

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462289

研究課題名(和文) 脊椎椎間板変性制御の病態解明および治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the treatment and pathophysiology based on the suppression of the intervertebral disc degeneration .

研究代表者

関 庄二 (Seki, Shoji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：00432112

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)：CILPTgおよびノーマルマウスの髄核組織の染色性が有意にTgマウス群で低下していた(椎間板のSafraninO染色)。Tgマウスの腰椎MRIT2強調画像で腰椎椎間板の輝度は低下しており、椎間板変性の進行が明らかになった。また椎間板変性抑制の実験では転写因子AP-1を標的にした。AP-1は椎間板を分解するMMP3,13やADAMTS4,5の発現を上昇する。AP-1阻害剤を用いたin vitro,in vivoの実験でIn vitroではこの阻害剤はヒト髄核細胞でMMPsやADAMTSsの発現を抑制した。In vivoでも同様にマウス椎間板穿刺変性モデルにおいてより有意に椎間板変性を抑制できた。

研究成果の概要(英文)：Safranin O staining in intervertebral disc were significantly decreased in Nucleus pulposus tissues of CILP Tg mice compared to controls. MRI analysis indicated obvious progression of degenerative intervertebral discs in Tg mice, which suggested reduction of the intensity of lumbar T2 weighted MR imaging.

We focused on the AP-1 of transcriptional factor which was therapeutic target for suppressing the intervertebral disc degeneration.AP-1 was expressed by MMP3, MMP13, ADAMTS4, and 5. An inhibitor of AP-1 was utilized by the experimental analysis of both in vitro and in vivo. This inhibitor was suppressed by the expression of both MMPs and ADAMTSs in in vitro. The intervertebral disc degeneration model which was induced by puncturing the intervertebral discs of mice tail was utilized by the in vivo analysis. An administration of the AP-1 inhibitor suppressed the intervertebral disc degeneration in this model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CILP 腰椎椎間板 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

我々は腰椎椎間板ヘルニア患者の DNA サンプルで、大規模な相関解析を行い、CILP 遺伝子 (cartilage intermediate layer protein) の I395T において有意な相関を見出した。さらに *in vitro* の機能解析から、CILP 蛋白の高発現が椎間板変性に関わる可能性を見出した (Seki S et al, Nature Genet, 2005)。

CILP トランスジェニックマウス(以下 Tg マウス)を作成し、表現型の解析や *in vivo* における CILP の役割を詳細に検討することで腰椎椎間板ヘルニア、椎間板変性の発症メカニズムの一端を解明したいと考え、以下の Tg マウスを作製した。CILP Tg マウスの作成の方法は、軟骨特異的発現ベクター pNASSb(COL11A2 promoter, IVS1) を用い、このベクターに CILP 遺伝子(C 末に HA tag を挿入)を導入しマイクロインジェクションによって Tg マウスを作成した。またこの Tg マウスを用い、表現型を解析した。この Tg マウスの椎間板の構造(髄核、線維輪)を、組織学的に確認すると、サフランin-O 染色にて髄核組織の染色性が有意に Tg マウス群で低下していた。さらに作成した各系統ごとに脊椎椎間板を MRI で評価すると、Tg マウスの腰椎 MRIT2 強調画像において、腰椎椎間板の輝度はノーマルマウスと比べて低下していたことから、明らかな椎間板変性の進行が認められたと考えられる。また各系統間の Tg マウスとノーマルマウスで、腰椎レントゲン上の椎間板高の違いを有意に認めている。

次に我々は、椎間板変性の進行を阻止するために、椎間板変性病態の最も下流で、アグリカンの分解に直接働くアグリカン分解酵素 ADAMTS5 を阻害することを試みてきた。ADAMTS5 遺伝子の siRNA オリゴを家兔椎間板に直接投与し、これによって椎間板変性抑制効果が得られることを報告してきた (Seki et al. Arthritis Res Ther)。しかし siRNA の局所投与には、侵襲性と複数椎間板変性への適応の限界があるため、これに代わる全身投与可能な治療戦略が必須である。そこでわれわれは、ADAMTS5 を含め、より上流で椎間板代謝の catabolism を制御できる可能性の高い c-fos/AP-1 を治療の標的分子とすることとした。転写因子 AP-1 は MMP3, MMP13 や ADAMTS4,5 の発現を上昇させ、椎間板基質を分解する。これを抑制するものとして、低分子化合物である c-fos/AP-1 特異的阻害剤を用い、既に *in vitro* の系で椎間板髄核細胞における効果を確認している。これを抑制するものとして、低分子化合物である c-fos/AP-1 特異的阻害剤を用い、既に *in vitro* の系で椎間板髄核細胞における効果を確認している。この候補薬は研究協力者である九州大学別府病院の塩澤俊一教授より既に供与されており (Nature Biotech 26;817, 2008)、ヒトへの投与も可能

