

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20051

研究課題名(和文)mTORシグナル制御による椎間板変性治療法の開発

研究課題名(英文)Development of treatment strategies for intervertebral disc degeneration by modulating mTOR signaling

研究代表者

由留部 崇(YURUBE, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：10514648

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究の目的は細胞内伝達機構であるmTORシグナル経路の制御が脊椎椎間板の変性疾患の予防・治療法となる可能性を検証することであった。ヒト椎間板細胞に対するRNA干渉を用いたシグナル制御因子の解析から、mTORC1の抑制が椎間板保護作用を来すことを明らかにした。次にmTORC1阻害剤が類似の椎間板保護作用を来すことを確認した。さらにRNA干渉を用いてオートファジーの特異的な阻害を行い、オートファジーのアポトーシス細胞死とセネッセンス細胞老化の抑止効果を明らかとした。本研究結果から、mTORシグナル経路とオートファジーの制御が椎間板変性の新たな細胞生物学的予防・治療法となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文):This study aimed to clarify effectiveness of biological therapies for intervertebral disc degeneration by modulating mTOR signaling. In our study, RNA interference technique revealed that suppression of the mTOR complex 1 (mTORC1) had protective effects against disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation. Furthermore, administration of mTORC1 inhibitors to find potential clinical applications showed similar beneficial effects on disc cells through Akt induction. Then, specific autophagy inhibition by RNA interference clearly presented anti-apoptotic and anti-senescent effects of autophagy. Based on these findings, biological modulation of mTOR signaling and autophagy is a potential therapeutic strategy for degenerative disc disease.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板変性 mTOR オートファジー 脊椎 整形外科

1. 研究開始当初の背景

腰痛は早急に解決すべき世界的な健康問題である。椎間板変性は腰痛の主たる独立した危険因子であるが、その発生機序は未だ明らかでない。変性椎間板に対する現在の治療の多くは切除を中心とした手術療法であり、結果的に椎間板を破壊し本来の機能を失うため、椎間板の機能を温存しつつ組織を再生させる新たな治療法の開発が急務である。自食作用オートファジーはストレス下で細胞が自己組織を分解・再利用して恒常性維持を図る機構である。オートファジーは細胞内の mTOR シグナル経路によって抑制的に制御されている。椎間板は人体最大の無血管組織であり、栄養の大部分を軟骨終板を介した椎体からの拡散に頼ることから、加齢や喫煙に伴う軟骨終板の硬化、石灰化により容易に栄養不足に陥る。低栄養が変性を生じる基盤となることから、我々はオートファジーと mTOR シグナル経路が椎間板の恒常性維持に重要な役割を担っていると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は椎間板におけるオートファジーと mTOR シグナル経路の役割を明らかにし、その制御が椎間板変性の有効な治療法になりうるか明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では具体的に以下の3点を検討した。椎間板細胞へ mTOR シグナル経路の制御因子である mTOR (mTOR 複合体 1 [mTORC1]・複合体 2 [mTORC2] を構成)、Raptor (mTORC1 を構成)、Rictor (mTORC2 を構成) の抑制遺伝子 (siRNA) をそれぞれ導入し (RNA 干渉)、椎間板変性の主要徴候である細胞死、細胞老化、細胞外基質分解に及ぼす影響を検討する。

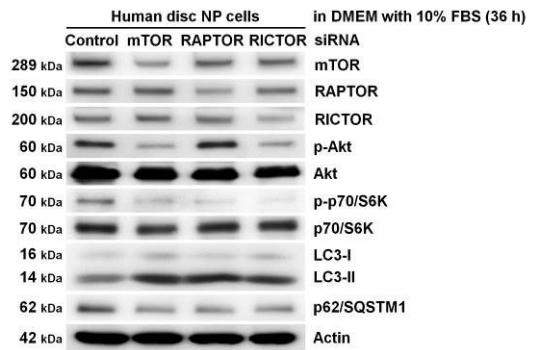
椎間板細胞へ mTORC1 阻害剤ラパマイシン、その誘導体エペロリムスやテムシロリムス、さらに類似効果を示すポリフェノールであるクルクミンを投与し、細胞死、細胞老化、細胞外基質分解に及ぼす影響を検討する。

椎間板細胞における mTORC1 阻害効果がオートファジーの誘導に由来するか明らかにすべく、オートファジー必須因子 Atg5 への RNA 干渉が及ぼす影響を検討する。

