

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16685

研究課題名（和文）mTOR阻害薬テムシロリムスによる椎間板変性に対する治療アプローチ

研究課題名（英文）Temsirolimus Is a Candidate of the Optimal mTOR Inhibitor in Human Intervertebral Disc Nucleus Pulposus Cells

研究代表者

垣内 裕司（Kakiuchi, Yuji）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40849212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：今回ラットを用いた動物実験でsiRNA干涉椎間においてX線学的評価や組織学的評価にて椎間板変性進行抑制作用を示した。mTORC1を阻害することによりオートファジーの誘導や細胞死・細胞老化の抑制、細胞外基質分解抑制などを介して椎間板保護作用を生じる可能性が示唆された。mTORシグナル経路はタンパク質合成やオートファジーのみならず、炎症や糖代謝などその他のカスケードとも関わりがあるため、さらなる機構の解明が必要である。また、mTORC1阻害薬であるテムシロリムスを用いた同様の研究を進めて、siRNAと薬剤との効果の比較も必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でラットの尾椎椎間板においてmTORC1を阻害することによりオートファジーの誘導や細胞死・細胞老化の抑制、細胞外基質分解抑制などを介して椎間板保護作用を生じる可能性が示唆された。腰痛は世界的な健康問題の一つであり、椎間板変性と深い関連がある。本研究のように椎間板内への注射による治療で椎間板変性を抑制し椎間板機能を温存できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：an in-vivo study was designed to clarify effects of mTORC1 modulation by Raptor RNAi in a rat tail model of intervertebral disc degeneration induced by temporary static compression. In-vivo intradiscal RNAi knockdown of Raptor demonstrated enhanced cellular autophagy, inhibited apoptotic cell death and senescent cell aging, radiographic height loss, and histological degeneration, indicating disc cell and matrix-protective effects. On the other hand, for degenerated discs induced by prior compressive load, the effects of RNAi were relatively limited.

研究分野：整形外科

キーワード：オートファジー 椎間板 mTORC1阻害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腰痛は世界的な健康問題の一つであり、椎間板変性と深い関連がある。椎間板変性は腰痛の主たる要因であり、経過により椎間板膨隆やヘルニアをきたし、就労やスポーツ活動に大きな支障を来す。進行すれば脊柱管狭窄を来し、難治性の神経痛や間欠跛行、膀胱直腸障害などの重篤な症状へと繋がる。椎間板変性に対しては現在外科的切除が主体であるが椎間板を破壊して本来の機能を失うこととなり術後の影響も大きい。これらのことから椎間板組織・機能が温存可能な治療法の開発が急務であり、成長因子の投与や遺伝子導入、幹細胞移植といった生物学的治療が日々研究されている。

mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路は細胞内の代謝経路であり、mTORは、Raptor を含む mTOR 複合体 1 (mTORC1) と Rictor を含む mTOR 複合体 2 (mTORC2) の2つの複合体として存在し、mRNA 翻訳やタンパク質合成、オートファジーなどをコントロールしている。オートファジーは、栄養不足や炎症などのストレス条件下で細胞の恒常性維持に関与する細胞内クリアランス機構である。我々は低栄養・酸素環境として特徴づけられる椎間板にとって、mTOR シグナルとオートファジーが重要な役割を果たすと仮定し、椎間板における mTOR シグナル経路のメカニズムの解明およびその制御が椎間板変性に与える影響を研究してきた。

### 2. 研究の目的

我々は以前ヒト椎間板髄核細胞へのmTOR阻害、特にmTORC1に対する選択的阻害がオートファジーやアポトーシスの抑制、細胞外基質分解を抑制することにより細胞保護効果を示したことを報告した。また、mTORC1の阻害薬であるテムシロリムスを用いた細胞実験において同様にヒト椎間板細胞への保護効果を示したが、ヒトへの臨床応用には動物実験が必要と考えられた。本研究はラット尾椎椎間板変性モデルを作成し、椎間板内へsmall interfering RNA (siRNA) や mTORC1 阻害薬であるテムシロリムスを投与しその変性過程を検討することで mTOR シグナル経路の椎間板における機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. RNA 干渉効率の評価

mTOR/Raptor/Rictor および control の4つの siRNA を用い、ラット尾椎間板にそれぞれリポフェクション法を用いて導入した。導入後7日および56日の時点で髄核を回収し、それぞれウエスタンブロッティングを行い mTOR シグナル経路およびオートファジーやアポトーシス、セネッセンスなど細胞代謝の評価を行った。また、蛍光標識 siRNA を用いて siRNA の局在と持続期間を評価した。

