

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10945

研究課題名(和文) 椎間板変性におけるWntシグナルを介す転写制御機構の解析と新規腰痛治療薬の探索

研究課題名(英文) Analysis of transcription factors mediated by Wnt signal in intervertebral disc degeneration and search for therapeutic agents for low back pain

研究代表者

檜山 明彦 (HIYAMA, Akihiko)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00514382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経栄養因子(Nerve growth factor: NGF)は、疼痛関連の神経伝達物質の発現誘導などにより痛みを惹起すると報告される。本研究目的は、ラットの椎間板細胞におけるWntシグナルによるNGFの発現解析を行い新規創薬につなげる橋渡し研究を行うことである。解析から、Wntシグナルは直接的にNGFの発現に関与せず、疼痛伝達ではWntシグナル以外の因子が間接的に関わっている可能性が示唆された。また腰椎変性疾患患者の椎間板に炎症性サイトカインにより発現が誘導されるCCL20/CCR6の発現が確認されたことからCCL20/CCR6が腰椎間板変性に関与している可能性があると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰痛は直接生命を脅かすものではないが、ADLを下げるばかりでなく患者のQOL低下を招き、人的にも社会的にもその経済的損失は計り知れない。椎間板変性症の病態解明が明らかにされれば、腰痛治療の新規分子標的治療薬として世界に先駆けて報告でき、腰痛患者の社会的コストの減少につながる可能性がある。今回、椎間板変性に関与するWntシグナルにおける疼痛関連因子NGFの発現を解析したが、Wntシグナルは直接的にNGFの発現に関与せず、疼痛伝達ではWntシグナル以外の因子であるケモカインや炎症性サイトカインが間接的に関わっている可能性が示唆され、新たな疼痛治療薬のターゲット因子として考慮された。

研究成果の概要(英文)：Nerve growth factor (NGF) is reported to induce pain by inducing the expression of pain-related neurotransmitters. The purpose of this study is to analyze the expression of NGF by Wnt signal in rat intervertebral disc cells and to carry out a translation study for new drug discovery.

We found that Wnt signal was not directly involved in the expression of NGF and that factors other than Wnt signal were indirectly involved in pain transmission. In addition, inflammatory cytokine in the intervertebral disc of patients with lumbar degenerative disease. It was suggested that the expression of CCL20 / CCR6, which is induced by CCL20 / CCR6, was confirmed. Therefore, it is considered that CCL20 / CCR6 may be involved in lumbar disc degeneration.

研究分野：脊椎・脊髄病疾患

キーワード：腰痛 椎間板変性 分子学的研究 創薬 Wntシグナル ケモカイン 炎症性サイトカイン NGF

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腰痛発生には一般に①椎間板のストレスや異常な椎間不安定性の増大(不安定性)が②椎間板細胞から炎症性サイトカインの分泌を生じ(感覚神経の感作)③自由神経終末の変性椎間板内への侵入(感覚神経の存在)により発生するのではないかとされる。しかしながら、実際に適した椎間板変性動物モデルがないこともあり、椎間板変性に基づく腰痛メカニズム(①なぜ椎間板変性が生じるのか?②なぜ椎間板変性から痛みが生じるのか?)は未だ明確ではない。

そのような背景から我々は、根本的な原因とされる椎間板変性の生じるメカニズムを解明するため、発生・分化など多様な機能を持つWntシグナルについて分子学的機能解析を行ってきた(Hiyama et al. BRR, 2008. Hiyama et al. JBC, 2009. Hiyama et al. JBMR, 2009.)。

その結果、Wntシグナルの活性化は椎間板細胞の老化(細胞老化;細胞静止)を誘導する事を報告した(Hiyama et al. Arthritis and Rheum, Journal of Cellular Physiology, 2010. Journal of Cellular Biochemistry, 2011.)。また同化作用や異化作用に関わるサイトカインに対するWntシグナルの影響を検討した結果、Wntシグナルの活性化はTNF- $\alpha$ やプロテアーゼであるMMP familyの発現を上昇させる一方で、同化作用における重要なサイトカインであるTGF- $\beta$  super-familyの発現をMAPKシグナルを介して上昇させる事がわかった。

しかしながら、シグナル伝達経路は細胞種や環境・条件により様々なシグナルが複雑にクロストークしており、椎間板変性においても必ずしも一つのシグナル(Wntシグナル)で椎間板変性の病態を解明できるものではない。ただし少なくともいくつかの局面においてはWntシグナルの活性化が、炎症性サイトカインや疼痛因子(神経栄養因子)に関わっていると考えられその経路の発現制御の解明は椎間板再生にとっても重要な位置づけにあると考えている。

