

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03801

研究課題名（和文）c-fos/AP-1阻害薬の疼痛制御機構とsc-RNAseq解析での椎間板再生

研究課題名（英文）Regeneration of intervertebral disc and control of low back pain with selective inhibitor of c-fos/AP-1

研究代表者

関 庄二（Seki, Shoji）

富山大学・学術研究部医学系・講師

研究者番号：00432112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、椎間板変性の原因遺伝子CILPを同定し（Nat Genet, 2005）、そのTg miceは、加齢により変性が促進した（BBRC, 2014）。今回我々は、ヒト皮膚細胞にKlf4, c-Myc, NOTO, SOX5,6,9遺伝子を導入し、direct reprogramming法と3次元培養の併用によりiPS髄核細胞を作成することに成功し、報告した（IJMS, 2022）。これで、ヒト皮膚細胞から直接髄核細胞を作成でき、細胞治療が可能となる。また思春期特発性側弯症の原因として黄色靭帯肥厚が関与する可能性も突き止めた（IJMS, 2022）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により直接ヒト皮膚細胞から椎間板の髄核細胞をiPSの技術を用いて分化誘導することに成功した。椎間板再生治療には、細胞治療、サイトカイン治療、薬物治療などさまざまな方法をこれまでも試みてきたが、細胞治療には、再生治療の可能性が最もあるにもかかわらず、細胞ソースに問題があった。本研究により細胞ソースの問題点が解決された。本研究の学術的意義は、細胞治療に基づく椎間板の再生において、ヒト皮膚細胞から直接髄核細胞に分化誘導でき、細胞治療の可能性を飛躍的に高めたと考えられる。また椎間板再生ができれば、ヘルニアや狭窄症などを含めた腰椎疾患患者の治療に多大な貢献ができ、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We identified a susceptibility gene for intervertebral disc degeneration, CILP (Nat Genet, 2005), whose degeneration accelerated with age in Tg mice (BBRC, 2014). This time, we introduced Klf4, c-Myc, NOTO, SOX5,6,9 genes into normal human dermal fibroblasts (NHDFs) and succeeded in creating iPS nucleus pulposus (NP) cells by direct reprogramming method and 3D culture. (IJMS, 2022). From above, NP cells can be created directly from NHDFs, making cell therapy possible. We also identified the possibility that ligamentum flavum hypertrophy is involved in the progression of adolescent idiopathic scoliosis (IJMS, 2022).

研究分野：脊椎

キーワード：脊椎 椎間板 黄色靭帯 思春期特発性側弯症 ダイレクトリプログラミング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰椎椎間板ヘルニアは、腰部脊柱管狭窄症の原因にもなり、腰痛の大きな原因のひとつであり、椎間板変性をもとに発症する。本邦での罹患率は約1%で、男女比は2.5:1である。申請者らは腰椎椎間板ヘルニア患者の相関解析からCILP遺伝子を同定した(Nat Genet, 2005)。さらにCILPを椎間板の髄核特異的発現ベクター(J Cell Biol, 1996)に導入し、髄核特異的にCILPが発現するTgマウスを作製し解析すると、ヒトの加齢変性に類似したマウスを作成した(Biochem Biophys Res Commun, 2014)。

IL-1bは、転写因子AP-1を介しMMPsやADAMTSsの発現を上昇させ、椎間板を分解する。その抑制因子であるc-fos/AP-1阻害薬(T-5224)(Nature Biotech 26;817, 2008)の効果をヒト髄核細胞で解析した(Sci Rep, 2017)。IL-1bにより椎間板変性を導入し、その後T-5224を加えると有意にMMPs, ADAMTSs(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)の発現を抑制し、椎間板基質である型コラーゲンの合成を促進し、マウス器官培養下でもT-5224の椎間板変性抑制効果を確認した。我々は、椎間板変性を進行させるMMPs(Matrix metalloproteinase)の発現を阻害するT-5224を使い変性、破壊抑制効果および疼痛軽減能力を発見した。一方椎間板疾患の感受性遺伝子として同定したCILP(cartilage intermediate layer protein)のトランスジェニックマウス(CILP Tg)は、変性が加齢とともに進行し、ヒトの病態と同じであることを証明した。

