

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09597

研究課題名(和文) ヒト椎間板変性に対するエピゲノムワイド関連解析

研究課題名(英文) Epigenome-wide association study of human intervertebral disc degeneration

研究代表者

明田 浩司 (Akeda, Koji)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20422826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト椎間板組織のエピゲノムワイド関連解析からDNAメチル化様式に変化を生じた225遺伝子を同定した。その中で細胞周期、細胞増殖、アポトーシスに関連する2遺伝子 (cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1 [CAPRIN1], growth arrest and DNA damage 45 gamma [GADD45G])に着目した。ヒト椎間板に2遺伝子のmRNAおよびタンパク質が発現していることを確認した。2遺伝子のタンパク発現陽性細胞数はヒト椎間板組織の変性進行期群で有意に増加していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

椎間板変性は遺伝性を背景に環境因子が影響すると考えられているが、その関連性は不明である。エピジェネティクスはDNAのメチル化修飾(DNAメチル化)を始めとした遺伝子発現を調節する機構であり、細胞分化や組織の安定化に寄与する。DNAメチル化様式に変化を生じたCAPRIN1, GADD45Gはヒト椎間板において発現しており、椎間板変性の進行に関連することが示された。エピジェネティクスの変化を背景に細胞周期関連遺伝子の発現の変化が椎間板変性の原因の一つである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide analysis of the DNA methylation profile has identified 220 differentially methylated loci associated with human intervertebral disc (IVD) degeneration. Among these, two cell-cycle associated genes, growth arrest and DNA damage 45 gamma (GADD45G) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1 (CAPRIN1), were focused on. The expression of cell-cycle-associated proteins (GADD45G and CAPRIN1) was enhanced in human NP cells at an advanced stage of degeneration, suggesting that it may be regulated during the progression of IVD degeneration to maintain the integrity of human NP tissues by controlling cell proliferation and apoptosis under epigenetic alteration.

研究分野：椎間板変性

キーワード：椎間板変性 エピジェネティクス DNAメチル化 細胞周期関連遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

椎間板は髄核とその周囲の線維輪、頭尾側の軟骨終板から構成されており、豊富な細胞外基質から成る。椎間板は脊柱の可動性、衝撃緩衝性に寄与するが、血管支配がないため組織修復・再生能が著しく低い。椎間板変性は中高年の90%以上に認められ、加齢による退行性変化と捉えることができる。しかし、椎間板の組織変性が急激に進行し、椎間板組織に亀裂、断裂が生じると疾患(椎間板症、椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄など)が発症するが組織修復能が低いため生じた組織損傷は修復されず、局所の炎症が遷延化(慢性化)し、腰痛を惹起する。

椎間板は加齢と共に、構成する細胞性質が変化し、また椎間板組織の水分含有量やプロテオグリカンが低下し、組織は線維化に進む。分子生物学的には変性椎間板内において炎症性サイトカインの発現が上昇していることが確認されている。炎症性サイトカインに誘導された様々な基質分解酵素が椎間板組織の崩壊を進行させていると考えられている。これら特徴的な変化を呈する椎間板変性の原因はすべて解明されていないが、年齢、性別、遺伝因子を背景に環境因子が影響すると考えられている。

エピジェネティクスとは、DNA配列の変化を伴わず、後天的に特定の遺伝子発現が調整され維持される仕組みであり、DNAメチル化やヒストン修飾が遺伝子発現を調整するスイッチ(オン、オフ)の役割をしている。その中でDNAメチル化とは、ゲノムDNAの3'-CG-5'(CpG配列)のC(シトシン)にメチル基が付加される反応(メチル化修飾)を言い、これにより特定の遺伝子発現が制御される。発達段階においてDNAメチル化のパターンにより、発現する遺伝子が調節され、様々な細胞に分化する。従って、DNAメチル化はヒトのように複雑な生物の体を正確に形づくるために必須の仕組みである。さらに、メチル化修飾は維持されることにより、分化後の組織の安定化に働く。そして、興味深いことにDNAメチル化状態は環境因子により変化することが知られている。したがって遺伝因子および環境因子と椎間板変性の関連性を繋ぐ鍵としてエピジェネティクスが重要な働きをしている可能性が高い。