### 2. 研究の目的

神経栄養因子(Nerve growth factor: NGF)は疼痛との関連が知られており、疼痛受容体の過敏化や疼痛関連の神経伝達物質の発現誘導、炎症反応の増幅、新たな神経線維の発芽などによって痛みを惹起すると報告されている。

椎間板におけるNGFの報告では、Freemontらは腰痛患者の椎間板内にはNGFやTNF- $\alpha$ 、IL-6などのサイトカインが発現していたことを報告している(Freemont et al. J Pathol, 2002)。またAbeらも同様に椎間板細胞をTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ で刺激することでNGF発現が上昇したことを報告している(Abe et al. Spine, 2007)。

これらの事から椎間板変性と腰痛におけるNGFの関係性が知られている。

そこで本研究の目的は、

- (1)椎間板変性に至る分子メカニズムをSprague Dawleyラットの腰椎椎間板細胞を用いて解析し、
- (2)ラットの椎間板細胞におけるWntシグナルによるNGFの発現解析を行う。
- (3)腰痛患者に対する痛みと炎症性サイトカインについて解析し新規創薬につなげる橋渡し研究を行うことを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1)椎間板変性に至る分子メカニズムの解明について研究をおこなう。

CTGF (CCN2)は、Cyr61 (CCN1)、NOV (CCN3)、WISP1 (CCN4)、WISP2 (CCN5)およびWISP3 (CCN6)を含む分泌型タンパク質のCCNファミリーメンバーのうちの一つである。このうちCCN1は、CCN2と類似の活性および発現パターンを有する一方で、CCN3はCCN2に対して拮抗的な作用をする。またCCN2 (CTGF)は髄核細胞中の細胞外マトリックス産生を増加させることや腰痛患者の椎間板中におけるCCN2発現の上昇が報告されている。そこでWntシグナルとCCN2とのシグナル解析をおこなう。

- ① 11週齢のSprague Dawleyラットの腰椎椎間板からラット椎間板細胞を単離培養した(n=32)。

培養した髄核細胞をもちいて遺伝子導入後にDual-Luciferase Reporter Assay system

(Promega)によりCCN2の転写活性を測定した。

② Wntの活性化剤BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime)を添加後(各濃度0.1-1.0  $\mu$ M)のCCN2の転写活性を測定した。

③ WT- $\beta$ -cateninまたは $\beta$ -catenin siRNAを遺伝子導入し転写活性を測定した。

(2) WntシグナルとNGFとのシグナルメカニズムは不明であり、椎間板変性と腰痛における分子学的解析を行うためWntシグナルによるNGFの影響を解析する。実験はSprague-Dawley(SD)ラット(n=32, 11週齢)から採取した髓核細胞を用いた。採取した髓核組織を分離後に、単層培養を行い実験に用いた。

① WntシグナルによるNGFの影響を解析するため、Wnt活性化剤であるBIO(6-bromoindirubin-3-oxime)を24時間添加しNGFの転写活性を評価した。

② NGFのレポーターとWt- $\beta$ -cateninとの遺伝子導入後のNGFの転写活性を評価した。

③ 遺伝子や蛋白レベルでの解析を行なった。

(3) 椎間板変性に至る分子メカニズムを解析するため、腰椎変性疾患で脊椎固定術をおこなったヒトの椎間板組織を提供していただき、遺伝子解析をおこなった。

① SDラットを用いて解析したデータを参考にして、CCN familyの発現をヒトサンプルで解析した。

② また痛みの程度や画像評価との相関関係を解析するため炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )やケモカインであるCCL20とその受容体であるCCR6の発現を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) WntシグナルによるCCN2の転写活性をgain-of functionやloss-of functionから解析した結果、Wntの活性化はCCN2転写活性を有意に減少させた。一方でWntの抑制はCCN2転写活性を上昇させた。

(2) Wntの活性化剤BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime)を24時間添加しNGFの転写活性を評価した。その結果、BIOを添加後(0.1  $\mu$ M-1.0  $\mu$ M)のNGFの転写活性には非添加群と比較し有意な変化はみられなかった。またNGFのレポーターとWt- $\beta$ -cateninとの遺伝子導入後のNGFの転写活性の評価でも同様の結果であった(図1)。