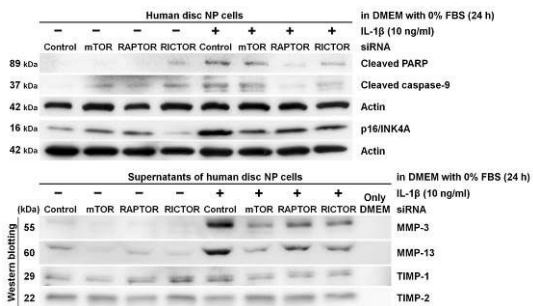
4. 研究成果

RNA 干渉による mTOR シグナル経路の抑制が椎間板変性へ及ぼす影響の検討

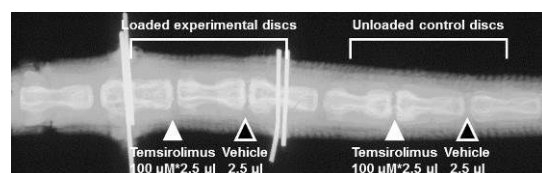
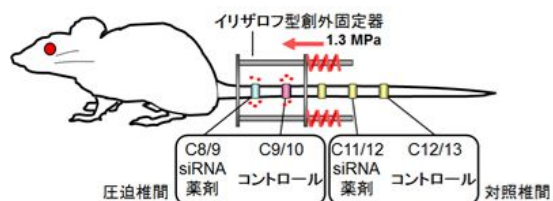
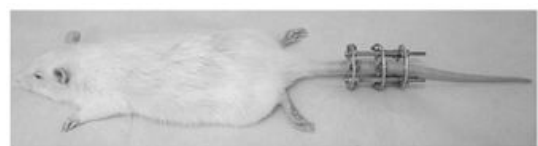
まずは手術で得られたヒト脊椎椎間板細胞への RNA 干渉による mTOR シグナル経路の抑制効果を検討する細胞実験を行った。mTOR・Raptor・Rictor のいずれも特異的に発現が抑制され、mTOR 下流の p70/S6K のリン酸化の抑制とオートファジーの誘導を認めしたが、Raptor 干渉でのみ mTOR 上流の Akt リン酸化の亢進が観察された。



mTOR・Raptor・Rictor 干渉のいずれもセネッセンス細胞老化の抑制、細胞外基質分解酵素 MMPs の発現と活性の減少を来したが、Raptor 干渉でのみアポトーシス細胞死の抑制がみられた。以上より、mTORC1 のみの抑制を来す Raptor 干渉が椎間板細胞保護作用を有することが判明した。

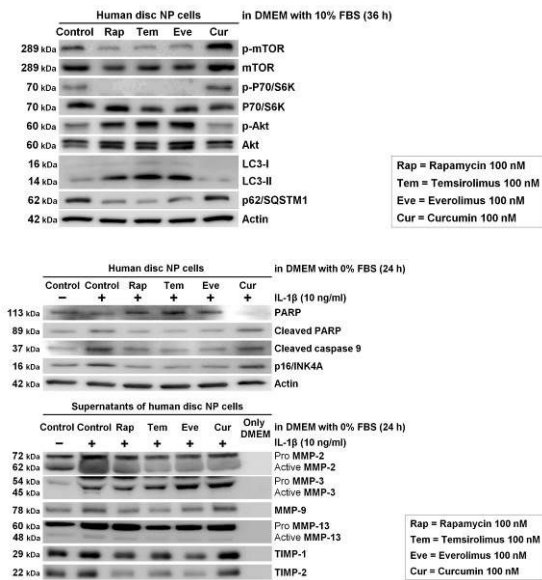


上記の結果を受けて、ラット尾椎椎間板の内部へ Raptor siRNA を局所投与し、その後創外固定器を用いて圧負荷を加えて変性を惹起する動物実験を施行した。単純 X 線撮影では有意の差には至っていないものの、Raptor 干渉椎間で椎間板高が保持される傾向にあった。現在も実験と解析を継続中である。

