

令和 3 年 6 月 14 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：18K16629

研究課題名（和文）時計遺伝子CRYに着目した体内時計の骨の成長および変形性関節症の制御機構の解明

研究課題名（英文）Patophysiology of osteoarthritis

研究代表者

大久保 直輝（Okubo, Naoki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60816578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：体内時計は複数の遺伝子によって構成される。本研究では、体内時計を構成する時計遺伝子Cryが変形性関節症の進行に対して抑制的に作用していることを明らかにした。マウスを用いた研究で、加齢や変形性関節症を発生させるモデルマウスで時計遺伝子Cry2の発現が低下していることを明らかにした。また、Cry2の低下は変形性関節症の進行を有意に増悪させることを明らかにした。これらから、Cry2が変形性関節症に対して抑制的に作用していると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は、様々な要因が発症や進展に関与する多因子疾患であり、日本における罹病患者数は1000万人を超えるとされる。これまでに様々な要因が関与していることが明らかにされてきたが、体内時計についての研究は不十分であった。本研究では、体内時計を構成する時計遺伝子Cryが変形性関節症の抑制に関与していることを明らかにした。今後、さらなる研究を通して、病態解明や治療法の開発につなげられる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The circadian clock consists of some of clock genes. We identified suppression of circadian clock cryptochrome 2 promoted osteoarthritis. Cry2 mRNA and protein were suppressed in mice with aging-related OA and with surgical OA models. Cry2 knock out (KO) but not Cry1 KO mice with experimental OA showed significantly increased severity of histopathological changes in cartilage.

研究分野：変形性関節症の病態解明

キーワード：変形性関節症 体内時計 時計遺伝子 Cry

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「体内時計」は、Per, Cry, Bmal1, Clock などの「時計遺伝子」と呼ばれる遺伝子群によって構成される機構のことで、生体内の約 24 時間周期のリズム (概日リズム) を制御する。

1997 年、ほ乳類の体内時計の存在が報告されて以降、様々な組織自律的な体内時計の存在が報告されてきた。2013 年、申請者らを含む複数のグループが骨・軟骨における体内時計の存在を報告した¹。2016 年には、ヒト正常軟骨と OA 軟骨を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、OA 軟骨において時計遺伝子 Cry の発現が有意に低下していることが報告された²。しかし、軟骨において時計遺伝子 Cry を中心とした体内時計の存在が、軟骨においてどのような役割を果たしているのかは明らかではなかった。

Cry は時計遺伝子の一つで、Cry1 と Cry2 の遺伝子が存在する。Cry1 と Cry2 の単独欠損マウスはリズム周期が変化し、Cry1/2 をともに欠損したマウスは概日リズムが消失する。このことから、Cry は概日リズムの制御に重要な役割を果たしていると考えられている。一方で、Cry は体内時計とは独立した遺伝子を最も多く制御する時計遺伝子であることが明らかにされている³。さらに、Cry は炎症の抑制や DNA 修復に関与し、恒常性を維持する役割があることが報告されている。以上から、時計遺伝子 Cry に着目して研究を行った。

文献

1. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, et al, Prolonged bioluminescence monitoring in mouse ex vivo bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates. PLoS One. 8(11):e78306. 2013
2. Akagi R, Akatsu Y, Fisch KM, et al, Dysregulated circadian rhythm pathway in human osteoarthritis: NR1D1 and BMAL1 suppression alters TGF- β signaling in chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage. 2017 Jun;25(6):943-951.
3. Koike N, Yoo SH, Huang HC, et al, Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. Science. 2012 Oct 19;338(6105):349-54.

2. 研究の目的

軟骨において時計遺伝子 Cry がどのような役割を果たしているのかを明らかにすること。

3. 研究の方法

加齢・変形性関節症の進行に伴う CRY1/2 の発現解析

加齢は変形性関節症の発症・進展に最も大きく関わる因子である。加齢に伴い時計遺伝子 CRY の発現がどのように変化するかを解析するために、生後 6 か月 (健常群) と生後 24 か月 (加齢群) のマウスから膝関節軟骨を採取して、免疫組織化学法により解析した。

OA モデルマウスは生後 4 か月で内側半月板切除術 (DMM: destabilizing the medial meniscus) を施行し、術後 8 週時点でマウスの膝関節軟骨を採取した。免疫組織化学法により CRY の発現解析を行った。

CRY1/2 欠損マウスにおける変形性関節症の進行

3 か月齢の CRY1 および CRY2 単独欠損マウスと野生型マウスに対して、内側半月板切除による変形性関節症モデルを作成した。術後 8 週に膝関節を採取して、組織学的に変形性関節症の進行を評価した。進行の評価は OARSI score を用いた。

