

令和元年9月2日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10843

研究課題名(和文) 椎間板変性機序の解明に基づく新たな治療戦略の開発研究

研究課題名(英文) Development of a novel treatment strategy against degenerative disc diseases

研究代表者

千葉 一裕 (Chiba, Kazuhiro)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 整形外科・教授)

研究者番号：80179952

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)：今回の一塩基多型による全ゲノム相関解析でアレル頻度が10%以下の新規感受性遺伝子や、過去に発見したCILP、COLL11A1、THBS2などの感受性遺伝子の相互作用は明らかに出来なかったが、酸化ストレスシグナルが椎間板変性やヘルニアの発生に影響を与える可能性を見出した。ラット尾椎を用いた椎間板変性モデルを作成し、椎間板細胞における活性酸素種の発現を確認した上で、同モデルに高気圧酸素を負荷したところ、2型コラーゲンやアグリカンなどの細胞外基質タンパクのmRNA発現が亢進し、TNF、COX-2など炎症性サイトカインのmRNA発現が抑制されることを見出し、治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の急速な高齢化により腰下肢痛で医療機関を受診する患者は急増しており医療経済上大きな問題である。腰下肢痛発症の原因の一つとして椎間板変性を端緒とする椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症などが挙げられる。本研究では椎間板変性の分子機序を解明し、新たな治療法を開発すべく、全ゲノム解析による原因遺伝子解析を実施した。その結果、椎間板変性への関連が示唆された酸化ストレスに対して動物モデルを用いて高気圧酸素負荷実験を行い、臨床応用の可能性を検討した。椎間板変性そのものを遅延・逆行せしめることができれば、腰下肢痛に苦しむ患者個人の健康向上に資するのみならず医療経済上も大きなインパクトをもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Disc degeneration (DD) triggers variety of lumbar diseases, such as lumbar disc herniation (LDH) and spinal stenosis that cause low back pain and sciatica, which bring huge socioeconomic burdens on rapidly ageing society. Our research team has discovered CLIP, COL11A1, THBS2 genes that are associated with DD and LDH through genome-wide association studies using single nucleotide polymorphism. In present study, we have further searched genes that relate to DD; however, could not discover novel susceptible genes with allele frequency<10% nor interactions of genes that we previously discovered. However, we have found that oxidative stress may be involved in DD. Using rat tail discs, we have established DD model and have found that application of hyperbaric oxygen upregulated expressions of collagen type II and aggrecan mRNAs and suppressed expressions inflammatory cytokine mRNAs including TNF and COX-2. Oxidative stress pathway could be therapeutic target in novel treatment against DD.

研究分野：脊椎・脊髄外科学

キーワード：椎間板 椎間板変性 腰痛症 椎間板ヘルニア 全ゲノム相関解析 原因遺伝子 酸化ストレス 高気圧酸素療法

1. 研究開発当初の背景

急速な高齢化社会の到来により、腰下肢痛で医療機関を受診する患者は増加の一途をたどっており、医療経済学的にも重要な問題となっている。腰下肢痛発症の原因の一つとして、椎間板ヘルニア、脊椎すべり症、腰部脊柱管狭窄などの退行変性疾患が挙げられる。こうした退行変性疾患発症の引き金となる椎間板変性の原因は未だに不明であり、有効な予防法、治療法は確立していない。椎間板変性の原因を解明し、変性過程そのものを予防・遅延あるいは逆行せしめることができれば、腰下肢痛に苦しむ患者個人の QOL を改善させ得るのみならず医療経済上も大きなインパクトがあると考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、さまざまな腰痛疾患発生の基盤となる椎間板変性に対する新しい治療戦略の確立に寄与する知見を集積することである。具体的な目標は以下のごとくである。

1) 全ゲノム関連解析の継続によりさらなる疾患感受性遺伝子を発見する。以上により発見した疾患感受性遺伝子群の結果の確証を得るために以下の実験を実施する。2) 疾患感受性遺伝子のアレルの違いにより発現するタンパクの機能の違いを解析する。3) 疾患感受性遺伝子のアレルの違いによる椎間板変性度の違いを解析する。4) 疾患感受性遺伝子群の椎間板変性への相互作用を分子生物学的に解析する。5) 発見された複数の疾患感受性遺伝子が椎間板変性に及ぼす複合的影響を統計学的に解析する。

