

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04311

研究課題名(和文) 脊椎の発生・維持・変性の分子機序解明を目指した統合的研究

研究課題名(英文) Comprehensive research for molecular regulation of development, homeostasis, and degeneration of spine

研究代表者

筑田 博隆(Chikuda, Hirotaka)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30345219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずレーザーマイクロダイセクションによる微小組織発現解析法を用いて、マウスの発達過程における脊椎各組織(線維輪、髄核、周囲靭帯など)からmRNAを回収し、RNAシーケンスを行って網羅的な発現プロファイル調べた。発現遺伝子についてパスウェイ解析を行い、特にTGF-betaに関する動きが大きいことを突き止めた。また特徴的な発現パターンを示す遺伝子のうち、椎間板線維輪の内側に特異的に発現する遺伝子についてはタモキシフェン誘導性のCreマウスを樹立し、現在も解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性腰椎症は変形性膝関節症を上回る膨大な患者数があるものの、人工膝関節置換術のような長期に安定した治療法はない。分子病態解明、さらには発生学的研究においても、脊椎は四肢関節と比べて大きく立ち遅れている。本研究によって得られた組織特異的Creマウスなどのバイオリソースや発現解析のデータベースは、脊椎疾患の研究に広く貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed expression profiles of spinal components, including annulus fibrosus, nucleus pulposus, paraspinal ligaments, etc. by laser microdissection and RNA sequencing. We performed pathway analyses and identified TGF-beta signaling may play pivotal roles in development of spine. We further identified candidate genes expressed in the inner layer of annulus fibrosus, and developed their Cre mice.

研究分野：整形外科

キーワード：脊椎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、骨粗鬆症と並ぶ運動器変性疾患の代表的疾患である。広義の変形性関節症には膝関節、股関節など四肢の関節に加え、脊椎の関節も含まれるが、東京大学医学部整形外科が実施しているコホート研究 ROAD study によると、レントゲン上で変形を有する日本人は、腰椎が 3,790 万人、膝関節は 2,530 万人いると算出されている (*J Bone Miner Metab* 27:620-8,2009)。このうち痛みで日常生活に支障を来している人は腰椎が 1,100 万人、膝関節が 780 万人とされ、腰椎は関節の変性疾患では最大の患者数を有することが明らかとなった (*Ann Rheum Dis* 68:1401-6, 2009)。厚生労働省が行っている国民生活基礎調査でも、腰痛は自覚症状として男性では 1 位、女性でも 2 位に挙げられており、変形性腰椎症は変形性膝関節症を上回る国民病といっても過言ではなく、社会の高齢化とともにますます患者数が増えると予想される。しかしながら、人工膝関節置換術が末期の変形性膝関節症の治療法として優れた長期成績を誇る一方、末期の変形性腰椎症にはそれに匹敵するような定型的で安定した治療法は開発されていない。

基礎研究についても両者には大きな乖離がある。変形性膝関節症については大規模なゲノムワイド関連解析 (GWAS) が数多く行われ、GDF5 を始めとする疾患関連遺伝子が数多く報告されている。また 2005 年には東京大学医学部整形外科や米国の研究室にてマウスを用いた変形性膝関節症モデルが開発され、遺伝子改変マウスの普及と相俟って、変形性膝関節症の分子レベルでの病態解明が飛躍的に進む契機となった。これらの病態研究から変形性膝関節症の予防効果を示唆する化合物や抗体が複数得られているほか、マウスモデルを用いて様々な治療研究も行われ、関節軟骨の再生促進作用を示すサイトカインや化合物も報告されている。一方、このような変形性膝関節症の基礎研究の活況とは対照的に、変形性腰椎症については GWAS も未だ報告がなく、マウスモデルも椎間板変性に限った報告が散発的に見られるだけである。さらには、発生生物学的にも脊椎の研究は遅れており、椎間板や椎体が発生する際の分子メカニズムは断片的にしか分かっておらず、四肢の骨・関節と比して大きな遅れがある。