である。

2. 研究の目的

腰椎椎間板疾患の発症・進行には種々の要因が関与しているが、その真の病態は未だ明らかでなく、また実際に有効な進行阻止手段もない。本研究は椎間板変性の病態解明を基盤に、その中心となる椎間板基質(マトリックス)の分解と合成をターゲットとし、これにかかわる分子および細胞を制御することにより、疾患の新たな治療戦略を試みようとするものである。

具体的には、以下の2つを行う。

椎間板変性感受性遺伝子 CILP が椎間板代謝・変性に及ぼす機能を、CILP Tg マウスを用い *in vivo* で解析することにより、椎間板変性メカニズムの中心事象を解明する。

臨床応用を目指して c-fos/AP-1 特異的阻害剤をマウスに経口投与し、マウス椎間板穿刺変性モデルを用いて、椎間板変性抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

について

CILP Tg マウスと正常マウスの解析で、椎間板の MRI 上の変性度、Safranin-O の染色性、X 線上の椎間板高に違いを認めている。さらにこの Tg マウスの頸椎に不安定性を導入(力学的負荷)すると椎間板変性が促進されることを知りえている。このモデルを用い椎間板変性開始早期の変化を形態学的に詳細に解析するとともに、椎間板におけるマトリックス代謝および CILP-TGFb-Smad シグナル変化を明らかにする。

について

C57BL/6 マウス 24 匹の尾椎に針を刺し、椎間板穿刺モデルを作成する。AP-1 阻害剤 (T5224) をマウスに経口投与し、実際に椎間板変性が起きるかどうかを単純 X 線, MRI, Safranin-O 染色で偽薬経口投与群と比較して組織学的に比較検討を行う。

4. 研究成果

について

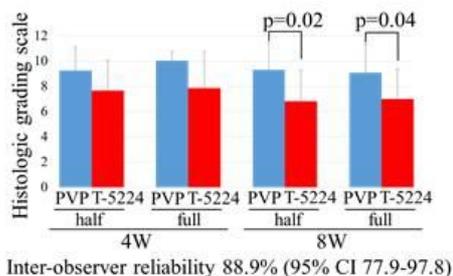
CILP 蛋白は、TGF-b シグナルにより発現上昇することが、RT-PCR および免疫組織化学的に明らかになった。また CILP 蛋白と TGF-b は direct に結合し、TGF-b シグナルの下流の Smads シグナルを抑制していた。

について

マウス尾椎の単純 X 線像では、4 週投与ラットにおいて、T5224 投与群と偽薬群で比較すると 2 群間に差を認めなかったが、8 週投与ラットにおいては T5224 投与群のほうが偽薬群に比べて椎間板高減少が有意に抑制された。MRI T2mapping において、4 週投与では、貫通で差を認めず、半分穿刺でプラセボ群に比べ T5224 群では有意に T2 値が高

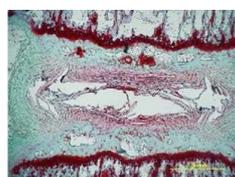
った。また 8 週投与では、半分穿刺、貫通のどちらも偽薬群に比べ T5224 群で有意に T2 値が高かった。さらに Safranin-O 染色を用いた組織学的な評価でも、有意に T5224 投与群で椎間板変性が抑制されていた (図 1, 2)

図 1 Safranin-O 染色での組織学的評価



half: half puncture, full: full puncture
PVP: 偽薬, T5224: c-fos/AP-1 阻害薬
Grading scale (Masuda らの方法を使用)

図 2 Safranin-O 染色の結果



PVP



T5224

PVP: 偽薬, T5224: c-fos/AP-1 阻害薬

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 6 件)

- 1) Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, Fujita K, Itoh Y, Nakamura M, Fuchino H, Kawahara N, Fukui N, Watanabe A, Kimura T, Tsumaki N. Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*. *Nat Commun*. 2016 Mar 24;7:10959.
- 2) Nogami M, Kimura T, Seki S, Matsui Y, Yoshida T, Koike-Soko C, Okabe M, Motomura H, Gejo R, Nikaido T. A Human Amnion-Derived Extracellular Matrix-Coated Cell-Free Scaffold for Cartilage Repair: In Vitro and In Vivo

Studies. *Tissue Eng Part A*. 2016 Apr;22(7-8):680-8.

