

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791570

研究課題名(和文) 椎間板における血管内皮増殖因子(VEGF)の機能解析と椎間板変性症の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of intervertebral disc degeneration and functional analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the intervertebral disc

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板における酸素分圧変化(低酸素・浸透圧)により惹起される血管新生といったシグナルの解明は椎間板変性のメカニズムを解明する上で新たな視点を提供すると考えられる。そこで本研究では、椎間板の恒常性維持に関与するとされる survival factor である VEGF に注目し、椎間板においての VEGF 作用の詳細な分子学的機能【シグナル制御】について解析した。その結果、Wnt シグナルと VEGF 間でのシグナルの加ストークが存在していることを示唆し、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。

研究成果の概要(英文)：The goals of this study were to examine whether Wnt signaling accelerates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of nucleus pulposus cells. Rat nucleus pulposus cells were cultured under normoxic or hypoxic conditions, and the expression and promoter activity of Wnt signaling and VEGF were evaluated. Nucleus pulposus cells exhibited increased beta-catenin mRNA and protein under the hypoxic condition. Nucleus pulposus cells cotransfected with the WT-beta-catenin expression plasmid or Si-beta-catenin expression, or treated with a different concentration of BIO, showed a dose-dependent increase in the activity of VEGF (V5-luc). We next measured the relative expression level of VEGF mRNA after the treatment of BIO. We analyzed protein expression with western-blot. Total beta-catenin level after the treatment of BIO increased to a greater extent in nucleus pulposus cells compared with untreated cells.

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

国内の腰痛患者は約800万から1000万人と推定され、患者のQuality of life (QOL) を著しく低下させる。これまで外科的治療による成果が報告されるが、術後の新たな機能障害が報告され、その限界と再生医療（遺伝子治療・細胞移植・成長因子療法）の可能性に注目が集まっている。我々のグループは、世界に先駆け椎間板変性に対する細胞移植療法（再生医療）に注目し研究してきた (*Hiyama et al. JOR, 2008.*)。更に近年では、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、細胞レベルで分子学的機能解析を行っている (*Hiyama et al. BRRC, 2008. Hiyama et al. JBC, 2009. Hiyama et al. JBMR, 2009.*)。その結果、Wntシグナルの活性化により椎間板細胞の老化を引き起こし、細胞増殖が抑制される事を報告した (*Hiyama et al. Arthritis and Rheum, Journal of Cellular Physiology, 2010. Journal of Cellular Biochemistry, 2011.*)。また椎間板組織および椎間板細胞において低酸素ストレスがマトリックス代謝（変性）に関わっている事が示唆されている。しかしながら椎間板にかかる機械的ストレスや他のシグナル機構によってVEGF発現がどのように誘導されるかについては報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、椎間板の恒常性維持に関与するとされる低酸素において survival factor とされる VEGF に注目したものであり、椎間板における VEGF 作用の詳細【シグナル制御】について解析を行う事が特徴的であり、当該研究期間内に in vitro で Wnt シグナルと VEGF との関係性を明らかにする事を目標とした。

3. 研究の方法

椎間板細胞における Wnt signal による

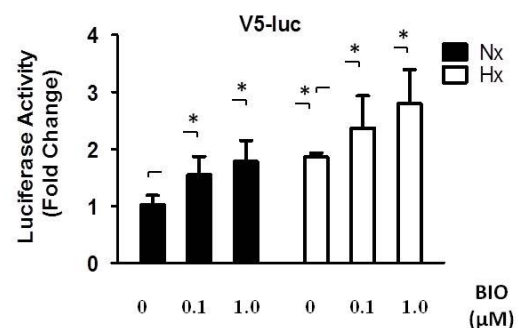
VEGF の発現制御の検討を行う

-1 トランスフェクションの前日に椎間板細胞を 24well /plate に播き、24 時間後に Lipofectamine 2000 を用いて目的遺伝子を導入する。その際に Luciferase reporter plasmids や内部標準として pRL-TK plasmid を用いる。遺伝子導入後、24 時間培養した細胞を回収し、細胞抽出液を用いて Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega)により Luciferase 活性を測定する。

