

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09323

研究課題名(和文) mTORC1制御による椎間板変性遺伝子・薬物治療法の開発

研究課題名(英文) Development of gene and pharmacological therapies for intervertebral disc degeneration by modulating mTORC1

研究代表者

由留部 崇 (YURUBE, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10514648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット椎間板圧迫モデルでmTORC1構成体RAPTORを標的としたRNA干渉の局所導入による画像・組織学的変性抑制効果が示唆された。ヒト椎間板細胞でRNA干渉によりRAPTORは50.1%-60.3%の発現抑制を認め、オートファジー誘導と細胞死、細胞老化、細胞外基質分解抑制が観察された。ヒト椎間板細胞でCRISPR-Cas9によるRAPTORの発現抑制は88.1%-89.3%に達し、RNA干渉と比較し、顕著で持続的なオートファジー誘導と細胞死、細胞老化、基質分解抑制を認めた。CRISPR-Cas9による遺伝子機能解析とRNA干渉による椎間板変性遺伝子治療の確立を目指し、さらに研究を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰痛は世界的な健康問題であり、脊椎椎間板変性はその主たる要因である。椎間板の発生・解剖学的特徴を顧み、細胞内クリアランス機構であるオートファジーとその上流で制御を行う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。本研究からRNA干渉やCRISPR-Cas9などの遺伝子発現抑制技術を用いたRAPTOR/mTORC1の選択的な抑制が椎間板変性抑制効果を有する可能性が示唆された。本研究で得られた知見から、細胞自身の清浄力・治癒力を高めて組織恒常性を図る、より生理的な新規椎間板変性治療法の開発に繋がる可能性があり、学術的・社会的に有意義であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that mTOR signaling would be influential in the intervertebral disc, which is the largest avascular, low-nutrient organ in the body. In-vitro RNA interference (RNAi) targeting RAPTOR, a component of mTOR complex 1 (mTORC1), successfully enhanced autophagy as well as suppressed apoptosis, senescence, and matrix catabolism in rat disc cells. In-vivo intradiscal knockdown of RAPTOR by RNAi further mitigated radiological and histological disc degeneration in rats through the induction of autophagy and inhibition of apoptosis, senescence, and matrix degradation. In addition, in-vitro CRISPR-Cas9 against RAPTOR presented consistent findings with RNAi, which are more robust and sustained. Thus, RNAi-mediated and CRISPR-Cas9-mediated suppression of RAPTOR/mTORC1 could be a new gene therapeutic approach to intervertebral disc degeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板 mTOR オートファジー 脊椎 整形外科

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛は日本の有訴率の第1位であり、米国では全労働人口の1%が腰痛のために就労できず、その経済損失は年間1000億ドルに達しており、早急に解決すべき世界的な健康問題である。脊椎の椎間板変性は腰痛の主な要因であり、青壮年者では椎間板ヘルニアを呈して就労やスポーツに支障をきたし、高齢者では脊柱管狭窄(580万人/本邦)の基盤となり、下肢痛やしびれから歩行障害を生じ、最終的には寝たきりや要介護状態へと陥ってしまう。現在の治療法は外科的切除が主体であり、組織破壊と機能喪失から脊椎疾患の高い再手術率や成績不良につながる。したがって椎間板が温存可能な新たな治療法の開発が急務であり、過去に成長因子の投与や幹細胞移植などの報告があるが、有効性が証明されたヒト椎間板変性への生物学的治療法はない。

椎間板は中心の髄核と周囲の線維輪からなる特殊な構造を取り、栄養供給の大部分を椎体からの拡散に依存する人体最大の無血管組織であり、加齢や喫煙に伴う軟骨終板の硬化・石灰化によって容易に栄養不足となる。そのため低栄養は椎間板変性の主たる契機の一つとされる。

自己食食「オートファジー」は細胞が老廃蛋白や異常小器官を分解・再利用して恒常性維持を図る細胞内クリアランス機構である。細胞内伝達機構の1つである「**mammalian target of rapamycin (mTOR)** シグナル経路」によりオートファジーは抑制的に制御を受ける。セリン・スレオニンキナーゼの一種である**mTOR** はアミノ酸などの栄養状態、インスリンなどの成長因子、**ATP** などのエネルギー状態、ストレスなど細胞内外の環境情報を統合して細胞増殖、**mRNA** 翻訳やタンパク合成に中心的な役割を担う。**mTOR** は **RAPTOR** を含む **mTOR** 複合体1 (**mTORC1**) と **RICTOR** を含む **mTOR** 複合体2 (**mTORC2**) として存在する。

以上より我々は低栄養・ストレス条件下に存在する椎間板細胞、特に髄核細胞の恒常性維持にはオートファジーと**mTOR** シグナル経路が重要な役割を果たすと仮説を立て、基礎研究を継続してきた。