3. 研究の方法

主な研究手法・戦略は以下の 5 つである。1) 一塩基多型 (SNP) を用いた全ゲノム関連解析 (genome-wide association study) による椎間板ヘルニアの疾患感受性遺伝子のさらなる探索。2) 疾患感受性遺伝子によって規定されるタンパクのアレルの違いに対する機能解析。3) 疾患感受性遺伝子のアレルの違いによる椎間板ヘルニア発症の統計学的解析。4) 疾患感受性遺伝子群が複合して椎間板細胞の増殖、基質代謝に与える影響の生化学的、分子生物学的解析。5) 疾患感受性遺伝子群が複合して椎間板変性度に与える影響の統計学的解析。

4. 研究成果

椎間板ヘルニア発症に寄与する疾患感受性遺伝子を新たに同定する目的にて、アレル出現頻度 minor allele frequency (MAF)10%以下の比較的頻度が低い遺伝子まで範囲を拡げ、単塩基多型 (Single nucleotide polymorphism:以下 SNP)用いた全ゲノム解析を実施した。1次スクリーニングとして、MRI による椎間板ヘルニアの診断、整形外科医による一年間以上の治療、三か月以上持続する背部から放散する片側下肢痛を診断基準として 374 例を患者群として集めた。対照

群は無症候性健常者 940 例であった。解析する SNP は遺伝統計学的手法により全ゲノムを網羅する 515286 個の SNP を選択した。今回の解析では椎間板ヘルニアと関連の高い SNP を 6 つ同定した。これらのうち、rs1112964, rs12385796, rs3846977, rs7040239 の 4 つの SNP は遺伝子領域内あるいは遺伝子近傍に存在した。しかしながら、現時点は、われわれが設定した有意水準を超える相関を示す SNP の同定には至っていない。また、今までわれわれが同定した *CILP*, *COL11A1* などの疾患感受性遺伝子の相互作用を Joint Effect 統計量算出などの統計学的手法によって検証したが、有意な相互作用は見られなかった。今回の全ゲノム相関解析の結果はネガティブであったが、今後、患者群の inclusion criteria のさらなる最適化、および対象患者数を増やすなどとして、再検討の予定である。

一方で、本研究計画実施期間中、椎間板変性やヘルニアの発生と、酸化ストレスシグナルとの関連性を示唆するデータが得られた。Wistar 系ラット尾椎椎間板穿刺による椎間板変性モデルを作成し、活性酸素種 (reactive oxygen species, 以下 ROS) のマーカーである Nitrotyrosine で免疫染色を行ったところ、穿刺群では非穿刺対照群と比較し有意に陽性細胞数が増加していた。また、椎間板変性に対する高気圧酸素環境 (hyperbaric oxygen, 以下 HBO) の影響を検証する目的で、穿刺群および対照群に 1 日 2 時間 10 日間、小動物用チャンバーで HBO (100% 酸素, 2.5 絶対気圧) を負荷したところ、組織学的検討で椎間板変性の進行が抑制されるという結果が、暫定的ながら得られた。採取した椎間板組織から mRNA を抽出し、HBO による遺伝子発現変化を検討したところ、Type II コラーゲンやアグリカンなどの細胞外マトリクスタンパク質の mRNA の発現が亢進し、TNF, COX-2 など炎症性サイトカインの mRNA の発現が抑制される傾向にあることを見出した。さらに、これらの in vivo の実験と並行して、椎間板髄核細胞の生物学的特性を有すると考えられている U-CH1-N 細胞を利用して、in vitro の実験系の構築を試みた。細胞内の ROS を誘導するため免疫細胞との共培養、炎症性サイトカインの添加を行い、U-CH1-N 細胞の遺伝子発現解析を行った。現在までのところ、まだ十分な in vitro モデルは確立できていないが、今後、実験条件の最適化を行い、椎間板変性に対する ROS および HBO の効果を、in vitro モデルを利用して、より詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 30 件)

Tsuiji T, Watanabe K, Hosagane N, Fujita N, Ishii K, Chiba K, Toyama Y, Nakamura M, Matsumoto M. Risk factor of radiological adjacent disc degeneration with lumbar interbody fusion for degenerative spondylolisthesis. J Orthop Sci. 2016, 21; 133-7.
査読有

doi: 10.1016/j.jos.2015.12.007.

Tsuji T, Chiba K, Asazuma T, Imabayashi H, Hosogane N, Matsumoto M. Factors that regulate spinal cord position after expansive open-door laminoplasty. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2017, 27; 93-9. 査読有

doi: 10.1007/s00590-016-1847-y.