東京大学医学部整形外科ではこのような現状を打破し、変形性腰椎症の病態を解明するために研究を行ってきた。上述の ROAD study のコホートを用いて大規模な変形性腰椎症の GWAS を行ってきたが、高い疾患感受性を示す候補遺伝子が複数得られており、現在個々の遺伝子に関して詳しい解析を行っている。また動物実験の基盤技術として、マウスを用いて様々な変性誘発モデルを試行してきたが、腰椎後方の椎間関節を切除して不安定性を惹起することにより、安定して変形性腰椎症を再現するのみに取り組んでいる。興味深いことに、GWAS で得られた候補分子の多くは、椎間板形成期に強く発現するものの、老齢期や変形性腰椎症モデルでの変性過程では発現が少なかった。ROAD study の調査でも、変形性腰椎症は変形性膝関節症より職業や生活習慣に影響されにくいことが明らかになっており (*Arthritis Rheum* 61:779-86,2009)。これらを全て勘案すると、変形性腰椎症のなりやすさは骨格形成期の段階で規定されていることが推定される。つまり脊椎の変性を研究するには、脊椎形成の分子メカニズムを詳しく知る必要があるが、四肢の骨・関節と比べると脊椎形成を制御する遺伝子は多くは解明されていない。

### 2. 研究の目的

東京大学医学部整形外科ではレーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いた微小領域からの mRNA の採取、増幅、RNA シーケンスによる網羅的発現解析法を確立している (*Biomed Res.* 35:263-70, 2014)。本研究ではまずこの技術を応用して、線維輪、髄核、椎体周囲靭帯が形成される過程で各組織ごとの経時的発現遺伝子変化をプロファイリングする。さらにこのデータからそれぞれの組織に特異的に発現する遺伝子を選別し、脊椎の発生を制御する候補遺伝子として解析対象にするとともに、特異性の高いものについては Cre マウスを樹立する。また平行して、マウスの腰椎に外科的不安定性を惹起させ、椎間板変性から変形性腰椎症を誘導させるモデルの開発も行う。そしてこれらの過程で得られた遺伝子発現情報と基盤ツールを基に、変形性腰椎症 GWAS で既に得られている候補遺伝子群についても統合的に解析を行い、脊椎の形成・維持・発生への関与を *in vitro*, *in vivo* の実験系で多角的に検証し、その分子制御機構の解明に挑む。

### 3. 研究の方法

#### (1) レーザーマイクロダイセクションなどを用いた脊椎の発現解析

申請者らは昨年、硬組織から LMD にて微小組織サンプルを回収し、mRNA を逆転写、増幅して RNA シーケンスを行う手法を確立、報告した (*Biomed Res.* 35:263-70, 2014)。この技術を用いて脊椎の詳細な発現解析を行う。まず切片作成に十分な大きさとなる E10.5-11.5 から、骨格成長が落ち着く生後 8w までのマウスサンプルを時系列に採取し、固定なしに専用コンパウンドに包埋して液体窒素内で急速凍結させる。川本法に準じて凍結切片を作成したのち、LMD によって各段階の線維輪、髄核、周囲靭帯を切り取る。回収されたサンプルから mRNA を回収し、逆転写、増幅を行ったのちに RNA シーケンスを行い、遺伝子群の発現量とその変化を詳細に解析する。

#### (2) 線維輪、髄核のマーカー遺伝子の選別と、組織特異的 Cre マウスの樹立

(1)で得られたデータから、発現量が豊富で、かつ組織特異性の高い遺伝子を選別する。in situ hybridization 法や免疫組織染色法など複数の方法で発現パターンを確認するとともに、既に Cre マウスが開発されていないかを調査する。既報があればマウス提供を依頼するが、既報がなければ Cre マウスを樹立する。その遺伝子座に Cre を直接ノックインすると、その遺伝子をヘテロノックアウトすることになるが、従来のトランスジェニックマウスの手法では生理的発現に必要なプロモーターやエンハンサーの予想が困難であることから、両者の中間的な手法である、BAC クローンを用いたトランスジェニックマウス作成を行う(図6)。この手法では当該遺伝子の周辺領域を丸ごと含んだ BAC クローンを用い、その翻訳領域を Cre カセットに置き換えるが、これによって当該遺伝子の発現に影響を与えることなく、生理的発現パターンを再現することが期待される。カセットとしては、セルトラッキングにも応用できるように EGFP も付けて、遺伝子組み換えのタイミングを自由にコントロールできるように ERT2 カセットを Cre に接合する。