椎間板変性は遺伝性を背景に環境因子が影響すると考えられているが、その関連性は不明である。エピジェネティクスはDNAのメチル化修飾(DNAメチル化)を始めとした遺伝子発現を調節する機構であり、細胞分化や組織の安定化に寄与する。一方、DNAメチル化の異常は様々な疾患の発症に関連することが報告されている。しかし、これまで椎間板変性とエピジェネティクスの関連性は明らかになっていない。本研究の目的はヒト椎間板組織のエピゲノムワイド関連解析からDNAメチル化特性を椎間板変性度別に解析し、椎間板変性の鍵となる候補遺伝子を同定し、その機能解析を行うことである。

2. 研究の目的

エピジェネティクスはDNAのメチル化修飾を始めとした遺伝子発現を調節する機構であり、様々な疾患の発生に関与する。我々はヒト椎間板組織のエピゲノムワイド関連解析を行い、椎間板変性に関連する225遺伝子を同定した。その中で、細胞周期に関連する2遺伝子(cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1 [CAPRIN1]およびgrowth arrest and DNA damage inducible 45 gamma [GADD45G])に着目した。CAPRIN1は細胞増殖に関連するRNA結合蛋白である。GADD45Gはヒト染色体9番上の遺伝子であり、DNA修復、細胞周期制御、アポトーシスに関与している。そこで我々は、CAPRIN1およびGADD45Gの発現が椎間板変性の進行に関与する可能性を考えた。本研究の目的は、ヒト椎間板におけるCAPRIN1およびGADD45Gの遺伝子および蛋白発現を調査し、椎間板変性との関連性を評価することである。

3. 研究の方法

1) ヒト椎間板細胞分離および培養法

手術(脊椎椎体間固定術)にて搔爬、摘出した椎間板組織の内、病理診断に使用されない余剰検体を本研究に使用した。手術室にて椎間板組織は、肉眼的に髄核と線維輪組織に分離し、生理食塩水にて十分洗浄後、髄核および線維輪組織を酵素処理することにより細胞を抽出し、単層培養を行った。

2) ヒト椎間板細胞培養: 細胞数 4.0×10^4 /mlとなるように、培養液(DMEM/F12 + 10%ウシ胎仔血清[FBS])で6-well dishにて培養した。37℃、CO₂:5%環境下で7-10日間培養を行う。24時間、無血清培地で培養した後、recombinant human IL-1 (rhIL-1) (R&D Systems社製)を用いて、(0, 0.1, 1.0, 10 ng/ml)の濃度下に48時間培養した。CAPRIN1およびGADD45Gの発現は以下の方法にて検討した。1. mRNA発現: RT-PCR法、2. 蛋白発現: Western blotting (WB)法、3. 蛋白発現: 蛍光免疫染色法(共焦点レーザー顕微鏡にて観察)。

3) ヒト椎間板組織におけるCAPRIN1およびGADD45Gの免疫組織学的検討:

ヒト椎間板組織の免疫組織学的評価は、脊椎手術にて摘出した椎間板組織を使用する。Pfirrmann分類の変性初期群(Grade 1-3)と変性進行期群(Grade 4-5)に分類し、CAPRIN1およびGADD45Gに

対する抗体を用いて免疫組織学的に評価した。各組織において5観察領域を無作為に選出し、免疫反応陽性細胞数を画像解析ソフトを用いて計測し、その陽性率を算出した。

4. 研究成果

1. CAPRN1 の評価

CAPRN1 の mRNA 発現は real time-PCR 法にて確認され、IL-1 刺激により mRNA 発現が亢進する傾向を認めた。WB にて蛋白質レベルでの発現を確認した。免疫組織学的検討では変性初期と比べて変性中期と変性後期では陽性細胞率は有意に高く ($P < 0.05$)、変性中期では変性後期より強陽性細胞が多かった ($P < 0.05$)。

