

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10924

研究課題名(和文) ADAMTS10によるフィブリリン生合成促進を介した新規椎間板変性治療法の確立

研究課題名(英文) Possible novel therapy of degenerated intervertebral disc by ADAMTS10

研究代表者

谷口 優樹 (Taniguchi, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80722165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではADAMTS10とともにWeill-Marchesani症候群(WMS)の原因遺伝子として知られているADAMTS17遺伝子の機能の解析に焦点を絞った。Adamts17のノックアウトマウスの作出に成功し、その表現型の解析を通して、Adamts17ノックアウトマウスが、WMSの表現型を呈すること、主に肥大軟骨細胞層の短縮を伴う成長障害を呈すること、成長軟骨板で細胞外のフィブリリンと2の増加を呈すること、成長軟骨板肥大層でのBMPシグナルの低下が生じていること、を見出し、論文として発表した。脊柱および椎間板については引き続き解析中であり、論文投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では遺伝子改変マウスの解析を通じてADAMTS17遺伝子の機能の解析をすることに成功した。当初目的とした椎間板での機能の解析や変性椎間板の治療効果というところまでは解析を進めることができなかったが、ノックアウトマウスの作出に成功し、また本遺伝子の軟骨内骨化過程における分子生物学的な機能を解明できた利点は大きい。現在同様のストラテジーで椎間板における機能解析を継続して行っており、新たな知見が得られつつある。本研究により椎間板変性における新たな機序が明らかになることが期待され、今後の創薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we mainly investigated the function of Adamts17, which is known to be a causative gene for Weill-Marchesani syndrome (WMS), as well as Adamts10. Thorough analysis of Adamts17<sup>-/-</sup> mice, we identified those facts: a) Adamts17<sup>-/-</sup> mice recapitulated WMS with shorter long bones, brachydactyly, and thick skin, b) the hypertrophic zone of the growth plate in Adamts17<sup>-/-</sup> mice was shortened with enhanced extracellular fibrillin-2 deposition, and c) BMP signaling is decreased in the terminal differentiation of the chondrocytes in limb cartilage in Adamts17<sup>-/-</sup> mice. Our data indicated that Adamts17 is involved in skeletal formation by modulating BMP-Smad1/5/8 pathway, possibly through inhibiting the incorporation of fibrillin-2 into microfibrils. These results were published as a peer-reviewed article. Now we are analyzing the phenotype of the intervertebral disc of Adamts17<sup>-/-</sup> mice and analyzing the function of ADAMTS17 in intervertebral disc.

研究分野：脊椎外科

キーワード：ADAMTS10 ADAMTS17 成長障害 フィブリリン 椎間板

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 椎間板変性に起因する変形性脊椎症はロコモティブシンドロームの中核をなす疾患のひとつであり、その克服は健康寿命の伸延や医療経済学的な観点からも喫緊の課題といえる。しかしながら椎間板変性の克服はおろか、その基盤となる椎間板変性の分子生物学的な機序も不明な点が非常に多く治療標的もまだ明らかになっていない現状がある。

(2) 我々は椎間板変性の治療ターゲットのひとつとしてフィブリリン1タンパクに着目した。フィブリリン1タンパクは細胞外基質を形成する成分のひとつで、同タンパクをコードする遺伝子である Fbn1 遺伝子はマルファン症候群の原因遺伝子であることが知られている。我々はこれまでに Fbn1 遺伝子の変異によるマルファン症候群症例では椎間板変性が有意に進行していることを見出し、またフィブリリン1タンパクが椎間板線維輪に発現しているという既報があることから椎間板線維輪におけるフィブリリンタンパクの脆弱性が椎間板変性の一要因となっているのではないかと仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

