



SIRT1 Regulation of Apoptosis of Human Chondrocytes

高山, 孝治

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5115

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005115>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	高山 孝治
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5115 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

SIRT1 Regulation of Apoptosis of Human Chondrocytes（SIRT1 によるヒト軟骨細胞のアポトーシスの調節）

審 査 委 員

主 査	教 授	前川 信博
	教 授	平田 健一
	教 授	平井 みどり

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

SIRT1 Regulation of Apoptosis of Human Chondrocytes

SIRT1 によるヒト軟骨細胞のアポトーシスの調節

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

整形外科学

(指導教員：黒坂 昌弘教授)

高山孝治

はじめに

変形性関節症 (OA) は関節疾患の中で最も高頻度にかかる疾患の一つであり、病状の進行によって歩行障害など日常生活に支障をきたすこととなる。現在我が国での患者数は 700 万人から 1000 万人と推定されているが、今後急速な高齢化に伴い、さらなる患者数の増大が予想され、社会的損失、経済的負担が大きくなることが示唆されている。これまで、OA の病態解明にむけた多くの研究が行われているが、未だその詳細な制御機構は解明されていない。ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 (silent information regulator two ortholog 1) は寿命を制御する重要な因子として報告され、変性疾患との関与が示唆されている。また SIRT1 は p53 などの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、OA において重要な病態の一因であることが示唆されているが、SIRT1 の軟骨細胞のアポトーシスにおける役割は未だ解明されていない。本研究の目的は SIRT1 の軟骨細胞での発現、軟骨細胞のアポトーシスにおける SIRT1 の役割及び、その制御メカニズムを解明することである。

方法

Normal Human Articular Chondrocytes-knee (Lonza 社) を購入し、正常ヒト軟骨細胞として使用した。人工膝関節置換術時に切除された大腿骨外顆より OA 軟骨細胞を採取した。

軟骨細胞における SIRT1 発現の検討

正常細胞と OA 軟骨細胞よりタンパクおよび RNA を抽出し、SIRT1 の発現を Western blotting または RT-PCR にて比較検討した。また軟骨細胞に GFP-SIRT1 plasmid を導入し、SIRT1 の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。

軟骨細胞へのストレス刺激による SIRT1 発現変化の検討

軟骨細胞のアポトーシスと OA 変化の関連が報告されている。また、飢餓ストレス、異化ストレス、メカニカルストレスが軟骨細胞にアポトーシスを誘導することが報告

されている。飢餓ストレスとして軟骨細胞を serum-starved medium 内で 48 時間培養を行い、タンパクを抽出した。異化ストレスとして軟骨細胞に 10ng/ml interleukin-18 (IL-18) または 50 μ M H₂O₂ を添加し、48 時間後にタンパクを抽出した。メカニカルストレスとして軟骨細胞に 2%または 5%の伸張ストレスを 6 時間 (0.25Hz)加え、4 時間後にタンパクを抽出した。抽出したタンパクの SIRT1 発現を Western blotting にて比較検討した。

SIRT1 による軟骨細胞のアポトーシス調節の検討

正常軟骨細胞にアポトーシスを誘導した上で、SIRT1 を抑制もしくは活性させ、アポトーシスの発現を比較検討した。SIRT1 の抑制は small interfering RNA (siRNA)にて行い、SIRT1 の活性は resveratrol にて行った。アポトーシスの誘導は nitric oxide(NO) 供与体である sodium nitroprusside(SNP) を用いた。アポトーシスの評価は TUNEL 染色と cleaved PARP の Western blotting にて比較検討した。

SIRT1 によるアポトーシスのメカニズム解析の検討

アポトーシスのメカニズム解明のため、アポトーシス関連因子である cleaved caspases-3, -8, -9 の発現を Western blotting にて比較検討した。さらにミトコンドリア経路の関与を調べるためにミトコンドリア分画を抽出し、Bax, Bcl-2 の発現を Western blotting にて比較検討した。

結果

軟骨細胞における SIRT1 の発現

SIRT1 の発現は正常軟骨細胞に比べ OA 細胞では低下していた。また、SIRT1 の発現は軟骨細胞の核に存在していた。

軟骨細胞へのストレス刺激による SIRT1 発現変化

軟骨細胞に飢餓ストレスを加えると SIRT1 の発現は低下していた。IL-18, H₂O₂ による異化ストレスでも同様に SIRT1 の発現は低下していた。またメカニカルストレス

でも同様に SIRT1 の発現は低下した。

SIRT1 による軟骨細胞のアポトーシス調節

TUNEL 染色による TUNEL 陽性細胞は SIRT1 の抑制にて有意に増加し、SIRT1 の活性にて有意に減少した。cleaved PARP の発現は、SIRT1 の抑制にて増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。

SIRT1 によるアポトーシスのメカニズム解析

cleaved caspase-3, -9 の発現は SIRT1 の抑制にて増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。cleaved caspase-8 の発現は、SIRT1 による影響は認めなかった。

ミトコンドリア分画において、Bax の発現は SIRT1 の抑制にて増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。また Bcl-2 の発現は SIRT1 の抑制にて増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。

