

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293332

研究課題名(和文) NADワールドによる骨軟骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of Sirt6 in bone and cartilage metabolism

研究代表者

大川 淳 (OKAWA, Atsushi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30251507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織特異的Sirt6欠損マウスを詳細に解析することにより、Sirt6による骨軟骨老化の制御機構を明らかにすることを目的とした。軟骨特異的Sirt6欠損マウス、骨細胞特異的Sirt6欠損マウスを詳細に解析したところ、関節においてはSirt6欠損により加齢に伴う軟骨基質の発現低下、脂肪組織の炎症亢進が認められた。骨細胞特異的Sirt6欠損マウスでは骨量が変化した。

研究成果の概要(英文)：Ageing is a pivotal risk factor for osteoporosis and osteoarthritis. The stress-response and chromatin-silencing factor Sir2, a yeast sirtuin, is a NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase and is involved in controlling ageing. Herein we sought to investigate the involvement of Sirt6 in the etiology of osteoporosis and osteoarthritis. Sirt6 haploinsufficiency in mice promoted the expression of inflammatory cytokines in the IPFP. Mesenchyme-specific Sirt6-deficient mice revealed both attenuated chondrocyte hypertrophy and proteoglycan synthesis, although chondrocyte senescence was enhanced as shown in the aged WT mice. Thus Sirt6 has key roles in the relationship among ageing, metabolic syndrome, and OA.

研究分野：整形外科

キーワード：Sirt6 senescence 骨代謝 軟骨代謝

### 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(OA)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。

NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) は、水溶性ビタミンであるニコチン酸、ニコチンアミドを前駆体として我々の体内で生合成され、酸化還元酵素の補酵素としてエネルギー獲得に重要な役割を有する。NAD を利用した様々な生化学反応が、種々の細胞イベントにおいて重要であることが報告されつつあるが、サーチュイン遺伝子による代謝制御はその代表的なものである。今井らは、NAD によってコントロールされる全身性の代謝、老化の制御機構を「NAD」ワールドと名付けた。

我々はこれまで Sirt6 に注目して研究を行ってきた。Sirt6<sup>-/-</sup>マウスは早期老化の表現型を呈するが、我々はその軟骨組織を組織学的に詳細に解析し、Sirt6 が軟骨の分化、増殖を促進すること、軟骨細胞の Senescence (老化) を抑制することを明らかにした (2013 Scientific Reports)。また、これらの制御が少なくとも一部は、軟骨分化増殖マスター因子である Indian hedgehog (Ihh) を介すること、Sirt6 は Ihh プロモーターと結合し、Ihh プロモーターに対する ATF4 結合を促進することなどを見出した (同)。

### 2. 研究の目的

本研究では組織特異的 Sirt6 欠損マウスを詳細に解析することにより、NAD ワールドによる骨軟骨老化の制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

軟骨組織での Sirt6 の機能を解析するために、四肢間葉系幹細胞特異的に発現する Prx-1 プロモーターで cre リコンビナーゼをドライブする Prx-1cre マウス、および骨細胞特異的に発現する DMP-1 プロモーターで cre リコンビナーゼをドライブする DMP-1cre マウスと Sirt6 floxed マウスを交差させ、Prx-1cre::Sirt6 floxed マウス、DMP-1cre::Sirt6 floxed マウスを作成した。変形性膝関節症の危険因子である加齢、および高脂肪食負荷下での Sirt6 の影響を検証するために、Sirt6<sup>+/-</sup>マウスに高脂肪食負荷を与えた。骨組織、軟骨組織を組織学的に詳細に解析した。糖代謝、脂肪代謝を詳細に解析した。

### 4. 研究成果

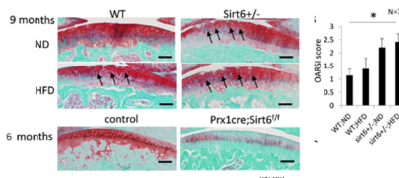
### 膝軟骨代謝に関する研究

#### 【結果】

高脂肪食負荷に対して Sirt6<sup>+/-</sup>マウスの体重増加は野生型と同等であったが、血中 adiponectin は減少し、resistin, GIP, PAI-1 は上昇した。Sirt6<sup>+/-</sup>マウスの内臓脂肪と膝蓋下脂肪体では TNF- $\alpha$ , IL-6 の発現が通常食でも増加し、高脂肪食負荷によって更に亢進した。これは Prx-1cre::Sirt6 floxed マウスでは認められなかった。膝関節では生後 9 ヶ月にて通常食でも Sirt6<sup>+/-</sup>マウスの骨棘形成、滑膜増殖、軟骨不整などの変形性膝関節症変化は進行した。Prx-1cre::Sirt6 floxed マウスではプロテオグリカン発現が著しく低下した (図 1-3)。免疫染色では変形性膝関節症のマーカーである ColX, MMP-13 の発現が増加したが、HFD にてより顕著となった (図 4)。

