

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591734

研究課題名（和文） 退行変性性腰痛症に対する新たな治療法開発に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Link between estrogen and TGF-beta signaling in intervertebral disc metabolism - possible therapeutic target for degenerative disc disease

研究代表者

千葉 一裕 (CHIBA KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：80179952

研究成果の概要：軟骨細胞において、エストロゲンはエストロゲン受容体（ER）依存性に TGF- β 下流の p38MAP キナーゼシグナルと相乗的に作用することで、II 型コラーゲン遺伝子発現を誘導することが明らかになった。卵巣摘出モデルおよび ER α 欠損マウスの表現型から、リガンド結合型 ER は椎体軟骨終板および椎間板基質の恒常性維持に寄与していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：エストロゲン・椎間板

1. 研究開始当初の背景

高齢者社会に突入している現在において、腰痛症の一因となる椎間板変性のメカニズムを解析し、臨症の現場へ還元することは、有意義なことと考えられる。

閉経は各臓器に様々な影響を及ぼすことが知られており、骨格系においては、骨の高代謝回転を引き起こして骨粗鬆症を生じさせ、脊椎圧迫骨折の大きな要因となっていることが知られている。このように閉経が原因となって引き起こされる症状は、主にエストロゲンとの因果関係が指摘され、現在までエストロゲン欠乏と多くの骨・軟骨系の代謝異常との作用機序が報告されている。変形性膝関

節症や椎間板変性（ともに軟骨組織に生じる）も閉経後の女性に多く所見が認められ、エストロゲン欠乏との関連が強く示唆されている病態ではあるが、その発症機序の詳細はわかっておらず、特に椎間板軟骨におけるエストロゲンの明確な分子作用機序については全く明らかになっていないのが現状である。

椎間板変性は、椎間板長の減少、細胞密度の減少、II 型コラーゲンの減少等で特徴づけられる。II 型コラーゲンは軟骨細胞の産生する主要な細胞外基質であり、椎間板の恒常性維持に重要な役割を果たしている。例えば *Col2a1* 遺伝子欠損マウスは、椎体軟骨終板

における骨化不全と椎間板変性を示す。

Col2a1 遺伝子の転写調節機構としては、転写因子 Sox9 による調節が研究されている。Sox9 は、*Col2a1* 遺伝子の第1イントロンに存在するエンハンサーに結合し、補因子 CBP/p300 等と結合し、転写活性を上昇させる。

TGFβ1 は、多種の細胞に対し広範な作用を示す因子である。ことに、TGFβ1 は細胞外基質の生成を促進することが知られている。また TGFβ1 は、ニワトリ胚芽の *Col2a* mRNA を増加させ、間葉系幹細胞からの軟骨細胞分化を促進することも知られている。しかしながら、TGFβの細胞内シグナル伝達因子 Smad6 の過剰発現マウスあるいは Smad4 の遺伝子欠損マウスにおいて、軟骨では大きな異常が観察されない。これらの結果から、軟骨細胞では TGFβは S 非依存性のシグナル伝達経路を利用していることが予想される。p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)の阻害剤が、ニワトリの軟骨細胞分化を阻害することが報告されている。また、マウスメサングウム細胞では、コラーゲン産生は TGFβ/MAP kinase 3 (MKK3)/p38 MAPK の経路によることが報告されている。

2. 研究の目的

閉経後のエストロゲン欠乏による骨粗鬆症性脊椎圧迫骨折は、慢性的な腰痛症の原因となるが、エストロゲンが椎間板変性に及ぼす影響を詳細に検討した報告はない。そこで、椎間板代謝におけるエストロゲンシグナルの役割、ことに II 型コラーゲン遺伝子の転写調節に対する作用を詳しく検討した。

まず、マウス成体においてエストロゲンシグナルが椎間板軟骨の恒常性維持に関与することを検討するために、卵巣摘出ラットモデルおよび ER^{-/-}ER 欠損マウスの椎間板を組織学的に解析した

エストロゲンは、核受容体スーパーファミリーに属するエストロゲン受容体 (ER) と結合し、その作用を発揮する。ホモ2量体 ER は、標的遺伝子プロモーター上のエストロゲン応答配列 (estrogen-responsive elements:ERE) に結合する。ERE に結合した ER は多数の転写補因子から成る巨大な転写因子複合体を形成し、クロマチン構造を再構成し転写を開始すると考えられている。

最近の研究結果から、ER シグナルは MAPK シグナルと cross-talk することが明らかとなった。例えば、エストロゲン依存性の癌細胞の増殖は、ER と MAPK シグナルとの cross-talk によることが報告されている。雌ラット成長板軟骨では、エストロゲンは細胞内カルシウム上昇を介して protein kinase C (PKC) を活性化し、その刺激が MAPK を介して