## 2. 研究の目的

これまでヒト脊椎手術検体から採取した椎間板細胞を用い、**mTOR** シグナル経路の機序解明及びその制御が椎間板変性に与える影響について検討してきた。**RNA** 干渉として **siRNA** を用い、選択的な **mTOR** 発現抑制 (**mTORC1**・**mTORC2** 障害) **RAPTOR** 発現抑制 (**mTORC1** 障害) **RICTOR** 発現抑制 (**mTORC2** 障害) について比較検討を行い、**RAPTOR/mTORC1** の選択的障害がオートファジーの誘導及びアポトーシス細胞死、セネッセンス細胞老化、細胞外基質異化の抑制に作用することを報告した。そこで本研究課題では **RNA** 干渉による **mTOR** シグナル経路の選択的な抑制が椎間板変性の生物学的治療法となる可能性について動物実験を通じて検討するとともに、ゲノム編集により強力な効果が期待できる **CRISPR-Cas9** を用いた遺伝子発現抑制技術の有用性について明らかにすべく、基礎実験を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット椎間板変性モデルを用いた **mTOR** シグナル経路の選択的な抑制 (**RNA** 干渉)

#### 1. 生体椎間板局所投与における **RNA** 干渉効率

**RNA** 干渉として **mTOR**・**Raptor**・**Rictor** 遺伝子及び非特異的配列 (**control**) の4つを標的とした **siRNA** を用い、ラット尾椎椎間板にリポフェクション法を用いた局所投与で導入した。導入後7日及び56日で椎間板髄核組織を回収し、ウエスタンブロッティング (**WB**) で **mTOR** シグナル経路活性及びオートファジー、アポトーシス、セネッセンスなど細胞恒常性維持機構の評価を行った。また蛍光標識 **siRNA** を用い、その局在と作用期間について検討した。

#### 2. 椎間板に対して **RNA** 干渉を用いた変性抑止効果

ラット尾椎椎間板内へ **mTOR**・**Raptor**・**Rictor**・**control** に対する **siRNA** をそれぞれ局所投与後、1.3 MPa の静的圧迫負荷を24時間加えることで変性を惹起、56日まで組織損傷過程を観察し、比較検討した。評価項目として X 線学的椎間板高、組織学的変化 (**H-E** 染色、**Safranin-O** 染色) **TUNEL** 染色、**DAB** 染色、蛍光免疫染色を用い、さらに椎間板髄核・線維輪組織の細胞外基質異化因子 (**MMPs**) 抗異化因子 (**TIMPs**) 同化因子 (アグリカン、II 型コラーゲン) などの **mRNA** 発現を定量 **PCR** で、タンパク発現解析を **WB** や免疫組織化学染色で検討した。

#### 3. 変性椎間板に対して **RNA** 干渉を用いた治療効果

上記2の実験では遺伝子発現の抑制後に椎間板変性を惹起しており、**RNA** 干渉が及ぼす予防

的な効果を検討したものであるが、変性椎間板に対する治療効果についても検討を加えた。ラット尾椎椎間板に **1.3 MPa**・**24** 時間の静的圧迫を加え、**28** 日後に変性度を評価のうえ、**Raptor siRNA** 又は **control siRNA** を椎間板内へ局所投与し、その後の変性過程を **2** と同様に比較した。

## (2) ヒト椎間板細胞を用いた **mTOR** シグナル経路の選択的な抑制 (**CRISPR-Cas9**)

ヒト脊椎手術検体から得た椎間板髄核細胞に対して **RNA** 干渉と **CRISPR-Cas9** を用い、**mTOR**・**RAPTOR**・**RICTOR** 遺伝子の選択的な発現抑制を行った。**RNA** 干渉としてリポフェクション法で特異的な **siRNA** を導入して遺伝子ノックダウンを行い、**WB** で導入効率を評価するとともに **mTOR** シグナル経路とオートファジー活性の推移について比較検討を行った。さらに **siRNA** 導入後、炎症・低栄養負荷として **IL-1 $\beta$**  を添加した無血清培地で培養し、細胞死、細胞老化、細胞外基質分解能について検討した。**CRISPR-Cas9** を用いた遺伝子ノックアウトにおいても同様の検討を行った。

