

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0051

研究課題名(和文) 栄養環境センサーを分子基軸とした脊椎側弯症に対する発症・進行予測技術の開発

研究課題名(英文) Establishment of a research platform for developing radical treatment and early predictive diagnostics for scoliosis through nutritional environmental signals

研究代表者

檜井 栄一 (Eiichi, Hinoi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70360865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子改変マウスを用いて脊椎側弯症の発症・進展におけるアミノ酸シグナルの重要性を検討した。その結果、細胞への必須アミノ酸輸送を担うアミノ酸トランスポーターを軟骨細胞特異的に欠損させると、胸郭変形を伴う重篤な脊椎側弯症を生じることが明らかになった。また、アミノ酸シグナルを細胞内で統合するmTORC1シグナルを軟骨細胞特異的に活性化すると脊椎側弯を含む骨格形成異常が生じることを見出した。これらの成果により、アミノ酸シグナルは脊椎・胸郭の恒常性維持に必須であり、その機能異常が脊椎側弯症の発症・進展に関与する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

本研究結果により、軟骨細胞のアミノ酸トランスポーター/mTORC1シグナルは、脊椎恒常性維持に重要な役割を果たしており、その機能破綻により脊椎側弯症が生じる可能性が示唆された。これらの成果を基盤として、アミノ酸トランスポーターを分子基軸とした思春期突発性脊椎側弯症に対する根本治療薬開発および早期予測診断技術開発を行うための研究基盤が確立されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the importance of amino acid signal for onset and progression of scoliosis with rib anomalies using genetically modified mice. Serious scoliosis with thoracic deformity was caused by inactivation of amino acid transporter and activation of mTOR signaling in chondrocyte. These results suggest that dysfunction of amino acid signal may be involved in the onset and progression of scoliosis.

研究分野：薬理学

キーワード：脊椎側弯症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎側弯症は脊椎が側方に湾曲する病気である。多くの患者は、その容姿や心理的ストレスに苦しみ、側弯変形による腰痛や背部痛、呼吸機能障害などに苦しんでいる。側弯症全体の約80%を原因不明の突発性側弯症が占めている。突発性側弯症の多くは、思春期の女の子(男女比=1:7)に発症(思春期突発性脊椎側弯症)するが、自覚症状が乏しく、外見の変化が明らかになるころには、脊椎の変形が相当に進んでいる場合が多い。脊椎の変形が進行すると自然治癒することはなく、矯正術や外科的手術が必要となり、治療タイミングを逃さないためにも早期発見が必須である。すなわち、思春期突発性脊椎側弯症の根本治療薬開発のみならず、思春期突発性脊椎側弯症発症や病態進行の早期予測診断技術の開発は喫緊の課題である。

アミノ酸シグナルの開始にはトランスポーターを介したアミノ酸の細胞内流入が欠かせない。脊椎の骨軟骨組織は、大腿骨のような長骨と同様に、軟骨細胞による軟骨形成後に骨芽細胞による骨形成が行われる「内軟骨性骨化」という機構によって形成される。申請者はこれまでに、必須アミノ酸輸送を担うアミノ酸トランスポーターが「内軟骨性骨化」による骨格形成および維持に必須であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

思春期突発性脊椎側弯症は遺伝的要因と環境的要因の相互作用により発症する多因子遺伝病であり、これまでヒトにおけるGenome Wide Association Studyによる一塩基多型探索などにより、*LBX1*、*BNC2*や*GPR126*など思春期突発性脊椎側弯症の疾患感受性遺伝子がいくつか同定されてきている。しかしながら、アミノ酸シグナルの機能異常と思春期突発性脊椎側弯症発症との相関性については、全く明らかとなっていない。

したがって本研究では、アミノ酸トランスポーターを分子基軸とした思春期突発性脊椎側弯症に対する根本治療薬開発および早期予測診断技術開発を行うための研究基盤確立を目指し、遺伝子改変マウスおよびゼブラフィッシュを用いて、アミノ酸トランスポーターの機能異常と思春期突発性脊椎側弯症の発症との関連性を検討した。

3. 研究の方法

(1)軟骨細胞特異的な遺伝子欠損マウスを作製するため、*Col2a1-Cre* マウスをドライバーとして用いた。軟骨細胞特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスを作製し、生後1週目から8週目までmicroCT解析および組織学的解析により、脊椎および胸骨の表現型解析を行った。また、タモキシフェン投与により時期特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスを作製するために、*Rosa26-CreER* マウスを用いた。時期特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスを作製し、生後直後にタモキシフェンを投与して、遺伝子欠損を誘導した。軟骨細胞特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスと同様に、生後1週目から8週目までmicroCT解析により、脊椎および胸郭の表現型解析を行った。

CRISPR-Cas9による遺伝子編集システムを用いて、アミノ酸トランスポーター欠損ゼブラフィッシュを樹立し、顕微鏡下での骨格表現型を観察した。

(2)軟骨細胞特異的な遺伝子欠損マウスの脊椎を摘出し、ウエスタンブロット法により、mechanistic target of rapamycin complex-1(mTORC1)シグナルおよびgeneral amino acid control(GAAC)経路に関わるタンパク質発現量およびリン酸化量を測定した。