フィブリリンタンパクは ADAMTS10 と ADAMTS17 ,ADAMTSL2 といったプロテアーゼタンパク群と相互作用し、これらのタンパクによって細胞外のフィブリリン1タンパクの合成が促進することが報告されているため、本研究では(1)これらの ADAMTS10 や ADAMTS17 といった遺伝子の機能解析を行い、(2)可能であれば椎間板におけるこれらのタンパクの機能解析や椎間板変性の治療への応用の可能性を模索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ADAMTS10 および ADAMTS17 の双方について解析する方針として、両マウスの flox マウスを作出することから開始することとした。結果的に ADAMTS17 の flox マウスの作出にスムーズに成功したため、本研究では主に ADAMTS17 の機能解析を行う方針とした。

(2) ADAMTS17 の flox マウスと CAG-cre マウスおよび軟骨特異的に Cre を発現する Col2a1-cre マウスを交配し、ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスおよび軟骨特異的 ADAMTS17 コンディショナルノックアウトマウス(Col2cKO)を作出し、骨格および全身の表現型の解析を行った。

(3) ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスの成長板軟骨の詳細な解析を行い、成長障害の機序の解析を行った。

(4) 成長軟骨での ADAMTS17 とフィブリリンタンパクの関係について解析を行った。

(5) Laser microdissection(LMD)を用いた網羅的解析を成長軟骨板で行った。

(6) 指節骨を用いた organ culture を用いた系で LMD を用いた網羅的解析の結果の解釈を行った。

(7) ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスの椎間板や脊柱での表現型の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) ADAMTS17 flox マウスの作出に成功し、CAG-cre マウスでの交配により、ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスを作出し、ADAMTS17 が全身でノックアウトされていることを確認した。

(2) ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスの表現型の解析を行った。5 - 10%程度の成長障害および手指骨の短縮(brachydactyly)と皮膚の肥厚を認め、ヒトでの ADAMTS17 変異に由来する Weill-Marchesni 症候群を再現する表現型が得られていることを確認した。(図1)また成長障害が軟骨内骨化の異常かを解析するために軟骨特異的 ADAMTS17 コンディショナルノックアウトマウス(Col2cKO)を作出し、同様に成長障害を呈することを確認し、成長障害が軟骨内骨化の異常に起因することであることを確認した。

(3) ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスの成長板軟骨の詳細な解析を行い、コントロールの WT マウスに比して肥大軟骨層の短縮が生じていることを突き止めた。また成長軟骨板の増殖性での細胞増殖には差がないこと、肥大軟骨層末期でのアポトーシスには差が生じていないことを確認した。

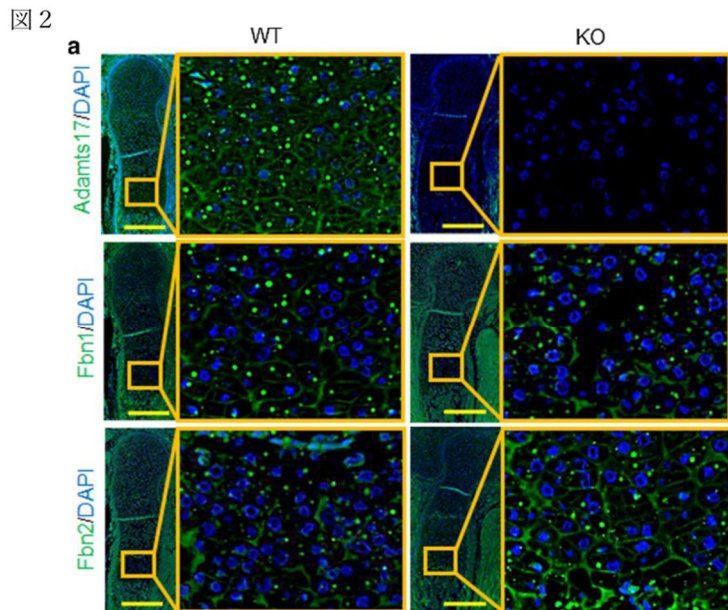
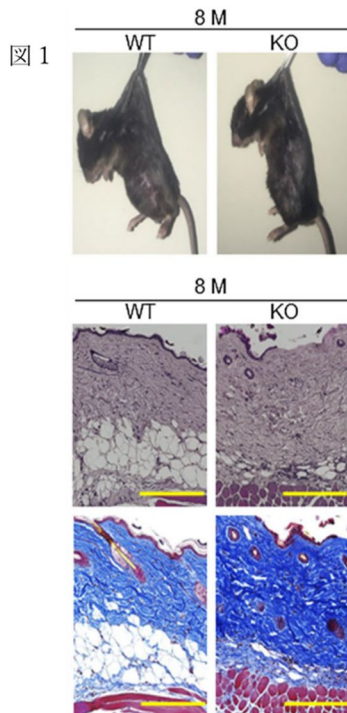
(4) 成長軟骨板の細胞外基質の評価を行った。予想に反して、ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスでは FBN1 タンパクには明らかな差は見られなかった。その一方で ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスでは FBN2 の発現が上昇していることが確認され、なんらかの機序で細胞外の microfibril assembly に差が生じていることが判明した。(図2)