③ 骨の成長に関する大腿骨発光レポーター評価系の確立

0 日齢の発光レポーターマウスを用いた。この発光レポーターマウスは PER2::Luc ノックインマウスで、時計遺伝子 PER2 の発現変化を発光量の変化として観察が可能なマウスである。このマウスから大腿骨を採取して、器官培養を行った。培養 dish を発光イメージングシステムにセットし、継時的発光観察を 3 日間行った。

4. 研究成果

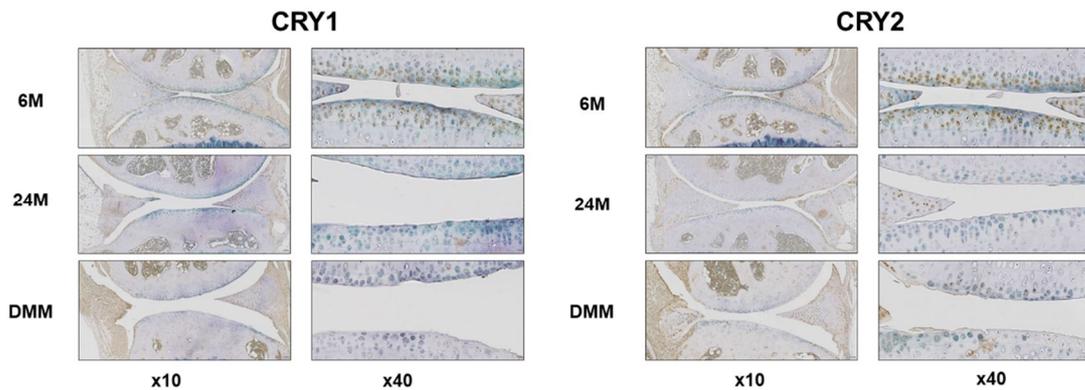
加齢・変形性関節症の進行に伴う CRY1/2 の発現解析

加齢および DMM 法により軟骨組織の摩耗を認めた。

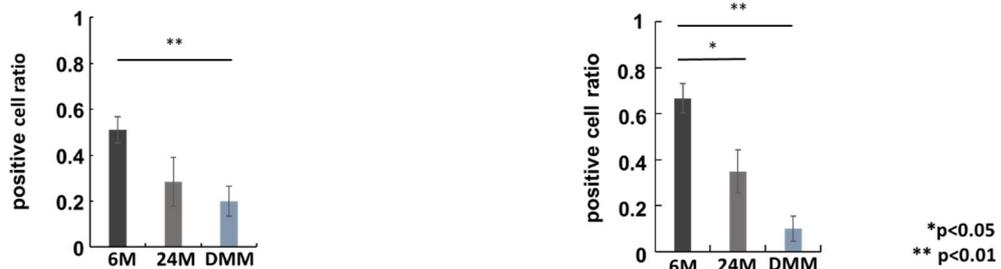
免疫組織化学法による CRY 陽性細胞の割合について、CRY1 陽性細胞の割合は生後 6 か月 (健常群) で 0.53、生後 24 か月 (加齢群) で 0.34 であり、有意差を認めなかった ($p=0.09$)。CRY2 陽性細胞の割合は生後 6 か月 (健常群) で 0.61、生後 24 か月 (加齢群) で 0.34 であり、有意差を認めた ($p=0.03$)。

