

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K10420
研究課題名(和文) 椎間板髄核の組織恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Tissue homeostasis of intervertebral disc

研究代表者

藤田 順之 (Fujita, Nobuyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30348685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はU-CH1-N細胞株を用いて、髄核細胞との類似性を検証した結果、U-CH1-Nは髄核の分子マーカーであるBrachyury (T)、CD24、Cytokeratin19の発現が高く、更には軟骨基質であるAggrecanやType II collagenの発現も高く、長期に培養したところ、アルシアンブルー陽性であり、脊索由来の髄核細胞と分子生物学的に非常に類似した特徴を持つ細胞株であることが判明した。本細胞株に対してカチオン性脂質を用いた遺伝子導入でも高い導入効率を示し、分子生物学的手法を用いた研究においても非常に有用であった。

研究成果の概要(英文)：We show that a chordoma-derived cell line U-CH1-N cells highly express the nucleus pulposus (NP) marker genes, including T, KRT19, and CD24. These observations were further confirmed by immunocytochemistry and flow cytometry. Reporter analyses showed that transcriptional activity of T was enhanced in U-CH1-N cells. Chondrogenic capacity of U-CH1-N cells was verified by evaluating the expression of ECM genes and Alcian blue staining. Of note, we found that proliferation and synthesis of chondrogenic ECM proteins were largely dependent on T in U-CH1-N cells. In accordance, knockdown of the T transcripts suppressed the expression of PCNA, a gene essential for DNA replication, and SOX5 and SOX6, the master regulators of chondrogenesis. On the other hand, the CD24-silenced cells showed no reduction in the mRNA expression level of the chondrogenic ECM genes. These results suggest that U-CH1-N shares important biological properties with notochordal NP cells.

研究分野：運動器

キーワード：椎間板 髄核 繊維輪 酸化ストレス 細胞株

1. 研究開始当初の背景

(1) 椎間板の微小環境を含む、恒常性維持機構を解明するうえで、髄核細胞における分子間ネットワークを明らかにすることは大変重要である。しかしながら、これまでの研究に用いたラットまたはヒト髄核細胞は組織から単離し、継代培養することにより元来の特徴を欠失しやすく、髄核細胞の分子生物学的な特性を維持することが困難である事が知られている。

(2) 1956年にHarmanらがフリーラジカル理論を唱え、これまでに、過剰な活性酸素種(ROS)がDNA、脂質、タンパク質に対して酸化ストレスとなり、がんや老化などに関与していることが報告されてきた。また、アルツハイマーや慢性閉塞性肺疾患等、その他、多数の疾患においてもその関与が示唆されているが、椎間板変性と酸化ストレスの関係について不明である。

2. 研究の目的

(1) 髄核細胞の特徴が維持され、また分子生物学的手法を適応しやすい髄核の細胞株を確立する事を目的とする。

(2) 椎間板変性と酸化ストレスの関係性について、in vitro、in vivo 両面において検討する事を目的とする。

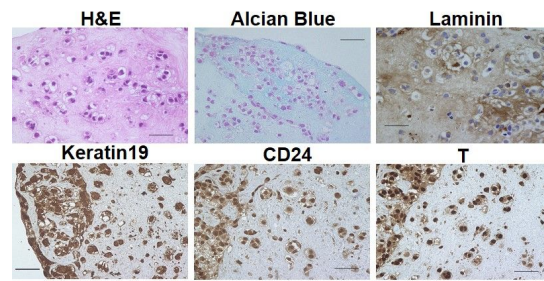
3. 研究の方法

(1) 脊索腫は髄核と同じく脊索を起源とする骨軟部腫瘍であり、これまでに幾つかの確立された細胞株が報告されている。近年、Katoらは脊索腫細胞株U-CH1から増殖能の高い細胞集団をサブクローニングしたU-CH1-N細胞を報告した。我々は本細胞株を用いて、髄核細胞との類似性を検証した。

