

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10406

研究課題名(和文) 椎間板変性に対する薬物治療へのアプローチ

研究課題名(英文) The approach of molecular treatments for the intervertebral disc degeneration.

研究代表者

前野 耕一郎 (Maeno, Koichiro)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70403269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト椎間板髄核細胞にmTOR、Raptor、RictorのsiRNAを導入すると、全群でオートファジー活性が増加した。一方、RaptorのsiRNA導入群は他群に比べアポトーシスおよびセネッセンスに関連する酵素の発現が抑制されていた。Raptorの選択的な機能抑制がオートファジーの誘導とアポトーシス・老化・基質分解の抑制を来していると考えられた。実際に臨床で使用可能なmTOR阻害薬を使用してヒト椎間板髄核細胞への影響を検討したところ、多くに椎間板保護作用を認めたと、特にテムシロリムスは他剤に比べて親水性が高く、臨床上の投与方法にも利点があるため椎間板変性治療薬としての有用性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：mTORC1 suppression through RNAi for Raptor showed protective effects against human NP cell apoptosis, senescence, and matrix degradation. This study suggests that selective inhibition for mTORC1 but not mTORC2 is beneficial to human NP cells, which depends on Akt as well as autophagy induction. Thus, Raptor is a potent target for new molecular treatments for human degenerative disc disease. And also, in our results, the first generation mTOR inhibitors suppressed mTOR signaling, induced autophagy and Akt, and showed protective effects against human disc NP cell apoptosis and senescence. In clinical use, adverse immunosuppression of mTOR inhibitors would recommend its local intra-discal injection rather than its systemic administration. To accomplish successful local delivery of agents, water solubility is a key factor. Therefore, intra-discal injection of temsirolimus that has improved water solubility is a potential therapeutic application to human degenerative disc disease.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板 mTOR Raptor siRNA アポトーシス オートファジー セネッセンス mTORC1阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛の主要因である脊椎疾患は椎間板の変性に起因する所が大きい。しかしながら椎間板変性の治療は確立されておらず、現状では鎮痛剤などの投薬治療に加え、椎間板を切除して固定するなどの、本来の椎間板の機能を犠牲にした外科的治療に頼らざるを得ない。このように治療の難しい椎間板変性に対しては、まずその変性のメカニズムを理解することが重要であるが、これまでに様々な研究が行われているものの、いまだ詳細なメカニズムについては明らかにされていない。このような中で我々は、細胞の持つ細胞内恒常性維持機構であるオートファジーと、セリン・スレオニンキナーゼの一つである mTOR (mammalian target of rapamycin) と呼ばれる酵素に注目した。オートファジーはストレス下で自己の余剰蛋白や老廃物を分解・再利用することによって、細胞の生存を促す機構のことである(1)。また mTOR は名前の由来の通り、ラパマイシン標的の蛋白質として発見され、2種類の分子複合体(mTORC1 および mTORC2)を形成することが知られている(2)。mTORC1 では Raptor、mTORC2 では Rictor と呼ばれる mTOR 結合蛋白質がそれぞれ同定されており、mTOR はこれらの蛋白質と結合することで細胞・組織の成長に作用する酵素として働く一方、オートファジーを抑制的に制御することが知られている(3)。これらの学術的背景から我々は、椎間板変性に mTOR を介したオートファジーの抑制が関与しているのではないかと考えた。すなわち、mTOR 経路の制御を行うことでオートファジーの活性化が引き起こされると、細胞自身の清浄力・治療力が高められて椎間板の恒常性を維持し、結果的に椎間板変性の進行を抑制するのではないかという仮説を立てた。これが本研究開始当初の背景となっている。

## 2. 研究の目的

上記背景を基盤とし、腰痛の主要因の一つといわれる椎間板の変性には mTOR 経路を介したオートファジーの制御が大きく関与しているという仮説を立証するとともに、将来的な椎間板変性に対する治療アプローチの模索を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

in vitro の実験において椎間板髄核細胞と mTOR を介したオートファジーとの関係を証明するために、ヒト椎間板髄核細胞の不活化細胞株に mTOR・Raptor・Rictor に対する siRNA をリポフェクション法で導入し、ウェスタンブロット(以下、WB)法でオートファジー必須因子の ATG5、オートファジーマーカー LC3 と基質 p62/SQSTM1 の動向を検討した。さらに IL-1 による細胞刺激下に、細胞死(アポトーシス)や細胞老化(セネッセンス)細胞外基質分解に関する遺伝子の評価を TUNEL 染色、WB 法、定量 PCR で検討した。