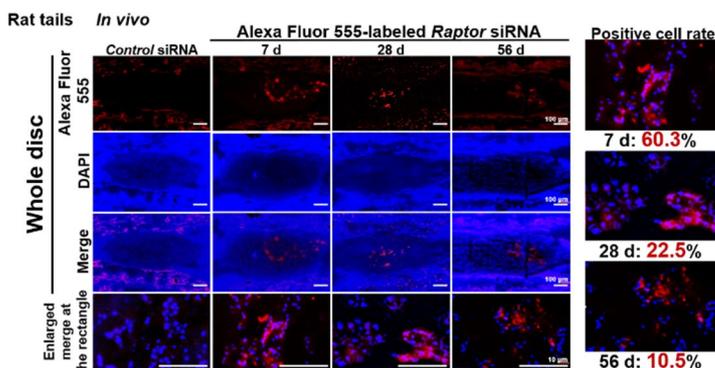
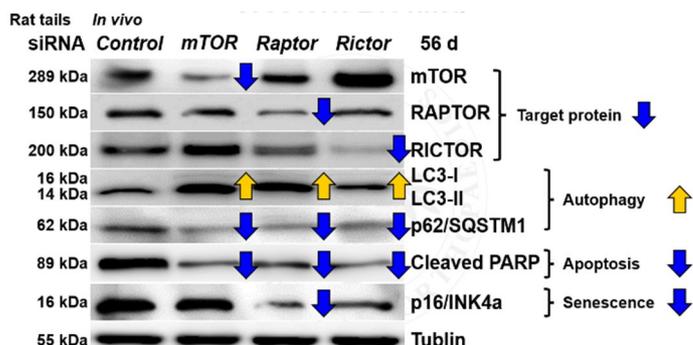
## 4. 研究成果

### (1) ラット椎間板変性モデルを用いた **mTOR** シグナル経路の選択的な抑制 (**RNA** 干渉)

#### 1. 生体椎間板局所投与における **RNA** 干渉効率

**WB** で **mTOR** シグナル経路の構成体である **mTOR**・**RAPTOR**・**RICTOR** タンパクについて評価したところ、**siRNA** を用いた生体内 **RNA** 干渉による選択的な発現抑制を認めた。オートファジーマーカー **LC3-II** の亢進とオートファジー基質 **p62/SQSTM1** の減少、アポトーシスマーカー **Cleaved PARP** の減少を認め、オートファジーの誘導とアポトーシスの抑制がみられた。またセネッセンスマーカー **p16/INK4a** は **Raptor RNA** 干渉群で最も顕著に減少していた。

**Alexa Fluor555**®標識 **siRNA** 導入後の蛍光免疫染色では **7** 日時点で椎間板髄核領域の広範囲に蛍光標識 **siRNA** を取り込んだ細胞が確認でき、陽性細胞率は **60.3%**であった。**56** 日では **10.5%**と陽性細胞率は低下していたが、長期間の生体内 **RNA** 干渉効果が椎間板髄核で観察された。

