

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860807

研究課題名(和文) Sirt1が関節炎発症に及ぼす影響

研究課題名(英文) The role of Sirt1 in arthritis

研究代表者

朴木 博幸 (Hounoki, Hiroyuki)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：90512088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチは特に治療しなければ経過で関節破壊の可能性が生じる炎症性疾患である。関節リウマチでみられる関節破壊に重要な役割を果たしているのは破骨細胞で破骨細胞は生体内で唯一骨吸収を担う細胞である。関節リウマチでは関節局所で破骨細胞による骨吸収が正常より亢進している状態と考えられ破骨細胞の分化誘導を抑制することは関節リウマチの関節破壊の進行を抑制する治療につながると考えられる。そこで我々はSirt1に着目した。実験の結果、Sirt1は関節炎による関節破壊で重要な役割を果たす破骨細胞の分化誘導に関して抑制的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is inflammatory disease which may lead to joint destruction without treatment. Osteoclasts play a important role in joint destruction in RA. So, inhibition of differentiation of osteoclast may lead to the treatment of RA. We investigated the role of Sirt1 in differentiation of Osteoclast. It is indicated that Sirt1 may negatively regulate the differentiation of Osteoclasts which play a important role in obstruction of joints in arthritis.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：免疫学 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは一般的に、古典的な炎症性の特徴を持つM1 マクロファージと、抗炎症性の特徴を持つM2 マクロファージという少なくとも2つの極性を持った種類が存在し多彩な機能を発揮している (Eur J Immunol 2011;41:1531)。それらは、炎症性疾患の中で種々の割合で存在し、それぞれ炎症的、抗炎症的な役割を演じており、その極性のシフトは種々の疾患の性質を規定していると考えられる。また、長寿遺伝子として知られる Sirt1 は、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の一つである。NF B や、AP-1 を構成する c-fos、c-jun などの転写因子を直接に脱アセチル化することにより、その転写活性を抑制する (Biochem Pharmacol 2011;81:569)。さらにアポトーシスの抑制や、活性酸素の抑制を介した機序もあり、Sirt1 の炎症に対する作用については、対応する細胞やその条件などでまちまちな結果が得られている。(Plos One2011;6:e24307, Ann Rheum Dis 2011;70:1866) 我々の研究室では、マクロファージ特異的Sirt1 ノックアウトマウス (LysM-SIRT1 KOマウス) を独自に作成し、解析を行なっている。興味深いことに、LysM-SIRT1 KO マウスより採取したM1 マクロファージは、野生型マウスのM1 マクロファージと比較して炎症および低酸素関連の遺伝子発現が増強していた。また、LysM-SIRT1 KO 由来の骨髄由来マクロファージは、in vitro 低酸素刺激に対する炎症反応が増強していた。これらのことから、Sirt1 はマクロファージにおいて、抗炎症的に作用している可能性がある。そこで我々は、マクロファージ細胞特異的にSirt1 をノックアウトすることで、関節炎誘発モデルマウスがどのような変化を示すかを検討することを着想した。また、単球・マクロファージは、破骨細胞への分化誘導が行われる唯一の細胞系である。しかし、生体での破骨細胞形成自体には、単球・マクロ

ファージだけでなく、RANKL提示細胞としての骨細胞、骨芽細胞、そしてT細胞も関与している。我々は、M2 マクロファージへの極性変化を促すIL-4 やIL-10 が破骨細胞への分化抑制がc-fos やc-jun の抑制を介していることを報告してきた(業績6,7)。また、tp1-2 がNF- B の活性化を抑制することによって破骨細胞形成を抑制できることも報告した(業績2)。Sirt1により抑制されるNF- B , c-fos,c-jun、は破骨細胞の分化増殖に必須な転写因子であり(ArthritisRes Ther 2011;13:219)、Sirt1 を破骨細胞の前駆細胞であるマクロファージで直接制御することで、破骨細胞形成の抑制しいては関節破壊の抑制をきたすのではないかと考えた。

2. 研究の目的

LysM-SIRT1 KO マウスの骨髄細胞から、破骨細胞誘導系を用いて、SIRT1 の破骨細胞への分化誘導に対する影響について解析を行う。

3. 研究の方法

マウスの骨髄細胞を採取し従来の方法(業績6,7)を用いて破骨細胞を誘導し、その時の破骨細胞への分化能をコントロールマウスと比較検討する。全体の実験を通して、すでに同じ研究室の研究協力者が作成し確立済みであるマクロファージ特異的SIRT1 欠損マウス (LysM-SIRT1 KO マウス) を用い、コントロールマウスとの比較検討を行う。個々の分子の蛋白発現の変化については western ブロットで解析する。

