

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791393
 研究課題名(和文) 軟骨細胞における SIRT1 の役割

研究課題名(英文) The role of SIRT1 in chondrocytes

研究代表者 松下雄彦 (MATSUSHITA TAKEHIKO)
 神戸大学・医学部附属病院・特命助教
 研究者番号：40467650

研究成果の概要(和文)：本研究により、SIRT1 の過剰発現により軟骨細胞における IL-1 β 誘導による関節破壊を促進する細胞外基質分解酵素の発現の抑制をすることが分かった。本研究結果から、SIRT1 が軟骨細胞において保護的に働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the overexpression of SIRT1 counteracted against the IL-1 β -induced expression of cartilage degrading enzymes, which presumably play important roles in cartilage degradation. Our study suggested that SIRT1 can play protective roles in chondrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：関節病学、SIRT1、軟骨、変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は整形外科領域で最も多い疾患で、関節軟骨の変性、消失によって関節変形、疼痛を生じ、日常生活において著しい機能低下をもたらす。これまで、病態解明にむけた多くの研究がおこなわれており、様々な病態変化が報告されているが、未だその詳細な制御機構は解明されていない。

NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素である silent information regulator 2 (Sir2) は多くの種間で保存され、Yeast や *caenorhabditus*, *elegans* においてカロリー制限を介した寿命延長に必須因子として報告されている。哺乳類において Sir2 遺伝子ファミリーは SIRT1-7 から成り、この中で

SIRT1 は最も塩基配列の相同性がある。近年、SIRT1 が老化や代謝などの制御に関わっていることが様々な臓器において報告されており、特に SIRT1 を刺激により老化に伴った病気の新しい治療方法として注目されている。また、SIRT1 は p53 などの様々な遺伝子の脱アセチル化を介して種々の細胞のアポトーシスを制御して、細胞の生存に関与していることが報告されている。一方、軟骨細胞のアポトーシスは、変形性関節症において重要な病態の一因であることが示唆されており、SIRT1 が軟骨細胞の変性に関与していると我々は仮説をたてた。

2. 研究の目的

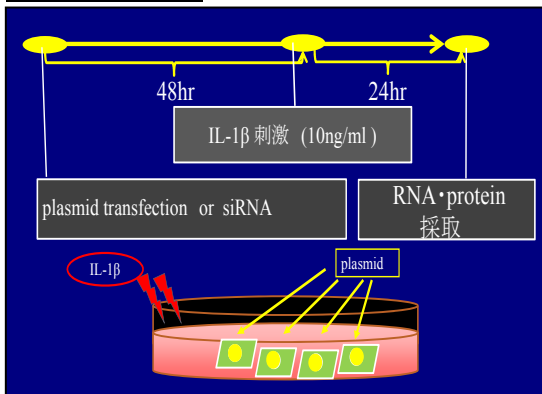
本研究の目的は、SIRT1 の軟骨細胞における

役割を調べることにより、病態の解明および、新しい治療方法を開発する手がかりをつくることである。

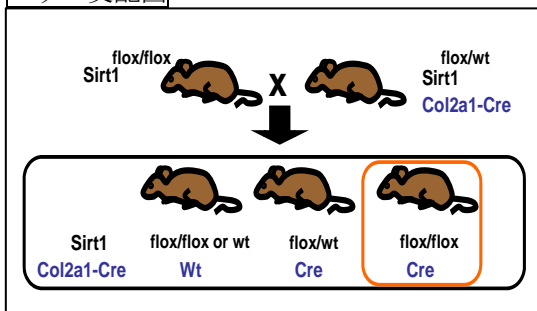
3. 研究の方法

変形性膝関節症患者由来の軟骨細胞と正常軟骨細胞の細胞株であるNHAC-kn細胞を用いて、まず *in vitro* の実験にて SIRT1 の役割を解析。上記軟骨細胞において SIRT1 を IL-1 β 刺激下で過剰発現もしくは抑制し、その遺伝子発現の変化をしらべることにより、SIRT1 が軟骨の破壊に保護的に機能するか調べた。SIRT1 の過剰発現には SIRT1 を coding した plasmid を用い、SIRT1 の抑制には small interfering RNA (siRNA) を用いた。遺伝子発現の変化は real-time PCR と western blotting を用いた。細胞内情報伝達を担う NF- κ B の一員である p65 と結合を免疫沈降法にてしらべ、p65 の脱アセチル化について western blotting 法にて調べた。さらに、免疫染色にて軟骨組織中における SIRT1 の発現と MMP-13 の発現を調べた。軟骨組織には手術中に得られる変形性関節症患者由来の軟骨と大腿骨頸部骨折にて人工骨頭置換術を行う際に得られた人工骨頭を用いた。一方、Cre-*loxP* の系を用いて SIRT1 の軟骨細胞特異的にノックアウトするマウスの作製も行った。SIRT1 の exon4 を loxP site で挟んだ変異遺伝子を有する SIRT1^{fllox/fllox} マウスと 2 型コラーゲン (Col2a1) promoter 下に Cre recombinase を発現する Col2a1-Cre トランスジェニックマウスの掛け合わせを行い、得られたマウスを組織学的に解析した。

