

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25462299

研究課題名（和文）mTOR阻害による寿命延長効果を応用した新規椎間板再生法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new intervertebral disc regeneration method based on mTOR inhibition using lifespan extension effect

研究代表者

三上 靖夫（Mikami, Yasuo）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80360030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではmTORシグナルの一部分を担うPI3K/Akt経路に影響を及ぼすHGF/c-Metシグナルの椎間板への効果を検討した。培養椎間板細胞において、HGF/c-Metシグナルは椎間板変性に関与する髄核細胞数の減少に有効に作用する成長因子であり、外的ストレスによって生じる髄核細胞のアポトーシスから細胞を保護し、基質分解を抑制する作用があることを示した。椎間板変性の予防および治療に対してHGF/c-Metシグナルが有効である可能性があると考えた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of HGF/c-Met signaling on NP cell abnormality caused by using primary NP cells isolated from rabbit IVD. HGF significantly enhanced the proliferation of NP cells. Apoptosis of NP cells was significantly inhibited by HGF/c-Met signaling. Induction of the inflammation mediators was significantly suppressed by HGF/c-Met signaling. These findings demonstrate that activation of HGF/c-Met signaling suppresses various damages in NP cells. We suggest the clinical potential of HGF for counteracting IVD degradation involved in NP cell abnormalities.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：椎間板変性抑制 mTOR HGF/c-Met

1. 研究開始当初の背景

椎間板は中心部の髄核と外層の線維輪からなり、脊柱の可動性と支持性の保持に重要な役割を果たしている。髄核組織は髄核細胞とプロテオグリカンやコラーゲンなどの細胞外基質から構成される。椎間板はメカニカルストレス、reactive oxygen species (ROS) 刺激、TNF- や IL-1 などの炎症性サイトカイン、低栄養化などの外的ストレスに常時さらされている。椎間板変性には過度の外的ストレスによって生じる髄核細胞のアポトーシス、細胞外基質の産生低下や分解促進が大きく関与している。髄核は無血管組織であることや髄核細胞の増殖能が低いことから、いったん変性すると自己修復は期待できない。椎間板機能の破綻は椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症など種々の脊椎疾患が生じる要因となり、腰痛や神経症状を引き起こす可能性がある。椎間板変性の予防および治療には、髄核細胞の細胞増殖を促進したり、アポトーシスおよび細胞外基質分解を抑制することが重要となるが、椎間板変性に有効な治療法は確立されていない。

そこでわれわれは、細胞増殖促進、抗アポトーシス、抗炎症作用などさまざまな働きをもつと報告されている肝細胞増殖因子(HGF)とその特異的受容体である c-Met に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、髄核細胞における c-Met の発現や HGF の作用を検討することである。さらに ROS や炎症性サイトカイン刺激によって生じるアポトーシスや炎症関連・基質分解因子の発現に対する HGF の作用を評価し、HGF が椎間板変性を抑制させる有用な成長因子であるかを検証する。

3. 研究の方法

髄核細胞単離

日本白色家兔(14-18週齢)を、安楽死さ

せ腰椎から椎間板を採取した。各々の椎間板から髄核組織を採取し、初代培養を行った。

Western blotting

細胞を継代し、recombinant human HGF あるいは recombinant rabbit TNF- を投与した。タンパクを回収し、Western blotting を行った。一次抗体は rabbit anti-c-Met (1:1000 dilution、abcam) と mouse anti-GAPDH (1:1,000 dilution、abcam) を使用した。

HGF 投与による細胞増殖能の変化

HGF 投与下での細胞増殖能の変化を cell counting kit 8 (CCK-8) を用いて評価した。HGF を 0、1、10、100ng/ml 投与し、1、3、5、7 日間培養した。

アポトーシス誘導と HGF 投与

アポトーシスを、H₂O₂(0.1mM) あるいは TNF- (100ng/ml) 刺激によって誘導した上で、HGF を投与した。

アポトーシスの評価

ア) TUNEL 染色

アポトーシスの有無を terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を用いて評価した。レーザー共焦点顕微鏡で TUNEL 陽性細胞率を計算した。

イ) Caspase -3/7 活性測定

アポトーシス関連因子である Caspase-3 活性を Caspase-Glo 3/7 Assays を用いて評価した。

炎症関連・基質分解因子の mRNA 発現の評価

TNF- 刺激によって炎症を励起し、HGF 投与による炎症関連・基質分解因子の発現変化を real time RT-PCR で分析した。炎症関連因子である COX-2、基質分解因子である MMP-3、9、13、ADAMTS-5 遺伝子発現を real-time RT-PCR によって分析した。

Statistical analysis

One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test

を使用して行った。p 値が 0.05 以下を統計学的に有意差ありとした。

4. 研究成果

(結果)