4. 研究成果

野生型マウスとノックアウトマウスから得られたそれぞれの骨髄マクロファージから破骨細胞を分化誘導し TRAP 染色により破骨細胞数を同定し破骨細胞の数をカウントした。図1に示す如く分化誘導される破骨細胞数は野生型に比べノックアウトマウスの方が多く統計学的に有意差を認めた。また破骨

細胞の分化誘導に関し western プロット法を用いて蛋白レベルで解析したところ図2に示す如く破骨細胞への分化誘導に必須の転写因子である NFATc1 の発現は野生型に比べノックアウトマウスの方がその発現が長期にわたることが確認された。

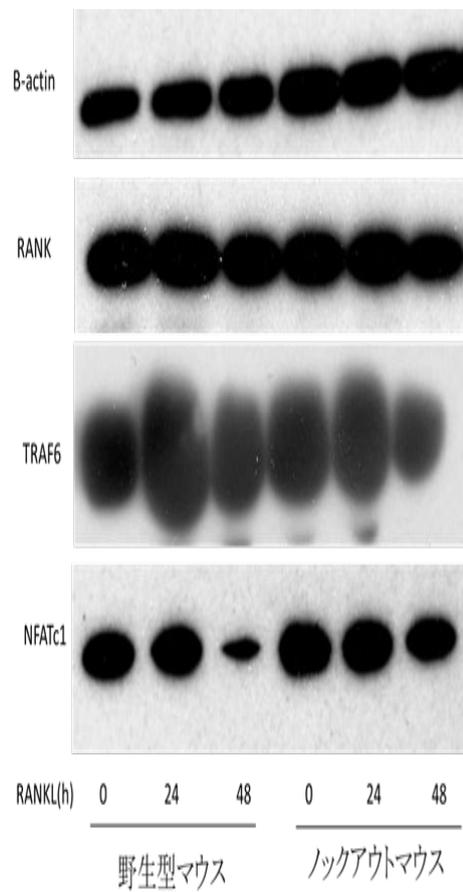
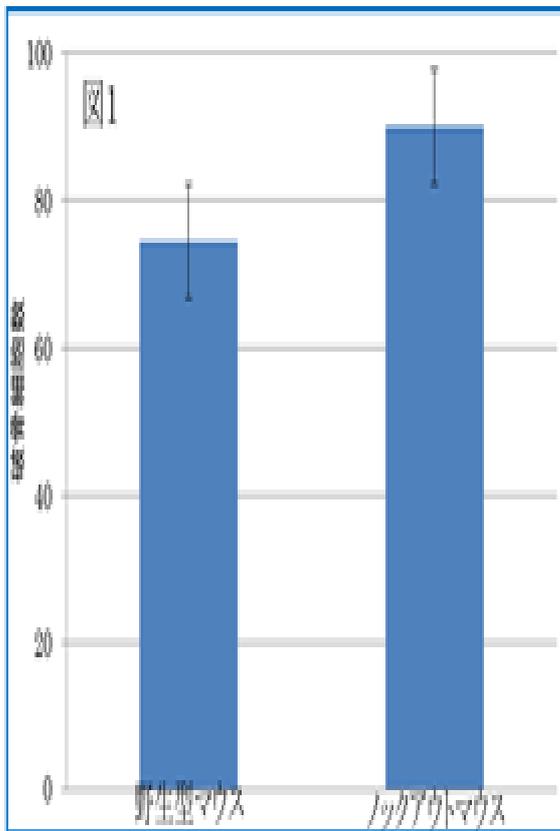


図2

〔引用文献〕

SIRT1 negatively regulates amyloid-beta-induced inflammation via the NF-kB pathway.
Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2013) 46: 659-669

Negative regulation of inflammation by SIRT1
Pharmacological Research 67 (2013) 60- 67

Sirt1 overexpression protects murine osteoblasts against TNF- α -induced injury *in vitro* by suppressing the NF- κ B signaling pathway
Acta Pharmacologica Sinica (2012) 33: 668-674

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

朴木 博幸 (HOUNOKI, Hiroyuki)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号: 90512088