

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10952

研究課題名(和文) 加齢に伴う脊椎変性の進行抑制に関わる因子の分子生物学的研究

研究課題名(英文) Attenuation of intervertebral disc degeneration and osteophyte formation via inhibition of Hedgehog signaling

研究代表者

中村 英一郎 (NAKAMURA, EIICHIRO)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10412644

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)：マウスの腰椎椎間関節を切除した椎間板変性モデルに、椎間板発生や変性過程で発現するHedgehogシグナルを伝達する膜蛋白のSmoothened (Smo) の阻害薬であるSonidegib (NVP-LDE225)を週3回腹腔内注射し椎間板変性の抑制が起こるか確認した。生理食塩水投与群(対照群)と比べ、阻害薬投与群では変性による椎間板高の低下が有意に抑制された。組織学的に、対照群の変性椎間板の終板軟骨層には肥大軟骨細胞が現れ、一部は骨化し層の破綻が見られ、その領域にVEGFやCD31の発現がみられた。一方、阻害薬投与群では軟骨細胞の肥大化、VEGFやCD31の発現は有意に抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴い椎間板変性が起こり腰痛や脊柱管狭窄、椎間不安定性、脊柱変形を引き起こし多くの脊椎疾患の原因となる。椎間板の発生や変性過程で発現するヘッジホグシグナルを伝達する膜蛋白のスムーズドの阻害薬であるソニデジブを椎間板変性モデルのマウスに腹腔内投与したところ、椎間板変性の抑制効果が見られた。ソニデジブは癌治療薬としてすでに臨床試験中の薬剤であり、超高齢社会で脊椎加齢変性疾患に対する抑制治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether inhibition of smoothened (Smo), a key component of hedgehog pathway in the process of endochondral ossification and intervertebral disc development, attenuates intervertebral disc degeneration in the degenerative spine model. Mice were intraperitoneally administered saline or Sonidegib, an antagonist of Smo, 3 times per week after operation for 10 weeks. Disc height reduction rate and Masuda classification score was significantly suppressed in Sonidegib group against the saline group at 10 weeks after operation. Saline group showed severe intervertebral disc degeneration, collapse of vertebral end plate layer, hypertrophic changes of chondrocytes in the vertebral end plate cartilage and osteophyte formation in the corner of vertebra. In contrast, all these phenomena were attenuated in the mice with administration of Sonidegib, indicating that hedgehog signaling has a crucial role in the degenerative spondylosis of spine.

研究分野：整形外科学

キーワード：椎間板変性 Hedgehog Smoothened 骨棘 Sonidegib 骨・軟骨代謝学 Cre 脊椎脊髄病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会において、脊椎と関節の変性により引き起こされる疾患は運動機能の低下を導き大きな問題となっている。加齢に伴う退行性変化として椎間板は変性し椎体には骨棘が形成される。また、椎間板変性が起きた椎間は腰痛や脊柱管狭窄、椎間不安定性、脊柱変形を引き起こし多くの脊椎疾患の主要な原因と考えられている。しかしながら、その根本的な原因として、脊椎の変性過程においてどのような因子が関与し機能しているのか未解明な部分が多い。

椎間板は中心部の髄核と周囲を取り囲む線維輪からなり、上下の椎体と椎体終板を介し連結している。椎間板の発生過程で、髄核では脊索細胞の存在と Sonic hedgehog (Shh) の発現が確認されており、また線維輪、椎体終板の発生過程には Indian hedgehog (Ihh) が発現していることがわかっている (DiPaola CP et al, J Orthop Res 2005)。また hedgehog シグナル伝達には、膜蛋白の Smoothed (Smo) が関与しており、膜貫通蛋白である Patched (Ptc) により抑制されている。Dahia らは、出生後の髄核にも Shh が出生前と同様に発現していることを示し、また出生後の椎体終板に Ihh が発現していることを示した。(Dahia et al, spine, 2009)。機能的には、申請者らは軟骨組織中の Ihh を生後に特異的に欠失させることで四肢、脊椎の形成と成長の障害が起こることを示し (Maeda Y, Nakamura E et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007)。また、Dahia らは髄核から分泌される Shh が出生直後の椎間板の成長にも影響を与えることを報告した (Dahia et al, Plos One, 2012)。

