



Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes

Nagai, K.

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6529号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006529>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes

ヒト軟骨細胞においてSIRT6抑制は細胞老化、DNA損傷、テロメア機能不全をきたす

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)

長井 寛斗

【目的】

変形性関節症 (Osteoarthritis ; OA) は主に高齢者に発生し軟骨変性を伴う疾患である。OAの進行には機械的ストレスや加齢、遺伝的要因など種々の要因が関与しているとされるが、近年の報告では軟骨における同化・異化の不均衡が生じ、マトリックスマクロプロテアーゼ (MMP) や ADAMTS に代表されるタンパク質分解酵素の発現が増加することや、アポトーシスや細胞老化が亢進することが進行の一因になっていると考えられている。

サーチュインはニコチニアミドアデニジヌクレオチド (NAD⁺) 依存性ヒストン脱アセチル化酵素で寿命を制御する重要な因子として報告され、加齢による疾患との関与が報告されている。哺乳類ではサーチュインは SIRT (silent information regulator two ortholog) 1~7まで7種類のサブタイプがあり、細胞内の様々な場所に存在しているが、SIRT1 はこれまで多分野での研究結果が報告され、軟骨細胞や変形性関節症に関する報告も多い。これまでに我々は、ヒト軟骨細胞を用いた *in vitro* の検討で、SIRT1 のアポトーシス制御や OA 関連遺伝子の制御を報告している。さらに軟骨細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウスを用いた検討では、軟骨細胞での SIRT1 欠損によって、機械的ストレスや加齢により OA が促進されることを示し、SIRT1 が OA 進行に保護的な役割を果たしていることを報告した。

近年 SIRT6 は DNA 損傷やテロメア機能、糖代謝、炎症抑制、寿命などに関与していると報告されており、加齢疾患において重要な役割をしていると考えられている。しかし、軟骨細胞や OA における SIRT6 の役割については、いまだ十分な報告がなく不明であり、今回我々はヒト軟骨細胞における SIRT6 の発現とその役割について検討を行った。SIRT6 は軟骨細胞に対して保護的な作用を持つと仮説を立てた。

【対象と方法】

まずヒト軟骨組織を用いて組織学的検討を行った。内反型変形性膝関節症に対する人工膝関節全置換術時に採取した大腿骨内顆・外顆をそれぞれ重度・軽度 OA 軟骨として実験に用いた (n=6)。また、大腿骨頸部骨折に対する人工骨頭置換術時に採取した、肉眼的に明らかな OA 変化のない大腿骨頭を正常軟骨として用いた (n=6)。免疫組織化学染色法にて軟骨部の SIRT6 の発現を調べた。さらに軟骨細胞の増殖能を評価するため、Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色も行った。

次にヒト正常軟骨細胞 (Normal Human Articular Chondrocytes; NHAC-kn, Lonza) を単層培養し *in vitro* の各実験に用いた (n = 3)。まず蛍光免疫染色法を用いて培養軟骨細胞での SIRT6 の発現と局在を調べた。次に RNA interference 法を用いて培養軟骨細胞の SIRT6 発現を抑制し各種検討を行った。SIRT6 small interfering RNA (siRNA)、Control siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて導入し、48 時間後に RNA、タンパク質を回収した。RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出したのち cDNA 化を行い、各種遺伝子発現変化を Real-time RT-PCR 法で検討した。タンパク質は Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) を用いて抽出精製し、Western blotting 法で評価した。