In vitro 実験図



マウス交配図

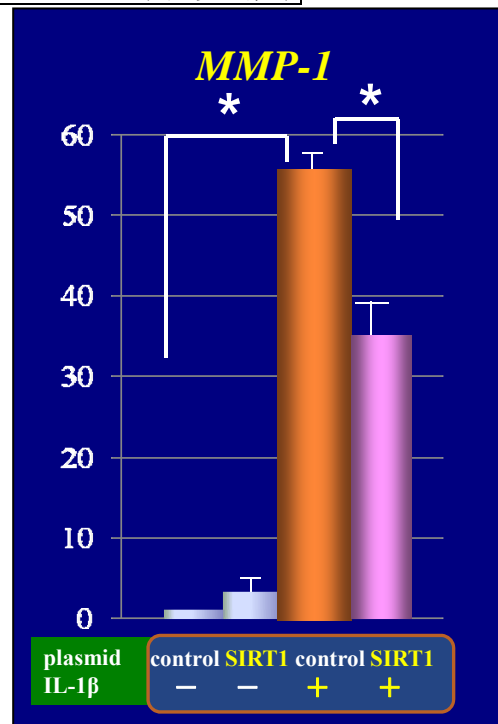


4. 研究成果

IL-1 β 刺激下で SIRT1 を過剰発現させた群では aggrecan の発現量の増加をみとめた。COL2A1 の発現量も同様の増加をみとめた。一方 ADTAM-TS5 や MMP-1、2、9、13 の発現量は IL-1 β 刺激により上昇をみとめたが、SIRT1 を過剰発現させた群ではその発現の上昇が一部抑制され (図 1)、SIRT1 の過剰発現が軟骨細胞に保護的に働く可能性が示唆された。一方で SIRT1 を抑制すると、aggrecan や COL2A1 の発現は減少した。また、IL-1 β 刺激による ADTAM-TS5 や MMP-1、2、9、13 の発現をさらに上昇させる傾向をみとめた (図 2)。また、免疫沈降法及び western blotting にて SIRT1 は NF- κ B の一員である、p65 と結合し脱アセチル化することがわかった (図 3、4)。IL-1 β 誘導による MMP の発現が p65 を介しているという過去の報告や、p65 のアセチル化が転写活性を促進するという報告を考慮すると、SIRT1 が MMP の発現を p65 の脱アセチル化を介して、その発現を調節していると考えられた (仮説図)。ヒト軟骨組織では SIRT1 の発現が減少している領域では MMP-13 の上昇をみとめ、一方で SIRT1 の発現を認めた部位では MMP-13 の発現は少ない傾向であった (図 5)。

SIRT1 のノックアウトマウスの外観上は通常の野生型マウスと比較して著明らかな変化はみとめなかった。また、生後 1 週のマウスの軟骨は著明らかな異常をみとめなかった。生後 6 か月のマウスではやや軟骨の変性が進んでいる傾向をみとめた。現在詳細について解析中である。