そこで、申請者らは前回採択研究 (H26-28 年度 基盤研究 C: 加齢に伴う脊椎変性メカニズムの分子生物学的解明) において、腰椎の椎間関節を切除することで椎間板にダイレクトな損傷を与えずに変性を惹起する椎間板変性促進モデルを作成し、Smo を生後にノックアウトしたマウス (Smo cKO) と野性型マウス (Wt) とで比較したところ、Smo cKO では、椎間板変性促進モデルで椎間不安定性を起こしても椎間板変性・骨棘形成がほとんど惹起されないことを見出した。しかし、その情報伝達経路は不明であり Smo の下流でどのようなことが起きているのか検討する必要がある。

また、近年、Smo の阻害薬 Sonidegib (Erismodegib NVP-LDE225) や hedgehog の阻害薬である Vismodegib (DGC-0449) が開発され、基底細胞癌など様々な癌に対する分子標的薬として臨床試験での効果が見られているとの報告がある。これら薬物の投与により、Smo ノックアウトマウスで見られたような椎間板変性の抑制効果が同じように得られるか検証することは非常に重要なことと言える。

2. 研究の目的

(1) 椎間板変性の過程で関与が示唆されたヘッジホグのシグナル伝達メカニズムについてさらに詳細に解析すること。

(2) Smo の阻害薬を腹腔内に投与し Smo のノックアウトマウスで得られた結果と同等の効果が得られるか解析すること。

3. 研究の方法

(1) コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の作成

前回採択研究と同様に、本研究でも CreER(T)-loxP システムを用いる。Cre がタモキシフェン投与下に全細胞に作動する Rosa-CreER(T) マウスと、Smo flox/flox (Smo fl/fl) マウスと交配させることにより、Rosa-CreER(T)-Smo fl/fl (Smo cKO) マウスの作成を行った。前回研究と同様に、成長障害をきたさず、かつ効率的に Smo を欠失できるタモキシフェンの腹腔内注射のタイミングを生後 3 週目、5 週目、手術 3 日前、手術前日に設定した。

(2) 椎間板変性モデルの作成

腰椎椎間での不安定性による椎間板変性・骨棘形成を誘導するモデルとして、椎間関節切除モデルを作成した。8週齢でマウスの第4腰椎両側下関節突起と第5腰椎棘突起を切除し、さらに抗重力運動をさせるため術1週後から8週間、高さ1mのクライミングケージ内で飼育し抗重力運動を負荷した。

(3) 椎間板変性促進モデルにおける Shh, Ihh, Smo の発現

Negative control (手術なし) 群と Control (Smo +/+、手術あり) 群、Smo cKO (Smo -/-、手術あり) 群における、椎間板髄核、線維輪、椎体終板、各組織での Shh, Ihh, Smo の発現を確認するため、術後2週、3週、4週時点での各組織を採取し total RNA を抽出して Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)にて messenger RNA (mRNA)の発現を定量した。

(4) 組織評価ならびに VEGF や CD31 の免疫染色

術後9週で屠殺し HE 染色、Safranin O 染色、各種の免疫染色を行った。椎間板変性は Masuda 分類で評価した。椎間板変性の評価として Masuda 分類を用いた。Masuda 分類は、線維輪、線維輪と髄核の連続性、髄核細胞数、髄核細胞外基質のそれぞれについて、1点:正常、2点:軽度の変性、3点:中~高度の変性とし、その合計(4点~12点)で椎間板変性の程度を評価した。

