

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893151

研究課題名(和文) オートファジー制御による椎間板変性治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment strategies for intervertebral disc degeneration by modulating autophagy

研究代表者

由留部 崇 (YURUBE, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：10514648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脊椎椎間板の変性過程におけるオートファジーの役割を明らかにし、その制御が椎間板変性の有効な治療法になりうるか検証することであった。まず、薬剤を用いたオートファジーの誘導が椎間板細胞保護作用を有することを確認した。さらに、保護作用を来すのに最も有用なオートファジー関連シグナル経路への干渉高位を特定した。動物を用いた検討でもオートファジー誘導剤の経口投与が椎間板組織の細胞外基質分解を抑制することを確認した。本研究結果から、オートファジーならびに関連するシグナル経路の制御が椎間板変性の新たな治療・予防法となる可能性が示唆された。得られた知見を基にさらに研究を進める所存である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed the elucidation of roles of autophagy in intervertebral disc degeneration, providing insight into potential therapeutic targets. In our study, pharmacological induction of autophagy using rapamycin, an mTORC1 inhibitor, had protective effects against disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation. In addition, we found that partial inhibition of mTORC1 only, but not of Akt and mTORC2 which exist in the upstream of mTORC1, provides these beneficial effects on disc cells. Furthermore, discs of rapamycin-fed mice demonstrated decreased degradation of aggrecan, a major matrix molecules, by both of MMPs and ADAMTSs. These findings suggest modulation of autophagy and related mTOR signaling as a possible treatment strategy for degenerative disc disease.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板変性 オートファジー 老化 脊椎 整形外科

1. 研究開始当初の背景

腰痛は早急に解決すべき世界的な健康問題である。椎間板変性は腰痛の主たる独立した危険因子であるが、その発生機序は未だ明らかでない。変性椎間板に対する現在の治療の多くは切除を中心とした手術療法であり、結果的に椎間板を破壊し本来の機能を失うため、椎間板の機能を温存しつつ組織を再生させる新たな治療法の開発が急務である。

オートファジーはストレス下で細胞が自己組織を分解・再利用して恒常性維持を図る機構である。オートファジーが関節軟骨へ及ぼす影響を検討した報告が散見されるが、椎間板での報告は未だない。椎間板は人体最大の無血管組織であり、栄養の大部分を軟骨終板を介した椎体からの拡散に頼っている。そのため加齢などに伴う軟骨終板の硬化、石灰化により容易に栄養不足に陥り、低栄養が変性を生じる基盤となることは広く認識されている。そのため我々は、低栄養が契機となり変性が誘導される椎間板ではオートファジーが恒常性維持に重要な役割を担っていると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、椎間板変性過程におけるオートファジーの役割を明らかにし、オートファジーの制御が椎間板変性の有効な治療法になりうるか検証することである。

3. 研究の方法

本研究では以下の5つについて検討すべく、研究を行った。

オートファジーの誘導・阻害が椎間板へ及ぼす影響を明らかにする研究

椎間板でオートファジーを誘導するための最適な方法・シグナルを明らかにする研究

椎間板髄核、線維輪、関節軟骨組織ごとのオートファジー活性の差を明らかにする研究

オートファジーが生体内の椎間板で及ぼしている影響を明らかにする研究

生体内の椎間板でオートファジーを誘導することで変性が抑制可能か明らかにする研究

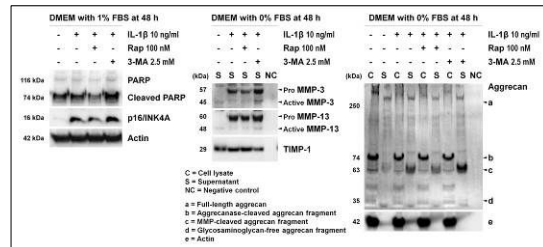
4. 研究成果

オートファジーの誘導・阻害が椎間板へ及ぼす影響を明らかにする研究

まずはピッツバーグ大学(アメリカ)との共同研究でウサギ椎間板細胞を培養し、IL-1 β (10 ng/ml) で炎症刺激を誘導した後にオートファジー誘導剤ラパマイシン、阻害剤3-MAを加え、反応を観察した。炎症刺激により誘導された細胞死(アポトーシス)、細胞老化(セネッセンス)はラパマイシン添加にて抑制され、3-MA添加にてさらに増大された。また、炎症刺激により基質分解酵素であるMMP-3、MMP-13の発現、活性化と代