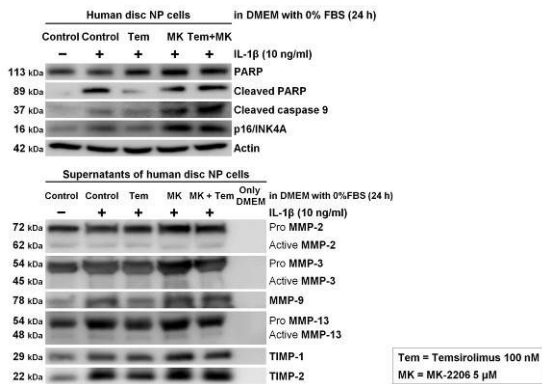


Raptor 阻害と同様の効果を有する薬剤が椎間板変性過程へ及ぼす影響の検討

Raptor への RNA 干渉は mTORC1 阻害により椎間板細胞保護作用を示すことから、mTORC1 阻害剤が類似の効果を来し得ると考え、ヒト椎間板細胞への複数の薬剤の投与を行った。ラパマイシン、エベロリムス、テムシロリムスはいずれも Raptor 干渉と類似の mTOR シグナル制御 (p70/S6K 抑制・Akt 亢進・オートファジー誘導) と椎間板細胞保護作用を示したが、その効果は同濃度であってもテムシロリムスで最も顕著であった。クルクミンは細胞毒性が低く安全と考えられた一方、椎間板細胞保護作用は乏しく、明らかな有効性は認められなかった。



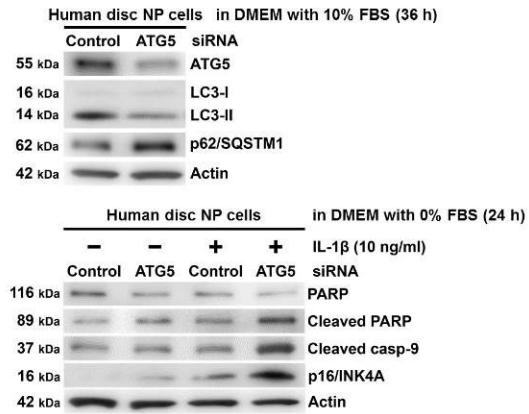
次にテムシロリムスの椎間板細胞保護作用が Akt に由来するか明らかにすべく、Akt 阻害剤 MK-2206 を用いた機能実験を行った。MK-2206 の添加によりアポトーシスマーカー・セネッセンスマーカー・基質分解酵素の発現がいずれも増大しており、Akt が重要な役割を果たすことが明らかとなった。



上記結果から、我々が確立したラット椎間板変性モデルへテムシロリムスの局所投与を行う実験を施行し、現在も継続中である。

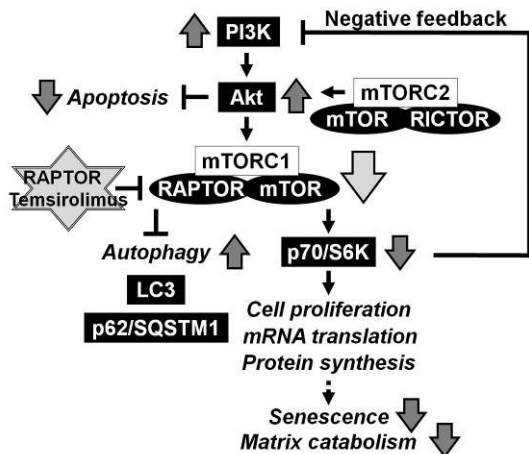
RNA 干渉によるオートファジーの抑制が椎間板変性へ及ぼす影響の検討

ヒト椎間板細胞への RNA 干渉を行い、オートファジー必須因子 Atg5 を特異的に抑制する細胞実験を行った。Atg5 干渉を介したオートファジーの抑制はアポトーシス細胞死とセネッセンス細胞老化を誘導することが明らかとなった。一方でオートファジーの阻害は細胞外基質代謝や MAPK 経路活性には直接的な影響を及ぼしていなかった。



現在、ラット椎間板変性モデルへ Atg5 siRNA の局所投与を行う実験を施行中である。

上記 ~ の検討から、mTOR シグナル経路が椎間板細胞に重要な役割を果たし、mTORC1 の一部の部分的な抑制を生じる Raptor 干渉が Akt のリン酸化を介して細胞保護作用を来す可能性が示唆された。さらに既に市販化されている mTORC1 阻害剤が類似の効果を来すことが確認され、ラパログ (ラパマイシン誘導体) に属するテムシロリムスが最も高い有効性を示していた。テムシロリムスはラパマイシンと比較して親水性が改良されており、同濃度でも効果が強く、かつ椎間板内への投与方法にも利点を有すると考えられた。



