

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：竹本 昌紘

専攻分野：整形外科学

指導教授：原口 直樹

主論文の題目：

Repetitive Compressive Loading Downregulates Mitochondria Function and Upregulates the Cartilage Matrix Degrading Enzyme MMP-13 Through the Coactivation of NAD-Dependent Sirtuin 1 and Runx2 in Osteoarthritic Chondrocytes

(反復荷重負荷は、変形性関節症の軟骨細胞において、NAD 依存性 Sirtuin 1 と Runx2 の共活性化を介して、ミトコンドリア機能を抑制し、軟骨マトリックス分解酵素 MMP-13 を増加させる)

共著者：

Yodo Sugishita, Yuki Takahashi-Suzuki, Hiroto Fujiya, Hisateru Niki, Kazuo Yudoh

緒言

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は、関節軟骨の変性、滑膜炎、骨棘形成、骨硬化を特徴とする進行性の変性疾患であり、関節痛や機能障害を引き起こし、患者の生活の質を著しく低下させる。日本では X 線上的変形を有する患者が 2500 万人以上存在し、そのうち約 1280 万人が実際に症状を呈しているとされ、今後も増加が予想されている。発症要因としては加齢、遺伝、性別、肥満、外傷、繰り返しの機械的負荷などが挙げられる。特に関節軟骨は無血管組織で修復能がほとんどないため、外的ストレスに対する細胞応答が軟骨変性進行に直結する。近年、OA の病因病態に関して、線維芽細胞様滑膜細胞や半月板細胞など関節内諸組織の変化も注目されているが、本研究では特に軟骨細胞の応答に焦点を当てた。

これまで、機械的負荷はミトコンドリア機能に影響を与え、ATP 産生の低下や活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 生成を介して細胞障害を引き起こすことが知られている。本研究では、軟骨細胞のミトコンドリア機能の調節因子である nicotinamide adenine dinucleotide

(NAD)およびその依存的脱アセチル化酵素 sirtuin 1 (Sirt1)、さらに転写因子 runt-related transcription factor 2 (Runx2)に着目した。Sirt1はNADを補酵素として活性化され、エネルギー代謝や細胞ストレス応答を制御する因子であり、またRunx2は軟骨細胞の肥大化やMMP-13産生促進に関与する。MMP-13は軟骨基質分解酵素としてOA進展に深く関与することが示されており、軟骨細胞におけるSirt1-Runx2-MMP-13経路が反復性力学的ストレスによって、どのように変化するかを明らかにすることが本研究の目的である。

方法・対象

人工膝関節置換術を受けたOA患者 (Kellgren-Lawrence grade 3、女性5例、60～73歳)の膝関節非荷重部から採取した軟骨組織をコラゲナーゼ処理して軟骨細胞を単離した。培養軟骨細胞をコラーゲンスポンジに播種して三次元 (3D) 細胞-コラーゲンスキャフォールドを作製し、3D培養系を確立した。反復荷重負荷は、カスタムメイド装置を用いて2.5 kPa (25.5 gf/cm²)の強度で15分、60分、180分間行った。非荷重負荷群を対照とし、各群で細胞増殖能、細胞膜損傷 (LDH アッセイ)、走査電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 観察、MMP-13産生、Sirt1およびRunx2発現 (ウェスタンブロット)、細胞内NAD濃度、ATP産生能を測定した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (承認1315号)の承認を得たものである。統計解析はANOVAまたはKruskal-Wallis検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

細胞生存性・細胞膜障害性に関して反復荷重負荷は細胞数や生存率に有意差を与えなかったが、細胞膜損傷は対照群より有意に増加した ($P < 0.05$)。SEM像では、負荷群で細胞表面の突起や微小顆粒が減少し、膜損傷が示唆された。

MMP-13産生は反復荷重負荷群ではMMP-13産生が有意に増加し ($P < 0.05$)、特に180分負荷群で顕著であった。

Sirt1発現は15分間の反復荷重負荷では変化が小さいものの、60分負荷で有意に発現が増加した ($P < 0.05$)。

Runx2発現も同様に60分・反復荷重負荷群で有意な発現上昇がみられた。

NAD濃度は60分・反復荷重負荷群では有意に低下し ($P < 0.05$)、Sirt1活性化に伴う消費が示唆された。

ATP産生は60分・反復荷重負荷群において有意に低下し ($P < 0.05$)、NAD減少とミトコンドリア機能低下が示唆された。

考察

本研究により、反復荷重刺激は Sirt1-Runx2 経路を活性化し、MMP-13 産生を促進すると同時に、ミトコンドリア内 NAD 消費増大の結果、ATP 産生は抑制されることが明らかとなった。これらの変化は、軟骨細胞の代謝恒常性の低下を誘導し、OA 進展に関与する可能性があると考ええる。

従来、生理的レベルであれば連続的な荷重負荷は、軟骨細胞活性に影響は少ないとされてきたが本研究結果から反復荷重負荷は OA 発症の一因となることが示唆された。この知見は、日常生活動作や職業的な反復動作による軟骨障害のメカニズムを解明する糸口になると考える。

また、ミトコンドリアは ATP 産生と ROS 生成の両面で関与するため、ストレス下では ROS 増加とエネルギー不足が相乗的に軟骨細胞活性を障害する可能性がある。Sirt1 は一般に抗老化因子として知られるが、本研究では軟骨細胞における Sirt1 の過剰活性化は Runx2 誘導および MMP-13 増加を誘導し、OA 進行に関与すると考える。

臨床的には、NAD-Sirt1 経路を標的とした治療戦略（NAD 補充療法、Sirt1 阻害剤）が OA 進行抑制に有望であると考えられる。ただし、本研究は *in vitro* 解析であり、関節内他組織（滑膜、半月板、脂肪体など）への影響や *in vivo* での検証が必要である。

結論

OA 軟骨細胞において、反復荷重負荷は① Sirt1-Runx2 経路の活性化、②MMP-13 産生の亢進、③ NAD 消費と ATP 産生低下によるミトコンドリア機能障害を引き起こすことが示された。これらの分子経路は、反復性の機械的ストレスが OA 進行に関与する中心的機序であると考えられる。本研究は、OA 治療の新たな分子標的として「ミトコンドリア NAD-Sirt1 経路」の重要性を明確にし、今後の臨床応用への基盤を提供するものである。