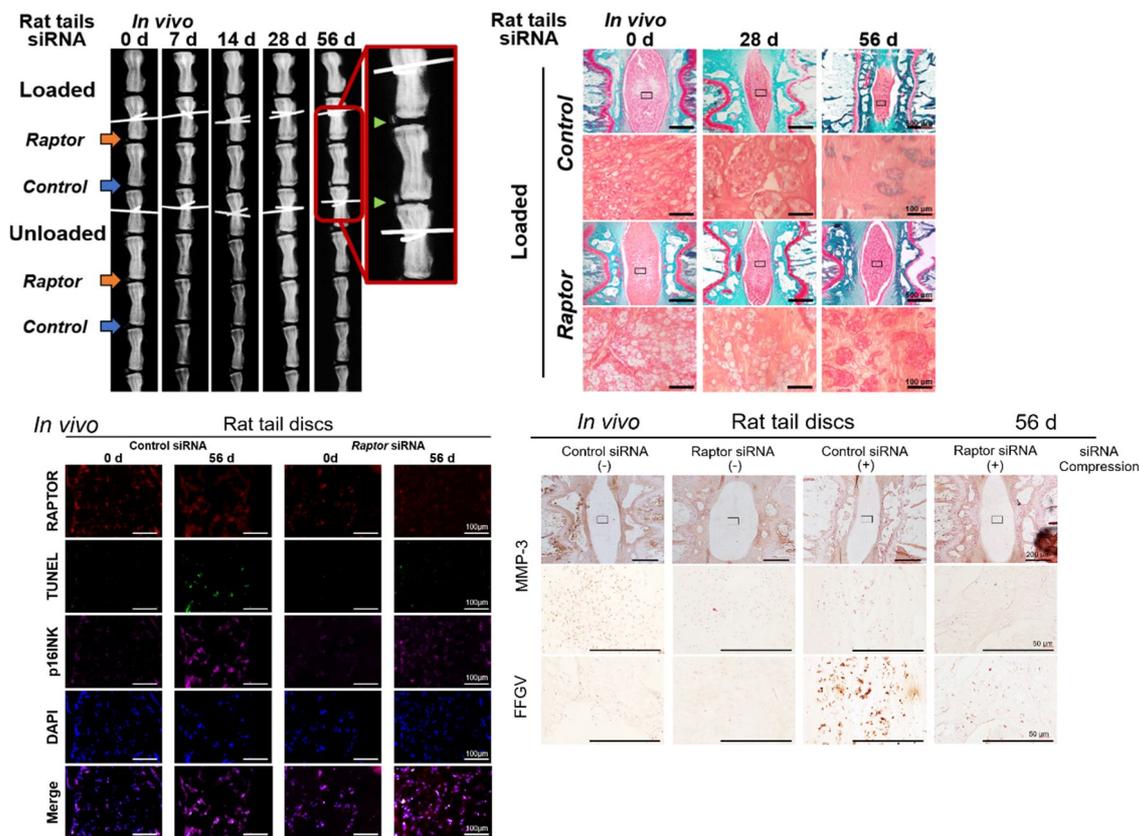


#### 2. 椎間板に対して **RNA** 干渉を用いた変性抑制効果

**X** 線学的評価では圧迫負荷後、近位側 **2** 椎間はすべての **RNA** 干渉群で経時的な椎間板高の低下を認めた。**mTOR siRNA** 導入椎間と **Rictor siRNA** 導入椎間においては **56** 日経過後に **control siRNA** 導入椎間との間に有意の椎間板高の差はみられなかったが、**Raptor siRNA** 導入椎間では **control siRNA** 導入椎間と比較して有意に椎間板高の減少が抑制されていた。

**Safranin-O** 染色を用いた組織学的変性度の評価では圧迫に伴って経時的に椎間板変性が進行し、髄核領域の減少、細胞数の減少や形態変化及び繊維輪の不整像が観察された。しかしながら **Raptor siRNA** 導入椎間では **control siRNA** 導入椎間と比較して髄核細胞数・形態が維持されており、変性度のスコアリングにおいても有意に低値であった。

**Raptor siRNA** 導入椎間と **control siRNA** 導入椎間を比較すると、**Raptor siRNA** 導入椎間でアポトーシスマーカー-TUNEL・セネッセンスマーカー-p16/INK4a 陽性細胞率の減少を認めた。**MMP-3** 及び **MMP** によるアグリカンの分解代謝産物 **FFGV** への **DAB** 染色による細胞外基質分解評価を行ったところ、**Raptor siRNA** 導入椎間では **control siRNA** 導入椎間に比べて **MMP-3** の発現と **FFGV** の産生が抑制されており、細胞外基質分解の抑制が示唆された。



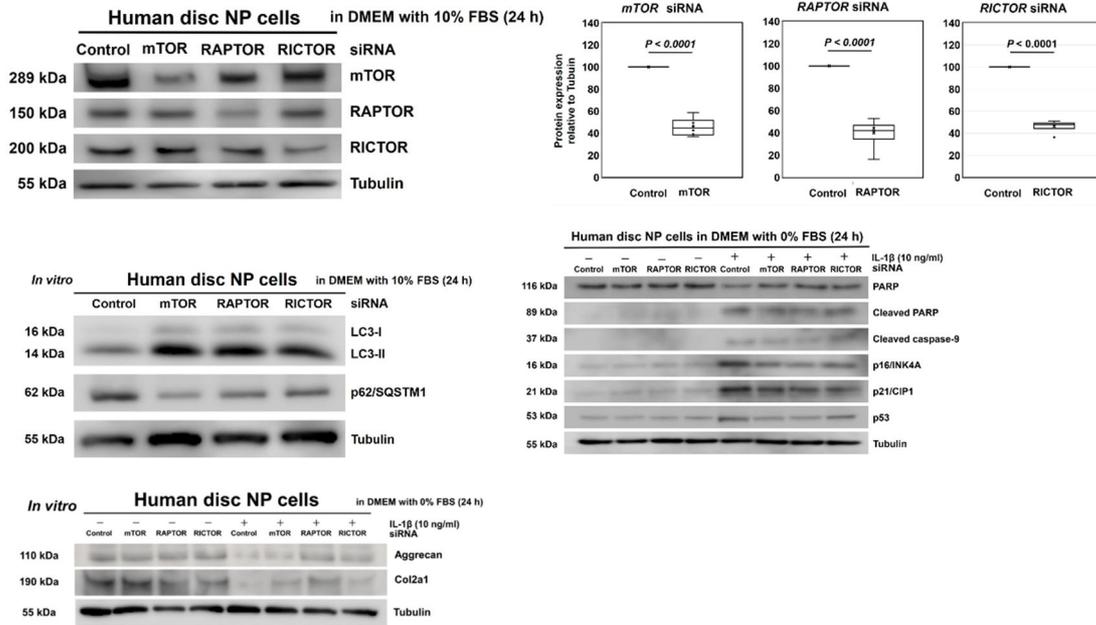
### 3. 変性椎間板に対して RNA 干渉を用いた治療効果

**1.3 MPa**・**24** 時間の静的圧迫から **28** 日が経過した椎間では X 線学的に椎間板高が低下し、組織学的変性所見を呈していた。その後、**Raptors iRNA** 又は **control siRNA** を導入し、さらに **28**・**56** 日後まで追跡したが、椎間板高に有意差はみられなかった。一方、**Safranin-O** 染色による組織学的評価では有意ではないものの **Raptor siRNA** 導入椎間で変性度が低い傾向を認めた。

