の短縮は明らかとなり、骨端部においては、二次骨化中心の成熟が遅延した。生後2週の脛骨成長板軟骨ではSirt6<sup>-/-</sup>マウスにおいて増殖層が短縮し、増殖マーカーPCNA陽性細胞が著明に減少していた。また一次骨梁の形成は著明に減少していた。一方、TUNEL法ではアポトーシス陽性細胞数に明らかな差は認められなかった。生後1週のSirt6<sup>-/-</sup>マウスから採取した初代軟骨細胞では、軟骨分化マーカーCol2a1, Col10a1の発現が野生型よりも低下していた。ATDC5および野生型初代軟骨細胞にてSirt6をノックダウンすると、Col2a1, Col10a1およびCyclinD1, CyclinD2の発現が低下した。一方、培養軟骨細胞におけるIGF-1の発現はSirt6ノックダウンの影響を受けなかった。以上、Sirt6は軟骨細胞の分化、増殖を促進することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

①Boku K., Ochi H., Tsuji K., Koga D., Okawa A., Morita S., Takeda S., Asou Y. Sirt6 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Journal of Bone and Mineral Research suppl.* 2011

② Hailati Aini, Hiroki Ochi, Munetaka Iwata, Atsushi Okawa, Daisuke Koga, Mutsumi Okazaki, Atsushi Sano, Yoshinori Asou. Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. *PLoS ONE* 2012 in press.

③Itoh H., Hara Y., Yagawa M., Kato T., Ochi H., Koga D., Okawa A., Shinomiya K., Asou Y. Runx2 expression correlates with the degree of disc aging: a comparison between Magnetic Resonance Imaging and Runx2 expression. *J Vet Med Sci.* 2012 in press.

④ Shimizu S, Okuda N, Kato N, Rittling SR, Okawa A, Shinomiya K, Muneta T, Denhardt DT, Noda M, Tsuji K, Asou Y. Osteopontin deficiency impairs wear debris-induced osteolysis via regulation of cytokine secretion from murine macrophages. *Arthritis Rheum.* 2010 May;62(5):1329-37.

⑤ Ochi, H ;Hara, Y ;Tagawa, M ;Shinomiya, K ;Asou, Y The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival. *J Orthop Res.* 2010 May;28(5):657-63.

⑥Ohba T, Haro H, Ando T, Wako M, Suenaga F, Asou Y. Koyama K, Hamada Y, Nakao A. TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues. *J Orthop Res.* 2009 Feb;27(2):229-35.

⑦Nakamura T, Iribe T, Asou Y. Miyairi H, Ikegami K, Takakuda K. Effects of compressive loading on biomechanical properties of disc and peripheral tissue in a rat tail model. *Eur Spine J.* 2009 Jun 26.

[学会発表] (計7件)

①Boku K., Ochi H., Tsuji K., Koga D., Okawa A., Morita S., Takeda S., Asou Y. Sirt6 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during

endochondral ossification. Annual meeting for American society for bone and mineral research 2011

②Iwata M, Ochi H, Hara Y, Koga D, Tagawa M, Okawa A, Asou Y. Short term high-fat diet induces osteophyte formation, apoptosis and degeneration of articular chondrocyte in murine knee joint. OARSI world congress on osteoarthritis. 2011

③Hailati A., Yamauchi Y., Ochi H., Koga D., Okawa A., Ogishima S., Okazaki M., Asou Y. TNFR1 deficiency facilitates articular cartilage ossification and osteophyte formation. OARSI world congress on osteoarthritis. 2011

④朴金瑛 辻邦和 古賀大介 森田定雄 大川淳 竹田秀 麻生義則 サーチュイン遺伝子 Sirt6 による軟骨代謝制御 東京骨関節フォーラム 2011

⑤岩田宗峻 越智広樹 原康 多川政弘 古賀大介 大川淳 麻生義則 短期高脂肪食負荷によるマウス変形性膝関節症モデルの樹立東京骨関節フォーラム 2011

⑥Aini Hailati, 麻生 義則, 越智 弘樹, 古賀 大介, 加藤 剛, 大川 淳, 佐野 淳, 岡崎 睦 Chondroprotective effects of procyanidin in murine articular chondrocytes 日本分子生物学会 2010/12/10 神戸

⑦Chondroprotective effects of procyanidin in murine articular chondrocytes Aini hailati, 麻生 義則, 越智 弘樹, 古賀 大介, 加藤 剛, 大川 淳, 佐野 淳, 岡崎 睦 日本分子生物学会 2010/12/10 神戸

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

麻生 義則 (ASO YOSHINORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄付講座教員

研究者番号：50345279

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：