Atg5 への干渉実験からオートファジーの阻害が抗アポトーシス・抗セネッセンス作用を来すことが明らかとなったが、細胞外基質分解には有意の影響がみられなかった。本研究結果から、Raptor 干渉やテムシロリムスのアポトーシス細胞死抑制効果にはオートファジーの誘導に加え Akt の誘導が主体的な影響を及ぼすこと、セネッセンス細胞老化抑制効果はオートファジーの誘導ならびに mTOR 下流の p70/S6K の抑制に依ること、細胞外基質分解抑制効果は Akt の誘導や p70/S6K の抑制に依ることが示唆された。

テムシロリムスは腎細胞癌への分子標的薬として臨床で用いられており、椎間板変性治療・予防のための長期全身投与では副作用が懸念される。そのため動物モデルを用いた検討で椎間板局所投与の有用性を示すことができれば、将来的な臨床応用への道を開くことができると考えられ、現在も継続中である。多くの国民が苦しんでいる腰痛への新たな治療を確立すべく、今後も研究を継続し、成果を報告していきたい。

#### 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 4 件)

伊藤雅明、由留部崇、他 9 名。Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction. *Osteoarthritis Cartilage* 25(12):2134-2146, 2017. 査読有。DOI: 10.1016/j.joca.2017.08.019

由留部崇、他 10 名。椎間板では他の筋骨格系組織よりもオートファジーの関与が大きく、その活性は変性とともに減少する。J Spine Res 8(2)、106-111、2017。査読有。  
<http://www.jssr.gr.jp/>

由留部崇、他 5 名。椎間板の微小環境 - 細胞代謝、オートファジーの観点から。整形・災害外科 60(3)、279-285、2017。査読有。  
<https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.18888/J00767.2017200314>

由留部崇、他 5 名。脊椎椎間板髄核におけるオートファジーの重要性とその誘導による椎間板変性予防の可能性。中部日本整形外科学会雑誌 60(3)、547-548、2017。査読無。  
<https://doi.org/10.11359/chubu.2017.547>

[学会発表](計 28 件)

由留部崇、他 9 名。椎間板では他の筋骨格系組織よりもオートファジーの関与が大き

く、その活性は変性とともに減少する：オートファジー制御による椎間板変性予防の可能性。第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016 年 4 月 14-16 日、幕張メッセ(千葉県)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。mTOR シグナル経路への選択的な干渉はオートファジーと Akt の活性化を誘導し、ヒト椎間板細胞における細胞死、老化と細胞外基質分解を抑制する。第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016 年 4 月 14-16 日、幕張メッセ(千葉県)

由留部崇、他 10 名。Intervertebral disc nucleus pulposus has intensive involvement of autophagy compared to other musculoskeletal tissues and its degeneration is linked with decreased autophagy. The 43rd Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (Spineweek 2016), May 16-20, 2016, Singapore (Singapore)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。Selective interference of mTOR signaling is protective against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation with autophagy induction. The 43rd Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (Spineweek 2016), May 16-20, 2016, Singapore (Singapore)

由留部崇、他 5 名。脊椎椎間板髄核におけるオートファジーの重要性とその誘導による椎間板変性予防の可能性。第 127 回中部日本整形外科学会災害外科学会学術集会、2016 年 9 月 30 日-10 月 1 日、まつもと市民芸術館(長野県) \* **学会奨励賞 受賞**

由留部崇、他 9 名。脊椎椎間板髄核では他の筋骨格・神経組織よりもオートファジーの関与が大きく、変性が進行するとその活性は減少する。第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 13-14 日、福岡国際会議場(福岡県)

西田康太郎、由留部崇、他 7 名。椎間板変性モデルについて。第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 13-14 日、福岡国際会議場(福岡県) \* 招待講演

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。mTOR シグナル経路への選択的な干渉はオートファジーと Akt の活性化を誘導し、ヒト椎間板細胞における細胞死、細胞老化と細胞外基質分解を抑制する：椎間板遺伝子治療の可能性。第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 13-14 日、福岡国際会議場(福岡県)

由留部崇、他 9 名。mTOR シグナル経路にお

ける RAPTOR への選択的な干渉はヒト椎間板細胞における細胞死、細胞老化と細胞外基質分解を抑制する。第 30 回日本軟骨代謝学会、2017 年 3 月 3-4 日、京都みやこめっせ(京都府)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。Inhibition of autophagy through ATG5 knock down induces apoptosis and senescence in human intervertebral disc cells. The 8th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section, March 9-11, 2017, Kobe (Japan)