-2 Wntシグナルの活性化による VEGF アイソフォームおよびその受容体の遺伝子・蛋白発現 (Western blotting を用い解析した。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った。その後、5% non fat dry milk で blocking し、一次抗体 (VEGF-A)、二次抗体を用いシグナルを検出した (ECL system) をそれぞれ検討を行う)。新生ラット (生後 2 日) (n=25) と成熟ラット (12 週) (n=25)の髄核細胞を初代培養後にそれぞれの試薬の存在下での影響について評価を行う。

4. 研究成果

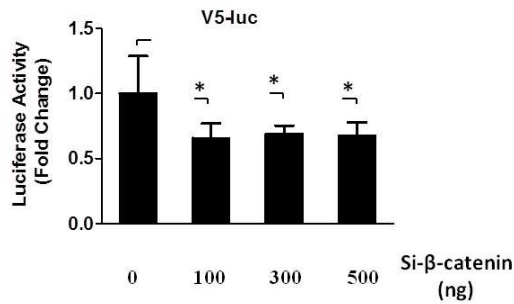
-1Wntシグナルの活性化による VEGF の転写活性を解明するため、Wntシグナルの活性化剤 (BIO: 6-bromoindirubin-3'-oxime)を添加後の VEGF(V5-luc)の転写活性を評価したところ、BIO の添加により V5-luc の転写活性が上昇することが示唆された (Figure 1)。



(Figure 1)

(Nx:Normoxia Hx:Hypoxia)

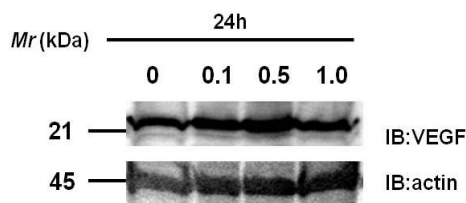
対して V5-luc と Si- β -catenin の plasmid をそれぞれ transfection し VEGF の転写活性を評価 (loss of function) したところ、V5-luc の転写活性が抑制された (Figure 2).



(Figure 2)

-2 この結果(-1)は Real-time PCR を用いた結果でも同様であった。

そこで、転写活性・遺伝子解析に引き続き、蛋白質発現を解析した。その結果 BIO(0.1, 0.5, 1.0 μ M) の添加 24 時間後では、VEGF-A の蛋白質発現が上昇することが示唆された (Figure 3).



(Figure 3)

Wnt シグナルは形態形成の誘導や細胞分化の調節など多様な機能を持つ事が報告されている。しかしながら、Wnt シグナルが椎間板形成や分化にどのように関わっていくかについては未解明である事から、我々は Wnt によって惹起されるシグナリングやその発現についての機能解析を行った。

これまでに、椎間板中の Wnt シグナルの活性化により椎間板細胞の老化を引き起こし、椎間板細胞増殖が抑制される事を報告した (*Hiyama et al. Arthritis and Rheumatism, J Cell Physiol, 2010. J Cell Biochem, 2011.*).

この事は、Wnt シグナルが老化含めた椎間板変性症の発症・進行に何らかの trigger として重要な因子となっている事が推測されるが、その機能調節メカニズム (シグナルクロック) については未だ十分に解明されていない。

軟骨においては、関節局所で炎症が生じると軟骨における酸素分圧は平常時よりもさらに低下し、各種の炎症性サイトカインの産生が促進されるとともに、VEGF などの血管新生増加因子や各種成長因子の発現増加が認められている。また OA においては、軟骨辺縁からの血管新生が修復過程に関与し、骨棘の形成を導くことが示唆されている。

本研究から、低酸素下では Wnt シグナルが活性化され VEGF の発現が亢進することが示唆された。これらの背景から椎間板変性過程に Wnt シグナルを介する VEGF の発現亢進が関わっている可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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]

6 . 研究組織

(1)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