また我々は、これまで軟骨細胞の起源同定、またSik3KOマウス(Serine/threonine-protein kinase 3)や膝関節軟骨欠損モデルを用いて軟骨再生にも取り組んできた(Nat Commun, 2016, Transplantation, 2012, Tissue Eng Part A, 2016)。さらに申請者らは近年scRNA-seq解析にて破骨細胞の起源の一部が、hematopoietic stem cell(HSC)でなく胎児yolk-sac(YS)に由来すること世界で初めて報告した(Nat cell biol 2019 Accepted)。

さらに我々は思春期特発性側弯症の発症メカニズムの一つとしてビタミンD結合蛋白が重要であることを報告した(BMC Musculoskelet Disord. 2019)。さらに進行メカニズムに黄色靭帯が関与している可能性についても研究している。

2. 研究の目的

本研究目的は、このCILP Tg(加齢モデル)と椎間板穿刺モデルを用い、T-5224投与後の疼痛軽減メカニズムを解明し、新規疼痛関連蛋白質の同定を行うことである。またサル椎間板穿刺モデルにおける椎間板修復効果および疼痛軽減効果を検証する。さらに椎間板が高度に破壊されたヒトを対象に、sc-RNA seq(single-cell RNA sequence)解析によりヒトiPS髄核細胞、線維輪細胞を作成、スフェロイドで3D構築した椎間板組織を作成し、ヌードラットに移植し椎間板再生法の確立を目指すことである。

また思春期特発性側弯症の原因解明をこれまで取り組んできており、黄色靭帯肥厚に着目した進行メカニズムの解明をすることである。

3. 研究の方法

iPS 髄核・線維輪細胞の樹立と3D椎間板構築

ヒト皮膚細胞に、MYC, KLF4, NOTO, SOX9を遺伝子導入したgroup1(NOTO-SOX9)と、MYC, KLF4, NOTO, SOX5,6,9の遺伝子を導入したgroup2(NOTO-SOXtrio)の2グループ間で比較した。各グループでReal-time PCR, Safranin-O染色, 蛍光免疫染色, 形態学的変化, Genome-wide Microarray analysis, FACSにて比較検討した。またnegative controlとしてヒト皮膚細胞、positive controlとしてヒト髄核細胞を使用した。

黄色靭帯肥厚に着目した思春期特発性側弯症の発症メカニズム

対象は、手術的加療を施行した胸椎カーブを呈するAIS患者25名(平均年齢13歳)である。手術時に摘出した黄色靭帯をAzan染色, EVG染色を用いて膠原繊維と弾性繊維の比(膠原繊維/弾性繊維)を凹側と凸側で比較検討した。側弯凹側、凸側群の黄色靭帯細胞でマイクロアレイを行った。さらにneutral vertebra(側弯のない部分)から摘出した黄色靭帯をControl群として、Control群と凸側群でもマイクロアレイを行い、発現量差を検討し、同定した遺伝子の機能解析を行った。

