

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592257

研究課題名(和文)長寿遺伝子による骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of Sirt6 in the chondrocyte metabolism

研究代表者

麻生 義則 (Asou, Yoshinori)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50345279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Sirt6を介する骨軟骨代謝のメカニズムを解明することである。Sirt6^{-/-}マウスは、四肢長管骨が野生型よりも短縮していた。骨端部においては、二次骨化中心の成熟が遅延した。脛骨成長板軟骨ではSirt6^{-/-}マウスにおいて増殖層と肥大軟骨層が短縮し、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。免疫染色では成長板軟骨における軟骨分化マーカーの発現が低下し、老化マーカーの発現が亢進していた。細胞を用いた解析の結果、Sirt6は少なくとも部分的にIhh発現制御を介して軟骨細胞の分化、増殖を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the Sirt6 signal pathway in cartilage metabolism. Sirt6 was expressed in primary chondrocytes and the chondrocyte-like cell line ATDC5. At birth, the length of the tibia and femur was shorter in Sirt6^{-/-}. In the growth plate (GP), PCNA expression was reduced in Sirt6^{-/-} mice. The number of TUNEL positive cells was comparable between Sirt6^{-/-} and littermates. Two weeks after birth, growth retardation was apparent in Sirt6^{-/-}, with reduced proliferating zone and hypertrophic zone in the growth plate, delayed ossification of secondary ossification center and decreased primary spongiosa. mRNA and protein expression of Col2a1, Col10a1 and Ihh in the growth plate was reduced in Sirt6^{-/-} primary chondrocytes. Functional analysis revealed Sirt6 positively regulates chondrocyte differentiation via the Atf4 -Ihh axis.

研究分野：分子生物学

キーワード：サーチュイン 軟骨代謝 老化

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、老化に関連した骨代謝制御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) 依存性にゲノム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 7 種類が同定されている。SIRT1、SIRT2 は細胞質と核に、SIRT3~SIRT5 はミトコンドリアに、SIRT6、SIRT7 は核に発現して

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。

2. 研究の目的

生後 4 週までの Sirt6^{-/-}マウスの骨組織を経時的に免疫組織学的に解析し、なおかつ、骨系細胞を採取して、骨芽細胞、破骨細胞の分化、増殖に対する Sirt6 の機能を明らかにする。また、マイクロアレイ法、Chip-seq 法などの手法を用いて Sirt6 の標的分子を明らかにするとともに、細胞内シグナルカスケードの解析を行う。

3. 研究の方法

出生後、Sirt6^{+/?}マウス、Sirt6^{-/-}マウスを継時的に屠殺し、骨組織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 を用いて過剰発現、ノックダウンなどの分子生物学手法を適用し Sirt6 の機能評価を行った。

4. 研究成果

出生直後において Sirt6^{-/-}マウスは、四肢長管骨が野生型よりも短縮していた。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^{-/-}マウスにおいて増殖層と肥大軟骨層が短縮し、増殖マーカー PCNA 陽性細胞が減少した。TUNEL 法では明らかな差は認められなかったが、senescence マーカーである PAI-1、IL-6 などの発現が Sirt6^{-/-}由来軟骨にて増加していた。成長板軟骨における Col2a1、Col10a1 および Ihh の発現が Sirt6^{-/-}マウスにおいて低下していた。ATDC5 および初代軟骨細胞にて siRNA により Sirt6 をノックダウン(Sirt6KD)すると、

軟骨増殖マーカー、分化マーカーが低下し、Ihh とその下流遺伝子 Gli1, Patched の発現が低下した。転写因子 ATF4 は Ihh 転写を正に制御するが、初代軟骨細胞を用いた ChIP assay の結果、Ihh プロモーターに対する ATF4 結合は Sirt6KD によって抑制された。これらの成果は先進性を評価され、2013 年度米国骨代謝学会にて優秀ポスター賞を受賞した。研究結果は Scientific Reports 誌に掲載された。

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 9 件)