(5) Smo 阻害薬投与による椎間板変性の抑制効果の検討

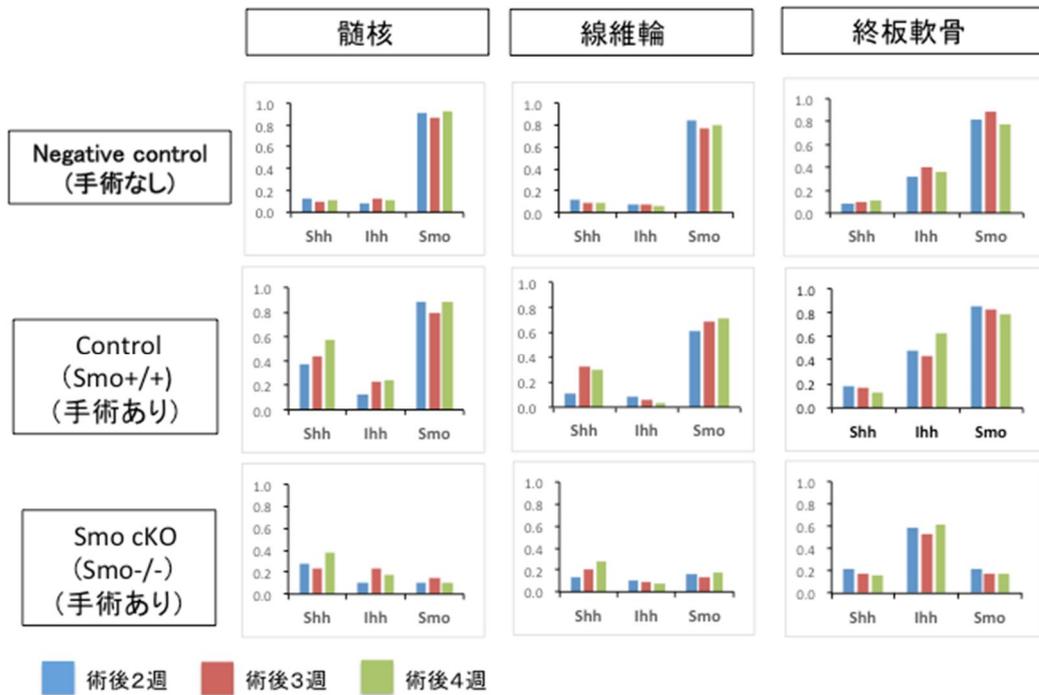
Smo 阻害薬 Sonidegib の腹腔内投与による椎間板変性への影響を検討した。8週齢野生型マウスに前述手術を行い、対照群には生理食塩水を術直後から腹腔内投与し、Sonidegib 投与群は Sonidegib を術直後、術後2週、術後4週から開始し3回/週腹腔内投与した3群を作成、術後10週で屠殺し Masuda 分類で評価し、また術前と屠殺時に μ CT を撮像し椎間板高低下率を測定した。

4 . 研究成果

(1) 椎間板組織での Shh, Ihh, Smoothened の発現

8週齢マウスで非手術の Negative control では、椎間板髄核、線維輪には Smo のみ発現が見られ、終板軟骨には Ihh と Smo の発現が見られた。コントロール (Smo +/+、手術あり) では、Negative control と比べ髄核には Shh と Ihh が、線維輪には Shh、終板軟骨には Ihh が有意に発現の増加がみられた。一方、Smo cKO (Smo -/-、手術あり) では、全ての組織で Smo の発現は有意に抑制されていた (図1)。

図1： 椎間板の髄核、線維輪、終板軟骨における Shh、Ihh、Smo の mRNA の発現



(2) 手術による椎間板変性と Smo cKO による椎間板変性の抑制効果

椎間板変性促進モデルによる椎間板変性を確認したところ、図2のように Negative control の正常椎間板に比べ、コントロールでは、髄核組織の減少と線維輪の断裂や不整を認め、また、終板軟骨の破綻と骨棘の形成が見られた。一方、Smo cKO では、手術による椎間板変性の促進が誘導されているにもかかわらず、椎間板組織の変性は抑制されていた。