図 1

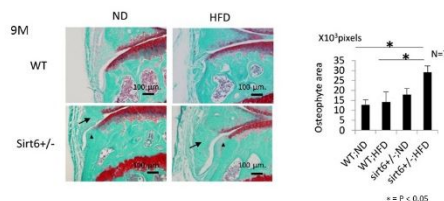
関節軟骨のSafranin-O染色



[ Sirt6<sup>+/-</sup>マウスにおいて関節軟骨表面の不整が認められ、高脂肪食負荷によって、よりこの変化は促進された。この所見は OARS1 score においても裏付けられた。Prx-1Cre::Sirt6<sup>f/f</sup> マウスでは、サフラニン-O 染色での染色性が低下し、関節軟骨におけるグリコサミノグリカン (GAG) 濃度低下が示された。]

図 2

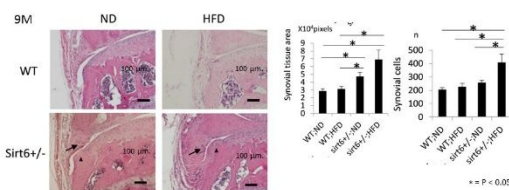
Sirt6<sup>+/-</sup>マウスの骨棘形成



[ 骨棘面積が Sirt6<sup>+/-</sup> 高脂肪食負荷群において有意に増加した。]

図 3

Sirt6<sup>+/-</sup>マウスの滑膜



[ 炎症細胞の浸潤に伴う滑膜増生は、骨棘形成と同様に、Sirt6<sup>+/-</sup> HFD 群において有意に増加した。]

## 骨細胞に関する研究

### 【結果】

成果報告書初回作成時において未発表なため、後日追加で報告する。

## 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 8 件)

A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T, Karasugi T, Baba H, Uchida K, Kawabata S, Okawa A, Shindo S, Takeuchi K, Taniguchi Y, Maeda S, Kashii M, Seichi A, Nakajima H, Kawaguchi Y, Fujibayashi S, Takahata M, Tanaka T, Watanabe K, Kida K, Kanchiku T, Ito Z, Mori K, Kaito T, Kobayashi S, Yamada K, Takahashi M, Chiba K, Matsumoto M, Furukawa K, Kubo M, Toyama Y; Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Ikegawa S. Nat Genet. 2014 Sep;46(9):1012-6 査読有り

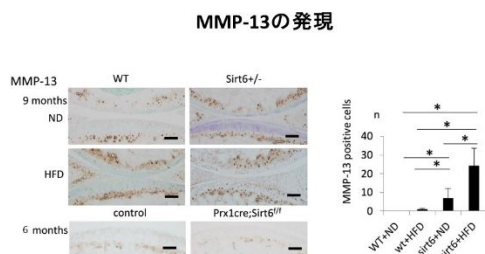
Enhancement of Runx2 expression is potentially linked to  $\beta$ -catenin accumulation in canine intervertebral disc degeneration. Iwata M, Aikawa T, Hakozaki T, Arai K, Ochi H, Haro H, Tagawa M, Asou Y, Hara Y. J Cell Physiol. 2015 Jan;230(1):180-90. 査読有り

Mitochondrial superoxide in osteocytes perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. Kobayashi K, Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Ozawa Y, Watanabe K, Koike M, Asou Y, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T. Sci Rep. 2015 Mar 16;5:9148. 査読有り

Pivotal role of Sirt6 in the crosstalk among ageing, metabolic syndrome and osteoarthritis. Ailixiding M, Aibibula Z, Iwata M, Piao J, Hara Y, Koga D, Okawa A, Morita S, Asou Y. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Oct 23;466(3):319-26. 査読有り

MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. Fukuda T, Ochi H, Sunamura S, Haiden A, Bando W,

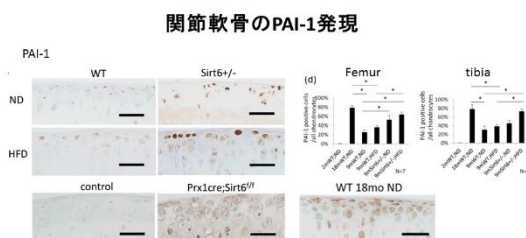
図 4



[ 関節軟骨の表層における MMP-13 の発現は Sirt6+/- ND において増加したが、HFD によって更に増加した。]

TUNEL 染色では Sirt6+/- マウスにおいて陽性細胞が増加したが Prx-1cre::Sirt6 floxed マウスでは増加しなかった。細胞老化の指標である PAI-1 は Sirt6+/- マウス、Prx-1cre::Sirt6 floxed マウスともに発現増加した (図 5)。