(5) 成長軟骨板での成長障害を生じるメカニズムを解明するために Laser microdissection(LMD)を用いて、軟骨終板部の網羅的発現解析を ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスおよび WT マウスで行った。Gene ontology 解析を行ったところ ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスでは軟骨終板で BMP シグナルの低下が生じていることが見出された。実際に ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスでは免疫組織染色において BMP シグナルの重要な指標のひとつである pSmad1 の低下が生じていることが確認された。

(6) ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスおよび WT マウスの中手骨を用いた器官培養系(organ culture)において ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスでは肥大層末期での BMP シグナルの低下および石灰化が障害されていること、BMP の添加により表現型が完全に rescue されることを確認し、実際に ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスでの成長障害が BMP シグナルの低下によることを示した。

以上までの結果を論文として発表した。(Oichi T, [Taniguchi Y](#), et al. Adamts17 is involved in skeletogenesis through modulation of BMP-Smad1/5/8 pathway. Cell Mol Life Sci. 2019 Dec;76(23):4795-4809.)

(7) 続いて上記で作出した ADAMTS17<sup>-/-</sup>マウスの椎間板および脊柱の表現型について解析を開始した。この結果については引き続き解析をしており今後論文投稿を予定している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oichi T, Taniguchi Y, Oshima Y, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 3;3(1)
2. 論文標題 Pathomechanism of intervertebral disc degeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOR Spine.	6. 最初と最後の頁 e1076.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsp2.1076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Oshima Y, Yano F, Mori Y, Chijimatsu R, Kim-Kaneyama JR, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 76(23)
2. 論文標題 Adamts17 is involved in skeletogenesis through modulation of BMP-Smad1/5/8 pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci.	6. 最初と最後の頁 4795-4809.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-019-03188-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi Y, Oichi T, Ohya J, Chikuda H, Oshima Y, Matsubayashi Y, Matsui H, Fushimi K, Tanaka S, Yasunaga H.	4. 巻 97(14)
2. 論文標題 In-hospital mortality and morbidity of pediatric scoliosis surgery in Japan: Analysis using a national inpatient database.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e0277.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.000000000010277.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 43(10)
2. 論文標題 A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically Induced Instability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine (Phila Pa 1976).	6. 最初と最後の頁 E557-E564.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002427.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Y, Matsubayashi Y, Kato S, Ono T, Oshima Y, Tanaka S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Prooperative assessment of the feasibility of pedicle screw insertion at the proximal thoracic curve in Lenke type 2 idiopathic scoliosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Global spine journal	6. 最初と最後の頁 261 - 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2192568219844989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 尾市 健 他
2. 発表標題 Adamts17はmicrofibril形成を介してTGF- $\beta$ シグナルを調整し、骨格成長に関与する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾市 健 他
2. 発表標題 Adamts17 は microfibril 形成を介して TGF- $\beta$ シグナルを調整し、骨格成長に関与する
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 琢 (Saito Taku) (30456107)	東京大学・医学部附属病院・准教授  (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松林 嘉孝  (Matsubayashi Yoshitaka)  (50747962)	東京大学・医学部附属病院・助教    (12601)	
研究 協 力 者	尾市 健  (Oichi Takeshi)		