

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2006～2008

課題番号：17591556

研究課題名（和文）

RNAi 法を利用した変性促進遺伝子を抑制する椎間板細胞移植治療法の開発

研究課題名（英文）

Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration

研究代表者

川口 善治 (YOSHIHARU KAWAGUCHI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：00262527

研究成果の概要：椎間板変性抑制が腰痛対策として有効な手段になりうると考え、実験を行った。椎間板が有する shock absorber としての働きには高い含水性を持つアグリカンを中心とした、プロテオグリカンが大きな役割を果たしている。アグリカンは特定の部位で Matrix Metalloproteinase や ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeat) ファミリーに属するいくつかのメタロプロテアーゼにより切断される。以上より、変性椎間板に発現している *adamts5* 遺伝子を siRNA (small interfering RNA) を用いて knock down することにより、椎間板変性を抑制させることが可能か否かを検討した。研究の方法として、in vitro と in vivo 研究を行った。in vitro 研究は家兔髄核細胞を用いて、*adamts5* 遺伝子を knock down するために、siRNA を作成し、単層培養の髄核細胞にトランスフェクションし、real-time PCR 法を用いて *adamts5* 遺伝子の knock down 率を検討した。その結果、アルジネートビーズ培養下で、*adamts5* siRNA が取り込まれることが分かった。*adamts5* の knock down が可能であることを検討したところ、コントロール siRNA に比べて *adamts5* siRNA は約 70% の knock down 率を示した。in vivo 研究では、家兔椎間板変性モデル (puncture model) を椎間板を 18G 針にて穿刺し作成し、無穿刺対照群と比較検討した。*adamts5* siRNA 投与群と control siRNA 群を作成し、2 週間毎に単純 X 線像で椎間板高を測定した。注入後 8 週間経過観察し、屠殺後 MRI および組織学的検討を行った。MRI は T2 像の輝度を 4 段階に分類しスコア化することにより評価した。組織は、椎間板組織の正中矢状断面をサフラニン-O、およびヘマトキシリンにて染色し、組織評価スコアによって評価した。結果は、椎間板高には変化を認めなかったものの、*adamts5* siRNA を投与した群では髄核部の輝度が、コントロール siRNA よりも有意に高く、高い水分含量を反映していた。組織学的なスコアでも *adamts5* siRNA 投与群で有意な変性の抑制が認められた。以上より、椎間板髄核変性において、*adamts5* は主要な役割を果たしていると考えられ、*adamts5* siRNA を用いることにより椎間板変性を抑制し、腰痛を予防できる可能性があることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	800,000	0	800,000
2007 年度	400,000	120,000	520,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	270,000	1,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：(1) 腰椎椎間板ヘルニア (2) 椎間板内治療 (3) siRNA (4) *adamts5*

1. 研究開始当初の背景

腰痛の生涯罹患率は高く、全人口の 75～80%に達するといわれている。腰痛は若年者や成壮年層にも多くみられることから腰痛による労働生産性の低下も問題とされ、社会的損失も大きいことが指摘されている。腰痛の原因は様々であるが、腰椎椎間板変性が主要因としてあげられる。椎間板変性は 20 歳代という若年層より発症することが解っており、椎間板ヘルニアなどの椎間板疾患の原因となる。

かかる観点より椎間板変性抑制が腰痛対策として有効な手段になりうると考えた。

椎間板は加齢やさまざまな原因により変性を起こし、その結果 shock absorber としての機能が低下する。その shock absorber としての働きには高い含水性を持つアグリカンを中心とした、プロテオグリカンが大きな役割を果たしている。アグリカンは特定の部位で Matrix Metalloproteinase や ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeat) ファミリーに属するいくつかのメタロプロテアーゼにより切断される。そこで我々は変性椎間板に発現している *adamts5* 遺伝子を siRNA (small interfering RNA) を用いて knock down することにより、椎間板変性を抑制させることを試みた。

2. 研究の目的

本研究は、*adamts5* の椎間板変性抑制効果を検討し、椎間板変性治療への応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

siRNA の作成：家兔髄核細胞を用いて、*adamts5* 遺伝子を knock down するために、siRNA を作成した。

in vitro における評価：作成したオリゴ siRNA を用いて、単層培養の髄核細胞にトランスフェクション (Trans it TKO、Takara) し、real-time PCR法を用いて *adamts5* 遺伝子の knock down 率を検討した。同時に *adamts5* の発現量を検討した。続いて椎間板変性の環境下を念頭において、家兔髄核細胞を IL-1 β 投与下に同様に培養し、*adamts5* の発現の上昇と、siRNA による knock down の程度を検討した。さらに siRNA トランスフェクションを家兔髄核細胞のアルジネートビーズ培養でも解析し、*adamts5* が knock down できるかを検討した。アルジネートビーズ培養下、および家兔椎間板変性モデルに投与する実験に関しては、*in vivo* でより安定性が高い siSTABLE *adamts5* siRNA (Dharmacon) を導入補助剤を用いずに使用した。