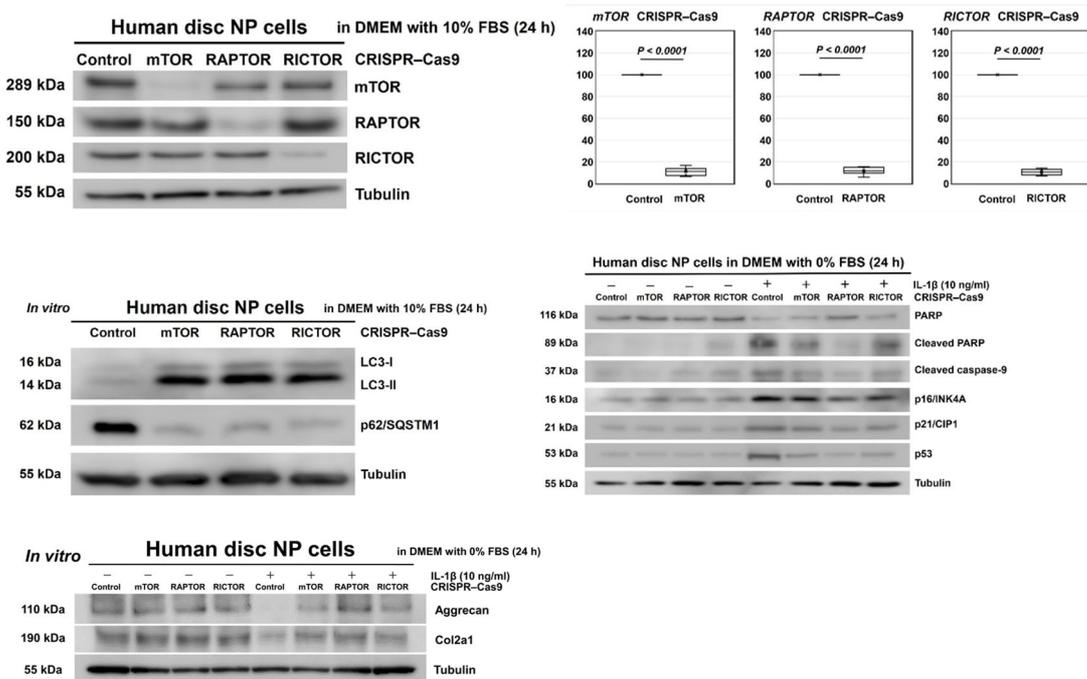
今回、ラットを用いた動物実験で **Raptor siRNA** 導入椎間における X 線・組織学的椎間板変性抑制効果が観察できた。**WB** や免疫染色の結果から **Raptor RNA** 干渉が **mTORC1** を選択的に阻害することにより、オートファジーの誘導及び細胞死、細胞老化、細胞外基質分解の抑制を介して椎間板保護作用を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら変性椎間板に対する治療効果は予防効果と比較して限定的であった。変性椎間板ではすでに髄核細胞や細胞外基質が減少しており、細胞に取り込まれることで作用する **siRNA** の効果が十分に発揮されなかった可能性がある。椎間板に対する頻回の穿刺はヘルニアなど椎間板構造の破綻をきたしやすく、なるべく単回投与が望ましい。本研究結果から椎間板内でより高効率に **siRNA** や遺伝子を作用させる手法の開発が必要だと考えられた。一方、非致死性である椎間板変性疾患におけるウイルスベクターの使用は導入効率が高くとも安全性に懸念がある。そのため今後は安全性が高く、長期間の作用が期待でき、優れた徐放性を有する、**drug delivery system** を応用した新たな遺伝子導入技術の開発が必要であると考えており、現在も研究を継続中である。

#### (2) ヒト椎間板細胞を用いた mTOR シグナル経路の選択的な抑制 (CRISPR-Cas9)

ヒト椎間板髄核細胞に対して RNA 干渉を用い、**mTOR**・**RAPTOR**・**RICTOR** 遺伝子を標的としたノックダウンを行ったところ、**mTOR** シグナル経路の構成体のいずれにおいても選択的な発現抑制が達成された。**WB** によるタンパク発現評価で抑制率は **50.1%**–**60.3%**の結果であった。さらに **mTOR** シグナル経路の選択的阻害により、オートファジー活性の亢進と細胞死、細胞老化、細胞外基質分解の抑制が観察された。