さらに実際の椎間板髄核細胞ならびに椎間板線維輪細胞とオートファジーの関係

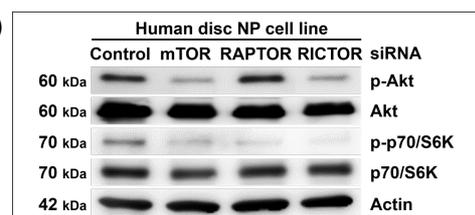
を証明すべく、腰椎変性疾患に対する後方侵入椎体間固定術で得られたヒト椎間板髄核・線維輪組織より蛋白を抽出し、ATG5、LC3-II と p62/SQSTM1 の発現を WB で検討するとともに、ヒト椎間板髄核細胞へ ATG5 siRNA を導入した上で、細胞生存率を CCK-8 法で検討した。また IL-1 刺激による細胞アポトーシス・セネッセンスの誘導についても WB で検討した。

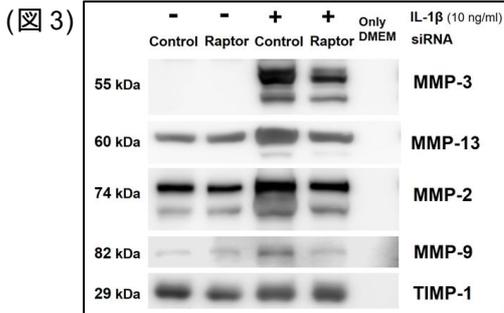
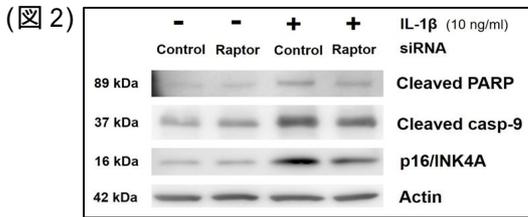
以上の結果を踏まえ、実際に臨床で使用可能な mTOR 阻害薬であるラパマイシン(Rap)、テムシロリムス(Tem)、エベロリムス(Eve)、クルクミン(Cur)を使用してヒト椎間板髄核細胞への影響を検討した。と同様に手術で得られた椎間板髄核の初代培養細胞に Rap, Tem, Eve, Cur の 4 剤を加え、1)CCK8 による細胞生存率の評価、2)WB による mTOR、Akt、P70/S6K の発現量とリン酸化を評価、3)オートファジーの評価として WB による LC3-II および p62/SQSTM1 の発現量の評価、4)さらに IL-1 刺激下での 4 剤投与において細胞アポトーシス(PARP、Cleaved PARP、Cleaved caspase-9 の発現量)、セネッセンス(p16/INK4A の発現量)、細胞外基質分解(MMP2・3・9・13、TIMP-1、TIMP-2 の発現量)を評価した。

## 4. 研究成果

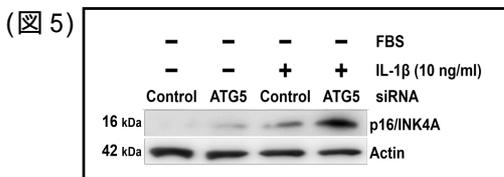
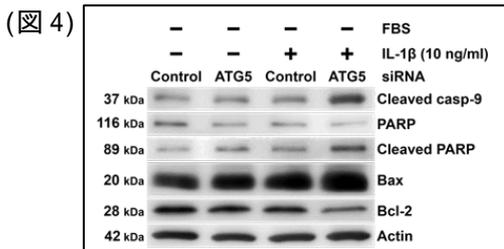
まず、ヒト椎間板髄核細胞不活化細胞株に導入した各 siRNA が標的蛋白の発現を特異的に抑制することを確認した(mTOR 56%, Raptor 63%, Rictor 53%)。また、これらの siRNA 導入後には全群で p70/S6K のリン酸化が減少し、さらに LC3 と p62/SQSTM1 で観察したオートファジー活性も全群で増加することが明らかとなった。一方、Akt のリン酸化は mTOR・Rictor の siRNA 導入群で減少していて、mTORC2 以下の遺伝子シグナルを広範に抑制することが示唆されたものの、Raptor の siRNA 導入群では Akt のリン酸化がむしろ増加していた(図1)。さらに IL-1 による細胞刺激を加えると、Raptor の siRNA 導入群ではコントロール群を比べ、TUNEL 陽性細胞の増加を有意に抑制するとともに、アポトーシスに関する cleaved PARP、caspase-9、セネッセンスに関する p16/INK4A、細胞外基質分解酵素である MMP-2、-3、-13、ADAMTS-4 の発現がいずれも抑制されていた(図2,3)。以上より、Raptor の選択的な機能抑制が Akt を活性化させつつ mTORC1 のみを抑制することでオートファジーの誘導とアポトーシス・老化・基質分解の抑制を来すことが示された。