表的な細胞外基質であるアグリカンの分解が誘導されたが、ラパマイシンによりMMP-3、MMP-13の発現は抑制され、MMP由来アグリカン分解産物も減少していた。一方で3-MAによりこれらはいずれもさらに強く産生されていた。

図1 ラパマイシン(Rap)と3-MAが椎間板細胞へ及ぼす影響

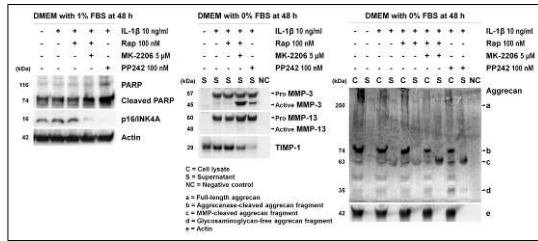


当研究室ではヒト椎間板不死化細胞株を用いて同様の検討を行うとともに、オートファジー必須蛋白 Atg5 に対して RNA 干渉を行い、Atg5 の発現を特異的に抑制した。Atg5 の抑制によりオートファジー活性は低下し、アポトーシスとセネッセンスが増大することが確認された。以上の結果から、3-MA や Atg5 抑制によるオートファジー阻害は炎症刺激を助長してしまう一方、ラパマイシンによるオートファジーの活性化は椎間板細胞保護作用を来す可能性が示唆された。

椎間板でオートファジーを誘導するための最適な方法・シグナルを明らかにする研究

ラパマイシンは mTOR シグナル経路で mTORC1 を特異的に抑制することでオートファジーを誘導する。そのため、mTOR シグナル経路の最適な干渉部位を探るべく、ウサギ椎間板細胞に対してラパマイシンだけでなく mTORC1 の上流に位置する Akt の阻害剤 MK-2206 を添加した群、mTORC1 のみでなく Akt のさらに上流に位置する mTORC2 まで阻害する mTORC1・mTORC2 二重阻害剤 PP242 を投与した群を作成し、ラパマイシン単独投与群と比較検討した。これらの阻害剤を投与した群ではオートファジーをより強力に誘導する一方でアポトーシスや細胞外基質分解を誘導する結果であった。従って、mTOR シグナル経路の広範な抑制は椎間板細胞保護作用を来さない結果であった。以上より、ラパマイシンに代表される mTORC1 のみの阻害が椎間板保護に繋がる可能性が示唆された。

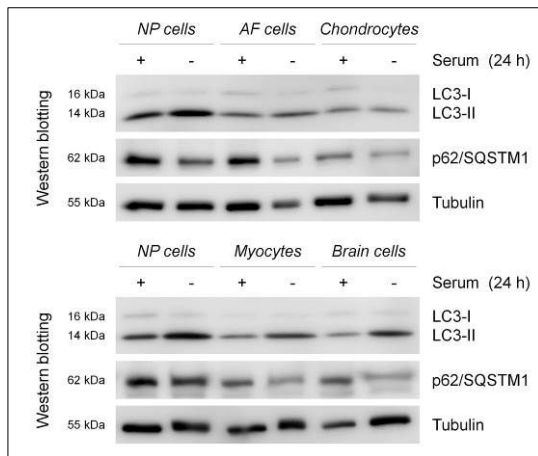
図2 ラパマイシン(Rap)、MK-2206、PP242が椎間板細胞へ及ぼす影響