**CRISPR-Cas9** を用いた **mTOR**・**RAPTOR**・**RICTOR** 遺伝子のノックアウトにおいても **mTOR** シグナル経路の選択的阻害が達成され、タンパク発現抑制は **88.1%–89.3%**と **RNA** 干渉よりも高率であった。**mTOR** シグナル経路の選択的阻害によるオートファジーの誘導と細胞死、細胞老化、細胞外基質分解の抑制が観察され、**RAPTOR** ノックアウトで特に顕著であり、**RNA** 干渉と比較して **CRISPR-Cas9** の遺伝子機能解析における有用性が示唆された。



以上の結果から、**CRISPR-Cas9** によるゲノム編集は **RNA** 干渉と比較して遺伝子発現抑制効果が高く、**mTOR** シグナル経路の機能解析にさらなる信頼性をもたらすと考えられた。**RAPTOR/mTORC1** の選択的阻害が椎間板変性の新たな細胞生物学的治療法となる可能性が示唆された。

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 7件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Gullbrand Sarah E., Ashinsky Beth G., Lai Alon, Gansau Jennifer, Crowley James, Cunha Carla, Engiles Julie B., Fuseillier Marion, Muehleman Carol, Pelletier Matthew, Presciutti Steven, Schol Jordy, Takeoka Yoshiki, Yurube Takashi, Zhang Yeja, Masuda Koichi, Iatridis James C.	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of a standardized histopathology scoring system for intervertebral disc degeneration and regeneration in rabbit models An initiative of the spine section	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOR SPINE	6. 最初と最後の頁 e1147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsp2.1147	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 該当する
1. 著者名 Lai Alon, Gansau Jennifer, Gullbrand Sarah E., Crowley James, Cunha Carla, Dudli Stefan, Engiles Julie B., Fuseillier Marion, Goncalves Raquel M., Nakashima Daisuke, Okewunmi Jeffrey, Pelletier Matthew, Presciutti Steven M., Schol Jordy, Takeoka Yoshiki, Yang Sidong, Yurube Takashi, Zhang Yeja, Iatridis James C.	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of a standardized histopathology scoring system for intervertebral disc degeneration in rat models: An initiative of the spine section	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOR SPINE	6. 最初と最後の頁 e1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsp2.1150	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 該当する
1. 著者名 Ito Masaaki, Yurube Takashi, Kanda Yutaro, Kakiuchi Yuji, Takeoka Yoshiki, Takada Toru, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Inhibition of Autophagy at Different Stages by ATG5 Knockdown and Chloroquine Supplementation Enhances Consistent Human Disc Cellular Apoptosis and Senescence Induction rather than Extracellular Matrix Catabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3965 ~ 3965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22083965	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 Yurube Takashi, Hirata Hiroaki, Ito Masaaki, Terashima Yoshiki, Kakiuchi Yuji, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Involvement of Autophagy in Rat Tail Static Compression-Induced Intervertebral Disc Degeneration and Notochordal Cell Disappearance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5648 ~ 5648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115648	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 Yurube Takashi, Han Inbo, Sakai Daisuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Concepts of Regeneration for Spinal Diseases in 2021	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8356 ~ 8356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168356	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 該当する

1. 著者名 武岡 由樹, 由留部 崇, 辻本 龍, 神田 裕太郎, 黒田 良祐, 角谷 賢一朗	4. 巻 64
2. 論文標題 ラット椎間板恒常性維持に対するAtg5依存性オートファジーの関与	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 中部日本整形外科災害外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 615 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11359/chubu.2021.615	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 Tsujiimoto R., Yurube T., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Kakiuchi Y., Miyazaki S., Zhang Z., Takada T., Kuroda R., Kakutani K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Involvement of autophagy in the maintenance of rat intervertebral disc homeostasis: an in-vitro and in-vivo RNA interference study of Atg5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 481 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2021.12.004	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 Miyazaki Kunihiko, Miyazaki Shingo, Yurube Takashi, Takeoka Yoshiki, Kanda Yutaro, Zhang Zhongying, Kakiuchi Yuji, Tsujimoto Ryu, Ohnishi Hiroki, Matsuo Tomoya, Ryu Masao, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Protective Effects of Growth Differentiation Factor-6 on the Intervertebral Disc: An In Vitro and In Vivo Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11071174	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 Yurube Takashi, Han Inbo, Sakai Daisuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Concepts of Regeneration for Spinal Diseases in 2022	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9710 ~ 9710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23179710	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 該当する