#### 2. 一時静的圧迫モデルを用いた変性過程に与える影響の検討

ラット尾椎静的圧迫椎間板変性モデルを作成し椎間板内へ各 siRNA、テムシロリムスを投与した後に1.3MPa、24時間の静的圧迫を加えることで椎間板変性を惹起し、変性過程を観

察して対照群と比較して椎間板変性度が抑制されるかを調べた。評価項目として椎間板高（レントゲン）、組織学的変化（safranin-0, H-E染色）、TUNEL染色、DAB染色、蛍光免疫染色などで椎間板構造解析を行い、さらに椎間板組織（髄核と線維輪）の細胞外基質同化因子（アグリカン、コラーゲンタイプII）・異化因子（MMPs、TIMPs）の遺伝子発現をRT-PCR法にて、蛋白合成の解析を免疫組織学的染色やウエスタンブロッティング法により行った。

#### 4. 研究成果

##### 1. RNA干渉効率の評価

(1) ウエスタンブロッティングでは各 siRNA による生体内 RNA 干渉により mTOR シグナルタンパクの選択的抑制がみられた。オートファジーマーカーである LC3 の亢進と p62/SQSTS1 の減少、アポトーシスマーカーである 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である p16/INK4a は Raptor 干渉群で最も顕著な抑制を示した(図 1)。

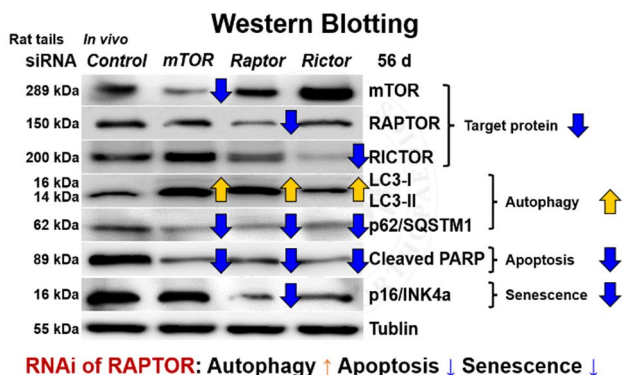


図 1 ウエスタンブロッティングによる mTOR 経路関連タンパク、細胞代謝の評価

(2) Alexa Fluor555®標識 siRNA を用いて siRNA の局在と持続時間を評価した。投与 7 日時点では髄核内に広範囲に蛍光標識 siRNA を確認でき、陽性細胞率は 60.3%であった。56 日後は 10.5%と陽性細胞率の低下を認めていたが、長期間にわたって siRNA が生体椎間板髄核内に確認できた(図 2)。

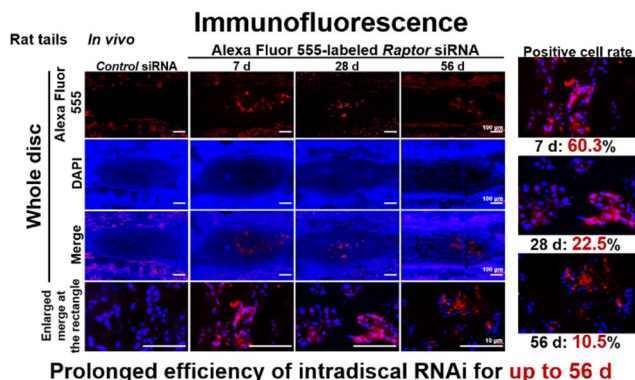


図 2. 蛍光標識 siRNA を用いた RNA 干渉の持続時間の検討

2. 一時静的圧迫モデルを用いた変性過程に与える影響の検討

(3) X 線学的な椎間板高評価では圧負荷後、頭側の 2 椎間はすべての siRNA 投与群で経時的に椎間板高の低下がみられた。mTOR siRNA、Rictor siRNA では 56 日時点でも対照群との間に有意な椎間板高の変化はみられなかったが Raptor siRNA 導入椎間では対照群と比較して有意に椎間板高の低下が抑制されていた(図 3)。

