

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09116

研究課題名（和文）骨粗鬆症におけるHGF/c-Metシグナルを介した骨と筋肉間ネットワークの解析

研究課題名（英文）Bone-to-muscle network mediated by HGF/c-Met signaling in osteoporosis

研究代表者

外村 仁（Tonomura, Hitoshi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：70604304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：HGF/c-Metシグナルが椎間板細胞の細胞増殖を促進する機序には低酸素誘導因子が重要な役割を果たすことを示した。また、ラット骨粗鬆症性椎体骨欠損モデルにおける椎骨、椎間板および傍脊柱筋におけるHGF/c-Metシグナルを中心とした成長因子や疼痛関連因子の発現動態を明らかにした。脊椎変性疾患における骨、椎間板および筋肉の臓器間ネットワークにHGF/c-Metシグナルが関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会において脊椎変性疾患は増加の一途をたどり、高齢者の健康寿命を低下させる原因となっている。脊椎の加齢性変化の中で、骨強度の低下、椎間板変性および傍脊柱筋の筋肉量と筋肉機能低下が生じ、それぞれの相互作用があると考えられるがその病態は明らかにされていない。本研究成果は高齢者の骨、椎間板および筋肉の老化が共存した運動器疾患に対して有用な予防・治療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：We showed that hypoxia-inducible factors play an important role in the mechanism by which HGF/c-Met signaling promotes cell proliferation of intervertebral disc cells. In addition, the expression patterns of HGF/c-Met related signaling, in vertebrae, intervertebral discs, and paraspinal muscles in a rat osteoporotic vertebral bone defect model were also clarified. We demonstrated the possible involvement of HGF/c-Met signaling in the interorgan network of bone, intervertebral disc, and muscle in spinal degenerative diseases.

研究分野：脊椎・脊髄

キーワード：HGF 椎間板 骨粗鬆症 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において運動器疾患は増加の一途をたどり、高齢者の健康寿命を低下させる原因となっている。高齢者の運動器疾患の中でも、骨強度の低下により骨折リスクが増大する骨粗鬆症とともに、骨格筋の筋肉量と筋肉機能が低下するサルコペニアに対する新たな予防・治療法の開発が望まれている。骨粗鬆症とサルコペニアはそれぞれ独立した疾患であるが、高齢者が骨粗鬆症とサルコペニアを合併して活動性の低下をきたす例は日常臨床でしばしば遭遇する。例えば、骨粗鬆症性椎体骨折の受傷後に骨癒合が遷延して治療が長引くと、傍脊柱筋(背筋)の筋萎縮や筋力低下が伴って加速度的に脊柱変形が進行する。このような負の連鎖をきたすと強い疼痛や麻痺が生じて患者の活動性は著しく制限されてしまう。骨粗鬆症とサルコペニアが合併する有病率や関連性が本邦でも報告されているが(Miyakoshi N: J Bone Miner Metab, 2013、Yoshimura N: Osteoporosis Int, 2017)、骨粗鬆症に伴って筋肉組織の加齢性変化が進行する病態は明らかにされていない点が多い。

骨と筋肉が運動器としての機能を果たすためには、両者の力学的相互作用が必要不可欠であり、古くから認識されている骨と筋肉の臓器間ネットワークといえる。骨と筋肉はともに内分泌器官であり、さまざまな液生因子を介した両者の相互作用を有することが注目されている(Kneissel D, Glass D: Bone, special issue, 2015)。筋肉から分泌される因子が骨代謝に関与し、骨から分泌される因子が筋肉の増生や脂肪変性に影響しながら筋骨格系の恒常性が維持されていると考えるが、詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多い。骨粗鬆症に伴う筋肉の加齢性変化には、このような骨と筋肉の臓器間ネットワークの破綻が関与している可能性がある。

われわれは成長因子の中で肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor 以下 HGF)とその特異的受容体である c-Met に着目し、運動器疾患における HGF/c-Met シグナルの役割について研究を行っている。HGF/c-Met シグナルが椎間板細胞の細胞増殖促進、抗アポトーシスおよび細胞外基質代謝改善効果を有し、椎間板変性を抑制する作用を持つことを報告した(Ishibashi H, Tonomura H: J Ortho Res, 2016)。HGF/c-Met シグナルは筋肉の発生と再生に重要な役割を果たすこと(Anderson JE: Adv Exp Med Biol, 2016)や骨形成を促進すること(Matsubara H: Clin Orthop Relat Res, 2008)が報告されているが、骨粗鬆症の病態における作用は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動器疾患における HGF/c-Met シグナルの役割に注目し、同シグナルを介した骨、椎間板および筋肉の臓器間相互ネットワークを解析し、運動器の老化調節機構を解明することである。本研究で得られたデータを蓄積すれば、高齢者の骨、椎間板および筋肉の老化が共存した病態に対して有用な予防・治療法の開発が可能となり、健康寿命の延伸につながると考えられる。