髄核細胞における c-Met 発現

培養髄核細胞において、定常状態で c-Met 産生が確認され、産生量は HGF の投与によって低下した。

HGF の髄核細胞に対する増殖促進

髄核細胞の増殖能は、10、100ng/ml の HGF の添加で HGF 非投与群と比較して、3、5、7 日目で濃度依存的に有意に亢進した。

HGF による髄核細胞アポトーシスの抑制

過酸化水素刺激あるいは TNF- α 負荷後の髄核細胞のアポトーシスを TUNEL 染色および caspase3/7 の産生量で評価した。過酸化水素刺激下 HGF 投与群の TUNEL 陽性細胞の割合は $3.8 \pm 0.98\%$ であり、過酸化水素刺激群 $13.8 \pm 2.14\%$ と比較して低かった。同様に TNF- α 負荷 HGF 添加群の TUNEL 陽性細胞の割合は $24.5 \pm 2.94\%$ であり、TNF- α 負荷群 $39.3 \pm 6.27\%$ と比較して低かった。過酸化水素刺激下 HGF 添加群では、過酸化水素刺激群と比較して caspase3/7 の産生量は有意に低下した。TNF- α 負荷 HGF 添加群では、TNF- α 負荷群と比較して caspase3/7 の産生量は減少する傾向を認めた。

髄核細胞における炎症関連および基質分解因子の mRNA 発現に対する HGF の効果

炎症関連および細胞外基質分解因子の mRNA 発現は TNF- α 負荷によって有意に亢進した。TNF- α 負荷 HGF 添加群では、TNF- α 負荷群と比較して COX-2、MMP-3、-9 発現上昇が有意に抑制されたが、MMP-13、ADAMTS-5 発現に対しては明らかな効果を示さなかった。

(考察)

c-Met は HGF の特異的受容体であり、HGF がリガンドとして結合することで mitogen-activated protein kinase 経路や

phosphatidylinositol-3 kinase 経路などの細胞内シグナルが活性化する多機能因子である。本研究では、培養髄核細胞が c-Met を産生し、HGF 投与により細胞増殖能が促進することが判明した。HGF 投与による c-Met 発現の低下は HGF/c-Met シグナルにおける負のフィードバックに由来する受容体発現の調節と考えた。

アポトーシスには内因性 (ミトコンドリア) 経路と外因性 (デスレセプター) 経路があり、両経路共通の下流である caspase3/7 が活性化してアポトーシスが進行する。髄核細胞のアポトーシスは、力学的ストレスや ROS 刺激では内因性経路、炎症性サイトカインでは外因性経路で誘導されることが報告され、椎間板変性には両者の経路が関与してアポトーシスが生じていると考える。今回われわれは、過酸化水素刺激および TNF- α 負荷の両方を用いてアポトーシス誘導を行い、HGF/c-Met シグナルが内因性と外因性の両経路のアポトーシスから髄核細胞を保護することを示した。

変性した椎間板では、過剰に発現した炎症性サイトカインによって炎症関連因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B と略)、COX-2 や基質分解因子である MMPs、ADAMTS などの発現が上昇し、基質分解が促進する。これらの炎症性サイトカイン刺激による基質分解促進作用は、進行する椎間板変性の原因のひとつであると考えられる。HGF はさまざまな炎症性疾患に対して抗炎症作用をもつことが示され、膝蓋腱や関節軟骨において HGF が NF- κ B や COX-2 の発現を制御して炎症を抑制することが報告されている。本研究において、HGF が TNF- α で誘導される髄核細胞の COX-2、MMP-3、-9 発現を低下させることが明らかとなり、HGF は基質分解を抑制する作用を持つことが明らかとなった。

本研究で、HGF は髄核細胞の増殖を促進し、化学的ストレスによって生じるアポトーシ

スから細胞を保護し、基質分解を抑制することを示した。髄核細胞における HGF/c-Met シグナルを制御することにより、椎間板変性の進行を抑制できる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

石橋秀信、他 10名

Hepatocyte growth factor/c-Met promotes proliferation, suppresses apoptosis and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro, J Orthoped Res. 査読有、Volume 36 (4)、2016、709-716

〔学会発表〕(計5件)

石橋秀信、肝細胞増殖因子の培養髄核細胞に対する効果の検討、第29回日本整形外科学会基礎学術総会、2014年10月9-10日、鹿児島

石橋秀信、Hepatocyte growth factor/c-Met promotes proliferation, suppresses apoptosis and maintains extracellular matrix by retrieving up-regulated MMP-3 in rabbit nucleus pulposus cells in vitro、61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society、2015年3月29-30日、LasVegas, USA

石橋秀信、培養髄核細胞における肝細胞増殖因子の抗アポトーシスおよび基質分解抑制効果の検討、第30回日本整形外科学会基礎学術総会、2015年10月22-23日、富山

石橋秀信、Hepatocyte growth factor/c-Met suppresses apoptosis and matrix degradation in rabbit nucleus pulposus cells in vitro、62th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society、2016年3月7-8日、Florida, USA

石橋秀信、Hepatocyte growth factor/c-Met signal promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro、ISSLS Sessions at SpineWeek 2016、2016年5月17-20日、Singapore

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三上 靖夫(MIKAMI YASUO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：80360030

(2)研究協力者

石橋 秀信(ISHIBASHI HIDENOBU)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院生

阪田 宗弘(SAKATA MUNEHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院生

井辻 智典(ITSUJI TOMONORI)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院生