

令和元年6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01463

研究課題名(和文) HGF/c-Metシグナルを介した低酸素応答による椎間板恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of disc homeostasis maintenance mechanism by hypoxia response via HGF / c-Met signal

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：定常酸素、HGF非投与であるコントロール群と比較し低酸素刺激で細胞増殖は軽度促進し、HGFの投与により有意に促進した。定常酸素、HGF非投与であるコントロール群と比較し低酸素刺激でHIF-1 発現の増加を認めた。また、低酸素刺激に加え、HGFの投与によりさらにHIF-1 発現は増加した。siHIF-1 を導入し低酸素環境下で培養すると髄核細胞の細胞増殖能は有意に低下した。低酸素刺激とHGF投与により促進された細胞増殖能はMAPK阻害剤の投与で有意に低下した。低酸素刺激とHGF投与により増加したHIF-1 タンパクは、pERKタンパクの発現とともに、MAPK阻害剤の投与により発現が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果から、髄核細胞において、低酸素刺激およびHGF投与がHIF-1 を介して細胞増殖を促進し、その経路にMAPK経路が関与していることが明らかになった。近年、髄核細胞におけるHIF-1 発現調節にヒストン脱アセチル化酵素やヒートショックプロテイン70、成長因子であるCCN2などが関与していることが報告され、椎間板変性の病態解析や治療法への応用が注目されている。本研究の結果からHGF/c-MetシグナルもHIF-1 発現調節を介して椎間板細胞の恒常性の制御に関与していると考え、今後のさらなるメカニズムの解析が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：In experiments conducted without HGF treatment, cell proliferation increased under 2% O₂, compared to that observed with cells grown under 20% O₂. Under hypoxic condition, HGF treatment significantly increased cell proliferation at culture days 5 and 7, compared to that observed in no-HGF treatment control cells. In addition, PD98059 significantly inhibited cell activity at culture days 5 and 7, compared to that observed in HGF treatment control cells under 2% O₂. HIF-1 expression was induced by hypoxic stimulation and further enhanced by HGF. PD98059 reduced pERK expression in NP cells, and suppressed HIF-1 expression which is enhanced by hypoxia and HGF.

研究分野：整形外科

キーワード：HGF 低酸素 HIF-1 椎間板

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰痛は病院を受診する主訴として多くの割合を占めている。腰痛発症の原因の一つとして椎間板変性が挙げられている。椎間板は中心部の髄核と周囲の線維輪の2つのパートで構成され、体幹の可動性と支持性に重要な役割を果たしている。椎間板変性が生じ、椎間板の機能が破綻すると、腰痛が引き起こされ、時として脊柱由来の神経症状までを生じさせる。椎間板は力学的ストレス、reactive oxygen species (ROS)、炎症性サイトカインなどのさまざまな外的ストレスにさらされている。これらの外的ストレスが過剰になると髄核細胞の増殖能が低下し、アポトーシスが進行、基質分解が促進することで椎間板変性が生じると報告されている。椎間板変性を抑制し、腰痛や神経症状の発症を予防あるいは治療するためには髄核細胞の増殖能を促進し、アポトーシスや基質分解を抑制することが必要であるが、未だ有効な治療法は確立されていない。椎間板は人体最大の無血管組織であり、NFは生理的に低酸素状態にあることが知られている。これに加えて、髄核細胞の増殖能が低いことから、NFがいったん変性すると自己修復は期待できないとされている。椎間板変性に対する生物学的な治療アプローチとして、これまで細胞移植、遺伝子導入、成長因子を用いた、単独あるいは組み合わせでの方法による治療効果が検討されてきた。これらの中でも成長因子は最も簡便で副作用が少ないという利点があり、transforming growth factor (TGF)- β 、insulin like growth factor (IGF)、platelet-derived growth factor (PDGF) などについての椎間板への効果が報告されている。