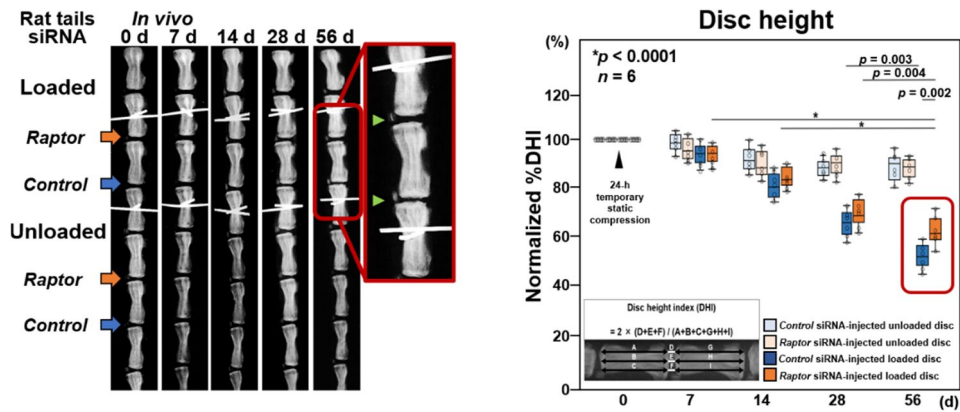


図 3. X 線像を用いた経時的な椎間板高の評価

(4) サフラニン-0 染色を用いた組織変性度評価では圧負荷に伴い、経時的に椎間板変性が進行し、56 日時点ではすべての群で髄核領域の減少および髄核細胞の減少、形態の変化・繊維輪の不整がみられた。Raptor siRNA 導入椎間では対照群と比較して髄核細胞の数や形態が維持されており、組織学的変性度も有意に低い結果であった(図 4)。

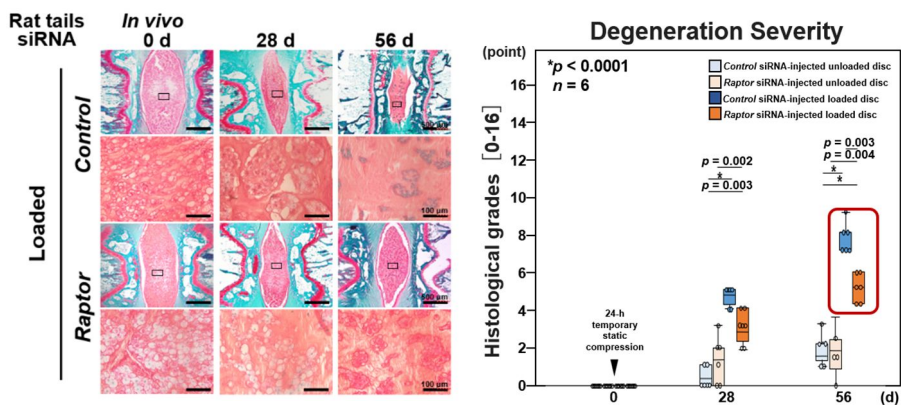


図 4. サフラニン-0 染色を用いた組織学的評価

(5) Raptor siRNA 導入椎間と対照群を比較すると、Raptor siRNA 導入椎間では TUNEL 陽

性細胞率の減少、セネッセンスマーカーである p16/INK4a の抑制がみられた。

また、3,3'-Diaminobenzidine(DAB)染色を用いて MMP-3 および MMP によるアグリカンの分解代謝産物である FFGV を用いて細胞外基質分解評価を行ったが、Raptor 導入椎間では対照群と比較して、MMP-3 や FFGV の産生が抑制されており細胞外基質分解の抑制がみられた。