1. Tumor necrosis factor- enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. Fujihara R, Usui M, Yamamoto G, Nishii K, Tsukamoto Y, Okamatsu Y, Sato T, Asou Y, Nakashima K, Yamamoto M. J Periodontal Res. 2014 Aug;49(4):508-17. doi: 10.1111/jre.12131. Epub 2013 Sep 19.
2. Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, Shibata S, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. Nature. 2013 May 23;497(7450):490-3. 査読あり
3. Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signaling. Piao J, Tsuji K, Ochi H, Iwata M, Koga D, Okawa A, Morita S, Takeda S, Asou Y. Scientific Reports, 2013 Oct 23. 査読あり
4. Initial Responses of Articular Tissues in a Murine High-Fat Diet-Induced Osteoarthritis Model: Pivotal Role of the IPFP as a Cytokine Fountain. Iwata M, Ochi H, Hara Y, Tagawa M, Koga D, Okawa A, Asou Y. PLoS ONE. 2013 Apr 12;8(4) 査読あり
5. Cytoplasmic reactive oxygen species and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading. Morikawa D, Nojiri H, Saita Y, Kobayashi K, Watanabe K, Ozawa Y, Koike M, Asou Y, Takaku T, Kaneko K, Shimizu T. J Bone Miner Res. 2013 May 14. 査読あり
6. Variations in gene and protein expression in canine chondrodystrophic nucleus pulposus cells following long-term three-dimensional culture. Iwata M, Ochi H, Asou Y, Haro H, Aikawa T, Harada Y, Nezu Y, Yogo T, Tagawa M, Hara Y. PLoS One. 2013 May 2;8(5) 査読あり
7. Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. Aini H, Ochi H, Iwata M, Okawa A, Koga D, Okazaki M, Sano A, Asou Y. PLoS ONE. 2012;7(5) 査読あり
8. Evaluation of the association between runt-related transcription factor 2 expression and intervertebral disk aging in dogs. Itoh H, Hara Y, Tagawa M, Kato T, Ochi H, Koga D, Okawa A, Asou Y. Am J Vet Res. 2012 Oct;73(10):1553-9. 査読あり
9. Runx2 haploinsufficiency ameliorates the development of ossification of the posterior longitudinal ligament. Iwasaki M, Piao J, Kimura A, Sato S, Inose H, Ochi H, Asou Y, Shinomiya K, Okawa A, Takeda S. PLoS One. 2012;7(8):e43372. doi: 10.1371/journal.pone.0043372. Epub 2012 Aug 21. 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 骨細胞特異的 Sod2 欠損マウスにおける骨リモデリング制御機構の解析 2013年5月28日-6月1日 神戸市、兵庫県
2. 骨細胞における抗酸化酵素 Sod2 の骨リモデリング制御機構 日本整形外科基礎学会 2013年10月17日-18日 幕張、千葉県
3. 細胞質活性酸素とSOD1はメカニカルストレス応答に伴う骨量変化を制御する 日本臨床分子医学会学術総会 2013年4月12日-13日 東京都
4. Wnt/ -catenin signaling による Runx2 の発現を介した椎間板髄核の変性および石灰化 日本獣医学会 2013年9月20日-21日 岐阜市、岐阜県
5. 軟骨異栄養性犬種における椎間板髄核変性の病態に関する検討 獣医麻酔外科学会 2014年1月11日-12日 仙台市、宮城県
6. 高脂肪食負荷による膝蓋下脂肪体肥大化は力学的負荷とは独立して変形性膝関節症を惹起する。日本整形外科基礎学会 2014年10月9日-10日 鹿児島市、鹿児島県
7. サーチュイン遺伝子 Sirt6 による軟骨代謝制御機構の解析 日本整形外科基礎学会 2014年10月9日-10日 鹿児島市、鹿児島県
8. The distinct role of the infrapatellar fat pad in a murine high-fat diet-induced osteoarthritis model. 米国骨代謝学会 ボルチモア、米国 2013年10月4日~7日
9. Osteocyte Specific Deletion of Superoxide Dismutase2 Induces Osteocyte Loss Resulting in Bone Loss Associated with Impairment of Bone Remodeling. 米国骨代謝学会 ボルチモア、米国 2013年10月4日~7日
10. Semaphorin 3A regulates bone homeostasis through sensory nerve system. 米国骨代謝学会 ボルチモア、米国 2013年10月4日~7日
11. Sirt6 regulate proliferation and differentiation of the postnatal growth plate chondrocyte via Ihh signaling. 米国骨代謝学会 ボルチモア、米国 2013年10月4日~7日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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
(東京医科歯科大学・大学院
医歯(薬)学総合研究科・准教授)

研究者番号：50345279

(2)研究分担者 辻 邦和
(東京医科歯科大学・大学院
医歯(薬)学総合研究科・准教授)

研究者番号：20323694

(3)連携研究者 荻島 創一
(東北大学・東北メディカ
ル・メガバンク機構・講師)

研究者番号：40447496