図 1: SIRT1 過剰発現の効果



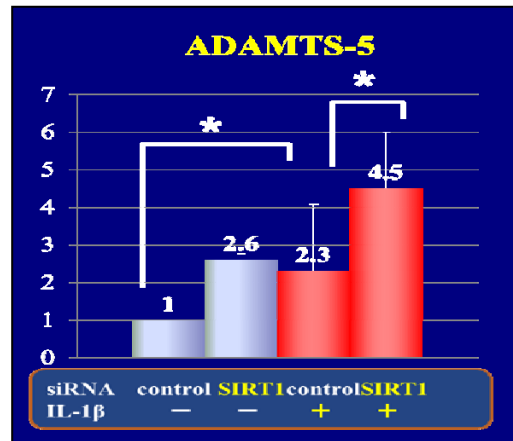
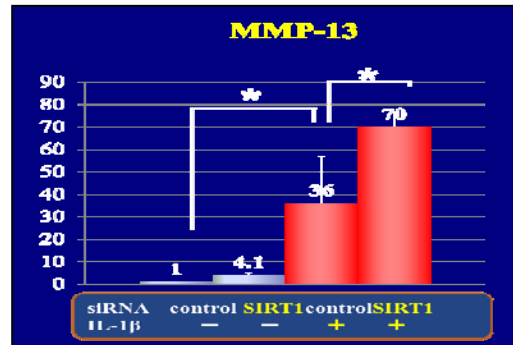
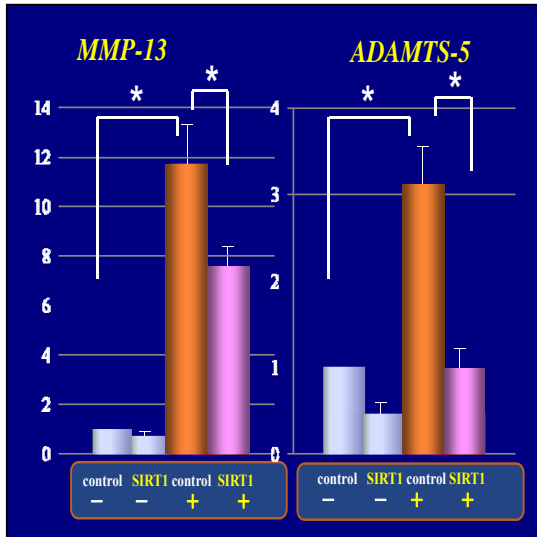
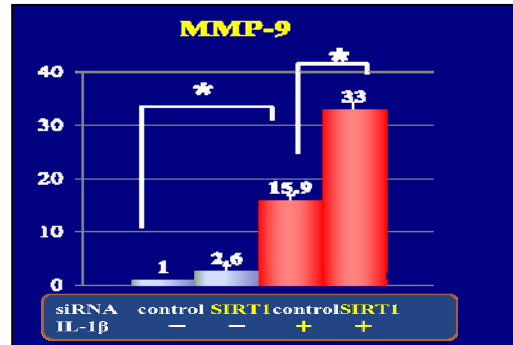
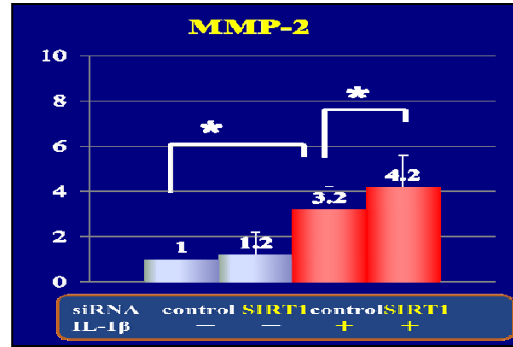
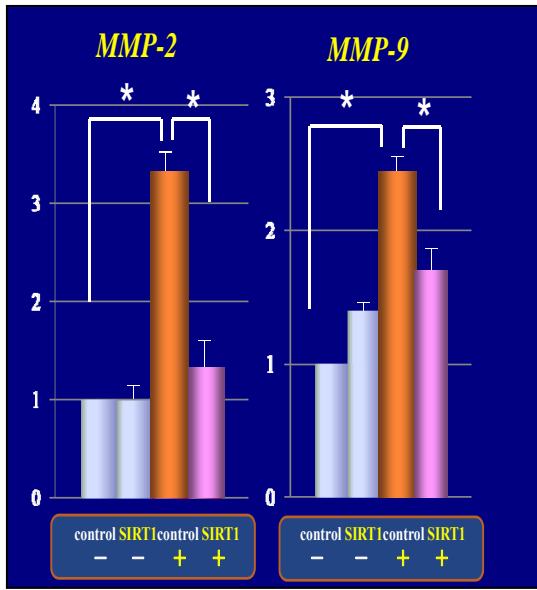