一方、DMM 法では、CRY1、CRY2 とともに陽性細胞割合が生後 6 か月（健常群）と比較して有意に低下していた。

これらの結果から、OA において CRY2 発現が減少していることが明らかになった。



(図) CRY1・CRY2 の免疫組織化学法による膝関節組織切片

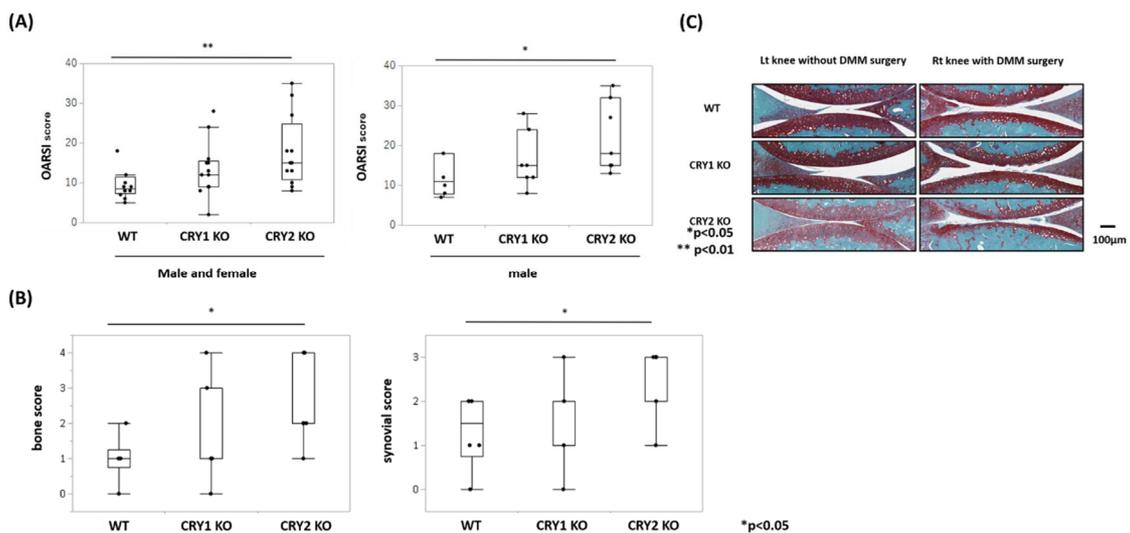


(図) 軟骨における CRY1 (左) と CRY2 (右) の陽性率変化

CRY1/2 欠損マウスにおける変形性関節症の進行

CRY1/CRY2 欠損マウスに対して、OA モデルを作成し、組織学的な検討を行ったところ、OA の進行評価に用いられる OARSI score が CRY2 欠損マウスで野生型マウスと比較して有意に高値であることが明らかになった。

さらに CRY2 欠損マウスでは bone score および synovial score が高値となることが分かった。



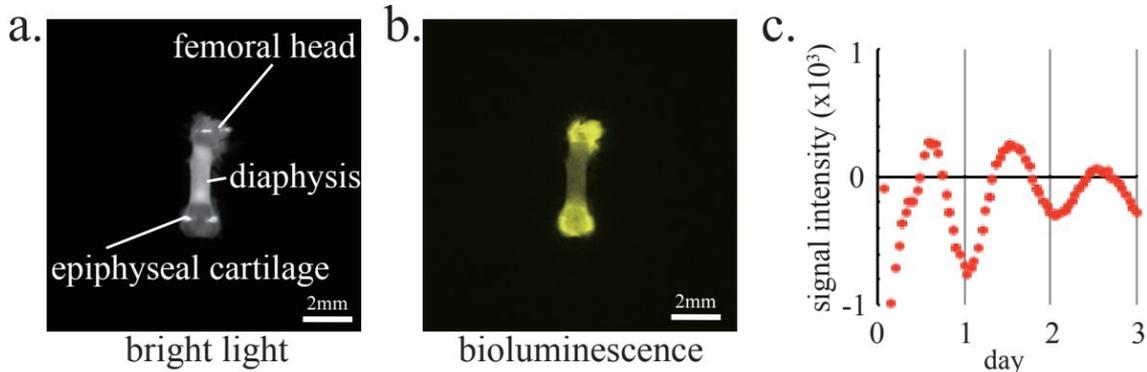
(図) CRY1/2 欠損マウスでの組織学的評価

、の結果から、CRY (特に CRY2) は OA 進行に対して抑制的に作用しており、加齢などの要因により CRY が欠損することで OA 進行の一因となっていることを突き止めた。

③ 骨の成長に関する大腿骨発光レポーター評価系の確立

0 日齢の PER2::Luc ノックインマウスから大腿骨を採取して、経時的発光観察を行ったところ、大腿骨骨端部では成長軟骨版から長軸方向近位になるにしたがって発光は徐々に弱くなり、骨幹部では軟骨部と比較し非常に弱かった。経時変化を解析したところ、発光

に約 24 時間の日内変動を認めた。



(図) 大腿骨器官培養系を用いた発光観察

この結果は、これまでしられていた若齢・高齢マウスと同様に、出生時にも軟骨に組織自立的な体内時計が備わっていることが明らかになった。さらに、この評価系を用いることで、体内時計と骨の成長に関わる検討を行えることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Ono R, Inoue M, Sasawaki Y, Grieten T, Okubo N, Ikoma K, Fujiwara H, Kubo T, Yagita K.	4. 巻 9
2. 論文標題 REV-ERB and REV-ERB Function as Key Factors Regulating Mammalian Circadian Output	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46656-0	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 -

1. 著者名 Bekki H., Duffy T., Okubo N., Olmer M., Alvarez-Garcia O., Lamia K., Kay S., Lotz M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Suppression of circadian clock protein cryptochrome 2 promotes osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 966 ~ 976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joca.2020.04.004	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大久保直輝、戸次 大史、Martin Lotz
2. 発表標題 変形性関節症におけるCRY2の発現低下
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H Bekki, T Duffy, N Okubo, M Olmer, O Alvarez-Garcia, K Lamia, S Kay, M.K. Lotz
2. 発表標題 Suppression of circadian clock protein cryptochrome2 promotes osteoarthritis
3. 学会等名 Osteoarthritis research society international 2019（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
研究協力者	Lotz Martin (Lotz Martin)		
研究協力者	池田 亮介 (Ikeda Ryosuke)		

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		
米国	The scripps research institute		