(3)軟骨細胞特異的なmTORC1シグナル活性化マウスを作製し、生後1週目から4週目までmicroCT解析および組織学的解析により、脊椎および胸郭の表現型解析を行った。

4. 研究成果

(1)軟骨細胞特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスの表現型解析を行った。その結果、同マウスは生後2週目以降に明確な脊椎側弯症の症状を呈した。さらに、時期特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスの表現型を解析したところ、少なくとも生後に遺伝子欠損を誘導した場合、著明な脊椎側弯症症状は観察されなかった。したがって、胎生期の軟骨細胞におけるアミノ酸トランスポーターが生後の脊椎恒常性の維持や脊椎側弯症の発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

CRISPR-Cas9による遺伝子編集システムを用いて作製したアミノ酸トランスポーター欠損ゼブラフィッシュの表現型を解析したところ、遺伝子改変マウスで認められた脊椎側弯や胸郭異常は観察されなかった。

(2)(1)の研究成果により、軟骨細胞特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスが思春期以降に症状の出現するヒト思春期突発性脊椎側弯症の臨床症状と高い類似性を呈することが明らかになった。したがって次に、軟骨細胞特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスを用いて、軟骨組織におけるアミノ酸トランスポーターの下流因子(脊椎恒常性維持に関与する責任因子)の同定を試みた。その結果、軟骨細胞特異的なアミノ酸トランスポーター欠損マウスの軟骨組織において、p70S6Kのリン酸化低下(mTORC1シグナルの低下)およびeIF2αのリン酸化亢進とATF4発現亢進(GAAC経路の亢進)が認められた。したがって、軟骨細胞のアミノ酸トランスポー

ーの下流には mTORC1 シグナルと GAAC 経路が存在することが明らかになった。

(3) 軟骨細胞のアミノ酸トランスポーターの下流に mTORC1 シグナルが存在することが明らかになったことから、次に軟骨細胞特異的 mTORC1 活性変動マウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、軟骨細胞特異的に mTORC1 を活性化した場合、重篤な脊椎側弯および胸郭変形を呈することが明らかになった。

以上の結果により、軟骨細胞のアミノ酸トランスポーター/mTORC1 シグナルは、脊椎恒常性維持に重要な役割を果たしており、その機能破綻により脊椎側弯症を呈する可能性が示唆された。本研究成果により、アミノ酸トランスポーターを分子基軸とした思春期突発性脊椎側弯症に対する根本治療薬開発および早期予測診断技術開発を行うための研究基盤が確立されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Iezaki T, Fukasawa K, Horie T, Park G, Robinson S, Nakaya M, Fujita H, Onishi Y, Ozaki K, Kanayama T, Hiraiwa M, Kitaguchi Y, Kaneda K, Yoneda Y, Takarada T, Guo XE, Kurose H, Hinoi E.	4. 巻 145
2. 論文標題 The MAPK Erk5 is necessary for proper skeletogenesis involving a Smurf-Smad-Sox9 molecular axis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev164004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.164004.	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 Iezaki T, Horie T, Fukasawa K, Kitabatake M, Nakamura Y, Park G, Onishi Y, Ozaki K, Kanayama T, Hiraiwa M, Kitaguchi Y, Kaneda K, Manabe T, Ishigaki Y, Ohno M, Hinoi E.	4. 巻 11
2. 論文標題 Translational Control of Sox9 RNA by mTORC1 Contributes to Skeletogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 228-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.05.020.	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 Hiraiwa M, Ozaki K, Yamada T, Iezaki T, Park G, Fukasawa K, Horie T, Kamada H, Tokumura K, Motono M, Kaneda K, Hinoi E.	4. 巻 10
2. 論文標題 mTORC1 Activation in Osteoclasts Prevents Bone Loss in a Mouse Model of Osteoporosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2019.00684	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 Ozaki K, Yamada T, Horie T, Ishizaki A, Hiraiwa M, Iezaki T, Park G, Fukasawa K, Kamada H, Tokumura K, Motono M, Kaneda K, Ogawa K, Ochi H, Sato S, Kobayashi Y, Shi Y.B, Taylor P.M, Hinoi E.	4. 巻 12
2. 論文標題 The L-type amino acid transporter LAT1 inhibits osteoclastogenesis and maintains bone homeostasis through the mTORC1 pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Signal.	6. 最初と最後の頁 eaaw3921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1126/scisignal.aaw3921	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 檜井栄一
2. 発表標題 骨を造る細胞の新たな役割 ~ 免疫・代謝・記憶 ~
3. 学会等名 第40回日本臨床栄養学会総会・第39回日本臨床栄養協会総会・第16回大連合大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜井栄一
2. 発表標題 骨軟骨代謝調節と時計遺伝子について
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜井栄一
2. 発表標題 アミノ酸トランスポーターと骨代謝
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2019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	小林 功 (Kobayashi Isao) (30774757)	金沢大学・生命理工学系・助教 (13301)	