in vivo における評価：家兔椎間板変性モデル (puncture model) として、椎間板 (L2/3、

L4/5) を 18G 針にて穿刺して椎間板変性を惹起し、L3/4 は無穿刺対照群とした。*adamts5* siRNA 投与群 (n=8, 椎間板数 16, 各椎間板に 10 μ g/ μ l の濃度で 10 μ l 投与) と control siRNA 群 (n=8, 椎間板数 16, 各椎間板に 10 μ g/ μ l の濃度で 10 μ l 投与) を作成し、2 週間毎に単純 X 線像で椎間板高を測定した。注入後 8 週間経過観察し、屠殺後 MRI および組織学的検討を行った。MRI は T2 像の輝度を 4 段階に分類しスコア化 (modified Thompson classification) することにより評価した。組織は、椎間板組織の正中矢状断面をサフラン-O、およびヘマトキシリンにて染色し、組織評価スコアによって評価した。

4. 研究成果

in vitro における評価

1) siRNA オリゴの評価

作成した siRNA (control, *adamts5*) それぞれを髄核細胞に導入して knock down 率を検討すると、コントロール siRNA に比べて約 70% の knock down を認めた。この knock down 効果は 1 週間以上持続することを確認した。

2) IL-1 β 刺激下での siRNA の評価

家兔髄核細胞への IL-1 β 添加により、*adamts5* の発現は有意に上昇し、10ng/ml でピークに達した。IL-1 β 10ng/ml 存在下で、*adamts5* siRNA をトランスフェクションすると、この状況下でも、コントロール siRNA と比べて 80% の knock down が可能であった。

3) アルジネートビーズ培養下での *adamts5* knock down

アルジネートビーズ培養下で、*adamts5* siRNA が取り込まれ *adamts5* の knock down が可能であるかを検討したところ、コントロール siRNA に比べて *adamts5* siRNA は約 70% の knock down 率を示した。

in vitro における評価

1) レントゲンによる椎間板高の変化

コントロール siRNA 群、*adamts5* siRNA 群における椎間板高は、注入後の 8 週までの観察で、統計学的な有意差は認めなかった。

2) MRI を用いた評価

adamts5 siRNA を投与した群では、L2/3、L4/5 において髄核部の輝度が、コントロール siRNA よりも有意に高く、高い水分含量を反映しており、椎間板変性が抑制されたと考えられた ($p = 0.02$)。

3) 組織学的評価

注入 8 週後のコントロール siRNA の組織像では、穿刺により髄核細胞の減少、細胞外マトリックスの減少が認められた。一方、*adamts5* siRNA 投与群では、髄核細胞の減少が軽微であり、またマトリックスの変性も抑制されていた。線維輪と髄核との境界領域においても、変性抑制が認められた。組織学

的なスコアでも *adamts5* siRNA 投与群で有意な変性の抑制が認められた ($p = 0.03$)。

結語

椎間板髄核変性において、*adamts5* は主要な役割を果たしていると考えられた。*adamts5* siRNA を用いることにより椎間板変性を抑制し、腰痛を予防できる可能性があることがわかった。

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]

主要論文については作成中である。

(研究に関連する報告 計 13 件)

- 1) Song Y-Q, Cheung KMC, Ho DWH, Poon SCS, Chiba K, Kawaguchi Y, Hirose Y, Alini M, Grad S, Ye AFY, Leong JCY, Luk KDK, Yip S-P, Karppinen J, Cheah KSE, Sham P, Ikegawa S, Chan, D. Association of the Asporin D14 allele with lumbar disc degeneration in Asians. *Am J Hum Genet* 2008;82:744-7.
- 2) Hirose Y, Chiba K, Karasugi T, Nakajima M, Kawaguchi Y, Mikami Y, Furuichi T, Mio F, Miyake A, Miyamoto T, Ozaki K, Takahashi A, Mizuta H, Kubo T, Kimura T, Tanaka T, Toyama Y, Ikegawa S. A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *Am J Hum Genet* 2008;82:1122-9.
- 3) Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, Mori M, Kamata M, Matsumoto M, Ozaki K, Tanaka T, Takahashi A, Kubo T, Kimura T, Toyama Y, Ikegawa S. A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet* 2007;81:1271-7.
- 4) Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet* 2006;119:611-616.
- 5) Seki S, Kawaguchi Y, Mori M, Mio F, Chiba K, Mikami Y, Tsunoda T, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Ikegawa S. Association study of COL9A2 with lumbar disc disease in the Japanese population. *J Hum Genet* 2006;51:1063-1067.
- 6) Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, Mio F, Mori M, Miyamoto Y,

Masuda I, Tsunoda T, Kamata M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nature Genet* 2005;37:607-612.