椎間板髓核、線維輪、関節軟骨組織ごとのオートファジー活性の差を明らかにする研究

生体内の筋骨格組織におけるオートファジーの重要性を検討するために、ラット椎間板髓核(NP)、椎間板線維輪(AF)、膝軟骨、大腿四頭筋、脳組織より細胞を抽出し、定常状態(10%血清添加培地)と飢餓状態(無血清添加培地)培養した。定常状態においては椎間板髓核細胞でオートファジーマーカー蛋白LC3とオートファジー基質p62/SQSTM1の発現を最も多く認めた。飢餓状態においては各細胞群でオートファジーの誘導が確認されたが、椎間板髓核細胞でLC3の誘導型であるLC3-IIが最も多く発現し、p-62/SQSTM1の発現低下がみられ(オートファジーによる消費 活性上昇)、オートファジーの著明な誘導が確認された。以上より、筋骨格系細胞のなかでも椎間板髓核細胞の恒常性維持におけるオートファジーの重要性が示唆された。

図3 筋骨格系細胞間でのオートファジー活性の比較

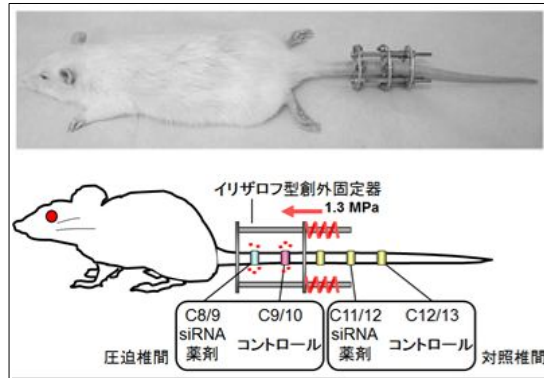


オートファジーが生体内の椎間板で及ぼしている影響を明らかにする研究

我々が確立したラット尾椎に圧負荷を加えることで椎間板変性を誘起する動物モデルの椎間板において、オートファジー必須蛋白であるAtg5を特異的に抑制する遺伝子(Atg5 siRNA)を導入した椎間板と特異的な遺伝子干渉を来さないControl siRNAを導入した椎間板を作成し、椎間板変性度に差があるかを検討した。Atg5 siRNA群で

Control siRNA群に比べて早期に椎間板変性を来す傾向がみられたが、未だ明らかな差を結論付けるには至っておらず、現在も実験を継続している。

図4 ラット尾椎椎間板変性動物モデル

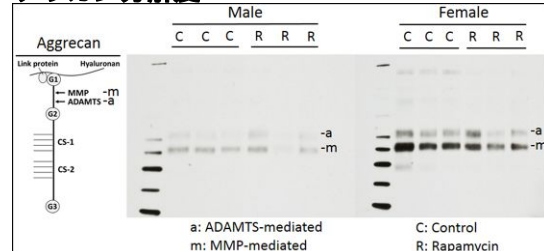


生体内の椎間板でオートファジーを誘導することで変性が抑制可能か明らかにする研究

上記動物モデルの椎間板にラパマイシンを投与して椎間板変性度に差があるか検討する実験を現在行っている。ラパマイシン投与椎間板において単純X線像で圧負荷による椎間板の狭小化が抑制されることが観察されており、現在は椎間板の組織学的検討を行っている。今後も実験を継続する予定である。

並行してピッツバーグ大学、ミシガン大学(いずれもアメリカ)との共同研究で、ラパマイシンの経口投与を行った野生型マウスとマーマセットを一定の年齢まで飼育し、椎間板組織での変性像を観察する研究を行った。ラパマイシン投与群の椎間板では非投与群と比較して代表的な細胞外基質であるアグリカンの分解産物が基質分解酵素MMP由来のものとは別の基質分解酵素ADAMTS由来のものいずれもが減少していることが確認され、ラパマイシンが退行性変化である椎間板変性に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

図5 ラパマイシン経口投与マウス(R)と非投与マウス(C)の椎間板組織におけるアグリカン分解度



上記 ~ の検討により、細胞恒常性維持機構である自食作用オートファジーが脊椎椎間板において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかしながらラパマイシンによる椎間板保護作用はオートファジーの誘導よりも mTORC1 阻害に由来する可能性が高く、椎間板におけるオートファジーの役割を明らかにするには Atg5 に関する機能実験を継続する必要がある。また、ラパマイシンとその誘導体は免疫抑制剤やがんへの分子標的薬として臨床で用いられており、椎間板変性治療・予防のための長期経口投与では副作用の問題が懸念される。そのため動物モデルを用いた我々の検討で椎間板局所投与の有用性を示すことができれば、将来的な臨床応用への道を開くことができると考えられる。多くの国民が苦しんでいる腰痛への新たな治療を確立すべく、今後も研究を継続し、成果を報告していきたい。