図 2

siRNA による SIRT1 抑制の影響

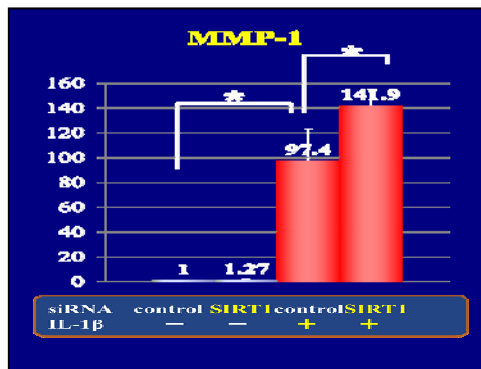


図 3 ;
SIRT1 過剰発現による p65 の脱アセチル化

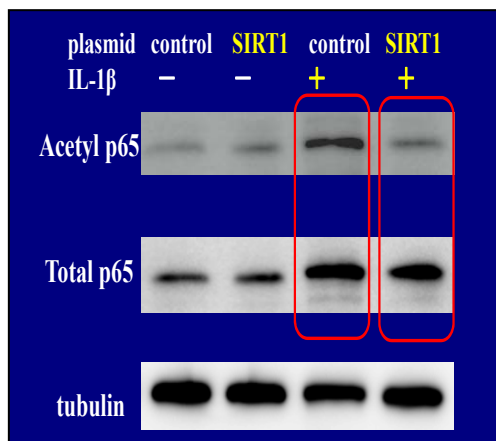


図 4 ; SIRT 1 と p65 の結合 (免疫沈降)

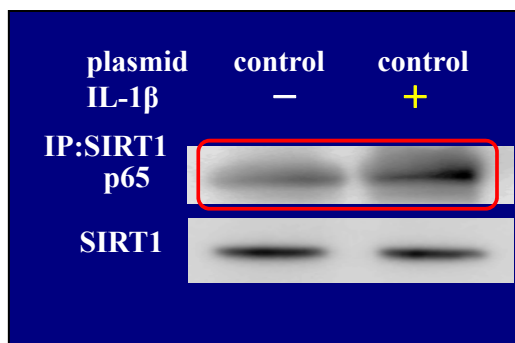
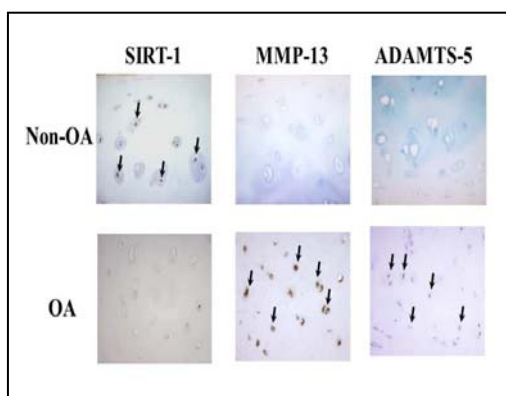
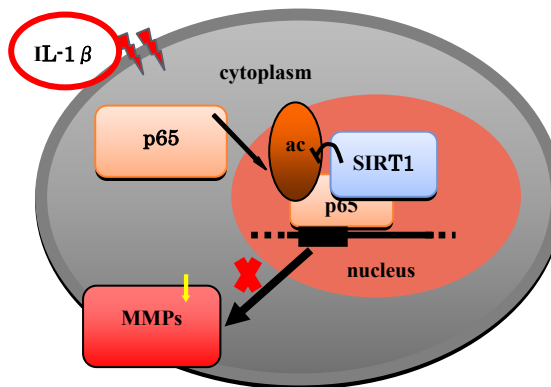


図 5 ;
軟骨組織における SIRT1 と MMP-13 と ADAMTS-5 の発現



実験結果から予想される仮説図



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 1 件)

①Fujita N, Matsushita T et al. Potential involvement of SIRT1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of chondrocyte gene expressions. Journal of Orthopaedic Research 2010; 29:511-5. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①Sasaki H, Matsushita T, et al. Overexpression of SIRT1 inhibits osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1β in human chondrocytes. International Cartilage Repair Society. 2010. 9. 26-29. Barcelona, Spain

②Sasaki H, Matsushita T, et al. Overexpression of SIRT1 inhibits osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1β in human chondrocytes. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 2010. 10. 16-20. Kyoto

③Sasaki H, Matsushita T, et al. Overexpression of SIRT1 inhibits osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1β in human chondrocytes. 57th annual Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 2011. 1. 13-16. Long Beach, USA

④佐々木宏, 松下雄彦 他. SIRT1 の過剰発現はヒト軟骨細胞においてIL-1β誘導による変形性関節症性様の遺伝子発現変化を抑制する. 日本整形外科基礎学術集会.

2010.14-15. 京都

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下雄彦 (MATSUSHITA TAKEHIKO)
神戸大学・附属病院・特命助教
研究者番号：40467650

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者