細胞増殖との関連を調べるため、NHAC-kn を培養し Control siRNA と SIRT6 siRNA を導入

し、Cell Counting kit-8 (CCK-8, Dojindo) を用いて経時的に評価した。また、Senescence associated β -Galactosidase (SA- β -Gal) assay (Cell Signaling Technology) を用いて細胞老化の評価を行った。すなわち NHAC-kn を培養し Control siRNA、SIRT6 siRNA を導入後 48 時間で染色を行い、陽性細胞率 (%) を両群で比較検討した。さらに DNA 損傷とテロメア機能不全を評価するため、過去の報告にあるように DNA 損傷部で見られるヒストン H2AX のリン酸化を示す γ H2AX foci と、テロメア機能不全を示すとされる telomere dysfunction-induced foci (TIFs) を調べた。NHAC-kn を培養し Control siRNA、SIRT6 siRNA を導入後 48 時間で抗 γ H2AX 抗体と抗 telomere repeat factor-1 (TRF-1) 抗体を用いて免疫蛍光染色法を行い評価した。 γ H2AX foci と TRF-1 の共発現部を TIFs とした。1 核あたりの γ H2AX foci の範囲を Image J を用いて計測し比較検討し、1 核あたりの TIFs 数を計測し比較検討を行った。統計学的検討として、全ての数値は平均値 \pm 95% 信頼区間で示し、StatView 5.0 を用いて解析し比較検討した。危険率 5% 未満を有意とした。

【結果】

ヒト軟骨組織を用いた免疫組織化学染色では、正常軟骨、変性軟骨とともに軟骨細胞の核内に SIRT6 の発現を認め、変性軟骨では表層部でより強く染色される傾向を認めた。培養軟骨細胞でも同様に核内に SIRT6 の発現を認めた。

培養軟骨細胞を用いた検討では、まず SIRT6 siRNA による SIRT6 発現抑制の効果を検討したが、Real-time PCR では Control 群に比べ SIRT6 は約 40% まで減少し、タンパク質レベルでも SIRT6 の発現抑制を確認した。Real-time PCR による検討では、Control 群での発現を 1 とすると、SIRT6 抑制により MMP-1 は 2.3 ± 0.5 倍 ($P = 0.03$)、MMP-13 では 4.7 ± 0.4 倍 ($P = 0.01$) と有意な発現増加を認めた。CCK-8 による細胞増殖能の評価では、SIRT6 抑制により siRNA 導入後 72 時間、96 時間で Control 群と比較して有意に吸光度の低下を認め (72 時間: 0.99 ± 0.06 vs 0.77 ± 0.06 , $P = 0.02$ 、96 時間: 1.53 ± 0.10 vs 1.16 ± 0.11 , $P = 0.002$)、SIRT6 抑制による細胞増殖能の低下が示唆された。またヒト軟骨組織の免疫組織学的検討では、変性軟骨における軟骨細胞の集簇部 (Cluster) で SIRT6、PCNA 共に強い発現を認めた。SA- β -Gal assay による細胞老化評価では、陽性細胞数の割合は Control 群 ($11.3 \pm 3.0\%$) と比較し SIRT6 抑制群 ($24.3 \pm 4.2\%$) で有意に増加を認め ($P = 0.008$)、SIRT6 抑制により細胞老化が引き起こされる事が示唆された。さらに、DNA 損傷とテロメア機能不全の評価では、SIRT6 抑制により γ H2AX foci の増加 ($1.0 \pm 0.1/\text{cell}$ vs $1.9 \pm 0.1/\text{cell}$, $P = 0.0001$) と TIFs の増加 ($1.3 \pm 0.2/\text{cell}$ vs $3.5 \pm 0.8/\text{cell}$, $P = 0.007$) が認められ、SIRT6 抑制により DNA 損傷やテロメア機能不全が増加することが示唆された。また、細胞老化に関与するとされる p16, p21 タンパク質を調べたところ、SIRT6 抑制により p21 は低下したものの p16 は発現上昇を認めた。

【考察および結論】

我々が涉獥した限りこれまでにヒト軟骨細胞における SIRT6 の役割を検討した研究はなく、本研究はヒト軟骨細胞における SIRT6 の役割を検討した最初の研究である。本研究では、まず免疫組織学的評価を行いヒト軟骨細胞における SIRT6 の発現を確認した。SIRT6 は過去

の報告と同様に核内に発現を認め、SIRT6 はストレスを直接受ける軟骨層の Superficial zone に主に発現を認めた。また、培養軟骨細胞においても核内に SIRT6 の発現を認めた。さらに OA 軟骨における軟骨細胞集簇部では、SIRT6 と PCNA は強く発現しており、SIRT6 が細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