(2) ラット椎間板変性モデルの椎間板と、手術時に採取されたヒト変性椎間板を用いた。

4. 研究成果

(1) U-CH1-Nは髄核の分子マーカーであるBrachyury (T)、CD24、Cytokeratin19の発現が高く、更には軟骨基質であるAggrecanやType II collagenの発現も高く、長期に培養したところ、アルシアンブルー陽性であり、脊索由来の髄核細胞と分子生物学的に非常に類似した特徴を持つ細胞株であることが判明した(図)。これまでに報告された脊索腫細胞株は増殖能が低いことが知られているが、U-CH1-N細胞は、他の脊索腫の細胞株と比較してdoubling timeが短いことが知られており、本細胞株に対してカチオン性脂質を用いた遺伝子導入でも高い導入効率を示し、分子生物学的手法を用いた研究においても非常に有用であり、今後の更なる低酸素環境を含む髄核の微小環境の解析において、有用なtoolとなる事が期待される。



U-CH1-Nの3次元培養

(2) 手術時に採取されたヒト変性椎間板を用いて、酸化ストレスマーカーNitrotyrosineの発現を検討したところ、変性に伴い、その発現が上昇する事が確認され、椎間板変性では酸化ストレスが蓄積している事が判明した。更に、酸化ストレス誘導剤をラット培養線維輪細胞に添加したところ、椎間板変性に関与する事が知られているTNF- α 、MMP-3、COX-2等の発現が濃度依存性に上昇し、逆にAggrecanの発現が低下した事より、酸化ストレスは線維輪細胞に対してcatabolicな作用を持つことがわかった。その下流シグナルについては、Western blot法にてMAPKが関与している可能性が示唆されている。興味深いことに、invitro解析において、酸化ストレスによる各遺伝子発現変動は抗酸化剤N-acetylcysteine (NAC)添加により有意に抑制された。また、逆に培養線維輪細胞に炎症性サイトカイン添加により、炎症を惹起させると、線維輪細胞内のROSの上昇が認められたことより、椎間板変性においては酸化ストレスと炎症の間でpositive feedback loopを形成している事が判明した。In vivo解析においては、ラット椎間板変性モデルにNACを摂取させ、その効果を判定した。摂取群の線維輪では、非摂取群に比して、酸化ストレスマーカーNitrotyrosinの発現が有意に低下し、TNF- α やAggrecanの発現変動も有意に抑制されていた。組織学的検討においても、MRI上も、摂取群では有意に変性が抑制されており、酸化ストレスは椎間板変性に関与し、抗酸化剤投与は椎間板変性に対する治療とな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 9件)

1. Fujii T, Fujita N, Suzuki S, Tsuji T, Takaki T, Umezawa K, Watanabe K, Miyamoto T, Horiuchi K, Matsumoto M, Nakamura M. The unfolded protein response mediated by PERK is casually related to the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. J Orthop Res. 2017. [Epub ahead of print] doi: 10.1002/jor.23787. 査読有り

2. Suzuki S, Fujita N, Fujii T, Yagi M, Watanabe K, Ishii K, Miyamoto T, Horiuchi K, Nakamura M, Matsumoto M. Potential involvement of the IL-6/JAK/STAT3 pathway

in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Spine*. 2017, 42, E817-E824. doi: 10.1097/BRS.0000000000001982. 査読有り

3 . Watanabe R, Fujita N, Sato Y, Kobayashi T, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Kuro-O M, Michigami T, Fukumoto S, Tsuji T, Toyama Y, Nakamura M, Matsumoto M, *Miyamoto T. Enpp1 is an anti-aging factor that regulates Klotho under phosphate overload conditions. *Sci Rep*. 2017, 7, 7786. doi: 10.1038/s41598-017-07341-2. 査読有り

4 . Ishihara S, *Fujita N, Yagi M, Tsuji T, Michikawa T, Nishiwaki Y, Fukui Y, Horiuchi K, Ishii K, Nakamura M, Matsumoto M, Watanabe K. Idiopathic spinal epidural fat accumulation is associated with hyperlipidemia. *Spine*. 2017. 43, E468-473. doi: 10.1097/BRS.0000000000002392. 査読有り

5 . Luo J, Huang L, Chen Z, Zeng Z, Miyamoto T, Wu H, Zhang Z, Pan Z, Fujita N, Hikata T, Iwanami A, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Matsumoto M, *Watanabe K, Cao K. Increased sorbitol levels in the hypertrophic ligamentum flavum of diabetic patients with lumbar spinal canal stenosis. *J Orthop Res*. 2017, 35, 1058-1066. doi: 10.1002/jor.23302. 査読有り