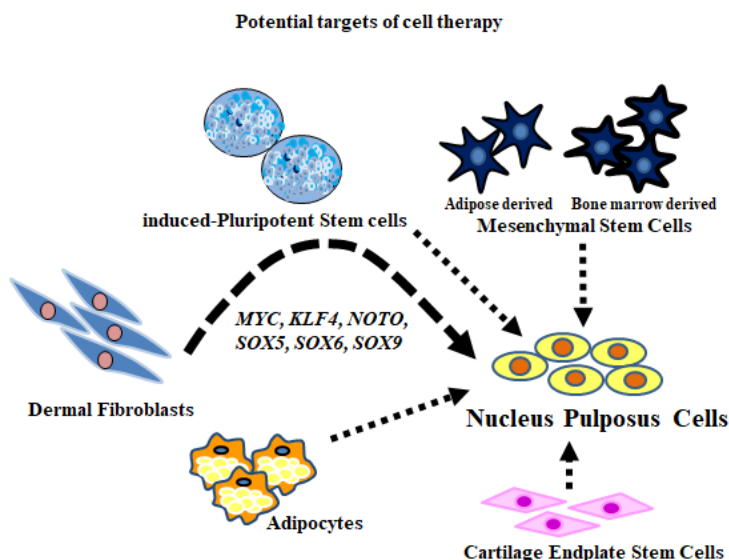
4. 研究成果

iPS 髄核・線維輪細胞の樹立と3D椎間板構築

Real-time PCRでは、NOTO-SOX9よりNOTO-SOXtrioグループで有意にAGC, COL2A1, COL9A2などの軟骨特異的遺伝子発現の上昇を認めた($p < 0.05$)。さらに髄核特異的遺伝子のGD2, CD24, Tie2などの遺伝子もnegative controlより有意な上昇を認めた($p < 0.05$)。Safranin-O染色では、NOTO-SOXtrioグループで最も強いメタクロマジアを示し、蛍光免疫染色でも、NOTO-SOXtrioグループでAGC, COL2A1の強い染色性を示した。またNOTO-SOXtrioグループでは、髄核特有の

空砲形成やコロニー形成を認め、Genome-wide Microarray でも positive control の髄核細胞と似たような発現パターンを呈していた。FACS 解析から、成熟度の高い髄核細胞であることが分かった。ヒト皮膚細胞から NOTO-SOXtrio の遺伝子導入により髄核細胞とほぼ同様の細胞を作ること的成功し、報告した(図1)(Int J Mol Sci. 2022)。本研究の結果は、今後の細胞治療に大きく貢献できると考えられる。

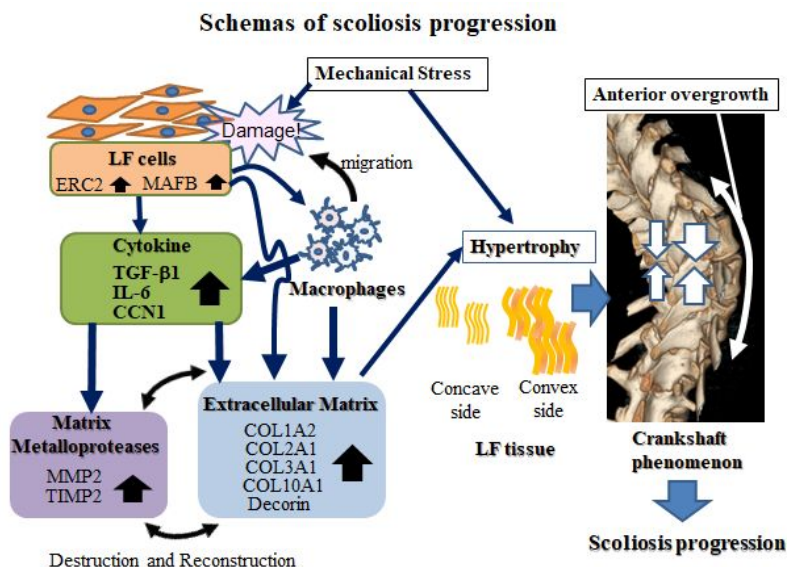
図1 細胞治療に向けた皮膚細胞からダイレクトリプログラミングを用いた髄核細胞への分化 (Int J Mol Sci. 2022)



黄色靭帯肥厚に着目した思春期特発性側弯症の発症メカニズム

Azan 染色では、凸側で膠原繊維の増生を認めた。EVG 染色では、膠原繊維と弾性繊維の比は凹側 0.49、凸側 0.94 で有意に凸側が高かった ($P < 0.005$)。凹側と凸側のマイクロアレイから 7 遺伝子に発現量に差を認め、ERC2 がウエスタンブロットで発現量が凸側で有意に高かった。また Control と凸側のマイクロアレイでは、47 遺伝子に差を認め、その中で MAFB が、ウエスタンブロットで凸側の発現上昇を認めた。黄色靭帯細胞に ERC2 を強制発現させると COL1A2, COL3A1, TGF- β 1 の発現上昇を有意に認め、MAFB を強制発現させると IL-6 の発現上昇を認めた。黄色靭帯細胞に IL-6 と TGF- β 1 の同時添加で、有意に COL1A2 と COL3A1 の発現上昇を認めた。黄色靭帯肥厚は、正常 < 凹 < 凸の順に認め、凸側で弾性繊維の低下を認めた。マイクロアレイ解析から ERC2、MAFB が凸側で有意に高く、TGF- β 1 や IL-6 を介して黄色靭帯肥厚を引き起こしたと考えられた。黄色靭帯肥厚に伴う後方支持組織の硬化により、側弯症が悪化した可能性が考えられた(図2)。上記の側弯進行メカニズムについて、報告した(Int J Mol Sci. 2022)。