遺伝子発現を調節するとも報告されている。しかし、軟骨の II 型コラーゲン遺伝子の転写調節にエストロゲンが関与するとの報告は無い。また、同遺伝子の転写調節に ER と MAPK との cross-talk があることも知られていない。

3. 研究の方法

(1) 卵巣摘出ラット: 8週齢 Wistar 雌ラットに卵巣摘出手術を施し、術後3ヶ月および7ヶ月に椎体を回収し、組織学的に解析した。

(2) ER^{-/-}ER 欠損マウス: 15ヶ月齢雌 ER^{-/-}ER 欠損マウスの椎間板を採取し、同月齢の野生型マウスと組織学的に比較した。

(3) 初代軟骨細胞: 新生児あるいは胎生 E18.5 の肋軟骨をコラーゲナーゼ処理し、初代軟骨細胞を調製した。活性炭処理した血清中で単層培養した軟骨細胞を16時間 17- β -estradiol (E2) または TGFβ1 で刺激した後、型コラーゲン mRNA (*Col2a1*) の発現誘導を RT-PCR あるいは real-time RT-PCR で定量した。TGFβ1 受容体阻害剤として、SB431542 (10 μg/ml) を用いた。

(4) レポーターアッセイ: 軟骨様細胞株 ATDC5 細胞を用いて、ER 転写活性ならびに型コラーゲン遺伝子 (*Col2a1*) 転写活性をルシフェラーゼ=レポーターを用いて検討した。ATDC5 細胞に、エストロゲン応答配列発現レポーターあるいは *Col2a1* promoter-enhancer 発現レポーター (promoter + 4x48 bp 1st intron enhancer) を、lipofectamine を用いて導入した。その際、ER, Dominant negative ER α , Sox9, GRIP1, p300, Constitutive active MKK6 発現ベクターを適宜共導入した。導入24時間後、E2 (10⁻⁹ M)、TGFβ1 (10 ng/ml)、SB202190 (10 μg/ml, p38 MAPK 阻害剤) を添加し、16時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。導入効率を標準化するために、レニラ=ルシフェラーゼを用いた。

(5) 免疫染色: ATDC5 細胞へ EGFP-GRIP 発現ベクターを導入し、細胞を固定後、ER 抗体で免疫蛍光染色をした。GRIP と ER の核内共局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ER α 欠損マウスは野生型と異なり、加齢とともに長幹骨の成長軟骨板が完全に閉鎖し、15ヶ月齢において椎体軟骨終板に明らかな変性像がみられた。ER β 欠損マウスでは、椎体軟骨終板に変性は認められなかった。

(2) 卵巣摘出ラットは sham control に比べ、術後3ヶ月、7ヶ月で椎体軟骨終板で変性が進んでいた。この変性は軟骨終板が2

次骨化あるいは石灰化により骨に置換されていることが特徴であった。組織免疫染色により、卵巣摘出ラットではII型コラーゲン陽性領域の減少が認められた。また、組織免疫染色により軟骨終板にER α ・ER β の発現を確認した。

(3) 野生型マウス由来軟骨細胞ではE2またはTGF β 1刺激により*col2a1* mRNAが上昇し、SB431542(TGF β 1受容体阻害剤)添加により、その活性上昇は抑制された。一方、ER α 欠損マウス由来軟骨細胞ではE2刺激による*col2a1* mRNAの発現上昇は認められなかった。この結果は、軟骨細胞における*col2a1*の発現がE2により調節されており、さらにE2シグナルがTGF β 1シグナルとcross-talkすることを示唆しているため、次に*col2a1* promoterを用いて、その転写制御機構を詳細に検討した。

(4) ATDC5細胞に導入された*col2a1* promoter活性は、E2およびTGF β 1刺激によって、ER α 依存的に活性化された。また、E2とTGF β 1の同時添加により、*col2a1* promoter活性は相乗的に誘導された。E2とTGF β 1同時添加により活性化されたpromoter活性は、ICI182780(ER α 阻害剤)添加により部分的抑制を受け、SB202190(p38 MAPK阻害剤)添加により完全に抑制された。また、同活性はDominant negative ER α の導入により濃度依存的に完全に抑制された。以上の結果から、*col2a1*の転写はER α により正の制御を受けており、そのシグナルはTGF β 1/p38 MAPKシグナルとcross-talkすると結論した。

(5) ATDC5細胞にエストロゲン応答領域レポーターを導入し、ER α による転写制御機構を検討した。恒常活性型MKK6およびER α の同時導入によりレポーター活性は上昇した。さらに、転写共役因子GRIP1を同時導入すると、レポーター活性は、E2添加により強力に上昇した。この活性上昇は、Dominant negative GRIP1の導入により、完全に抑制された。ATDC5細胞へEGFP-GRIP1を導入し、内在性のER α との核内局在を比較した。ER α は、比較的均一な粒状の染色パターンを示した。EGFP-GRIP1は数種類の染色パターンを示したが、そのうち大きな斑点状(Foci)の構造が、しばしばER α の染色像と一致した。GRIP1の軟骨分化に対する生理的役割を確定するために、GRIP1 siRNAを用いて、軟骨分化、石灰化、*col2a1*産生に対する効果を現在検討中である。