3. 研究の方法

われわれが過去に報告した HGF/c-Met シグナルが椎間板細胞の細胞増殖促進、抗アポトーシスおよび細胞外基質代謝改善効果を有し、椎間板変性を抑制する作用について詳細な作用機序を細胞の低酸素応答で中心的な役割を担う転写因子である低酸素誘導因子(HIF)に着目して解析した。

生後 12 週の日本白色家兔を安楽死させた直後、腰椎椎間板を摘出し細切した後、酵素処理を行い、平板培養を行った。定常酸素濃度のみでなく、低酸素インキュベーターを用いて、酸素濃度 5% の低酸素環境下でも同様に検討する。また、適宜 HGF 投与下において評価を行った。以下の各種ストレス負荷を行なった。メカニカルストレス: 静水圧負荷装置を用いて、50-100MPa、2 時間の非生理的な圧力負荷を加えた後、4 時間培養した、炎症性サイトカイン刺激: IL-1 β 10ng/ml、TNF- α 50ng/ml を培地に加えた後、48 時間培養した、NO 誘導性アポトーシス: Sodium nitroprusside(SNP) 0.5mM を培地に加えた後、12 時間培養した、熱ストレス: 恒温槽を用いて熱ストレス(43 $^{\circ}$ C、2 時間)を加えた後、4 時間培養した。WST-8 法と LDH 法を用いて、ストレス負荷後の椎間板細胞の viability を評価した。HIF、HGF/c-Met シグナル関連因子の発現は Western Blotting 法を用いて発現を評価した。Real time PCR 法を用いて m-RNA レベルの発現評価も行なった。HIF、HGF/c-Met シグナルのタンパク相互作用については免疫沈降法を用いて評価した。また、ストレス環境下や HGF 投与下において以下の各種阻害剤を投与し、HIF 発現、HGF/c-Met シグナルへの影響を評価した。PI3K/Akt、MEK/ERK、JAK/STAT 経路に対する阻害剤(NK4、LY294002、PD98059、cucurbitacin 1 など)を用いた。さらに軟骨基質代謝や細胞保護へどのように作用するかを検討した。

今までわれわれが確立した骨粗鬆症性ラット椎体骨欠損モデルを用いて、椎骨、椎間板および傍脊柱筋における HGF/c-Met シグナルを中心とした成長因子や疼痛関連因子の発現動態

を解析した。

全身麻酔下で生後 12 週ラットの両側卵巣を摘出した (OVX ラット)。その後 8 週経過した時点で以下の実験を行なった。対照として同じ週齢の sham 手術を行ったものを用いた (正常ラット)。次に全身麻酔下でラットの第 3-5 腰椎椎体前方にエアドリルで $\phi 4\text{mm}$ の半球状の骨欠損 (椎体骨折) を作製した。術後 0-12 週の骨組織 (正常椎体と骨欠損椎体)、椎間板組織 (椎間板と線維輪) と筋肉組織 (傍脊柱筋、腓腹筋) の形態変化を正常ラットと OVX ラットで比較した。組織や血清の HGF/c-Met シグナル関連因子、骨代謝マーカーおよび筋の肥大・萎縮関連因子の発現についても検討した。ラット骨粗鬆症性椎体骨折モデルにおける骨および筋肉組織の形態変化と HGF/c-Met シグナル関連因子、骨代謝マーカーおよび筋の肥大・萎縮関連因子の発現動態を解析した。画像評価: μCT の多重断層画像で骨欠損椎体の骨梁構造を 3 次元的に評価し、骨形態計測を行なった。腰椎と下腿の MR 画像 (Agilent 社製動物用 MRI) を撮像し、椎間板および傍脊柱筋と腓腹筋の評価を行った。筋面積から筋萎縮を、筋内輝度変化から脂肪変性の程度を検討した。生化学的評価: 椎体骨組織、椎間板組織および傍脊柱筋、腓腹筋組織や血清を採取し、PCR 法や ELISA 法で HGF/c-Met シグナル関連因子、骨代謝マーカーおよび筋の肥大・萎縮関連因子の発現量を測定した。組織学的評価: 椎体の骨組織切片を作成し、HE 染色で組織学的評価を行う。ALP 染色、TRAP 染色を行い、骨芽細胞や破骨細胞の観察も行う。椎間板の組織切片を作成し、HE 染色、サフラニン O 染色を行い、細胞および基質について組織学的に形態を評価した。傍脊柱筋、腓腹筋の組織切片を作成し、HE 染色で筋繊維と筋細胞の評価を行う。脂肪染色を行い、筋組織内の脂肪量についても検討した。いずれの組織も HGF/c-Met シグナル関連因子、骨代謝マーカー、軟骨代謝マーカーおよび筋の肥大・萎縮関連因子に対する免疫組織染色を行い、その発現分布を解析した。