図2：椎間板変性促進モデルにおける椎間板変性と Smo cKO による椎間板変性抑制の効果

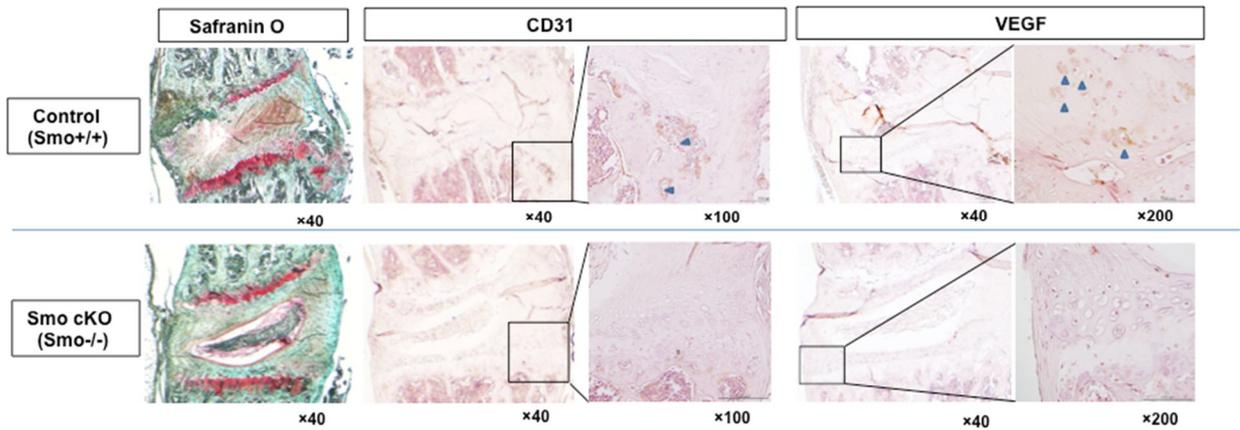


Safranin O 染色 矢印：終板軟骨層は破綻し、肥大軟骨細胞と骨化した領域を認める

(3) 組織学的検討：CD31 と VEGF の発現

組織学的には、コントロール群では、髄核は消失し、線維輪には断裂が見られ、終板軟骨層には肥大軟骨細胞が現れ、一部は骨化し層の破綻が見られた。隅角部にも肥大した軟骨細胞と骨化した領域が見られた。免疫染色にて、CD31 と VEGF の発現を検討したところ、肥大した軟骨細胞と骨化した領域に VEGF ならびに CD31 の発現が見られた。一方、Smo cKO では終板軟骨層は保たれており、やや肥大した軟骨細胞はみられるものの VEGF や CD31 の発現は見られなかった(図3)。