考察

本研究において、SIRT1 はヒト軟骨細胞に存在し、核に局在していることが明らかとなった。SIRT1 の発現は軟骨細胞の OA 変化に従い減少した。また、ヒト軟骨細胞のアポトーシスを誘導すると報告されている種々のストレス刺激により SIRT1 の発現は減少していた。以上より、SIRT1 はヒト軟骨細胞の OA 変化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。SIRT1 によるヒト軟骨細胞のアポトーシスへの関与については、SIRT1 抑制によりアポトーシスが促進し、逆に SIRT1 活性によりアポトーシスが抑制されたことより、SIRT1 がヒト軟骨細胞でアポトーシスを制御する重要な因子として示唆された。また、その制御メカニズムとして Bax, Bcl-2 の調節によるミトコンドリア経路の制御を介していることが示唆された。以上の結果より SIRT1 による軟骨細胞のミトコンドリア経路を介したアポトーシスの制御が明らかとなり、SIRT1 の活性により軟骨細胞の OA 変化を抑制する可能性が示唆された。

SIRT1 は OA に対する治療の新しい標的となる可能性があり、新たな治療法の確立により OA で苦しむ多くの人々に対して多大なる福音をもたらし、健康寿命の延伸に貢献する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2144号	氏 名	高山 孝治
論文題目 Title of Dissertation	SIRT1 Regulation of Apoptosis of Human Chondrocytes SIRT1 によるヒト軟骨細胞のアポトーシスの調節		
審査委員 Examiner	主 査 前川 信博 Chief Examiner 副 査 平田 健一 Vice-examiner 副 査 平井 みどり Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

変形性関節症（OA）の病態解明にむけた多くの研究が行われているが、未だその詳細な制御機構は解明されていない。ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1（silent information regulator two ortholog 1）は、細胞のアポトーシスを制御し、変性疾患との関与が報告されている。本研究の目的は SIRT1 の軟骨細胞での発現を確認し、SIRT1 によるヒト軟骨細胞のアポトーシスの調節を解明することである。

材料と方法

Normal Human Articular Chondrocytes-knen を取得し、正常ヒト軟骨細胞として使用した。人工膝関節置換術時に切除された大腿骨外顆より OA 軟骨細胞を採取した。

1) ヒト軟骨細胞における SIRT1 発現の検討

正常軟骨細胞、OA 軟骨細胞よりタンパクおよび RNA を抽出し、SIRT1 の発現を Western blotting または RT-PCR にて比較検討した。次に正常軟骨細胞に GFP-SIRT1 plasmid を導入し、SIRT1 の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。

2) ストレス刺激による SIRT1 発現変化の検討

飢餓ストレスとして軟骨細胞を serum-starved medium 内で 48 時間後タンパクを抽出した。異化ストレスとして軟骨細胞に 10ng/ml interleukin-18 (IL-18) または 50 μ M H₂O₂ を添加し、48 時間後タンパクを抽出した。メカニカルストレスとして軟骨細胞に 2%または 5%の伸張ストレスを 6 時間 (0.25Hz) 加え、4 時間後にタンパクを抽出した。抽出したタンパクの SIRT1 発現を Western blotting にて比較検討した。

3) SIRT1 による軟骨細胞のアポトーシス調節の検討

正常軟骨細胞に nitric oxide(NO) 供与体である sodium nitroprusside(SNP)を添加しアポトーシスを誘導した上で、small interfering RNA (siRNA)にて SIRT1 を抑制、または resveratrol にて SIRT1 を活性化させた。アポトーシスの評価を TUNEL 染色と cleaved PARP の Western blotting にて検討した。

4) SIRT1 によるアポトーシスのメカニズム解析の検討

アポトーシス関連因子である cleaved caspases-3、-8、-9 の発現を Western blotting にて比較検討した。さらにミトコンドリア分画を抽出し、Bax、Bcl-2 の発現を Western blotting にて検討した。

結果

1) ヒト軟骨細胞における SIRT1 の発現

SIRT1 の発現は正常軟骨細胞に比べ OA 軟骨細胞で低下していた。SIRT1 は軟骨細胞の核に限局していた。

2) ストレス刺激による SIRT1 発現変化の検討

軟骨細胞に飢餓ストレス、異化ストレス、メカニカルストレスを加えると SIRT1 の発現は低下していた。

3) SIRT1 による軟骨細胞のアポトーシス調節

SIRT1 の抑制にて TUNEL 陽性細胞は有意に増加し、SIRT1 の活性にて有意に減少した。また、SIRT1 の抑制にて cleaved PARP の発現は増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。

4) SIRT1 によるアポトーシスのメカニズム解析

SIRT1 の抑制にて cleaved caspase-3、-9 の発現は増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。cleaved caspase-8 の発現は、SIRT1 による影響は認めなかった。

ミトコンドリア分画において、Bax の発現は SIRT1 の抑制にて増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。また Bcl-2 の発現は SIRT1 の抑制にて増強し、SIRT1 の活性にて減弱した。

考察ならびに結論

SIRT1 の発現は軟骨細胞の OA 変化に従い減少し、種々のストレス刺激により SIRT1 の発現は減少しており、SIRT1 はヒト軟骨細胞の OA 変化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。Ginzberg らは SIRT1 による OA 関連遺伝子の発現減少を報告しているが、その機序は不明であった。一方、OA の原因としては、軟骨細胞のアポトーシスの関与が報告されている。今回の研究により SIRT1 による軟骨細胞のミトコンドリア経路を介したアポトーシスの制御が明らかとなり、SIRT1 は軟骨細胞のアポトーシスを抑制することにより OA 関連遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。SIRT1 は OA 治療の新しい標的となる可能性があり、新たな治療法の確立に繋がり得るのではないかと考えられた。

本研究は、軟骨細胞のアポトーシスにおける SIRT1 の役割について研究したものであるが、従来解明されていなかった軟骨細胞における SIRT1 のアポトーシス抑制メカニズムについて、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。