図2 黄色靭帯肥厚に基づく側弯進行のメカニズム (Int J Mol Sci. 2022)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seki Shoji, Iwasaki Mami, Makino Hiroto, Yahara Yasuhito, Miyazaki Yoshitaka, Kamei Katsuhiko, Futakawa Hayato, Nogami Makiko, Tran Canh Tung Nguyen, Hirokawa Tatsuro, Tsuji Mamiko, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 23
2. 論文標題 Direct Reprogramming and Induction of Human Dermal Fibroblasts to Differentiate into iPS-Derived Nucleus Pulposus-like Cells in 3D Culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4059 ~ 4059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ide Shintaro, Yahara Yasuhito, Kobayashi Yoshihiko, Strausser Sarah A, Ide Kana, Watwe Anisha, Xu-Vanpala Shengjie, Privratsky Jamie R, Crowley Steven D, Shinohara Mari L, Alman Benjamin A, Souma Tomokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Yolk-sac-derived macrophages progressively expand in the mouse kidney with age	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e51756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.51756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yahara Yasuhito, Barrientos Tomasa, Tang Yuning J., Puvindran Vijitha, Nadesan Puvindran, Zhang Hongyuan, Gibson Jason R., Gregory Simon G., Diao Yarui, Xiang Yu, Qadri Yawar J., Souma Tomokazu, Shinohara Mari L., Alman Benjamin A.	4. 巻 22
2. 論文標題 Erythromyeloid progenitors give rise to a population of osteoclasts that contribute to bone homeostasis and repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-019-0437-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki S, Iwasaki M, Makino H, Yahara Y, Kondo M, Kamei K, Futakawa H, Nogami M, Watanabe K, Tran Canh Tung N, Hirokawa T, Tsuji M, Kawaguchi Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Association of Ligamentum Flavum Hypertrophy with Adolescent Idiopathic Scoliosis Progression-Comparative Microarray Gene Expression Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23095038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関 庄二、牧野紘士、箭原康人、野上真紀子、渡邊健太、近藤美穂、亀井克彦、川口善治
2. 発表標題 特発性側弯症患者における黄色靭帯肥厚に着目した発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第36回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 庄二、牧野紘士、箭原康人、野上真紀子、渡邊健太、近藤美穂、亀井克彦、川口善治
2. 発表標題 思春期特発性側弯症患者における黄色靭帯肥厚のメカニズムの検討
3. 学会等名 第35回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 庄二、牧野紘士、箭原康人、亀井克彦、二川隼人、野上真紀子、Nguyen Tran Canh Tung、廣川達郎、岩崎真美、辻真美子、宮崎義孝、川口善治
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミング法によるヒト皮膚細胞から髄核細胞への分化誘導
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 庄二、牧野紘士、箭原康人、野上真紀子、渡邊健太、近藤美穂、亀井克彦、二川隼人、廣川達郎、岩崎真美、Nguyen Tran Canh Tung、川口善治
2. 発表標題 特発性側弯症患者における頂椎部黄色靭帯肥厚に着目した進行メカニズムの解明
3. 学会等名 第37回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2022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	野上 真紀子 (Nogami Makiko) (30750202)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究 分担者	牧野 紘士 (Makino Hiroto) (50816022)	富山大学・附属病院・医員 (13201)	
研究 分担者	箭原 康人 (Yahara Yasuhito) (60456390)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	

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