次に SIRT6 の役割を調べるため、SIRT6 抑制の影響を *in vitro* で調べた。最近 Piao らは SIRT6 ノックアウトマウスでの検討を行い、成長軟骨板の増殖層や肥大層が SIRT6 ノックアウトマウスで減少しており、SIRT6 が軟骨増殖の重要な因子である可能性を報告している。さらに、本研究では SIRT6 抑制は細胞老化を増加させたが、血管内皮細胞や iPS 細胞、線維芽細胞など他の細胞でも細胞老化への関与が同様に報告されている。我々はさらに SIRT6 抑制により DNA 損傷やテロメア機能不全が増加することを示したが、過去にも SIRT6 の DNA 修復やテロメア機能への保護的な作用が報告されており、本研究結果を支持するものである。

サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターである p21 や p16 を介した経路は細胞老化を誘導するシグナルとして重要であり、p53 や pRB が関連しているとされる。DNA 損傷は細胞老化を引き起こす一因子で、まず p53 や p21 を介した経路で細胞老化を誘導するとされているが、DNA 損傷やテロメア機能不全は p16 を誘導し、重度の DNA 損傷やテロメア機能不全が生じた細胞の細胞増殖を抑制する Second barrier として働くと言われている。OA と p16 との関連については Zhou らが報告しており、p16 陽性細胞が OA 細胞では正常軟骨組織と比べ非常に多く発現していること、さらに OA 軟骨細胞で p16 を抑制すると細胞老化が減少し、細胞増殖や軟骨基質の産生が増加することを報告しており、これらの所見から p16 は OA 発症の一因子となっている可能性が考えられる。本研究では SIRT6 抑制により p21 発現が減少し p16 発現が増加したことより、軟骨細胞において SIRT6 は p16-pRB 経路を介して細胞老化を抑制している可能性が考えられた。p16 の発現が増加した一方で p21 の発現が低下したことは興味深いが、Stein らはヒト線維芽細胞を用いて p16 と p21 が異なる役割を持っていること報告しており、彼らの研究では p21 は細胞老化の早期に発現が上昇するが、細胞老化が完了すると p21 の発現は減少し p16 の発現上昇が認められ、p16 の発現上昇は細胞周期の停止を維持するのに重要ではないかと結論付けている。従って、本研究ではタンパク質を回収する際に既に多くの細胞で細胞老化が完了していたため、p16 と p21 の発現レベルに違いが生じたと推察される。

また今回の研究では MMP-1、MMP-13 の mRNA 発現が SIRT6 抑制により有意に増加したが、特に MMP-13 は 2 型コラーゲン分解に関与する主要な因子であり OA 進行への関与が報告されており、さらに MMP-1 と MMP-13 は加齢に伴って軟骨細胞で発現が増加すると報告されている。SIRT6 は、ストレスや炎症の際に刺激される NF- κ B を制御すると報告されており、今回の MMP 発現上昇も NF- κ B 経路を介していた可能性が考えられる。また、老化細胞では正常細胞と比べ細胞の性質が変化し MMP やインターロイキンなどの発現が増加するとも報告されており、SIRT6 が抑制された細胞ではこの様な細胞の形質変化が生じたことが考えられるが、SIRT6 による MMP-1 や MMP-13 制御のメカニズムについては今後更なる研究が

必要である。

結論として、SIRT6 抑制はヒト軟骨細胞において MMP-1, MMP-13 の発現を増加させるとともに、細胞増殖を低下させて細胞老化を引き起こした。さらに DNA 損傷やテロメア機能不全を生じた。以上の結果より、SIRT6 はヒト軟骨細胞において DNA 損傷やテロメア機能不全、細胞老化を抑制的に制御する一因子として重要な役割を果たしてい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 2554 号	氏名	長井 寛斗
論文題目 Title of Dissertation	Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes ヒト軟骨細胞において SIRT6 抑制は細胞老化、DNA 損傷、テロメア機能不全をきたす		
審査委員 Examiner	主査 平井 康一 Chief Examiner 副査 平井 宽斗 Vice-examiner 副査 向坂 敏朗 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【背景】

