

機関番号：32644

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791419

研究課題名(和文) 椎間板変性症の病態解明と新創薬開発へ向けた分子学的基盤研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms involved in intervertebral disc degeneration and potential new treatment strategies

研究代表者

檜山 明彦 (HIYAMA AKIHIKO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00514382

研究成果の概要(和文)：本研究では、椎間板変性のメカニズム、特にPG中の糖鎖構造に注目した上で、その glycosaminoglycan (GAG) に関わる糖転移酵素のグルクロン酸転移酵素 (glucuronyltransferase-I; GlcAT-I) の椎間板発現と発現調整について調査した。その結果 GlcAT-I は椎間板中に多く発現しており、Ca<sup>2+</sup>が TonEBP/NFAT5 (浸透圧調整に関わる因子) と相互作用しながら GlcAT-I の椎間板間細胞のシグナル調整に働く事を解明した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this investigation was to study the expression and regulation of  $\beta$ 1,3-Glucuronosyltransferase-I (GlcAT-I), a key enzyme regulating GAG synthesis in cells of the intervertebral disc. There was a robust expression of GlcAT-I in the nucleus pulposus *in vivo*. We demonstrate that calcium regulates expression of GlcAT-I, a critical enzyme required for GAG synthesis through TonEBP/NFAT5 and Cn-NFAT signaling pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

椎間板変性の疾病を解明する上で、髄核細胞中の Aggrecan 中の糖鎖 (GAG) 構造・機能解析を行う事が重要である。そこで我々は硫酸化 GAG 合成に必須な酵素である、グルクロン酸転移酵素 (glucuronyltransferase-I; GlcAT-I) に注

目した。この酵素はコア蛋白質セリン残基のリンカー部位である Gal- $\beta$ (1,3)Gal- $\beta$ (1,4)Xyl- $\beta$ 1-O-Ser に GlcUA を結合させることで、ヘパリン硫酸とコンドロイチン硫酸の両方に共通のリンカー構造 GlcUA- $\beta$ (1,3)Gal- $\beta$ (1,3)Gal- $\beta$ (1,4)Xyl- $\beta$ 1-O-Ser

(GlcUA:グルクロン酸 Gal:ガラクトース Xyl:キシロースを示す)を作ることによって伸長し、PGとして合成される(Kitagawa et al. JBC. 1996). また最近の研究から、糖転移酵素の突然変異による形態形成異常や疾患が次々に見い出され、GAGが組織形成とその機能発現に必須の役割を果たしていることが明確に証明されつつある。このような背景にも関わらず、椎間板細胞におけるヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸合成の鍵となるこのグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-I) の研究は、世界的にもまだ行われていない。

## 2. 研究の目的

日本国内の腰痛患者は約 800 万から 1000 万人と推定され、激しい疼痛と運動制限をもたらす患者の Quality of life(QOL)を著しく低下させる。そのため腰痛の主原因の 1 つである椎間板変性の病態解明と治療法の開発は必須の課題である。椎間板変性の病因としては、多因子要因(遺伝的素因・環境的素因含め)が考えられているが、いずれにしても細胞外マトリクスである Proteoglycan(PG)が著明に減少する事が主な原因と考えられる。本研究では、椎間板変性のメカニズム、特に PG 中の糖鎖構造に注目した上で、その glycosaminoglycan (GAG) に関わる糖転移酵素のグルクロン酸転移酵素 (glucuronyltransferase-I; GlcAT-I)と椎間板細胞環境 (浸透圧調整に関わる因子) の相互作用を解明し、新たな治療法 (疾病バイオマーカーの探索含め) の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

**糖鎖(GAG)合成の制御機序の解明のため糖転移酵素 GlcAT-I の発現・機能を解析する。**

**(1) GlcAT-Iの椎間板内発現を各種検査法を用い評価する**

-1 ラット椎間板組織中の GlcAT-I 発現を Immunohistochemistry (免疫学的組織染色法)を用い解析する。方法は、新生ラット (生後 2 日)