垣内裕司、由留部崇、他 8 名。Temsirolimus is a candidate of the optimal mTOR inhibitor for protecting human intervertebral disc nucleus pulposus cells. The 8th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section, March 9-11, 2017, Kobe (Japan)

由留部崇、他 9 名。Involvement and roles of autophagy in maintaining notochordal cell homeostasis of the intervertebral disc nucleus pulposus. The 63rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 19-22, 2017, San Diego (CA, USA)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。Selective mTORC1 inhibition through RNA interference for Raptor is protective against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation with Akt and autophagy induction. The 63rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 19-22, 2017, San Diego (CA, USA)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。Autophagy contributes to cell survival, anti-apoptosis, anti-senescence and extracellular matrix homeostasis in human disc nucleus pulposus cells. The 63rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 19-22, 2017, San Diego (CA, USA)

垣内裕司、由留部崇、他 8 名。Temsirolimus is a candidate of the optimal mTOR inhibitor in human intervertebral disc nucleus pulposus cells. The 63rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 19-22, 2017, San Diego (CA, USA)

由留部崇、他 9 名。椎間板髄核におけるオートファジーの重要性とその脊索表現型保持への関与の可能性。第 46 回日本脊椎脊髄病学会、2017 年 4 月 13-15 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。ATG5 のノックダウンによるオートファジーの抑制はヒト椎間板細胞のアポトーシスとセネッセンスを誘導し、細胞数を減少させる。第 46 回日本脊椎脊髄病学会、2017 年 4 月 13-15 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道)

垣内裕司、由留部崇、他 8 名。ヒト椎間板髄核髄傍における mTOR 阻害薬の細胞死、細胞老化、細胞外基質分解抑制効果の比較。第 46 回日本脊椎脊髄病学会、2017 年 4 月 13-15 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道)

由留部崇、他 11 名。Involvement of autophagy in intervertebral disc degeneration and its possible contribution to the maintenance of notochordal cell homeostasis. The 44th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine, May 29-June 2, 2017, Athens (Greece)

伊藤雅明、由留部崇、他 8 名。Inhibition of autophagy through ATG5 knock down induces apoptosis and senescence in human intervertebral disc cells. The 44th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine, May 29-June 2, 2017, Athens (Greece)

②垣内裕司、由留部崇、他 8 名。Temsirolimus is a candidate of the optimal mTOR inhibitor for protecting human intervertebral disc nucleus pulposus cells. The 44th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine, May 29-June 2, 2017, Athens (Greece)

②垣内裕司、由留部崇、他 8 名。mTORC1 阻害薬テムシロリムスはヒト椎間板髄核細胞において細胞死、細胞老化、細胞外基質分解を抑制する。第 36 回運動器移植再生医学研究会、2017 年 9 月 29-30 日、京都ホテルオークラ(京都府)

③由留部崇、他 10 名。脊椎椎間板変性へのオートファジーの関与とその脊索由来細胞における恒常性維持機構の可能性。第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年 10 月 26-27 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

④伊藤雅明、由留部崇、他 9 名。オートファジーの抑制はヒト椎間板細胞においてアポトーシス、セネッセンスを誘導し、細胞数を減少させる。第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年 10 月 26-27 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

②⑤垣内裕司、由留部崇、他 9 名。mTORC1 阻害薬テムシロリスムはヒト椎間板髄核細胞において細胞死、細胞老化、細胞外基質分解を抑制する。第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年 10 月 26-27 日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県）

②⑥由留部崇、他 10 名。Involvement of autophagy in intervertebral disc degeneration and its contribution to cell survival with the maintenance of notochordal phenotype. The 45th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society, November 30-December 2, 2017, Hollywood (FL, USA)

②⑦由留部崇、他 9 名。Involvement of autophagy in intervertebral disc degeneration and its contribution to cell homeostasis with the maintenance of notochordal phenotype. The 64th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 10-13, 2018, New Orleans (LA, USA)

②⑧垣内裕司、由留部崇、他 7 名。Temsirolimus is a candidate of the optimal mTOR inhibitor to protect human disc cells through AKT rather than autophagy induction. The 64th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 10-13, 2018, New Orleans (LA, USA)

〔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  
由留部 崇 (YURUBE, Takashi)  
神戸大学・医学部附属病院・特定助教  
研究者番号：10514648

研究者番号：

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )