

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09204

研究課題名（和文）microRNAを介した腰椎椎体終板障害の機能解明および新たな治療戦略の確立

研究課題名（英文）Functional elucidation of lumbar vertebral endplate disorders via microRNA mediation and establishment of novel therapeutic strategies

研究代表者

中前 稔生（Nakamae, Toshio）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：40595758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は遺伝子発現ネットワークを司るマイクロRNA（miRNA）のノックアウト（KO）マウスを用いて、miRNAの椎体終板を含む椎間板における機能を解析した。

軟骨で発現の高い2種類のmiRNA（miR-23a/b クラスターおよびmiR-26a）のKOマウスを用いての軟骨終板および椎間板の評価を行った。組織学的所見では、miR-26aのKOマウスでは軟骨終板の変化に明らかな差は認めず、椎間板変性の進行も認めなかったが、miR-23a/b クラスターのKOマウスでは軟骨終板の成熟は抑制され、椎間板変性の進行も早期から認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マウス脊椎における軟骨終板の経時的な組織学的変化の詳細な観察を行うとともに、miRNAを介した新たな椎間板の発生・成熟、軟骨終板変性の分子機構を、軟骨で高発現しているmiR-23a/b クラスターおよびmiR-26aのKOマウスを用いて解析することで明らかにした画期的な研究である。

研究成果の概要（英文）：In the current study, we used knockout mice for microRNAs (miRNAs) that regulate gene expression networks to analyze the function of miRNAs in cartilage endplate degeneration.

We evaluated the cartilage endplates using knockout mice for two highly expressed miRNAs in cartilage (miR-23a/b cluster and miR-26a). Histological findings showed no significant difference in cartilage endplate changes compared to controls in miR-26a knockout mice, whereas in miR-23a/b cluster knockout mice, the maturation of cartilage endplates was inhibited. Moreover, in histological evaluations of intervertebral discs, progression of intervertebral disc degeneration was not observed in miR-26a knockout mice, but it was observed early on in knockout mice for the miR-23a/b cluster.

研究分野：医学

キーワード：マウス 椎体終板障害 microRNA 腰痛 軟骨終板 椎間板

1. 研究開始当初の背景

本邦において、腰痛は有訴者率で男性の第1位、女性の第2位であり、推定1000万人の腰痛患者が存在する。腰痛に対する治療に莫大な医療費がかかるだけでなく、超高齢社会を迎えた我が国における労働生産性低下にも繋がり、腰痛による社会的損失は甚大である。腰痛の有訴者が多い原因の一つに、腰痛の分子生物学的な病態解明が進んでいないことが挙げられる。腰痛の85%は原因の特定が困難との報告もあり、原因が特定できなければ適切な治療選択が困難となり、腰痛を難治化させることになる。このように腰痛の解決には、まず病態解明が喫緊の課題となる。

一方、これまでに、髄核を中心とした椎間板変性についてはこれまで数多くの研究が行われてきたが、椎体終板変性の基礎研究は少なく、その分子病態機構の解明には至っていない。また近年、非コードRNAであるマイクロRNA (miRNA) が様々な遺伝子発現を調整し、生命現象に重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、軟骨終板変性におけるmiRNAの詳細な機能については未だ解明されていない。

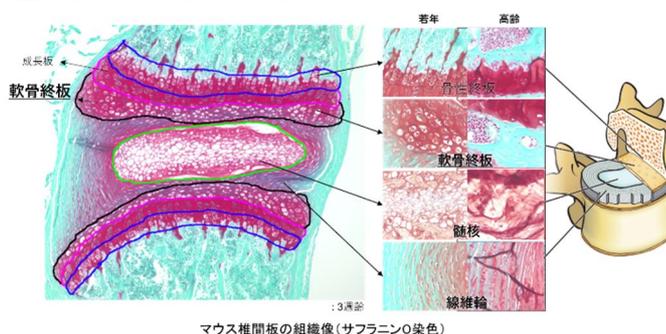
2. 研究の目的

本研究の目的は、野生型マウスを用いて加齢にともなう軟骨終板変性の病態を解明するとともに、椎間板で発現の高い2種類のmiRNA (miR-23a/b クラスターおよびmiR-26a) の軟骨終板・椎間板における機能を解析することである。

3. 研究の方法

加齢による野生型マウスおよび2種類のKOマウスの表現系解析

：野生型マウスとmiR-23a/b クラスターおよびmiR-26aのKOマウスを用いて、加齢による軟骨終板を含む椎間板の組織学的解析を行った。



マウス椎間板の組織像 (サフラニンO染色)

：組織学的評価：生後3, 6, 12, 18か月に軟骨終板を含めた椎間板および椎体の組織切片を作製し、HE染色にて形態学的評価を行うとともに、サフラニンO染色を行い、軟骨組織やコラーゲン線維の評価を行った。Masudaらの組織学的評価分類を用いて椎間板組織のスコアリングを行うとともに、われわれ独自の評価法を用いて軟骨終板のスコアリングを行った。また2型、10型コラーゲン、MMP-13などの免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 加齢マウスにおける組織学的検討

組織学的スコアリングによると、椎間板のスコアリングは加齢とともに増加し、特に6か月齢から12か月齢の間に明確な変化を認めた。組織学的スコアリングは12か月齢以降も緩徐に増加した(図1)。

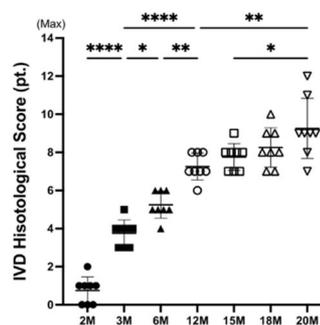


図1

椎間板末梢側の軟骨終板は明らかな経時的なスコアリング変化は認めなかったが、椎間板中枢側の軟骨終板は2か月齢と6か月齢との間で有意に骨化が進行した。さらには、12か月齢か月齢より骨化内の硬化性変化を生じ変性が進行した(図2)

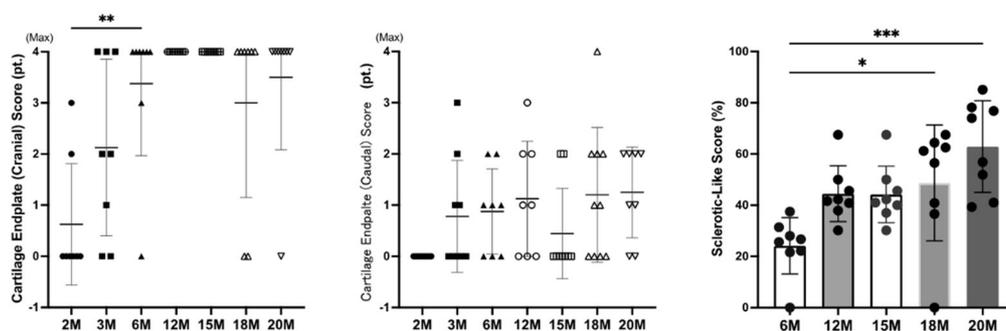


図2

また、加齢とともに椎間板および軟骨終板における2型コラーゲンは減少し、10型コラーゲンは増加した。一方、椎間板および軟骨終板におけるMMP-13陽性細胞は加齢とともに増加した(図3)。

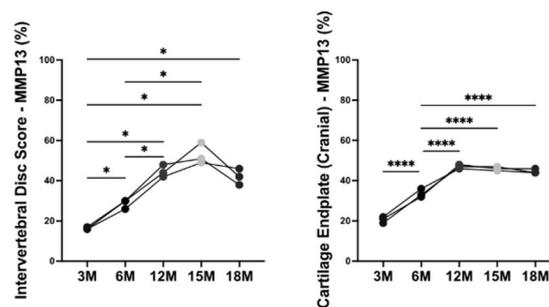


図3

(2) ノックアウトマウスにおける組織学的検討

軟骨で発現の高い2種類のmiRNA(miR-23a/b クラスターおよびmiR-26a)のKOマウスを用いた軟骨終板および椎間板の組織学的評価を行った。我々の教室では、miR-23a/b クラスターおよびmiR-26a KOマウスは、関節軟骨の発生・成熟や変形性関節症の発症に関与していないことを以前に報告している(*Front Cell Dev Biol* 2023, *Mech Ageing Dev* 2023)。軟骨終板および椎間板においてもmiR-26a KOマウスは、コントロールと比べ明らかな差は認めなかった(図4)。

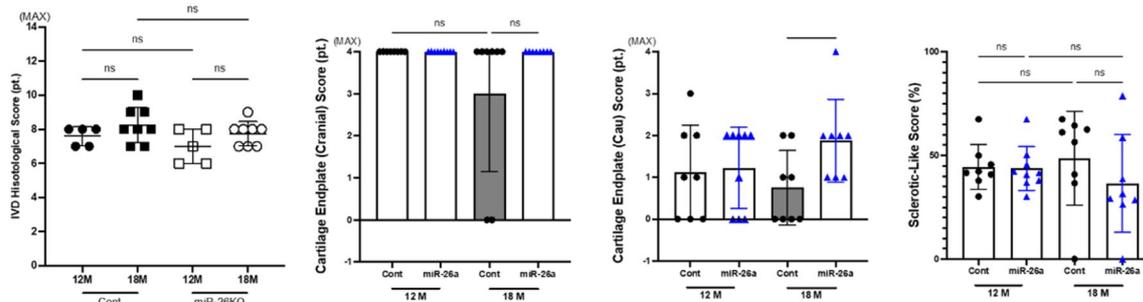


図4

しかし、miR-23a/b クラスターとmiR-26aのダブルKOマウスでは、軟骨終板の成熟が抑制され、さらに重篤な椎間板変性を早期から認めた(図5)。そして、miR-23a/b クラスターKOマウスでも同様に、軟骨終板の成熟抑制および椎間板変性を認めたことからmiR-23a/b クラスターが椎間板の維持に重要であることが明らかになった。これらの結果から、miR-23a/b クラスターが

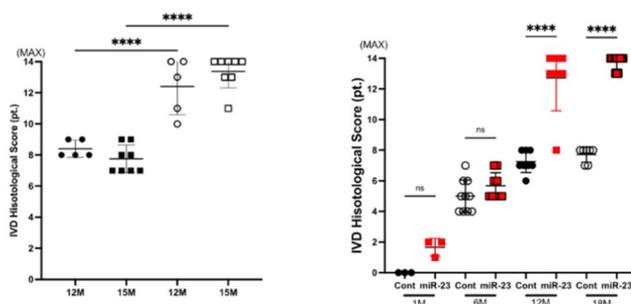


図5

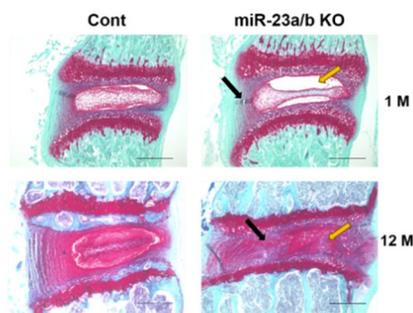


図6

椎間板の恒常性維持と軟骨終板の成熟に重要であることが示唆された。この miR-23a/b クラスターKOによる異常は、1か月齢の髄核ですでに認められることから、髄核細胞における miR-23a/b クラスターの機能不全によって引き起こされたと考えられる。(図6)

今後、in vitro 実験により髄核細胞における miR-23a/b クラスターの中でも特に重要な miRNA およびその標的遺伝子を同定するなど、miRNA による髄核の発生・成熟機構を明らかにするとともに、miR-23a/b クラスターの補充などによる椎間板治療への応用を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中前稔生 味八木茂 Fadlyansyah F. Husain 亀井直輔 安達伸生
2. 発表標題 マウス腰椎軟骨終板の加齢に伴う経時的な組織学的変化の検討
3. 学会等名 第38回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中前稔生 味八木茂 Fadlyansyah F. Husain 亀井直輔 安達伸生
2. 発表標題 miR-26aノックアウトマウスは終板障害を発症する
3. 学会等名 第38回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fadlyansyah Farid, Toshio Nakamae, Dilimulati Yimiti, Naosuke Kamei, Nobuo Adachi, Shigeru Miyaki
2. 発表標題 MiR-23a/b cluster and miR-26a double knockout mice promote age-related disc degeneration
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Fadlyansyah Farid, Toshio Nakamae, Dilimulati Yimiti, Naosuke Kamei, Nobuo Adachi, Shigeru Miyaki
2. 発表標題 Histological Changes in the Intervertebral Disc of C57BL6 mice and senescence-accelerated mice (SAMP8) due to aging
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Fadlyansyah Farid, Toshio Nakamae, Naosuke Kamei, Toshiaki Maruyama, Kazuto Nakao, Hiroki Fukui, Shigeru Miyaki, Nobuo Adachi
2. 発表標題 Spontaneous Histopathologic Changes of Cartilage Endplate in Mice During Aging
3. 学会等名 第53回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Fadlyansyah Farid, Toshio Nakamae, Naosuke Kamei, Toshiaki Maruyama, Kazuto Nakao, Hiroki Fukui, Shigeru Miyaki, Nobuo Adachi
2. 発表標題 Spontaneous Histopathologic Changes of Cartilage Endplate and Intervertebral Disc in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 during Aging
3. 学会等名 第53回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2024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	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・特定教授 (15401)	
研究分担者	亀井 直輔 (Kamei Naosuke) (70444685)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	

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
---------	---------