4. 研究成果

低酸素下 HGF 投与群の椎間板細胞では、定常酸素下 HGF 投与群、低酸素下 HGF 非投与群および対照群と比較して培養 5、7 日目で有意に細胞増殖が促進された。いずれの群においても培養 7 日目の LDH 放出量に有意差を認めず、低酸素刺激と HGF による細胞毒性はなかった。椎間板細胞の HIF-1 α 産生は低酸素刺激で誘導され、HGF 投与により有意に増大した。HIF-1 α 産生は si-HIF-1 α 導入によって抑制され、低酸素刺激と HGF 投与で促進した。細胞増殖は si-HIF-1 α 導入により抑制された。また、PD98059、LY294002 および cucurbitacin 1 の投与は濃度依存的に椎間板細胞の HIF-1 α 産生を低下させ細胞増殖を抑制した。低酸素環境の培養椎間板細胞において HGF が HIF-1 α 産生を介して細胞増殖を促進することが明らかとなった。さまざまな細胞において、HGF/c-Met シグナルと HIF-1 α 産生についてのシグナル伝達経路の解析が行われ、HGF と HIF-1 α のクロストークが存在することが報告されている。本研究では、HGF が椎間板細胞の HIF-1 α 産生を MAPK、PI3K/Akt および STAT3 経路で促進することが示された。生理的に低酸素環境にある椎間板細胞では、独自の HIF-1 α 産生調節機構によって恒常性を維持しており、この調節機構の破綻が椎間板細胞の減少や基質産生の低下をもたらし、椎間板変性を引き起こす一因と考えられている。近年、ヒストン脱アセチル化酵素、熱ストレス蛋白質や結合組織成長因子などの低酸素以外の因子による椎間板細胞の HIF-1 α 産生調節が明らかにされている。本研究の結果から、HGF/c-Met シグナルも椎間板細胞の HIF-1 α 産生を調節して椎間板変性を制御している可能性があると考えた。本研究で、HGF が椎間板細胞の細胞増殖を促進する機序には HIF-1 α 産生が重要な役割を果たすことを示した。HGF/c-Met シグナルによる椎間板細胞の HIF-1 α 産生調節機構の解明により、椎間板変性の病態解析や治療法への応用が可能である。本研究結果をまとめ論文発表を行なった。

骨粗鬆症性ラット椎体骨欠損モデルを用いて、椎骨、椎間板および傍脊柱筋における HGF/c-Met シグナルを中心とした成長因子や疼痛関連因子の発現動態を生化学的、組織学的に解析した (未発表データ)。骨粗鬆症と筋萎縮に関する因子についての考察を行い、論文発表する予定である。また、関節および脊椎変性疾患における HGF/c-Met シグナルの役割についての今までの報告を review して論文発表を行なった。

これらの研究成果から高齢者の骨、椎間板および筋肉の老化が共存した運動器疾患に対して有用な予防・治療法の開発につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Itsuji Tomonori, Tonomura Hitoshi, Ishibashi Hidenobu, Mikami Yasuo, Nagae Masateru, Takatori Ryota, Tanida Takashi, Matsuda Ken-Ichi, Tanaka Masaki, Kubo Toshikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Hepatocyte growth factor regulates HIF-1 -induced nucleus pulposus cell proliferation through MAPK-, PI3K/Akt-, and STAT3-mediated signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24679	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 Tonomura Hitoshi, Nagae Masateru, Takatori Ryota, Ishibashi Hidenobu, Itsuji Tomonori, Takahashi Kenji	4. 巻 21
2. 論文標題 The Potential Role of Hepatocyte Growth Factor in Degenerative Disorders of the Synovial Joint and Spine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8717 ~ 8717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21228717	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井辻智典, 外村 仁, 長江将輝, 高取良太, 清水佑一, 石橋秀信, 谷田任司, 松田賢一, 田中雅樹, 高橋謙治
2. 発表標題 肝細胞増殖因子が髄核細胞のHIF-1 発現と細胞増殖に与える影響
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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	高取 良太 (Takatori Ryota) (10351355)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長江 将輝 (Nagae Masateru) (60604303)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関