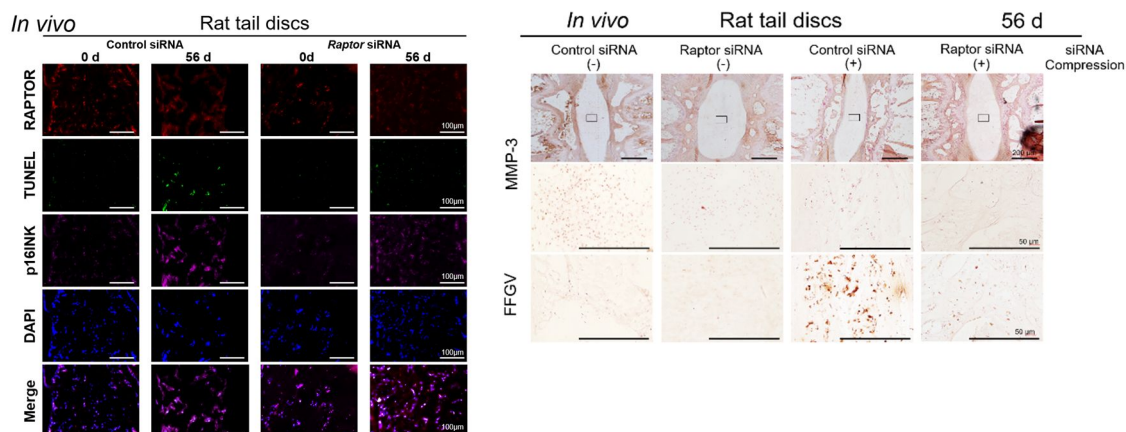


図 5. 免疫染色による細胞死・細胞老化の検討(左)および DAB 染色による細胞外基質分解の評価

今回ラットを用いた動物実験で Raptor siRNA 干渉椎間において X 線学的評価や組織学的評価にて椎間板変性進行抑制作用を示した。ウエスタンブロットティングや免疫染色の結果からは Raptor に対する RNA 干渉が、mTORC1 を阻害することによりオートファジーの誘導や細胞死・細胞老化の抑制、細胞外基質分解抑制などを介して椎間板保護作用を生じる可能性が示唆された。mTOR シグナル経路はタンパク質合成やオートファジーのみならず、炎症や糖代謝などその他のカスケードとも関わりがあるため、さらなる機構の解明が必要である。また、蛍光標識 siRNA を用いた生体内 RNA 干渉は長期間確認できたが、陽性細胞率は経時的に減少していた。椎間板への薬剤投与は穿刺による直接投与が主流であるため、複数回の穿刺は椎間板損傷のリスクが懸念される。そのため一度の穿刺でより長期かつ高効率に薬剤を投与できる方法を開発することも必要と考えられた。その一つとしてナノ粒子ゲルを Drug delivery system(DHS)として応用した投与を現在研究中である。また、mTORC1 阻害薬であるテムシロリムスを用いた同様の研究を進めて、siRNA と薬剤との効果の比較も必要である。

今回得られた知見をもとにさらなる研究を進めていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 劉正夫
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 BioSpine Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉正夫
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 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉正夫
2. 発表標題 CRISPR Cas9 versus RNA interference for degenerative disc disease treatment by the selective inhibition of mTOR signaling
3. 学会等名 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷直利
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抑制的に作用する
3. 学会等名 日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷直利
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 ISSLS annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷直利
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 50th Annual Meeting, The International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷直利
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 熊谷直利
2. 発表標題 RaptorへのRNA干渉を介したmTORC1の選択的阻害は椎間板変性抑止効果を示す -ラット尾椎一時圧迫モデルを用いた検討-
3. 学会等名 第53回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 熊谷 直利
2. 発表標題 Selective RNA interference of Raptor/mTORC1 protects against the progression of intervertebral disc degeneration through the induction of autophagy 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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------