

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10811

研究課題名(和文) 椎間板変性のバイオメカノロジーの解明

研究課題名(英文) Elucidation of biomechanology of intervertebral disc degeneration

研究代表者

安野 雅統 (Anno, Masato)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：10771884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腰痛の主原因の一つである椎間板変性は50歳以上で90パーセント以上に見られるありふれた病態である。しかし、何故椎間板が変性するかの詳細な機序は分かっていない。今回我々はマウスの腰椎椎間関節を切除することで不安定性を惹起し、再現性を持って椎間板変性を来すモデルを樹立した。このモデルを用いて、レーザーマイクロダイセクションおよびRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行った所、椎間板変性に重要であるシグナルおよび遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により生理的なマウス椎間板変性モデルを樹立できた。また、このモデルを用いた網羅的解析により椎間板変性に関与するいくつかの重要なシグナルおよび遺伝子群を同定する事が出来、椎間板変性研究の基板を構築することが出来たといえる。今後はこれらの遺伝子やシグナルの機能を解析し、椎間板変性発生の機序をより詳細に解析するとともに、治療標的となりうる物質の探索を行う。

研究成果の概要(英文)：Intervertebral disc degeneration (IDD) is a main contributor of low back pain and is a common clinical condition observed in more than 90% of the population. However, the actual molecular mechanism of IDD remains unknown. Here, we established a novel mouse IDD model in which instability is induced by resecting bilateral facet joints. Using this IDD model, we performed expression analyses by laser microdissection and RNA-seq. In consequence, we identified important signals and genes which may be associated with IDD.

研究分野：脊椎

キーワード：椎間板変性

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

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において、腰痛は日本国民の訴える自覚症状のうち男性で1位、女性でも2位であり、その生涯罹患率は60-80%と報告されている。腰痛の主原因の一つである椎間板変性に関わる医療費として年間およそ1,700億円もの費用が費やされるなど、医療経済に深刻な影響を及ぼしており、椎間板変性の克服は喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス椎間板関節切除により不安定性を誘導し、椎間板変性を来すモデルを樹立する。本モデルを用いて変性早期の各コンパートメントでの遺伝子発現パターンを網羅的に解析することで、分子生物学的な観点から椎間板変性の初期に生じている現象を捉え、さらには将来的な治療ターゲットとなる各コンパートメントの遺伝子を同定することを目指す。

### 3. 研究の方法

マウス椎間関節を顕微鏡下にて切除し、不安定性を誘導し、椎間板変性の変化のタイムコースを観察する。具体的には術後2, 4, 8, 12週でレントゲン評価、組織学的評価を行い、術後12週で免疫染色を行う。正常椎間板および変性椎間板の凍結切片を作成し、椎間板の各組織(髄核、線維輪、軟骨終板)からLaser microdissection (LMD) を用いてmRNAを回収し、精製、増幅を行い、最適条件を確立する。また変性の過程で各コンパートメントでの代表的な変性マーカーであるMMPがどう変化するかを解析し、本モデルにおいて、どの組織で変性が始まるのかを見極め、その時期の変性モデルのマウス椎間板の各組織(髄核、線維輪、軟骨終板)においてLMDを行い、mRNAを回収して精製、増幅する。コントロールとして非手術群を用い、正常組織での発現と比較して変化の大きい遺伝子を抽出する。各組織毎に解析を行い、発現量や発現パターンの変化の特異性の高い遺伝子については免疫染色法によって実際の発現変化を確認する。また、得られたデータはバイオインフォマティクスを用いた解析を行い、メカニカルストレスが椎間板変性を起こすシグナル経路について解析する。

### 4. 研究成果

(1)マウス椎間関節を切除することで再現性をもって椎間板変性を来すモデルを樹立した。ヒト椎間板変性ではレントゲン上椎間板高の狭小化がみられるが、本モデルでも同様の変化が見られた(図1)。ヒト椎間板変性は組織学的には、線維輪の走行の変化、髄核-線維輪の境界の不明瞭化などが見られるが、本モデルでも同様の所見が見られた。また、椎間板変性を誘導したマウスの線維輪内層には肥大軟骨様細胞がみられ、Ⅱ型コラーゲン、Ⅹ型コラーゲン、MMP13など椎間板変性で上昇するとされている蛋白質の

発現が上昇していた。以上の結果から、本モデルは椎間板変性モデルとして妥当であると考えられた。本モデルでは従来の椎間板に穿刺をするようなモデルとは異なり椎間板に直接の操作を加えておらず、より生理的なモデルと考えられた。本モデルと遺伝子改変マウスを組み合わせることで、よりエビデンスの高い遺伝子の機能解析を行う事が可能となった。