2. GADD45G の評価

GADD45G の mRNA 発現が確認され、WB にて蛋白質レベルでの発現も認めた。mRNA 発現は IL-1 投与においては濃度依存的に増加する傾向を認めた。免疫組織学的評価にて髓核に GADD45G 陽性の軟骨様細胞が確認され、その陽性率は変性進行期群 ($76.2 \pm 5.3\%$) が変性初期群 ($57.3 \pm 4.7\%$) と比較し有意に高値であった ($P < 0.01$)。

DNA メチル化様式に変化を生じた CAPRN1, GADD45G はヒト椎間板において発現しており、椎間板変性の進行に関連することが示された。エピジェネティクスの変化を背景に細胞周期関連遺伝子の発現の変化が椎間板変性の原因の一つである可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikuno Akihiro, Akeda Koji, Takebayashi Shin-ichiro, Shimaoka Motomu, Okumura Katsuzumi, Sudo Akihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Genome-wide analysis of DNA methylation profile identifies differentially methylated loci associated with human intervertebral disc degeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222188	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 Sano Tomohiko, Akeda Koji, Yamada Junichi, Takegami Norihiko, Sudo Takao, Sudo Akihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Expression of the RANK/RANKL/OPG system in the human intervertebral disc: implication for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2609-x	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 Kawaguchi Koki, Akeda Koji, Yamada Junichi, Hasegawa Takahiro, Takegami Norihiko, Fujiwara Tatsuhiko, Sudo Akihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Expression of GADD45G and CAPRIN1 in Human Nucleus Pulposus: Implications for Intervertebral Disc Degeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5768 ~ 5768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24065768	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Junichi Yamada; Koji Akeda; Koki Kawaguchi; Takahiro Hasegawa; Norihiko Takegami; Tatsuhiko Fujiwara; Akihiro Sudo
2. 発表標題 Expression Of Cytoplasmic Activation/proliferation-associated Protein-1 (carpin1) In The Human Nucleus Pulposus
3. 学会等名 Orthopaedic Reseach Society 2023 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Koki Kawaguchi; Koji Akeda; Takahiro Hasegawa; Junichi Yamada; Norihiko Takegami; Tatsuhiko Fujiwara; Akihiro Sudo
2. 発表標題 Expression Of Growth Arrest And Dna Damage 45 Gamma (gadd45g) In Human Nucleus Pulposus
3. 学会等名 Orthopaedic Reseach Society 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 山田淳一、明田浩司、川口航希、長谷川貴栄、竹上徳彦、藤原達彦、須藤啓広
2. 発表標題 ヒト椎間板におけるCytoplasmic activation/proliferation associated protein-1 (caprin-1)の発現
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 川口航希、明田浩司、長谷川貴栄、山田淳一、竹上徳彦、藤原達彦、須藤啓広
2. 発表標題 ヒト椎間板におけるGrowth arrest and DNA damage inducible 45 gamma (GADD45G)の発現
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 川口航希、明田浩司、長谷川貴栄、山田淳一、竹上徳彦、藤原達彦、須藤啓広
2. 発表標題 ヒト椎間板髄核におけるCaspase recruitment domain-containing protein 14 (CARD14) の発現
3. 学会等名 第52回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Koki Kawaguchi, Koji Akeda, Takahiro Hasegawa, Junichi Yamada, Norihiko Takegami, Tatsuhiko Fujiwara, Akihiro Sudo
2. 発表標題 Expression of Caspase recruitment domain-containing protein 14 (CARD14) in human nucleus pulposus
3. 学会等名 International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting, 2023 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Junichi Yamada, Koji Akeda, Koki kawaguchi, Takahiro Hasegawa, Norihiko Takegami, Tatsuhiko Fujiwara, Akihiro Sudo
2. 発表標題 Association of Expression of Cytoplasmic Activation/Proliferation-Associated Protein-1 (Caprin-1) with Human Intervertebral Disc Degeneration
3. 学会等名 International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting, 2023 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023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	奥村 克純 (Okumura Katsuzumi) (30177183)	三重大学・生物資源学研究科・招へい教授 (14101)	
研究分担者	島岡 要 (Shimaoka Motomu) (40281133)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	須藤 啓広 (Sudo Akihiro) (60196904)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------