

主論文要旨

論文提出者氏名：

小林 創

専攻分野：最新医学研究コース

コース：

指導教授：藤谷 博人

主論文の題目：

The Nicotinamide Adenine Dinucleotide(NAD)-Dependent Deacetylase Sirtuin-1 Regulates Chondrocyte Energy Metabolism through the Modulation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) in Osteoarthritis(OA).

(ニコチンアミドジヌクレオチド依存性脱アセチル化酵素であるサーチュイン 1 は変形性関節症において AMPK を通じて軟骨細胞のエネルギー代謝を調節する)

共著者：

Koh Terauchi , Naoko Yui , Kanaka Yatabe , Toshikazu Kamada,

Hiroto Fujiya , Hisateru Niki , Haruki Musha , Kazuo Yudoh

緒言

変形性関節症(Osteoarthritis; OA)は高齢化社会において急速に罹患人口が増加している運動器疾患である。膝OAの有病率は40歳以上の男性では42.6%、女性では62.4%と言われている。

近年、Nicotinamide Adenine Dinucleotide(NAD)依存性脱アセチル化酵素活性を持つSirtuin-1(Sirt-1)が長寿遺伝子関連蛋白として注目され、細胞エネルギー代謝を含む様々な細胞機能を制御していることが明らかになってきた。OAにおける軟骨変性には、軟骨細胞のエネルギー代謝の変化・破綻が関与し、軟骨組織の恒常性に影響することで病態が進行すると考えられている。そこで我々は、OAにおける軟骨細胞のエネルギー代謝についてSirt-1に焦点を当てて解析した。

方法・対象

変形性関節症に対して人工関節置換術施行時に採取した変性軟骨組織

(11 症例)から樹立した培養 2-3 継代目までの軟骨細胞を実験に用いた。各症例の軟骨組織由来の軟骨細胞を培養液のみ (C 群)、IL-1 β 刺激(10 ng/ml) (I 群)、Sirt-1 機能阻害薬添加 (S 群)、IL-1 β 刺激+Sirt-1 機能阻害薬添加 (IS 群) の4群に分けて、① Sirt-1 発現度、② 細胞エネルギー産生調節因子の 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) および adenosine triphosphate (ATP) 活性、③ 軟骨細胞活性の評価として軟骨基質 proteoglycan (PG) の合成能と軟骨基質分解酵素 MMP (matrix metalloprotease)-13 産生能を解析した。Sirt-1 は Western Blot 法、ATP はルシフェラーゼ蛍光法、AMPK、PG および MMP-13 は ELISA 法にて解析した。統計学的検討は Student's T 検定とし、有意水準を $P < 0.05$ とした。本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認(承認番号 1315 号)を得ておこなった。

結果

① 軟骨細胞の Sirt-1 発現: 4 群全ての培養条件下で OA 軟骨細胞(n=11)には Sirt-1 の発現が確認されたが、軟骨異化因子 IL-1 β 刺激によって Sirt-1 発現の抑制がみられた。

② 軟骨細胞の AMPK-ATP エネルギー代謝機構: 軟骨細胞の ATP 産生を調整する AMPK 活性および ATP 産生は、IL-1 β 刺激により有意に減少した ($P < 0.05$)。Sirt-1 機能阻害条件下に IL-1 β 刺激すると、AMPK 活性および ATP 産生は IL-1 β 刺激時よりもさらに減少がみられた。

③ 軟骨細胞活性: 軟骨細胞の MMP-13 産生能は IL-1 β 刺激により有意に上昇を認めたが ($P < 0.05$)、Sirt-1 機能抑制条件下ではその産生量は減少する事が確認され、MMP-13 産生能に Sirt-1 が関与することが示唆された。軟骨細胞の PG 産生能については4群間に有意な差は認めなかったが、IL-1 β 刺激により減少傾向がみられた。

考察

本研究において、軟骨変性誘導・異化因子として認められている IL-1 β 刺激は、軟骨細胞のエネルギーセンサーである AMPK 活性および Sirt-1 発現ならびに ATP 産生を抑制することが明らかとなった。さらに、IL-1 β 刺激下の AMPK 活性減少は、Sirt-1 機能抑制下において顕著であった事より、Sirt-1 が AMPK 活性を制御している可能性が示唆された。一方、AMPK 活性が Sirt-1 を活性化させるとの報告もあり、今後さらに AMPK と Sirt-1 の相互作用を検討する必要があるが、我々は、軟骨異化因子 IL-1 β によって、Sirt-1 発現および ATP 産生能を調整する AMPK 活性が抑制され、その結果として ATP 細胞エネルギー産生が低下すると考えている。

IL-1 β 刺激による軟骨細胞の ATP 産生低下時に、PG は低下する傾向がみられるも、MMP-13 産生は上昇していた。すなわち、IL-1 β 刺激により軟骨

細胞の ATP 産生能が低下し、PG 等の軟骨基質合成や MMPs 等の酵素合成のための細胞エネルギー代謝が低下しても、MMP-13 が増強する機構の存在が示唆された。一方、この MMP-13 増強も Sirt-1 機能阻害により抑制される傾向がみられた。我々はこれまでに、Sirt-1 抑制により MMP-13 の発現プロモーターRunx-related transcription factor 2 (Runx2)活性が低下し、その結果 MMP-13 産生が低下する機構を報告しており、Runx2 を介して Sirt-1 が MMP-13 産生を制御する機構があると考え、今後検討を進めていく。

結論

軟骨細胞において、軟骨変性誘導因子の IL-1 β は Sirt-1 を介して AMPK-ATP エネルギー代謝機構ならびに軟骨細胞活性に関与することが示唆された。今後、軟骨細胞のエネルギー代謝がより明確に判明すれば、OA の治療として AMPK や Sirt-1 がターゲットになる可能性があると考えられる。