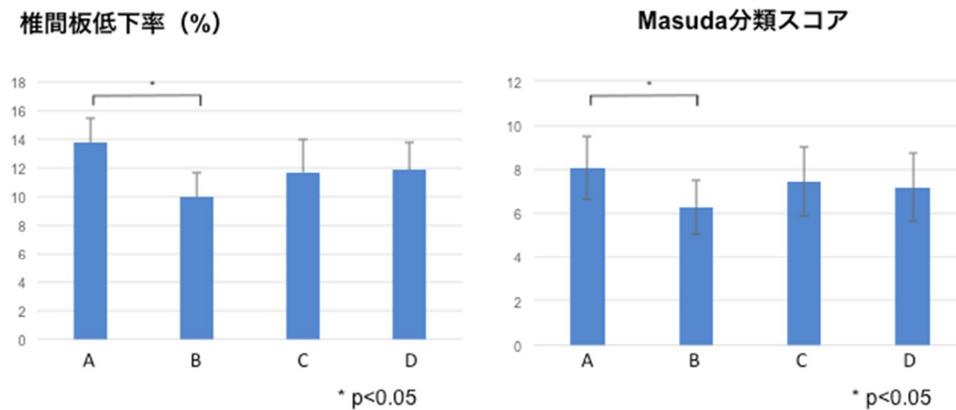
図3：免疫染色によるCD31とVEGFの発現の確認



(4) Smo 阻害薬投与による椎間板変性の抑制効果の検討

野生型マウスへの椎間関節切除手術後に Smo の阻害薬である Sonidegib (Erismodegib, NVP-LDE225)を週3回腹腔内注射し、椎間板変性の抑制が起こるか否か確認した(図4)。生理的食塩水投与群(A)と Sonidegib 投与開始時期を術直後(B)、術2週後(C)、術4週後(D)からとした阻害薬投与群3群との計4群で比較したところ、B群はA群に対して変性による椎間板高の低下が有意に抑制され、C,D群でも椎間板高低下の抑制傾向が見られた。ただし、術直後から Sonidegib 投与した場合がもっとも変性抑制効果があり、投与の開始時期が遅れるとその効果は低下することがわかった。また、Masda 分類のスコアでも同様に B群は有意に椎間板変性が抑制されていた。

図4：Smo 阻害薬の Sonidegib 投与による椎間板変性の抑制効果



- A: 術後から生理食塩水を腹腔内投与
- B: 術後からSonidegibを腹腔内投与
- C: 術2週間後からSonidegibを腹腔内投与
- D: 術4週間後からSonidegibを腹腔内投与

以上のことから、椎間関節切除による椎間不安定性により惹起される椎間板変性には、Hedgehog signalが関与しており、Hedgehogは椎体終板軟骨の肥大化を促進して骨化を促し、本来の椎間板組織への栄養補給路に負の影響を与える可能性がある。また、隅角部では内軟骨性骨化様のプロセスで骨棘形成に関与していると考えられた。

さらに、Smo の阻害薬である Sonidegib の腹腔内投与により椎間板変性が有意に抑制され、ノックアウトマウスで起きた現象を阻害薬投与で再現できた。Sonidegib は癌治療薬としてすでに臨床試験が行われている薬剤であり、超高齢社会の中で加齢変性疾患に対する変性抑制治療へ期待できる結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takada S, Nakamura E, Sabanai K, Tsukamoto M, Ohtomo H, Kanoh S, Murai T, Fukuda H, Okada Y, Uchida S, Sakai A	4. 巻 38(3)
2. 論文標題 Attenuation of Post-Traumatic Osteoarthritis After Anterior Cruciate Ligament Injury Via Inhibition of Hedgehog Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 609-619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24494.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hokuto Fukuda, Eiichiro Nakamura, Ken Sabanai, Manabu Tsukamoto, Yasuaki Okada, Shinichiro Takada, Akinori Sakai
2. 発表標題 Attenuation of Intervertebral disc degeneration and osteophyte formation via inhibition of hedgehog signaling
3. 学会等名 EUROSPINE 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田北斗・中村英一郎・佐羽内研・塚本 学・岡田祥明・酒井昭典
2. 発表標題 Hedgehog pathwayの阻害は椎間板変性と椎体骨棘形成を抑制する
3. 学会等名 第4回黒潮カンファランス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田北斗、中村英一郎、佐羽内 研、塚本 学、田島 貴文、大隈 加代子、岡田 祥明、山根 宏敏、酒井 昭典
2. 発表標題 変形性脊椎症における椎間板変性と椎体骨棘形成にはHedgehogシグナルが関与する
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hokuto Fukuda, Eiichiro Nakamura, Ken Sabanai, Yasuaki Okada, Takafumi Tajima, Kayoko Okuma, Manabu Tsukamoto, Shinichiro Takada, Akinori Sakai
2. 発表標題 Hedgehog signaling is associated with intervertebral disc degeneration and osteophyte formation
3. 学会等名 OARSI (Osteoarthritis Research Society International) World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田北斗、中村英一郎、佐羽内研、塚本学、田島貴文、大隈加代子、岡田祥明、酒井昭典
2. 発表標題 椎間板変性と椎体骨棘形成にはHedgehogシグナルが関与する
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会 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
連携研究者	佐羽内 研 (SABANAI Ken) (70644863)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	
連携研究者	塚本 学 (TSUKAMOTO Manabu) (70778159)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	
連携研究者	山根 宏敏 (YAMANE Hirotoshi) (50721693)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	