(6) これらの結果からエストロゲンは軟骨組織において、ER α を介しTGF β 1-p38MAPKシグナルと相乗的に作用することで*col2a1*発現を正に調節することが明らかとなった。エストロゲンが、椎体軟骨終板の生理的なマトリックス代謝に影響を与え、直接および間接的に椎間板組織の恒常性維

持に寄与する可能性が示唆された。以上から、エストロゲン欠乏は椎間板変性のリスクファクターの一つと考えられた。閉経後骨粗鬆症治療薬として使用されている選択的エストロゲン受容体作動薬が椎間板変性への治療方針となりうる可能性を示した。

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8件)

Morisue H, Matsumoto M, Chiba K, Matsumoto H, Toyama Y, Aizawa M, Kanzawa N, Fujimi TJ, Uchida H, Okada I. Novel apatite fiber scaffolds can promote three dimensional proliferation of osteoblasts in rodent bone regeneration models.

J Biomed Mater Res A. Epub ahead of print.2009, 査読有

Fujita N, Chiba K Vascular endothelial growth factor A is a survival for nucleus pulposus cells in the intervertebral disc.

Biochem Biophys Res Commun 372 巻(367-372) 2008, 査読有

Hirose Y, Chiba K A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar disc herniation.

Am J Hum Genet 82 巻(1122-1129) 2008, 査読有

Fukui M, Chiba K Japanese Orthopaedic Association Back Pain Evaluation Questionnaire. Part 3. Validity study and establishment of the measurement scale: Subcommittee on Low Back Pain and Cervical Myelopathy Evaluation of the Clinical Outcome Committee of the Japanese Orthopaedic Association, Japan.

J Orthop Sci 13 巻(173-179) 2008, 査読有

Matsumoto M, Chiba K Surgical results and related factors for ossification of posterior longitudinal ligament of the thoracic spine: a multi-institutional retrospective study.

Spine 33 巻(1034-1041) 2008, 査読有

Matsumoto M, Chiba K Risk factors for closure of lamina after open-door laminoplasty.

J Neurosurg Spine 9 巻(530-537) 2008, 査読有

Miyake A, Nishimura G, Futami T, Ohashi

H, Chiba K, Toyama Y, Furuichi T, Ikegawa S.

A compound heterozygote of novel and recurrent DTDST mutations results in a novel intermediate phenotype of Desbuquois dysplasia, diastrophic dysplasia, and recessive form of multiple epiphyseal dysplasia.

J Hum Genet (367 -372) 2008, 査読有

Nakamura M, Ishii K, Watanabe K, Tsuji T, Takaishi H, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K. Surgical treatment of intramedullary spinal cord tumors: prognosis and complications.

Spinal Cord. 46 巻 (282 -286) 2008, 査読有

[学会発表](計 7 件)

Kato, M. et al., A possible link between estrogen and TGF- β signaling in intervertebral disc metabolism: Estrogen receptor- α -dependent regulation of type II collagen gene expression in chondrocytic cells.

55th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society.

2009 年 2 月 22 -24 日

Sands Expo Convention Center

NV USA

加藤 雅敬 (KATO MASANORI)

卵巣摘出ラットにおける椎間板変性機序の解析(第 2 報) ER を介した II 型コラーゲン遺伝子の転写制御について

第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会

2008 年 10 月 24 日

国立京都国際会館

Kato, M. et al., Estrogen Regulates Type II Collagen Gene Expression via ER α -dependent Genomic Actions in Rat Intervertebral Disc Cells

第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会

2008 年国際腰椎学会

2008 年 5 月 2 -6 日

Geneva Switzerland

Kato, M. et al., Type II Collagen Gene Expression of Intervertebral Disc in Ovariectomized Rats.

54th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society.

2008 年 3 月 2 -5 日

San Francisco, CA USA

Kato, M. et al., Type II Collagen Gene Expression of Intervertebral Disc in Ovariectomized Rats.

6th Combined Meeting of Orthopaedic Research Society

2007 年 10 月 20 -24 日

Hawaii Convention Center, HI USA

Kato, M. et al., Degeneration of Intervertebral Disc in Ovariectomized Rats. 29th The American Society for Bone and Mineral Research.

2007 年 9 月 17 日

Hawaii Convention Center, HI USA

加藤 雅敬 (KATO MASANORI)

ラット卵巣摘出モデルにおいて椎間板変性は経時的に進行する

第 25 回日本骨代謝学会

2007 年 7 月 21 日

大阪国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 一裕 (CHIBA KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 80179952

(2) 研究分担者

高石 官成 (TAKAISHI HIRONARI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 60236180

辻 崇 (TSUJI TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 60296639

(3) 連携研究者