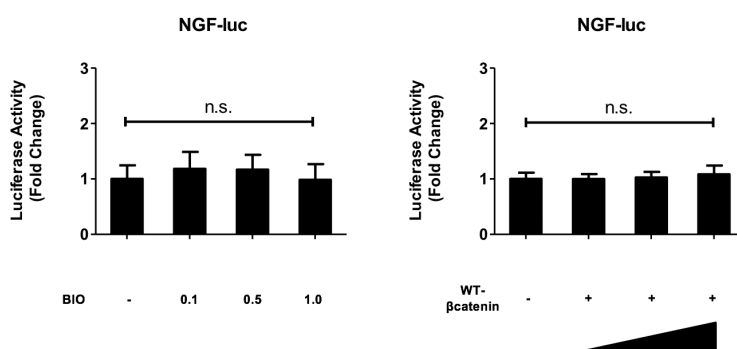


図1

転写レベルではWntシグナルの活性化によってNGFの発現変化はみられなかったため、引き続き遺伝子や蛋白レベルでの解析をおこなった。BIOを添加後のNGFの遺伝子発現量やそのレポーターである低親和性受容体p75、高親和性受容体TrkAの遺伝子発現量には非添加群と比較して有意差はなかった。

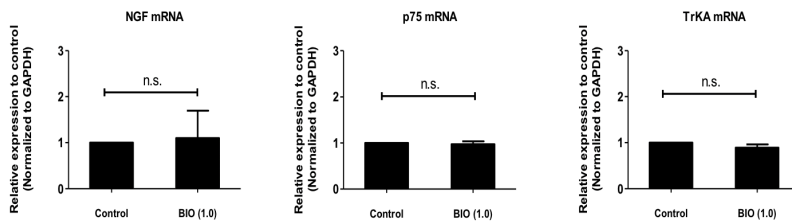


図2

Westernblot法や蛍光染色を用いた蛋白発現量の解析でも、BIO添加後(24時間)のNGF蛋白発現量に非添加群と比較して有意差はなかった(図3)。

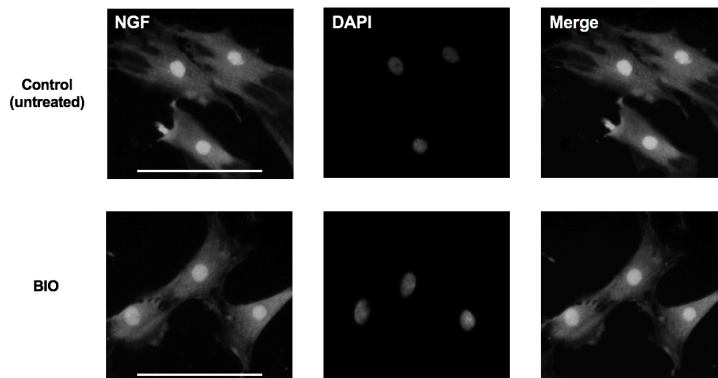


図3

以上の結果から、椎間板細胞ではWntシグナルの活性化は神経栄養因子NGFの発現に影響がないことが示唆された。

(3) 腰椎変性疾患から採取できた椎間板組織をReal-time PCRにかけ解析すると、ラットのデータと同様にCCN2の発現が他のCCN familyと比較し高いことがわかった。さらに腰痛や下肢痛を有す腰椎変性疾患中の椎間板組織には、炎症性サイトカインのうちTNF- $\alpha$ よりもIL-6の発現が高く、変性椎間板組織内にCCR6の発現が炎症性サイトカインと同程度発現していることが確認された。

一方でCCR6のリガンドであるCCL20は変性椎間板中に発現を確認したが、その発現量は炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )よりも低かった。

以上の「椎間板変性におけるWntシグナルを介す転写制御機構の解析と新規腰痛治療薬の探索」における研究の成果として、Wntシグナルは直接的に神経成長因子NGFの発現に関与せず、疼痛伝達においてはWntシグナル以外の因子が間接的に関わっている可能性が示唆された。

今回の解析から腰痛や下肢痛を有す腰椎変性疾患中の椎間板組織中には炎症性サイトカインのうちTNF- $\alpha$ よりもIL-6の発現が高く、変性椎間板組織内に炎症性サイトカインにより発現が誘導されるCCL20/CCR6の発現が確認された。このことからCCL20/CCR6が腰痛患者の椎間板変性に関与している可能性が示唆され、今後は、椎間板(正常から変性に至る過程での)における炎症性サイトカインによるケカイン発現に関して明らかにする必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 檜山明彦
2. 発表標題 椎間板細胞を用いたWntシグナルによるCCN familyの機能解析
3. 学会等名 第32回 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017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	酒井 大輔  (SAKAI Daisuke)  (10408007)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	