(n=12) 成熟ラット (12 週) (n=12)を屠殺後、椎間板切片を HE, Alcian-blue 染色 (酸性ム多糖類:コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸を特異的に染色する) で評価し、同時にペルオキシダーゼを用い、免疫組織染色 (DAB 法) も行う。これにより椎間板組織内の GlcAT-I の局在(髄核・線維輪との比較)を検討する。

-2 ラット椎間板組織中・培養細胞の GlcAT-I 遺伝子・蛋白質発現を解析する。方法は、椎間板組織から屠殺後すぐに RNA・蛋白質を抽出し、椎間板細胞からは培養後 1 継代後に RNA・蛋白質を抽出し(遺伝子発現のためには Real-time PCR を行うが、方法は RNA を鋳型として、逆転写反応と PCR を同一の反応系で行える RNA-direct TM SYBR Green Real-time PCR Master Mix を用いる。蛋白質発現のためには Western-Blotting を用い解析する。SDS-PAGE (12% running gel) により蛋白質(組織・培養細胞)を分離後、PVDF メンブレンへ転写を行う。その後、5% non fat dry milk で blocking し、一次抗体 (GlcAT-I) , 二次抗体を用いシグナルを検出する (ECL system)。

-3 ラット椎間板培養細胞中の GlcAT-I 蛋白質局在を immunofluorescence 法 (蛍光抗体法) を用い解析する。方法は、1 継代後の椎間板細胞を 96-well plate に播種し、培養 24 時間後に一次抗体 GlcAT-I 抗体を用いた後、2 次抗体蛍光色素 (Alexa Fluor 647) を用い、抗原抗体反応の後で励起波長を当てて蛍光発色させ蛍光顕微鏡で椎間板細胞中の GlcAT-I の局在箇所 (核・細胞質) を検討する。

**(2) 椎間板細胞における浸透圧調整メディエーター TonEBP/NFAT5 による糖転移酵素 GlcAT-Iの転写制御を解析する (更にCaシグナル伝達経路の解明を実験目標とする)**

-1 ラット椎間板培養細胞の GlcAT-I reporter 活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用い解析する。方法は、まず GlcAT-I promoter 活性を計測するため、それぞれの遺伝子上流域に pGL3-luc ベクターを挿入し3種類の reporter vector を作成する (Figure.6, Figure.7)。その後、遺伝子導入効率をみるため内部標準として pRL-TK vector (Renilla のルシフェラーゼ活性を測定する) と共に培養細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い transfection を行う。48 時間後に細胞回収しそれぞれ GlcAT-I reporter 活性を解析する。行う Dual-Luciferase Reporter Assay の実験系は(実験①~⑦)。

- ①. 椎間板細胞内  $Ca^{2+}$  増加が GlcAT-I promoter 活性に与える影響を調べるために transfection 24 時間後に Calcium ionophore, Ionomycin (IM)(1ug/ml) と PKC activator, Phorbolmyristate acetate (PMA) (100ng/ml) を一緒に添加し、添加 24 時間後に GlcAT-I-D, GlcAT-I-M, GlcAT-I-P, それぞれの GlcAT-I reporter 活性を評価する。
- ②. 実験1を踏まえ transfection 後、同様に Ca chelator BAPTA (10uM) を添加し 24 時間後に GlcAT-I reporter 活性を評価する。
- ③. 椎間板細胞における TonEBP/NFAT5 が GlcAT-I promoter 活性に影響するかを検討するため、DN (Dominant-negative)-TonEBP と WT (Wild-type)-TonEBP plasmid を別々に co-transfection し GlcAT-I reporter 活性をそれぞれ評価する。
- ④. 実験 3 を踏まえ、椎間板細胞に代わり TonEBP<sup>+/+</sup>, TonEBP<sup>-/-</sup> MEF (mouse embryonic fibroblast) cell をそれぞれ