図 5



[ Sirt6+/- において PAI-1 発現が増加した。野生型マウスでも加齢に伴い PAI-1 発現が増加した。Prx-1Cre::Sirt6 floxed マウスでも PAI-1 発現が増加した。]

### 【考察と結論】

Sirt6 欠損により加齢に伴う軟骨基質の発現低下、脂肪組織の炎症亢進が認められた。軟骨細胞のアポトーシス亢進は Sirt6+/- のみに認められたことから Sirt6 減少に伴う膝蓋下脂肪体の炎症が寄与したものと考えられる。SIRT6 は NF- $\kappa$ B の corepressor として機能し、NF- $\kappa$ B のターゲット遺伝子の H3K9 を脱アセチル化することにより NF- $\kappa$ B 標的因子の発現を抑制することから、Sirt6 を欠損した膝蓋下脂肪体でも NF- $\kappa$ B を介する炎症反応促進が起きているものと考えられる。また、Sirt6+/- マウス、Prx-1cre::Sirt6 floxed マウスともに軟骨細胞の PAI-1 発現が増加したことから、Sirt6 欠損は軟骨細胞の senescence を促進することが明らかとなった。本研究により、Sirt6 は脂肪代謝、軟骨代謝を介して OA 進行に寄与するが明らかとなった。

Inose H, Okawa A, Asou Y, Takeda S. FEBS Lett. 2015 Oct 24;589(21):3302-8. 査読有り

Limited significance of screening computed tomography after cementless total hip arthroplasty with highly cross-linked polyethylene at 7-10 years of follow-up. Takada R, Jinno T, Koga D, Yamauchi Y, Asou Y, Muneta T, Okawa A. Mod Rheumatol. 2016 Sep;26(5):757-60. 査読有り

Pleiotropic Functions of High Fat Diet in the Etiology of Osteoarthritis. Asou Y, Iwata M, Ochi H, Ailixiding M, Aibibula Z, Piao J, Jin G, Hara Y, Okawa A. PLoS One. 2016 Sep 9;11(9):e0162794. 査読有り

Intraoperative evaluation of the effects of femoral component offset and head size on joint stability in total hip arthroplasty. Jinno T, Koga D, Asou Y, Morita S, Okawa A, Muneta T. J Orthop Surg (Hong Kong). 2017 Jan 1;25(1):2309499016684298. 査読有り

[学会発表](計 7 件)

サーチュイン遺伝子 Sirt6 による軟骨代謝制御機構の解析 朴 金瑛, 辻 邦和, 越智 広樹, 古賀 大介, 大川 淳, 竹田 秀, 麻生 義則 2014 年 10 月 日本整形外科学会基礎学会

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 岩田宗峻, 越智 広樹, 原 康, 古賀 大介, 大川 淳, 麻生 義則 2014 年 10 月 日本整形外科学会基礎学会

前方進入法と前側方進入法による人工股関節全置換術後早期 CT における股関節外転筋断面積の比較検討 高田 亮平, 神野 哲也, 古賀 大介, 平尾 昌之, 星野 ちさと, 麻生 義則, 森田 定雄, 宗田 大, 大川 淳 2015 年 5 月 日本整形外科学会

セメントレス人工股関節全置換術後の大腿骨脆弱性骨折 平尾 昌之, 神野 哲也, 古賀 大介, 高田 亮平, 麻生 義則, 森田 定雄, 宗田 大, 大川 淳 2015 年 5 月 日本整形外科学会

メタボリックシンドロームと変形性膝関節症のクロストークにおけるサーチュイン遺伝子 Sirt6 の機能解析 麻生 義則, Maierhaba Ailixiding, Zulipiya Aibibula, 朴 金瑛, 古賀 大介, 大川 淳, 森田 定雄 2015 年 10 月 日本整形外科学会基礎学会

人工股関節全置換術におけるトラネキサム酸静脈内投与の効果と凝固線溶系に与える影響 平尾 昌之, 神野 哲也, 古賀 大介, 高田 亮平, 瀬川 裕子, 星野 ちさと, 麻生 義則, 森田 定雄, 宗田 大, 大川 淳 2015 年 10 月 日本股関節学会

SIRT6 in the crosstalk among ageing and metabolic osteoarthritis. Ailixiding M, Aibibula Z, Iwata M, Piao J, Hara Y, Koga D, Okawa A, Morita S, Asou Y. 2016 年 3 月 国際変形性関節症学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 淳 (OKAWA, Atsushi )  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 30251507

(2) 研究分担者

麻生 義則 (ASOU, Yoshinori )  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授  
研究者番号 : 50345279