(図1)

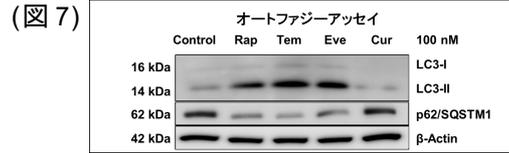
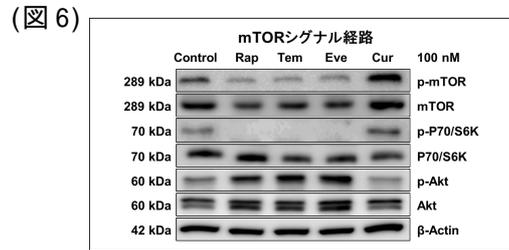




ヒト椎間板髄核細胞においては経時的な LC3-II の増大と p62/SQSTM1 の減少を示し、オートファジーの亢進を認めた。また ATG5 の RNA 干渉による ATG5 抑制群では細胞生存率が有意に低下していた。さらに ATG5 抑制群は IL-1 刺激下でアポトーシス促進因子である Bax、cleaved caspase-9、cleaved PARP、セネッセンスマーカー p16/INK4A の増大と、抗アポトーシス因子 Bcl-2 の減少を示し(図 4,5)、ATG5 を抑制することで、細胞アポトーシスとセネッセンスがともに亢進することが示された。これにより、これまで明らかにされていなかったヒト椎間板組織や細胞におけるオートファジーの関与が示された。



Rap, Tem, Eve の 3 剤の投与により mTOR シグナル経路の抑制ならびにオートファジー活性と Akt のリン酸化亢進を認め(図 6,7) ヒト椎間板髄核細胞での強力な保護作用が示された。一方、Cur 投与群ではオートファジー活性や Akt のリン酸化はコントロール群とほぼ同等であった。以上より Rap, Tem, Eve の 3 剤では椎間板髄核細胞への保護作用が期待できるが、特に Tem は他の 2 剤に比べて親水性が高く、临床上の投与方法に利点があるため、椎間板変性治療薬として有用ではないかと考えられた。



#### <引用文献>

- (1) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. Tang D, et al., J Cell Biol 2010;190(5):881-92.
- (2) Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. Cafferkey R et al., Mol Cell Biol. 1993 Oct; 13(10):6012-23.
- (3) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Zoncu R et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2011;12(1):21-35.

#### 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 1 件)

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kakiuchi Y, Takeoka Y, Miyazaki S, Kuroda R, Nishida K.

Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction. Osteoarthritis Cartilage 25(12):2134-2146, 2017.

doi: 10.1016/j.joca.2017.08.019. Epub 2017 Sep 6.

[学会発表](計 16 件)

伊藤 雅明, 由留部 崇, 角谷 賢一朗, 前野 耕一郎, 高田 徹, 宮崎 真吾, 寺嶋 良樹, 黒坂 昌弘, 西田 康太郎. mTOR シグナル経路への干渉は椎間板における細胞死、老化と変性を抑制する。第 30 回 日本整形外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 22-23 日、富山

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Miyazaki S, Terashima Y, Kakiuchi Y, Kurosaka M, Nishida K. Selective Interference of mTOR

Signaling is Protective Against Human Disc Cellular Apoptosis, Senescence, and Extracellular Matrix Degradation with Autophagy Induction. The 62<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 5-8, 2016, Orland, Florida

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Miyazaki S, Terashima Y, Kakiuchi Y, Kurosaka M, Nishida K.

Selective Interference of mTOR Signaling is Protective Against Human Disc Cellular Apoptosis, Senescence, and Extracellular Matrix Degradation with Autophagy Induction. The 43<sup>th</sup> Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine, May 16-20, 2016, Singapore

伊藤 雅明、由留部 崇、角谷 賢一朗、前野 耕一郎、高田 徹、宮崎 真吾、寺嶋 良樹、垣内 裕司、黒坂 昌弘、西田 康太郎。mTOR シグナル経路への選択的な干渉は Akt の活性化およびオートファジーを誘導し、ヒト椎間板における細胞死、老化と細胞外基質分解を抑制する。第 45 回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2016 年 4 月 14-16 日、千葉

伊藤 雅明、由留部 崇、角谷 賢一朗、前野 耕一郎、高田 徹、寺嶋 良樹、垣内 裕司、武岡 由樹、黒田 良祐、西田 康太郎。mTOR シグナル経路への選択的な干渉はオートファジーと Akt の活性化を誘導し、ヒト椎間板細胞における細胞死、細胞老化と細胞外基質分解を抑制する : 椎間板遺伝子治療の可能性。第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 13-14 日、福岡

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kakiuchi Y, Takeoka Y, Kuroda R, Nishida K. Inhibition of autophagy through ATG5 knock down induces apoptosis and senescence in human intervertebral disc cells. The 8<sup>th</sup> Annual Meeting of Cervical Spine Research Society -Asia Pacific Section-, March 9-11, 2017 Kobe, Japan

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kakiuchi Y, Takeoka Y, Kuroda R, Nishida K.