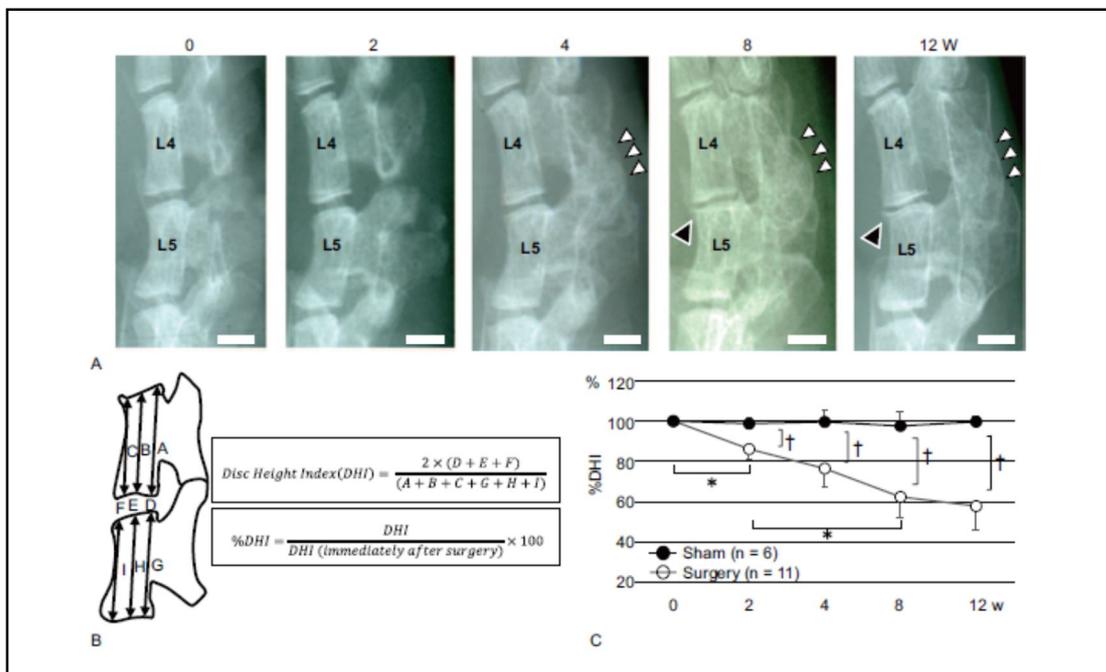
### (3) マウス変形性腰椎症モデルの確立

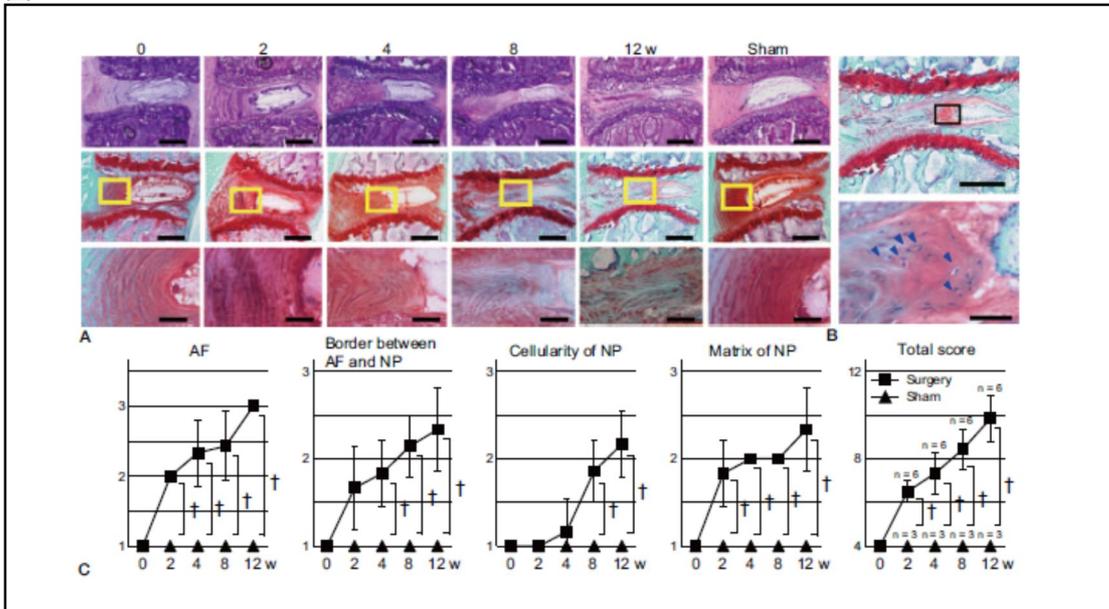
マウスの第 4-5 腰椎の棘突起、棘上・棘間靭帯、椎間関節を切除することによって脊椎の後方の支持機構を破綻させ、腰椎椎間板に過剰な負荷をかけるモデルを確立する。経時的に飼育を行い、椎体の変形の程度についても解析を行う。