6 . Watanabe R, Fujita N, Takeda S, Sato Y, Kobayashi T, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Matsumoto Y, Matsumoto M, Nakamura M, *Miyamoto T. Ibandronate concomitantly blocks immobilization-induced bone and muscle atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 480, 662-668. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.112. 査読有り

7 . *Fujita N, Suzuki S, Watanabe K, Ishii K, Watanabe R, Shimoda M, Takubo K, Tsuji T, Toyama Y, Miyamoto T, Horiuchi K, Nakamura M, Matsumoto M. A chordoma-derived cell line U-CH1-N recapitulates the biological properties of notochordal nucleus pulposus cells. *J Orthop Res*. 2016, 34, 1341-1350. doi: 10.1002/jor.23320. 査読有り

8 . Fujita N, Hosogane N, Hikata T, Iwanami A, Watanabe K, Shiono Y, Okada E, Ishikawa M, Tsuji T, Shimoda M, Horiuchi K, Nakamura M, Matsumoto M, *Ishii K. Potential Involvement of Obesity-associated Chronic Inflammation in the Pathogenesis of Idiopathic Spinal Epidural Lipomatosis. *Spine*. 2016, 41, E1402-E1407. https://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/2016/12010/Potential_Involvement_of_Obesity_Associated.14.aspx 査読有り

9 . Suzuki S, *Fujita N, Hosogane N,

Watanabe R, Hikata T, Iwanami A, Watanabe K, Ishii K, Toyama Y, Takubo K, Horiuchi K, Miyamoto T, Nakamura M, Matsumoto M. Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2015, 17, 316. doi: 10.1186/s13075-015-0834-8. 査読有り

[学会発表](計 8件)

1 . Fujita N. Pathogenesis of lumbar spinal epidural lipomatosis. *Jishuitan Forum*. Beijing. 2018.

2 . Fujita N. Molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration. 5th International Spine symposium of Four Universities. Seoul. 2017.

3 . Fujita N, Fujii T. Potential Involvement of unfolded protein response in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. ORS PSRS 4th International Spine Research Symposium. Philadelphia. 2017.

4 . Fujita N, Suzuki S, Fujii T, Watanabe K, Ishii K, Tsuji T, Miyamoto T, Horiuchi K, Matsumoto M, Nakamura M. Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration. 30th annual meeting of Japanese Society of Cartilage Metabolism. English session. Kyoto. 2017.

5 . Fujita N, Hosogane N, Hikata T, Iwanami A, Watanabe K, Shiono Y, Okada E, Ishikawa M, Horiuchi K, Nakamura M, Matsumoto M, Ishii K. Potential involvement of inflammatory cytokines in the etiology of idiopathic spinal epidural lipomatosis. The 43rd International Society for the Study of the Lumbar Spine. Singapore. 2016.

6 . Fujita N, Watanabe R, Suzuki S, Watanabe K, Ishii K, Horiuchi K, Miyamoto T, Nakamura M, Matsumoto M. A chordoma-derived cell line U-CH1-N recapitulates the biological properties of notochordal nucleus pulposus cells. The 3rd International Philadelphia Spine Research Symposium. Philadelphia. 2015.

7 . Fujita N, Watanabe R, Suzuki S, Fujii T, Hikata T, Watanabe K, Ishii I, Miyamoto T, Toyama Y, Matsumoto M. Brachyury is essential transcription factor for maintain homeostasis in notochordal cell. The 42nd Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine. San Francisco. 2015.

8 . Fujita N, Watanabe R, Suzuki S, Hikata T, Watanabe K, Ishii K, Miyamoto T, Toyama Y, Matsumoto M. Brachyury is an essential transcription factor for maintaining homeostasis in notochordal cells. The 61st

Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. Las Vegas. 2015.

〔産業財産権〕

取得状況（計 1件）

名称：椎間板変性症、腰痛改善を処置するための医薬組成物、及び治療薬のスクリーニング方法

発明者：藤田順之、鈴木悟士、松本守雄、中村雅也、中島大輔

権利者：同上

種類：特願

番号：2017-528983

取得年月日：2017/11/07

国内外の別：国内

6．研究組織

(1)研究代表者

藤田 順之 (FUJITA, Nobuyuki)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師

研究者番号：30348685

(2)研究分担者

松本 守雄 (MATSUMOTO, Morio)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授

研究者番号：40209656