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 15 件)

由留部 崇 他、Rapamycin, a mTORC1 inhibitor, protects the intervertebral disc against cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation through Akt activation rather than autophagy induction、61st Orthopaedic Research Society、2015.3.28-31、ラスベガス(アメリカ)

由留部 崇 他、Rapamycin, a mTORC1 inhibitor, has beneficial, but other mTOR modulators have harmful effects on the intervertebral disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation、第 44 回日本脊椎脊髄病学会、2015.4.16-18、福岡国際会議場(福岡県)

由留部 崇 他、Protective effects of rapamycin against intervertebral disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation are linked to Akt phosphorylation as well as to autophagy induction、42nd International Society for the Study of the Lumbar Spine、2015.6.8-12、サンフランシスコ(アメリカ)

由留部 崇 他、Rapamycin, but not other mTOR modulators, is protective against intervertebral disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation、42nd International Society for the Study of the Lumbar Spine、2015.6.8-12、サンフランシスコ(アメリカ)

Prashanti P, Ngo K, Pohl P, 由留部 崇 他、The anti-aging agent rapamycin mitigates age-associated proteoglycan matrix loss in intervertebral discs of the nonhuman primate marmoset model、42nd International Society for the Study of the Lumbar Spine、2015.6.8-12、サンフランシスコ(アメリカ)

由留部 崇 他、ラパマイシン以外の mTOR 阻害薬は椎間板細胞におけるアポトーシス、セネッセンス、細胞外基質分解を抑制しない、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015.10.22-23、富山国際会議場(富山県)

由留部 崇 他、ラパマイシンの椎間板細胞保護作用はオートファジーの誘導だけでなく Akt 活性の上昇に由来している、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015.10.22-23、富山国際会議場(富山県)

角谷 賢一郎、由留部 崇 他、椎間板変性と抗老化因子との関係について、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015.10.22-23、富山国際会議場(富山県)

伊藤 雅明、由留部 崇 他、mTOR シグナル経路への選択的な干渉は椎間板における細胞死、老化と細胞外基質分解を抑制する、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015.10.22-23、富山国際会議場(富山県)

由留部 崇 他、Intervertebral disc nucleus pulposus is a major autophagy-involved musculoskeletal organ and its degeneration is linked with decreased autophagy、62nd Orthopaedic Research Society、2016.3.5-8、オーランド(アメリカ)

伊藤 雅明、由留部 崇 他、Selective interference of mTOR signaling is protective against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation with autophagy induction、62nd Orthopaedic Research Society、2016.3.5-8、オーランド(アメリカ)

由留部 崇 他、椎間板では他の筋骨格系組織よりもオートファジーの関与が大きく、その活性は変性ととともに減少する：オートファジー制御による椎間板変性予防の可能性、第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016.4.14-16、幕張メッセ(千葉県)

伊藤 雅明、由留部 崇 他、mTOR シグナル経路への選択的な干渉はオートファジーと Akt の活性化を誘導し、ヒト椎間板細胞における細胞死、老化と細胞外基質分解を抑制する、第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016.4.14-16、幕張メッセ(千葉県)

由留部 崇 他、Intervertebral disc nucleus pulposus has intensive involvement of autophagy compared to other musculoskeletal tissues and its degeneration is linked with decreased autophagy、43rd International Society for the Study of the Lumbar Spine (Spineweek 2016)、2016.5.16-20、シンガポール(シンガポール)

伊藤 雅明、由留部 崇 他、Selective interference of mTOR signaling is protective against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation with autophagy induction、43rd International Society for the Study of the Lumbar Spine (Spineweek 2016)、2016.5.16-20、シンガポール(シンガポール)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

由留部 崇 (YURUBE, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10514648

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：