## 4. 研究成果

まずマウス変形性腰椎症モデルの開発については、初年度にバリデーションも完了して論文公表に至った。マウスの第 4-5 腰椎の棘突起、棘上・棘間靭帯、椎間関節を切除することによって脊椎の後方の支持機構を破綻させ、経時的に椎間板腔の狭小化がみられ、一部に骨棘の形成も確認された(図1)。組織学的にも椎間板が線維輪内側から変性していくのが確認された(図2)。

図 1





次にレーザーマイクロダイセクションなどを用いた脊椎の発現解析として、硬組織から LMD にて微小組織サンプルを回収し、mRNA を逆転写、増幅して RNA シーケンスを行う手法を転用した (Biomed Res. 35:263-70, 2014)。まず切片作成に十分な大きさとなる E10.5-11.5 から、骨格成長が落ち着く生後 8w までのマウスサンプルを時系列に採取し、固定なしに専用コンパウンドに包埋して液体窒素内で急速凍結させ、川本法に準じて凍結切片を作成したのち、LMD によって各段階の線維輪、髄核、周囲靭帯を切り取った。回収されたサンプルから mRNA を回収し、逆転写、増幅を行ったのちに RNA シーケンスを行い、遺伝子群の発現量とその変化を詳細に解析した。発現遺伝子についてパスウェイ解析を行い、それぞれの組織で重要な役割を果たすであろうシグナル経路の候補を複数得たが、特に TGF-beta に関する動きが大きいことが分かった。