7) 関 庄二, 川口善治, 木村友厚: 腰椎椎間板ヘルニアの発症メカニズム. *関節外科* 27: 212-220, 2008

8) 川口善治, 関 庄二, 阿部由美子, 木村友厚: 遺伝子学的手法を用いた腰痛へのアプローチ. 特集/腰痛の基礎研究, *日本腰痛会誌* 14:70-75, 2008

9) 関 庄二, 川口善治, 木村友厚: 腰椎椎間板ヘルニアの発症メカニズム—CILP1395T の TGF- β 1 作用抑制を介する細胞外マトリックス発現抑制の相違—, *骨・関節・靭帯、アークメディア* 20:213-223, 2007

10) 関 庄二, 川口善治, 木村友厚: 腰椎椎間板ヘルニア関連遺伝子—CILP 臨整外 42:698-703, 2007

11) 川口善治, 関 庄二, 木村友厚: 特集: 腰痛治療—新たなアプローチ—基礎研究、2) 遺伝子による腰痛の解析. 真興交易(株) 医書出版部「ペインクリニック」28:17-23, 2007

12) 関 庄二, 川口善治, 木村友厚: 腰椎椎間板ヘルニアの原因遺伝子同定. *整形外科* 56:1456, 2005

13) 川口善治, 関 庄二, 阿部由美子, 金森昌彦, 石原裕和, 信清正典, 杉森一仁, 木村友厚: 腰椎椎間板疾患の素因に関わる遺伝子解析. シンポジウム 椎間板変性の分子メカニズムから治療. *日整会誌* 78:918-922, 2004.

[学会発表] (計 10 件)

椎間板関連学会報告

1) 三尾太, 千葉一裕, 松本守雄, 川口善治, 三上靖夫, 関庄二, 森正樹, 高畑武司, 小柳貴裕, 鎌田修博, 福井康之, 河野亨, 河野仁, 久保俊一, 木村友厚, 戸山芳昭, 池川志郎: 腰椎椎間板ヘルニアの原因遺伝子 COL11A1. 第 21 回日本軟骨代謝学会. 2008, 3, 21-22, 京都.

2) 三尾太, 千葉一裕, 廣瀬裕一郎, 川口善治, 三上靖夫, 関庄二, 森正樹, 高畑武司, 小柳貴裕, 鎌田修博, 福井康之, 河野亨, 河野仁, 河野克己, 石川雅之, 田村睦弘, 久保俊一, 木村友厚, 松本守雄, 戸山芳昭, 池川志郎: 腰椎椎間板ヘルニアの感受性遺伝子—発症のメカニズム—. 第 37 回日本脊椎脊髄病学会, 2008, 4, 24-26, 東京

3) 川口善治, 関庄二, 千葉一裕, 三上靖夫, 木村友厚, 池川志郎: 腰椎椎間板ヘルニアおよび腰痛に対する遺伝子学的アプローチ. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008,

10, 23-24, 京都

4) 関庄二, 阿部由美子, 川口善治, 浅沼邦洋, 舛田浩一, 木村友厚: adamts5 遺伝子ノックダウンにおける椎間板変性抑制効果. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008, 10, 23-24, 京都

5) Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Mio F, Mori M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Ikegawa S. A functional SNP in cartilage intermediate layer protein (CILP) is associated with susceptibility to lumbar disc disease. World spine forum, Kyoto, 1 23-26, 2008

6) Kawaguchi Y: Overview of current methods for diagnosis of disc degeneration and low back pain. World spine forum, Kyoto, 1 23-26, 2008

7) Seki S., Abe Y., Kawaguchi Y., Asanuma K., Masuda K., Kimura T.: Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle puncture model. ISSLS, 2008, 6, Geneva, Switzerland

8) 関庄二, 川口善治, 千葉一裕, 三上靖夫, 尾矢剛志, 三尾太, 森正樹, 益田郁子, 鎌田修博, 久保俊一, 戸山芳昭, 木村友厚, 池川志郎: 腰椎椎間板ヘルニアの遺伝子解析. 第79回日本整形外科学会学術集会, 2006, 4, 東京.

9) Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Mio F, Mori M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Ikegawa S: CILP I395T is associated with susceptibility to lumbar disc disease. 33rd annual meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2006, 6, Bergen, Norway

10) 川口善治, 関庄二, 千葉一裕, 三上靖夫, 木村友厚, 池川志郎: 腰椎椎間板ヘルニアにおける疾患感受性遺伝子の同定. 日本整形外科基礎学会(シンポジウム), 2006, 10, 長崎

・助教

研究者番号: 00432112

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 善治 (KAWAGUCHI YOSHIHARU)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号: 00262527

(2) 研究分担者

長田 龍介(OSADA RYUSUKE)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号: 40293310

(3) 連携研究者

関 庄二(SEKI SHOJI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)