1. 著者名 Yurube Takashi, Takeoka Yoshiki, Kanda Yutaro, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Intervertebral disc cell fate during aging and degeneration: apoptosis, senescence, and autophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 North American Spine Society Journal (NASSJ)	6. 最初と最後の頁 100210 ~ 100210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xnsj.2023.100210	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 由留部 崇、武岡 由樹、神田 裕太郎、伊藤 雅明、垣内 裕司、辻本 龍、黒田 良祐、角谷 賢一朗	4. 巻 36
2. 論文標題 特集 椎間板の基礎と臨床 椎間板変性とオートファジー	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 脊椎脊髄ジャーナル	6. 最初と最後の頁 13 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.5002202004	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 Ohnishi Hiroki, Zhang Zhongying, Yurube Takashi, Takeoka Yoshiki, Kanda Yutaro, Tsujimoto Ryu, Miyazaki Kunihiko, Matsuo Tomoya, Ryu Masao, Kumagai Naotoshi, Kuroshima Kohei, Hiranaka Yoshiaki, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Anti-Inflammatory Effects of Adiponectin Receptor Agonist AdipoRon against 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 8566 ~ 8566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24108566	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 Kakutani Kenichiro, Yurube Takashi, An Howard S., Doita Minoru, Masuda Koichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Cytokine Inhibitors Upregulate Extracellular Matrix Anabolism of Human Intervertebral Discs under Alginate Beads and Alginate-Embedded Explant Cultures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12336 ~ 12336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241512336	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 該当する

1. 著者名 Yurube Takashi, Han Inbo, Sakai Daisuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Concepts of Regeneration for Spinal Diseases in 2023	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16335 ~ 16335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242216335	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 該当する

1. 著者名 Yurube Takashi, Buchser William J., Zhang Zhongying, Silwal Prashanta, Lotze Michael T., Kang James D., Sowa Gwendolyn A., Vo Nam V.	4. 巻 7
2. 論文標題 Rapamycin mitigates inflammation mediated disc matrix homeostatic imbalance by inhibiting <scp>mTORC1</scp> and inducing autophagy through Akt activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JOR SPINE	6. 最初と最後の頁 e1303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsp2.1303	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 該当する

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 武岡 由樹、由留部 崇、辻本 龍、神田 裕太郎、黒田 良祐、角谷 賢一郎
2. 発表標題 ラット椎間板恒常性維持に対するAtg5依存性オートファジーの関与：ラット細胞・動物実験の検討
3. 学会等名 第136回中部日本整形外科災害外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yurube T., Kakiuchi Y., Ito M., Tsujimoto R., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Takeoka Y., Miyazaki S., Yamamoto J., Zhang Z., Takada T., Tadokoro K., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Involvement of autophagy in human lumbar spine herniated and degenerative disc diseases
3. 学会等名 The 47th Virtual Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsujimoto R., Yurube T., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Kakiuchi Y., Yamamoto J., Zhang Z., Takada T., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 In-vitro and in-vivo maintenance of rat intervertebral disc homeostasis through Atg5-dependent autophagy
3. 学会等名 The 47th Virtual Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeoka Y., Kanda Y., Yurube T., Ito M., Tsujimoto R., Kakiuchi Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Ryu M., Zhang Z., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Protective roles of Atg5-dependent autophagy against human and rat disc cellular apoptosis and senescence: an in-vitro and in-vivo loss-of-function study
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由留部 崇、武岡 由樹、神田 裕太郎、垣内 裕司、辻本 龍、伊藤 雅明、平田 裕亮、張 鍾穎、黒田 良祐、角谷 賢一郎
2. 発表標題 椎間板再生の基礎と臨床（未来）
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由留部 崇、武岡 由樹、神田 裕太郎、辻本 龍、垣内 裕司、伊藤 雅明、平田 裕亮、張 鍾穎、黒田 良祐、角谷 賢一郎
2. 発表標題 椎間板恒常性維持を目指した変性予防・組織修復の試み
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryu M., Yurube T., Zhang Z., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kumagai N., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Development of treatment for intervertebral disc degeneration by selective interference of the mTOR signaling pathway using the CRISPR-Cas9 system
3. 学会等名 第3回BioSpine Japan研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryu M., Yurube T., Zhang Z., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kumagai N., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Development of treatment for degenerative disc disease by the selective gene silencing of mTOR signaling using the RNA interference and CRISPR-Cas9 systems
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 由留部 崇、劉 正夫、辻本 龍、武岡 由樹、神田 裕太郎、宮崎 邦彦、大西 洋輝、松尾 智哉、熊谷 直利、黒島 康平、平中 良明、黒田 良祐、角谷 賢一朗
2. 発表標題 CRISPR-Cas9システムとRNA干渉法を用いたmTORシグナル経路の選択的阻害による脊椎椎間板変性治療効果の比較
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻本 龍、由留部 崇、武岡 由樹、神田 裕太郎、宮崎 邦彦、大西 洋輝、垣内 裕司、宮崎 真吾、張 鍾穎、黒田 良祐、角谷 賢一朗
2. 発表標題 ラット椎間板恒常性維持へのオートファジーの関与：Atg5に対するRNA干渉を用いた細胞・動物実験による検討
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷 直利、由留部 崇、劉 正夫、張 鍾穎、武岡 由樹、神田 裕太郎、宮崎 邦彦、大西 洋輝、松尾 智哉、黒島 康平、平中 良明、黒田 良祐、角谷 賢一朗
2. 発表標題 ラット尾椎椎間板におけるRaptor/mTORC1への選択的なRNA遺伝子干渉はオートファジーを誘導するとともに椎間板変性進行に対して抑制的に作用する
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 2023年