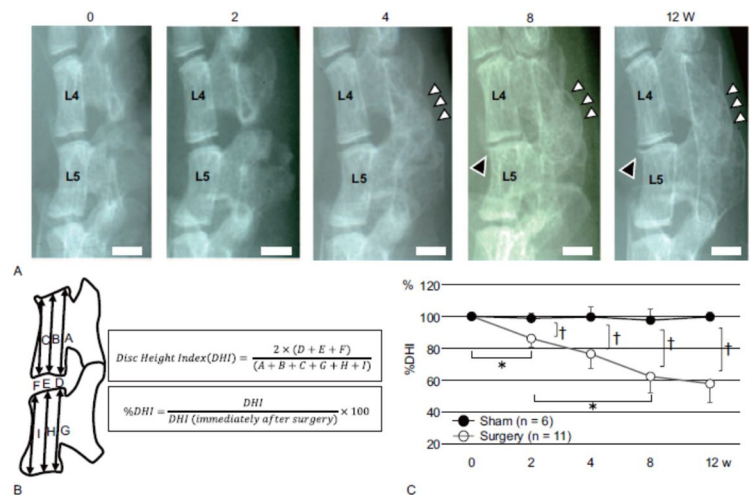


図1 レントゲン上の経時的変化

(2)次に我々は(1)のモデルを用いた網羅的な発現解析を行った。変性初期の遺伝子変化を知るために、8週齢の正常マウスおよび変性モデル術後2週齢マウスから、それぞれ髄核、線維輪をLMDを用いて採取した。mRNAを抽出し、増幅したのに対して次世代シーケンサーを用いたRNA-seqを行った(図2)。髄核特異的のマーカである *Krt19*, *skt* は髄核由来サンプルで特異的に発現しており、また線維輪特異的のマーカである *Col1a1*, *Pax1* は線維輪由来サンプルで特異的に発現していたことから、髄核および線維輪のサンプリングは的確に行えていたと考えられた。変性

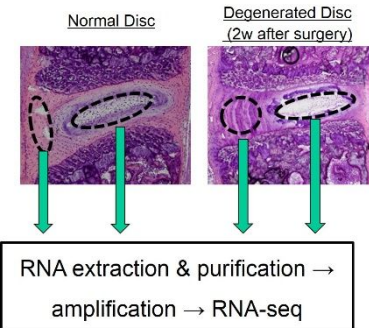


図2 LMD-RNA-seqによる網羅的解

マーカーである *Col10a1*, *Mmp3*, *Mmp13* は髄核サンプルで変動はなく、線維輪サンプルでは変性誘導後に全て上昇していた。これらの事から、本モデルでは髄核ではなく、線維輪でまず変性が誘導されていると考えられた。そこで線維輪サンプルにおいて変性誘導により発現量が10倍以上変動している遺伝子を抽出し、IPAを用いた上流解析を行ったところ、椎間板変性モデルではTGFシグナルが有意に減弱していることが判明した。各変動遺伝子を過去の報告を参考に調査したところ、TGFシグナルを介して線維化に関与する *Nr4a1* 遺伝子の発現が線維輪において変性誘導後に著明に増加していることを同定した。免疫染色によっても、Nr4a1蛋白が線維輪外層で発現が増加していることが確認された(図3)。

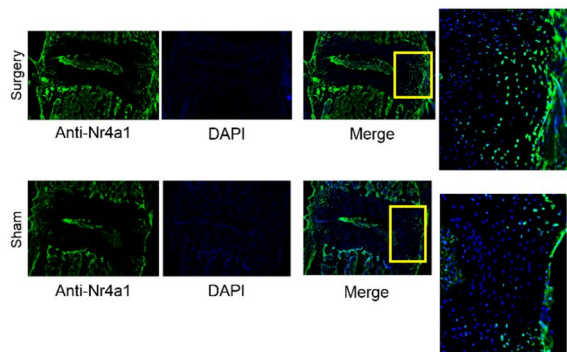


図3 Nr4a1免疫染色

今後はNr4a1 floxマウスを用いて、椎間板変性におけるNr4a1の機能解析を行う予定である。本研究後はこれらの因子を修飾することで変性が抑制されるかを検討することで治療ターゲットとなりうるかを今後検証する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, Saito T: A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability. **Spine (Phila Pa 1976)**. 2018 May 15;43(10):E557-564. doi: 10.1097/BRS.0000000000002427.PMID:29016437 (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 尾市健、谷口優樹、相馬一仁、矢野文字子、松林嘉孝、大島寧、筑田博隆、田中栄、齋藤琢：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第90回日本整形外科学会学術総会、仙台、2017.5.18-21
2. 尾市健、谷口優樹、相馬一仁、矢野文字子、田中栄、齋藤琢：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第31回日本整形外科学会基礎学術総会、福岡、2016.10.13-14
3. 尾市健、谷口優樹、相馬一仁、矢野文字子、松林嘉孝、大島寧、筑田博隆、田中栄、齋藤琢：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第34回日本骨代謝学会学術総会、大阪、2016.7.20-23
4. 尾市健、谷口優樹、相馬一仁、矢野文字子、松林嘉孝、大島寧、筑田博隆、田中栄、齋藤琢：

腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第2回日本骨免疫学会、沖縄、  
2016.7.6-8

〔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

研究分担者氏名：齋藤 琢

ローマ字氏名：Saito Taku

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30456107

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。