Inhibition of Autophagy Through ATG5 Knock Down Induces Apoptosis and Senescence, Resulting in Reduced Cellularity, in Human Intervertebral Disc Cells. The 63<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 19-22, 2017, San Diego, California

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kakiuchi Y, Takeoka Y, Kuroda R, Nishida K.

Selective mTORC1 Inhibition Through RNA Interference for RAPTOR is Protective against Human Intervertebral Disc Cellular Apoptosis, Senescence, and Extracellular Matrix Degradation with Akt and Autophagy Induction. The 63<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 19-22, 2017, San Diego, California

伊藤 雅明、由留部 崇、角谷 賢一朗、前野 耕一郎、高田 徹、宮崎 真吾、寺嶋 良樹、垣内 裕司、黒坂 昌弘、西田 康太郎。mTOR シグナル経路への選択的な干渉は Akt の活性化およびオートファジーを誘導し、ヒト椎間板における細胞死、老化と細胞外基質分解を抑制する。第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2017 年 4 月 14-16 日、千葉

伊藤 雅明、由留部 崇、角谷 賢一朗、前野 耕一郎、高田 徹、寺嶋 良樹、垣内 裕司、武岡 由樹、黒田 良祐、西田 康太郎。ATG5 のノックダウンによるオートファジーの抑制はヒト椎間板細胞のアポトーシスとセネッセンスを誘導し、細胞数を減少させる。第 46 回日本脊椎脊髄病学会、2017 年 4 月 13-15 日、札幌

垣内 裕司、由留部 崇、角谷 賢一朗、前野 耕一郎、高田 徹、寺嶋 良樹、伊藤 雅明、武岡 由樹、黒田 良祐、西田 康太郎。ヒト椎間板髄核傍における mTOR 阻害薬の細胞死、細胞老化、細胞外基質分解抑制効果の比較。第 46 回日本脊椎脊髄病学会、2017 年 4 月 13-15 日、札幌

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kakiuchi Y, Takeoka Y, Kuroda R, Nishida K.

Inhibition of autophagy through ATG5 knock down induces apoptosis and senescence in human intervertebral disc cells. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine, May 29-June 2, 2017, Athens, Greece

Kakiuchi Y, Yurube T, Takeoka Y, Ito M, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kuroda R, Nishida K.

Temsirolimus is a candidate of the optimal mTOR inhibitor for protecting human intervertebral disc nucleus pulposus cells. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine, May 29-June 2, 2017, Athens, Greece

垣内 裕司、由留部 崇、角谷 賢一朗、前野 耕一郎、高田 徹、寺嶋 良樹、伊藤 雅明、武岡 由樹、黒田 良祐、西田 康太郎。mTORC1 阻害薬テムシロリムスはヒト椎間板髄核細胞において細胞死、細胞老化、細胞外基質分解を抑制する。第 36 回運動器移植

再生医学研究会、2017年9月29-30日、京都

伊藤雅明、由留部崇、角谷賢一郎、前野耕一郎、高田徹、寺嶋良樹、垣内裕司、武岡由樹、土井田稔、黒田良祐、西田康太郎。オートファジーの抑制はヒト椎間板細胞においてアポトーシス、セネッセンスを誘導し、細胞数を減少させる。第32回日本整形外科学会基礎学術集会、2017年10月26-27日、那覇  
垣内裕司、由留部崇、角谷賢一郎、前野耕一郎、高田徹、寺嶋良樹、伊藤雅明、武岡由樹、土井田稔、黒田良祐、西田康太郎。mTORC1阻害薬テムシロリスムはヒト椎間板髄核細胞において細胞死、細胞老化、細胞外基質分解を抑制する。第32回日本整形外科学会基礎学術集会、2017年10月26-27日、那覇

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前野 耕一郎 (Koichiro, Maeno)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：70403269

### (2) 研究分担者

西田 康太郎 (Kotaro Nishida)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00379372

角谷 賢一郎 (Kenichiro Kakutani)  
神戸大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10533739

由留部 崇 (Takashi Yurube)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10514648

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

宮崎 真吾 (Shingo Miyazaki)  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

寺嶋 良樹 (Yoshiki Terashima)  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

伊藤 雅明 (Masaaki Ito)  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

武岡 由樹 (Yoshiki Takeoka)  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

垣内 裕司 (Yuji Kakiuti)  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生