1. 発表者名 劉 正夫、由留部 崇、張 鍾穎、武岡 由樹、神田 裕太郎、宮崎 邦彦、大西 洋輝、松尾 智哉、熊谷 直利、黒島 康平、平中 良明、黒田 良祐、角谷 賢一朗
2. 発表標題 CRISPR-Cas9システムを用いたmTORシグナル経路の選択的阻害による椎間板変性への新規治療法の開発
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 2023年

1. 発表者名 Kumagai N., Yurube T., Ryu M., Zhang Z., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Selective interference of Raptor/mTORC1 protects against the progression of intervertebral disc degeneration through autophagy induction in a rat tail temporary static compression model
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (Spineweek 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryu M., Yurube T., Zhang Z., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kumagai N., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Development of treatment for intervertebral disc degeneration by the selective interference of the mTOR signaling pathway using the CRISPR-Cas9 system
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (Spineweek 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 由留部 崇
2. 発表標題 脊椎椎間板の恒常性維持を目指した変性予防・組織修復の試み～基礎研究から学ぶ困難の対処法～
3. 学会等名 第19回名古屋脊椎脊髄Webセミナー2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 由留部 崇
2. 発表標題 脊椎椎間板の恒常性維持を目指した変性予防・組織修復の試み
3. 学会等名 第62回大阪脊椎外科フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷 直利、由留部 崇、劉 正夫、辻本 武尊、武岡 由樹、宮崎 邦彦、大西 洋輝、松尾 智哉、黒島 康平、平中 良明、黒田 良祐、角谷 賢一朗
2. 発表標題 mTORシグナル経路への選択的なRNA干渉はラット尾椎椎間板組織において変性抑止効果を有する
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉 正夫、由留部 崇、武岡 由樹、宮崎 邦彦、大西 洋輝、松尾 智哉、熊谷 直利、黒島 康平、平中 良明、黒田 良祐、角谷 賢一朗
2. 発表標題 RNA干渉法とCRISPR-Cas9システムを用いたmTORシグナル経路の選択的阻害がもたらすヒト椎間板変性抑止効果の比較
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kumagai N., Yurube T., Ryu M., Tsujimoto T., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Selective RNA interference of the mTOR signaling pathway protects against the progression of intervertebral disc degeneration through autophagy induction in a rat tail temporary static compression model
3. 学会等名 第4回BioSpine Japan研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yurube T.
2. 発表標題 Development of gene therapy by modulating intracellular mTOR signaling and autophagy for degenerative disc disease
3. 学会等名 The 3rd Annual Conference, Korean Society of Basic Neurosurgical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kumagai N., Yurube T., Ryu M., Takeoka Y., Kanda Y., Tsujimoto T., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Selective RNA interference of Raptor/mTORC1 protects against the progression of intervertebral disc degeneration in a rat tail temporary static compression model
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryu M., Yurube T., Kumagai N., Takeoka Y., Kanda Y., Tsujimoto T., Miyazaki K., Ohnishi H., Matsuo T., Kuroshima K., Hiranaka Y., Kuroda R., Kakutani K.
2. 発表標題 Comparative study between gene silencing strategies for intervertebral disc degeneration using RNA interference and CRISPR-Cas9 through the selective interference of mTOR signaling
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2024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	角谷 賢一朗  (KAKUTANI Kenichiro)  (10533739)	神戸大学・医学研究科・特命准教授   (14501)	
研究 分担者	張 鍾穎  (ZHANG Zhongying)  (00824195)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	

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			
米国	Icahn School of Medicine at Mount Sinai	University of Pennsylvania	University of California, San Diego	他5機関
オーストラリア	University of New South Wales			
ポルトガル	Universidade do Porto			
スイス	University of Zurich			
フランス	University of Nantes			
中国	Hebei Medical University			
韓国	CHA University			
米国	Rush University	University of California, San Diego		
米国	University of Pittsburgh			