2. 研究の目的

われわれは、今までに hepatocyte growth factor (HGF) は特異的受容体である c-Met を介してシグナルを伝達し、髄核細胞において細胞増殖を促進し、アポトーシス、炎症、基質分解を抑制することを報告した (Ishibashi H, J Orthop Res. 2016.)。しかし、髄核細胞内の HGF/c-Met シグナルの詳細な検証は行われていない。hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) は低酸素状態の細胞にて誘導される転写因子であり、その Subtype の一つである HIF-1 α は関節軟骨基質の保護効果を持ち、低酸素組織である関節軟骨において不可欠な役割を果たし、変形性関節症の発症機序に関与していることが報告されている。加えて、髄核細胞において HIF-1 α が発現していることが明らかにされ、低酸素刺激により増加し髄核細胞において基質代謝を促進し、恒常性維持に関与すると報告されている。また、外的ストレスにより HIF-1 α の発現が低下すると基質代謝は抑制され、椎間板変性を促進することが報告されている。われわれは、HGF が髄核細胞の細胞増殖を促進する機序に HIF-1 α が関与していると仮説を立て、検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 日本白色家兔 (雄性、12-14 週齢) の椎間板組織から髄核細胞を単離し、単層培養を行う。
- 2) HGF 投与し、20%、2%酸素下で培養し、細胞増殖能を WST-8 法で、HIF-1 α タンパクの発現を Western Blotting 法を用いて評価した。
- 3) HGF 投与し 2%酸素下で培養した髄核細胞において HIF-1 α を Knockdown し、細胞増殖能と HIF-1 α タンパクの発現を評価した。
- 4) HGF を投与した髄核細胞に MAPK 阻害剤である PD98059 を投与後、2%酸素下で培養し、細胞増殖能と HIF-1 α タンパク、pERK タンパク発現を評価した。

4. 研究成果

定常酸素、HGF 非投与であるコントロール群と比較し低酸素刺激で細胞増殖は軽度促進し、HGF の投与により有意に促進した。定常酸素、HGF 非投与であるコントロール群と比較し低酸素刺

激で HIF-1 発現の増加を認めた。また、低酸素刺激に加え、HGF の投与によりさらに HIF-1 発現は増加した。我々が設計・作成した siHIF-1 によって HIF-1 発現が抑制されることを確認した上で、siHIF-1 を導入し低酸素環境下で培養すると髄核細胞の細胞増殖能は有意に低下した。低酸素刺激と HGF 投与によって促進された細胞増殖能は MAPK 阻害剤の投与により有意に低下した。低酸素刺激と HGF 投与によって増加した HIF-1 タンパクは、pERK タンパクの発現とともに、MAPK 阻害剤の投与により容量依存性に発現が抑制された。

今回の結果から、髄核細胞において、低酸素刺激および HGF 投与が HIF-1 を介して細胞増殖を促進し、その経路に MAPK 経路が関与していることが明らかになった。

近年、髄核細胞における HIF-1 発現調節にヒストン脱アセチル化酵素やヒートショックプロテイン 70、成長因子である CCN2 などが関与していることが報告され、椎間板変性の病態解析や治療法への応用が注目されている。

本研究の結果から HGF/c-Met シグナルも HIF-1 発現調節を介して椎間板細胞の恒常性の制御に関与していると考え、今後のさらなるメカニズムの解析が必要と考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Sakata M, Tomomura H, Itsuji T, Ishibashi H, Takatori R, Mikami Y, Nagae M, Matsuda KI, Tanaka M, Kubo T. J Orthop Surg (Hong Kong). 26,2018. Osteoporotic effect on bone repair in lumbar vertebral body defects in a rat model. [査読あり](#)

https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2309499018770349?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed

Sakata M, Tomomura H, Itsuji T, Ishibashi H, Takatori R, Mikami Y, Nagae M, Matsuda KI, Tabata Y, Tanaka M, Kubo T. Bone Regeneration of Osteoporotic Vertebral Body Defects Using Platelet-Rich Plasma and Gelatin-Tricalcium Phosphate Sponges. Tissue Eng Part A. 24,2018,1001-1010. [査読あり](#)

https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/ten.TEA.2017.0358?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed

Ishibashi H, Tomomura H, Ikeda T, Nagae M, Sakata M, Fujiwara H, Tanida T, Mastuda K, Kawata M, Kubo T. J Orthop Res. 34,2016,709-16. Hepatocyte growth factor/c-met promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro. [査読あり](#)

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.23063>

〔学会発表〕(計 1 件)

井上智典, 外村 仁, 長江将輝, 高取良太, 石橋秀信, 谷田任司, 松田賢一, 三上清夫, 田中雅樹, 久保俊一 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 髄核細胞における肝細胞増殖因子の効果 HIF-1 についての検討

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

池田 巧

(IKEDA TAKUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40453120

沢田 光思郎

(SAWADA KOUSHIROU)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：40460555

外村 仁

(TONOMURA HITOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：70604304

(2)研究協力者

井辻 智典

(ITSUJI TOMONORI)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。