変形性関節症 (OA) は軟骨変性を伴う疾患であり加齢はその一因とされている。サーチュインはヒストン脱アセチル化酵素で寿命を制御する重要な因子として報告され、哺乳類では SIRT (silent information regulator two ortholog) 1~7まで存在する。近年 SIRT6 は DNA 損傷やテロメア機能、糖代謝、炎症抑制、寿命などに関与していると報告されているが、軟骨細胞や OA における SIRT6 の役割についてはまだ不明である。申請者らは、SIRT6 が軟骨細胞に対して保護的な作用を持つと仮説をたて、ヒト軟骨細胞における SIRT6 の発現とその役割について検討をおこなった。

【対象と方法】

手術時に採取したヒト重度・軽度 OA 軟骨と正常軟骨組織を用いて組織学的検討を行った。免疫組織化学染色にて軟骨部の SIRT6 発現を調べ、軟骨細胞の増殖能を評価するため Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) の発現も調べた。次にヒト正常軟骨細胞 (NHAC-kn) を培養し *in vitro* の各実験に用いた。まず、蛍光免疫染色にて培養軟骨細胞での SIRT6 発現と局在を調べた。次に RNA interference 法を用いて SIRT6 発現を抑制し検討を行った。SIRT6 small interfering RNA (siRNA)、Control siRNA を導入し、48 時間後に RNA とタンパク質を回収し、遺伝子発現変化を Real-time RT-PCR 法、タンパク質は Western blotting 法で評価した。細胞増殖を調べるため Cell Counting kit-8 を用いて経時的に評価した。また、細胞老化評価のため Senescence associated β -Galactosidase (SA- β -Gal) assay を用いて陽性細胞率 (%) を比較検討した。さらに、DNA 損傷を示す γ H2AX foci と、テロメア機能不全を示す telomere dysfunction-induced foci (TIFs) を蛍光免疫染色法にて評価した。統計学的検討を行い、危険率 5%未満を有意とした。

【結果】

ヒト軟骨組織の免疫組織化学染色では軟骨細胞の核内に SIRT6 発現を認め、培養軟骨細胞も同様に SIRT6 発現を認めた。培養軟骨細胞を用いた検討では、SIRT6 抑制により Real-time PCR では軟骨基質分解酵素である matrix metalloproteinases (MMP) -1 が Control 群と比較し 2.3 ± 0.5 倍、MMP-13 では 4.7 ± 0.4 倍と有意な発現増加を認めた。細胞増殖能の評価では、SIRT6 抑制により siRNA 導入後 72, 96 時間で有意な細胞増殖能の低下を認めた。OA 軟骨組織の軟骨細胞集簇部では SIRT6、PCNA 共に強い発現を認めた。SA- β -Gal assay による評価では、陽性細胞数は Control 群と比較し、SIRT6 抑制群で有意に増加を認めた。DNA 損傷とテロメア機能不全の評価では、SIRT6 抑制により γ H2AX foci の増加 ($1.0 \pm 0.1/\text{cell}$ vs $1.9 \pm 0.1/\text{cell}$) と TIFs の増加 ($1.3 \pm 0.2/\text{cell}$ vs $3.5 \pm 0.8/\text{cell}$) を認めた。また細胞老化に関与する p16, p21 タンパク質の発現は、SIRT6 抑制により p21 は低下したものの p16 は発現上昇を認めた。

【考察ならびに結論】

ヒト軟骨細胞の核内に SIRT6 の発現を認め、過去に他の細胞で報告されている結果と同様であった。OA 軟骨における軟骨細胞集簇部では SIRT6 と PCNA はともに強く発現し SIRT6 の細胞増殖への関与が示唆された。また SIRT6 抑制により MMP-1, MMP-13 の発現が上昇し、細胞増殖能の低下や細胞老化の進行を認めた。さらに SIRT6 抑制により DNA 損傷やテロメア機能不全を引き起こし、細胞老化に関与する p16 の発現上昇を認めた。以上より SIRT6 はヒト軟骨細胞において DNA 損傷やテロメア機能不全、細胞老化を抑止的に制御する一因子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

本研究は、SIRT6 のヒト軟骨細胞における機能について研究したものであるが、これまでにヒト軟骨細胞における SIRT6 の発現や役割について検討した報告はなく、本研究が初めての報告である。SIRT6 が軟骨細胞における DNA 損傷やテロメア機能不全、細胞老化に関与し、ヒト軟骨細胞に対して保護的な役割を果たしている可能性が示された点で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。