用いて IM/PMA 添加後の GlcAT-I reporter 活性をそれぞれ評価する。

- ⑤. TonEBP/NFAT5 の target gene である WT-TauT, MT-TauT-promoter 活性を IM/PMA 添加群、更に Caシグナルの downstream である Calcineurin (Cn) の inhibitor, FK506 (10ng/ml) と Cyclosporin A (1ug/ml) を添加群でそれぞれの reporter 活性を評価する。
- ⑥. 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇により活性化される Cn の影響を調べるため、Cn $\alpha^{-/-}$  cell, Cn $\beta^{-/-}$  cell と Cn $\alpha^{+/+}$  cell を用い、IM/PMA 添加後の GlcAT-I reporter 活性をそれぞれ評価する。
- ⑦. 細胞質内でリン酸化状態で存在する転写因子 NFAT は活性化された Cn により脱リン酸化され核内に移行し転写誘導されるが、その転写因子 NFAT(NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4) の GlcAT-I reporter への関与を調べるため椎間板細胞に GlcAT-I reporter plasmid と NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4 expression plasmid をそれぞれ co-transfection し、IM/PMA 添加後の GlcAT-I reporter 活性をそれぞれの NFAT 群で評価する。

-2 次に Ionomycin, PMA 刺激後のラット椎間板培養細胞中の NFAT5 遺伝子・蛋白質発現をそれぞれ解析し、さらに Calcineurin (Cn) 活性が NFAT5 遺伝子・蛋白質発現に影響しているか検討するため Cn inhibitor である FK506 (10ng/ml) , Cyclosporin A (1ug/ml) をそれぞれ IM, PMA とともに添加し添加 8 時間, 24 時間後に NFAT5 遺伝子・蛋白質発現を検討する (方法は GlcAT-I 抗体を用いた場合と同様。遺伝子発現を Real-timePCR 法。蛋白質発現を Western-Blotting 法を常法に従い行う)。そ

の後、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation) を用い、転写因子 NFAT5 の GlcAT-I promoter 上のリクルートを検討する。方法は Control 細胞と TonEBP/NFAT5 を transfection した COS7 細胞を用いる。Transfection 48 時間後に、1) 細胞固定 2)免疫沈降 3)DNA の回収 4)PCR による DNA の増幅検出の順に解析を行う。

#### 4. 研究成果

椎間板再生医療実現化に向けては、椎間板細胞自体のキャラクター解析が必要である。本実験では、椎間板変性の生じるメカニズムを解明するため分子学的に椎間板細胞のキャラクター解析を行い、椎間板細胞における糖転移酵素による分子学的 GAG 代謝について国内外にはじめて報告した。今後、GAG (糖鎖)の機能ドメインの構造解析が更に進めば、様々なシグナル伝達経路を選択的に制御することが可能になると考えられる。すなわち本研究の結果は、糖転移酵素の関わる疾患である、椎間板変性症を含め、広く創傷治癒、炎症疾患などに対する治療や薬剤開発の第1歩の報告にもなると考えられる。

#### 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] (計 1 件)

① Hiyama A et al、BMP-2 and TGFbeta Stimulate Expression of beta1,3 Glucuronosyl Transferase-I (GlcAT-I) in Nucleus Pulposus Cells Through AP1, TonEBP and Sp1: Role of Map Kinases、Journal of Bone Miner Res、有、25(5)、1179-90

[学会発表] (計 1 件)

① 檜山 明彦、TGF-β/BMP シグナルは AP-1, TonEBP を介し椎間板内硫酸化グリコサミングリカン代謝に関与する、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14・15 日、国立京都国際会館 (京都府)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

檜山 明彦 (Hiyama Akihiko)

東海大学・外科学系整形外科・助教

研究者番号：00514382

##### (2)研究分担者

酒井 大輔 (Sakai Daisuke)

東海大学・外科学系整形外科・講師

研究者番号：10408007