- 3) Nakamura Y, Kikugawa S, Seki S, Takahata M, Iwasaki N, Terai H, Matsubara M, Fujioka F, Inagaki H, Kobayashi T, Kimura T, Kurahashi H, Kato H. PCSK5 mutation in a patient with the VACTERL association. *BMC Res Notes*. 2015 Jun 9;8:228.
- 4) Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*. 2014 Sep 25;513(7519):507-11.
- 5) Seki S, Tsumaki N, Motomura H, Nogami M, Kawaguchi Y, Hori T, Suzuki K, Yahara Y, Higashimoto M, Oya T, Ikegawa S, Kimura T. Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 18;446(4):876-81.
- 6) Song YQ, Karasugi T, Cheung KM, Chiba K, Ho DW, Miyake A, Kao PY, Sze KL, Yee A, Takahashi A, Kawaguchi Y, Mikami Y, Matsumoto M, Togawa D, Kanayama M, Shi D, Dai J, Jiang Q, Wu C, Tian W, Wang N, Leong JC, Luk KD, Yip SP, Cherny SS, Wang J, Mundlos S, Kelempisioti A, Eskola PJ, Männikkö M, Mäkelä P, Karppinen J, Järvelin MR, O'Reilly PF, Kubo M, Kimura T, Kubo T, Toyama Y, Mizuta H, Cheah KS, Tsunoda T, Sham PC, Ikegawa S, Chan D. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J Clin Invest*. 2013 Nov;123(11):4909-17.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) 牧野紘士, 川口善治, 齋藤 充, 関 庄二, 安田剛敏, 鈴木賀代, 渡邊健太, 木田吉城, 丸毛啓史, 木村友厚. 脊椎変形疾患における椎間板および黄色靭帯内の AGEs-AGEs は脊椎変形に關与するか. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会; 2015 Oct. 22-23; 富山.
- 2) 箭原康人, 木村友厚, 妻木範行. 変形性關節症性変化における *Sik3* の役割. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会; 2015 Oct. 22-23; 富山.
- 3) 箭原康人, 関 庄二, 牧野紘士, 塩沢俊一, 妻木範行, 木村友厚. 選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬によるマウスの椎間板変性抑制効果. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会; 2015 Oct. 22-23; 富山.
- 4) 牧野紘士, 関 庄二, 元村 拓, 箭原康人, 野上真紀子, 渡邊健太, 塩沢俊一,

- 木村友厚．ラット椎間板穿刺モデルを用いた c-Fos/A 阻害薬の椎間板変形抑制効果．第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会；2015 Oct. 22-23；富山．
- 5) 野上真紀子，関 庄二，元村 拓，下条竜一，杉森一仁，渡邊健太，牧野紘土，二階堂敏雄，木村友厚．羊膜由来細胞外マトリックスと PLGA 担体を用いたサル膝関節軟骨修復．第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会；2014 Oct. 9-10；鹿児島．
- 6) 箭原康人，木村友厚，妻木範行．マウス OA モデルにおける関節軟骨細胞分化の解析．第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会；2014 Oct. 9-10；鹿児島．
- 7) Makino H, Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Kimura T. Lumbar disc degeneration progression in young adults in their 20's. 41st Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine; 2014 Jun. 3-7; Seoul.
- 8) 牧野紘土，川口善治，安田剛敏，関 庄二，鈴木賀代，木村友厚：MRI における椎間板変性の自然経過 - 椎間板変性が若年より進行する集団がある？ - 第 21 回日本腰痛学会，2013 Nov. 1-2，東京．
- 9) 野上真紀子，小池千加，岡部素典，吉田淑子，関 庄二，松井好人，木村友厚，二階堂敏雄：羊膜間葉系細胞が産生する細胞外基質をコートした新規 hybrid-scaffold の軟骨修復促進効果．第 12 回日本再生医療学会総会，2013 Mar. 21-23，東京．

〔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

関 庄二 (SEKI SHOJI)

富山大学・医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号：00432112

(2)研究分担者

川口 善治 (KAWAGUCHI YOSHIHARU)
富山大学・医学薬学研究部(医学)・准教授
研究者番号：262527

元村 拓 (MOTOMURA HIRAKU)

富山大学・附属病院・助教
研究者番号：50640827

(3)連携研究者

妻木範行 (TSUMAKI NORIYUKI)

京都大学 iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：50303938