また特徴的な発現パターンを示す遺伝子のうち、椎間板線維輪の内側に特異的に発現する遺伝子についてはタモキシフェン誘導性の Cre マウスを樹立し、Rosa26-tdTomato と交配させてトラッキングを行ったところ、椎間板線維輪周辺の progenitor と思われる細胞群を標識することができた。現在このマウスを用いて詳細にセルトラッキングを行うとともに、その細胞の特性について解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suto Takahito, Yonemoto Yukio, Okamura Koichi, Sakane Hideo, Takeuchi Kimihiko, Tamura Yasuyuki, Kaneko Tetsuya, Ayabe Keio, Chikuda Hiroataka	4. 巻 Aug 10
2. 論文標題 The three-year efficacy of iguratimod in clinical daily practice in patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1510879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Masaya, Saito Kenichi, Yanagawa Takashi, Chikuda Hiroataka, Tsushima Yoshito	4. 巻 36
2. 論文標題 Phase I clinical trial of percutaneous cryoablation for osteoid osteoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 669~675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11604-018-0768-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okura Chisa, Ishikawa Hajime, Abe Asami, Yonemoto Yukio, Okamura Koichi, Suto Takahito, Oyakawa Tomo, Miyagawa Yusuke, Otani Hiroshi, Ito Satoshi, Kobayashi Daisuke, Nakazono Kiyoshi, Murasawa Akira, Takagishi Kenji, Chikuda Hiroataka	4. 巻 21
2. 論文標題 Long-term patient reported outcomes of elbow, wrist and hand surgery for rheumatoid arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1701~1708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takasawa Eiji, Sorimachi Yasunori, Iizuka Yoichi, Tsunoda Daisuke, Mieda Tokue, Iizuka Haku, Chikuda Hiroataka	4. 巻 Jan 4
2. 論文標題 Risk Factors for Rapidly Progressive Neurological Deterioration in Cervical Spondylotic Myelopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SPINE	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Tetsuya, Okamura Koichi, Yonemoto Yukio, Okura Chisa, Suto Takahito, Tachibana Masahiro, Tamura Yasuyuki, Inoue Makoto, Chikuda Hirotaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Short-term daily teriparatide in patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1362093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Reo, Sumitani Masahiko, Ogata Toru, Chikuda Hirotaka, Matsubara Takehiro, Kato So, Shimojo Nobutake, Uchida Kanji, Yamada Yoshitsugu	4. 巻 653
2. 論文標題 Direct evidence of central nervous system axonal damage in patients with postoperative delirium: A preliminary study of pNF-H as a promising serum biomarker	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 39~44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2017.05.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Yuki, Kawata Manabu, Ho Chang Song, Mori Daisuke, Okada Keita, Kobayashi Hiroshi, Sugita Shurei, Hosaka Yoko, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Yano Fumiko, Ikeda Toshiyuki, Akiyama Haruhiko, Mills Alea A., Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Kawaguchi Hiroshi, Saito Taku	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 598~609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.39976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayakawa Kentaro, Kurano Makoto, Ohya Junichi, Oichi Takeshi, Kano Kuniyuki, Nishikawa Masako, Uranbileg Baasanjav, Kuwajima Ken, Sumitani Masahiko, Tanaka Sakae, Aoki Junken, Yatomi Yutaka, Chikuda Hirotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Lysophosphatidic acids and their substrate lysophospholipids in cerebrospinal fluid as objective biomarkers for evaluating the severity of lumbar spinal stenosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45742-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoda Daisuke, Iizuka Yoichi, Mieda Tokue, Iizuka Haku, Chikuda Hirotaka	4. 巻 2019
2. 論文標題 Unusual Painful Muscle Spasm in a Dialysis-Dependent Patient with Progressive Cervical Kyphosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Orthopedics	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7062568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshii Toshitaka, Egawa Satoru, Hirai Takashi, Kaito Takashi, Mori Kanji, Koda Masao, Chikuda Hirotaka, Hasegawa Tomohiko, Imagama Shiro, Yoshida Masahiro, Iwasaki Motoki, Okawa Atsushi, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 25
2. 論文標題 A systematic review and meta-analysis comparing anterior decompression with fusion and posterior laminoplasty for cervical ossification of the posterior longitudinal ligament	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 58~65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takasawa Eiji, Sorimachi Yasunori, Iizuka Yoichi, Tsunoda Daisuke, Mieda Tokue, Iizuka Haku, Chikuda Hirotaka	4. 巻 44
2. 論文標題 Risk Factors for Rapidly Progressive Neurological Deterioration in Cervical Spondylotic Myelopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SPINE	6. 最初と最後の頁 E723~E730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imagama Shiro, Chikuda Hirotaka, et al.	4. 巻 43
2. 論文標題 Perioperative Complications After Surgery for Thoracic Ossification of Posterior Longitudinal Ligament	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 SPINE	6. 最初と最後の頁 E1389~E1397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Lucas S?bastien, Primbs Tatjana, Knipfer Lisa, Wirtz Stefan, Kadono Yuhō, Saito Taku, Tanaka Sakae, Sarter Kerstin, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Type 2 innate lymphoid cells inhibit the differentiation of osteoclasts and protect from ovariectomy-induced bone loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115335 ~ 115335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chijimatsu Ryota, Nakamoto Hideki, Maenohara Yuji, Amakawa Masahiro, Miyake Yoshihide, Yamanaka Hiroyuki, Iba Kousuke, Yamashita Toshihiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of EP4-selective agonist KAG-308 suppresses mouse knee osteoarthritis development through reduction of chondrocyte hypertrophy and TNF secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56861-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oichi Takeshi, Taniguchi Yuki, Soma Kazuhito, Chang Song Ho, Yano Fumiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 43
2. 論文標題 A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically Induced Instability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 SPINE	6. 最初と最後の頁 E557 ~ E564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Oichi T, Saito T, et al
2. 発表標題 A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-induced Instability
3. 学会等名 Annual meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 栄  (Tanaka Sakae)  (50282661)	東京大学・医学部附属病院・教授   (12601)	
研究 分担者	大島 寧  (Yasushi Oshima)  (50570016)	東京大学・医学部附属病院・講師   (12601)	
研究 分担者	松林 嘉孝  (Yoshitaka Matsubayashi)  (50747962)	東京大学・医学部附属病院・助教   (12601)	