Ogura Y, Chiba K (30人中22番) et al. A functional variant in MIR4300HG, the host gene of microRNA MIR4300 is associated with progression of adolescent idiopathic scoliosis. Hum Mol Genet. 2017, 26; 4086-92. 査読有

doi.org/10.1093/hmg/ddx291

Takahashi Y, Chiba K (39人中24番), Hosogane N (39人中34番), et al. A Replication Study for the Association of rs11190870 With Curve Severity in Adolescent Idiopathic Scoliosis in Japanese. Spine. 2018, 43; 688-92. 査読有

doi: 10.1097/BRS.0000000000002413.

kou I, Chiba K, Hosogane N (共著者である Japan Scoliosis Clinical Research Group に含まれる), et al. A multi-ethnic meta-analysis confirms the association of rs6570507 with adolescent idiopathic scoliosis. 2018, 8; 11575. 査読有

doi: 10.1038/s41598-018-29011-7.

Takeda K, Chiba K (共著者である Japan Scoliosis Clinical Research Group に含まれる), et al. A multiethnic meta-analysis defined the association of rs12946942 with severe adolescent idiopathic scoliosis. 2018, 64; 493-8. 査読有

doi: 10.1038/s10038-019-0575-7.

[学会発表] (計 67 件)

細金直文, 河野仁, 今林英明, 藤田順之, 八木満, 千葉一裕, 石井賢, 中村雅也, 松本守雄, 渡邊航太. 成人脊柱変形の術後矢状面アライメントが日常生活動作に与える影響. 第 50 回日本側弯症学会. 京都市, 2016 年.

細金直文, 八木満, 渡邊航太, 松本守雄, 今林英明, 大和雄, 松山幸弘, 渡辺慶, Ames C., Lafage V., 千葉一裕. 成人脊柱変形に対する手術戦略の国際間比較. 第 51 回日本側弯症学会. 札幌市, 2017 年.

細金直文, 藤田順之, 今林英明, 千葉一裕. 河野仁, 八木満, 名越慈人, 辻収彦, 石井賢, 中村雅也, 松本守雄, 渡邊航太. 成人脊柱変形 LIF による変形矯正の理論と実際. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会. 札幌市, 2017 年.

今林英明, 佐々木淳也, 田口瑛子, 井上雅博, 松橋優介, 佐々尾宙, 細金直文, 千葉一裕. 頸髄圧迫性病変と手内筋萎縮の関連性. 第 19 回圧迫性脊髄症研究会. 東京, 2018 年.

Chiba K, Matsuyama Y. Follow-up study of condoliase treatment in patients with lumbar disc herniation. 45th Annual Meeting of International Society for the Study of the Lumbar Spine. Alberta, Canada, 2018.

美馬雄一郎，藤田順之，鈴木悟志，藤井武，辻崇，宮本健史，千葉一裕，松本守雄，中村雅也．Semaphorin 3Aの椎間板変性に対する抑制効果．第33回日本整形外科学会基礎学術集会．奈良，2018年．

松橋優介，堀内圭輔，高橋洋平，渡邊航太，細金直文，田口瑛子，井上雅博，今林英明，池川士郎，松本守雄，千葉一裕．思春期突発性側弯症関連遺伝子LBX1を骨格筋特異的に欠損したマウスは前肢と胸郭の低形成を来す．第33回日本整形外科学会基礎学術集会．奈良，2018年．

松橋優介，堀内圭輔，白石安永，田口瑛子，井上雅博，須佐美知郎，今林英明，藤田真敬，千葉一裕．椎間板変性に対する抗気圧酸素治療．第64回防衛衛生学会．東京．2019年．

[図書] (計7件)

今林英明，千葉一裕．ガイドライン外来診療，日経メディカル開発．2016，605(230-6)．

千葉一裕．専門医の整形外科学外来診療 -最新の診断・治療- ．南江堂 ．2017，445(123-128)．

[産業財産権]

無し

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 一裕 (CHIBA, Kazuhiro)

防衛医科大学校・整形外科学講座・教授

研究者番号 80179952

(2) 研究分担者

今林 英明 (IMABAYASHI, Hideaki)

防衛医科大学校・整形外科学講座・講師

研究者番号 40296629

細金 直文 (HOSAGANE, Naobumi)

防衛医科大学校・整形外科学講座・講師

研究者番号 10365306

(3) 研究協力者

堀内 圭輔 (HORIUCHI, Keisuke)

三宅 敦 (MIYAKE, Atsushi)