

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22249056

研究課題名（和文）変形性腰椎症の分子病態解明と治療標的分子同定を目指した戦略的研究

研究課題名（英文）Strategic research for elucidation of molecular pathophysiology and identification of therapeutic target of lumbar spondylosis

研究代表者

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40282660

研究成果の概要（和文）：

変形性腰椎症データベースを用いた GWAS によって疾患との関連が強い SNP を調べ、該当する遺伝子を 2 つ絞りこんだ。これらの遺伝子はともに、マウスとヒトの椎間板線維輪に強く発現しており、椎間板変性ととも発現が減少していた。それぞれコンディショナルノックアウトマウスを作成し、マウスモデルにて解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

We identified two candidate genes associated with lumbar spondylosis by GWAS of our cohort. These genes were abundantly expressed in mouse and human annulus fibrosus of intervertebral disc, and their expression was decreased with the degeneration of intervertebral disc. We have established conditional knockout mice of the two genes and are analyzing their functional roles.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------------|------------|
| 2010 年度 | 15,100,000 | 4,530,000 | 19,630,000 |
| 2011 年度 | 11,800,000 | 3,540,000 | 15,340,000 |
| 2012 年度 | 9,700,000 | 2,910,000 | 12,610,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 36,600,000 | 10,980,000 | 47,580,000 |

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

キーワード：脊椎脊髄病学、変形性腰椎症

1. 研究開始当初の背景

変形性腰椎症は、四肢の変形性関節症と並んで高齢者の生活の質を脅かす疾患であり、その主症状である腰痛は日本国民の訴える自覚症状のトップである（厚生労働省国民生活基礎調査）。しかしながら、その発症メカニズムについてはメカニカルストレスの蓄積が原因であること以外は殆ど解明されておらず、したがってその根本的治療法は未だに存在しない。また、変形性腰椎症は四肢歩行では再現できないために動物モデルによる

実験的研究がほとんど行われておらず、変形性関節症と比してその分子病態は謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究では、世界最大規模の変形性腰椎症のコホートから得られるゲノムサンプルを用いてゲノムワイド関連解析(GWAS)を行うと同時に、独自に開発したメカニカルストレスによる軟骨変性・骨化に関する in vitro モデルをベースに最新のトランスクリプトー

ムの網羅的解析を行い、この2つのアプローチから得られるデータを統合解析する。これによってこれまで解析が困難であった変形性腰椎症の分子病態を解明し、治療の標的シグナル・分子の同定に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

変形性腰椎症データベースについて重症度評価および環境因子による層別化を行い、ゲノム解析対象の選定を行ってGWASを施行し、疾患感受性遺伝子およびゲノム領域を同定する。これと並行して、メカニカルストレスによる培養軟骨細胞の変性・骨化in vitroモデルの条件検討を詳細に行った後、マイクロアレイベースの多面的なスクリーニングを行い、メカニカルストレス応答性遺伝子などを絞り込む。その後、GWASとin vitroモデルの両者の結果を統合して解析することで、共通の疾患関連遺伝子を絞り込む。さらに機能解析などを個別に行うことで疾患責任分子・シグナルを同定し、その分子・シグナルを修飾する低分子化合物、抗体、siRNAなどを用いてin vitroモデル上でストレス耐性に与える効果を検討し、変形性腰椎症の治療標的分子の同定に繋げる。

4. 研究成果

我々が保有する大規模データベースについて、初年度に因子分析による潜在的要因・背景に存在する要素の分析を行いデータベースを階層化・層別化して危険因子の重みづけで平均化し、昨年度にデータベースからcontrol(全椎間KL1以下)200例、case(全椎間KL3以上)200例を無作為抽出して、Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0を用いてゲノム上のほぼ全てのSNPのジェノタイプピングを行い、ジェノタイプピングした全ての多型についてSNP間の連鎖不平衡係数を算出し、疾患感受性ブロックを絞り込み、さらに疾患感受性ブロック内の全SNPのリシーケンスを行った。本年度はこれら得られたより正確な多型情報から各SNPおよびハプロタイプの疾患との相関を解析し、疾患感受性遺伝子、もしくはゲノム領域を複数同定した。さらにその結果p値が 10^{-7} 以下の強い疾患感受性を示す遺伝子が複数得られた。この中で最も相関の強い遺伝子XとYについて、その発現をマウスで解析したところ、椎間板線維輪に発現が見られた。またヒト手術サンプルを用いて解析したところ、やはり椎間板線維輪に発現することが判明した。より詳細な機能を解析するため、その遺伝子XとYのノックアウトマウスの作成を行い、Xについては椎間板変性モデルを作成して解析の取り掛かっている。Yにつ

いては作出し終えた段階であり、解析は今後の課題となる。これらの分子の機能をin vitroで検証するためのin vitroメカニカルストレスモデルについては、高圧負荷時の機器のトラブルが相次いだり、ようやく2012年度に安定した静水圧負荷モデルが完成し、現在サンプルを回収してマイクロアレイなどによる検証を進めている。

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19件)

1. Fukai A, Kamekura S, Chikazu D, Nakagawa T, Hirata M, Saito T, Hosaka Y, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum-US* 64: 198-203, 2012.
2. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP- β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet* 21: 1111-1123, 2012.
3. Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K, Liu W, Toyosawa S, Moriishi T, Kawaguchi H, Takada K, Komori T: SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS ONE* 7: e32364, 2012.
4. Muraki S, Akune T, Oka H, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tokimura F, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis and knee pain in Japanese men and women: A longitudinal population-based cohort study. *Arthritis Rheum-US* 64: 1447-1456, 2012.
5. Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33: 4451-4459, 2012.
6. Muraki S, Akune T, Oka H, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tokimura F, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Incidence and risk factors for radiographic lumbar spondylosis and lower back pain in Japanese men and women: The ROAD study. *Osteoarthr Cartilage* 20: 712-718, 2012.

7. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, and Ung-il Chung: Gli1 participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287: 17860-17869, 2012.
 8. Itoh S, Saito T, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algül H, Schmid RM, Chung UI, and Kawaguchi H: GSK-3 α and GSK-3 β are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA phosphorylation. *J Biol Chem* 287: 29227-29236, 2012.
 9. Ishimoto Y, Yoshimura N, Muraki S, Yamada H, Nagata K, Hashizume H, Takiguchi N, Minamide A, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Yoshida M: Prevalence of symptomatic lumbar spinal stenosis and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: The Wakayama Spine Study. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1103-1108, 2012.
 10. Muraki S, Akune T, Oka H, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tokimura F, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Physical performance, bone and joint diseases, and incidence of falls in Japanese men and women: A longitudinal cohort study. *Osteoporosis Int* (in press, DOI: 10.1007/s00198-012-1967-0).
 11. Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, and Hoshi K: Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol* (in press, DOI: 10.1002/jcp.24116).
 12. Nagata K, Yoshimura N, Muraki S, Hashizume H, Ishimoto Y, Yamada H, Takiguchi N, Nakagawa Y, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Yoshida M: Prevalence of cervical cord compression and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: The Wakayama Spine Study. *Spine* (in press, DOI: 10.1097/BRS.0b013e31825a2619).
 13. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, and Akune T: Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: A 3-year follow-up of the ROAD study. *Osteoarthr Cartilage* (in press, DOI: 10.1016/j.joca).
 14. Oka H, Akune T, Muraki S, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N: The mid-term efficacy of intra-articular hyaluronic acid injections on joint structure: a nested case control study. *Mod Rheumatol* (in press).
 15. Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, Saito T, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, and Chung UI: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis* (in press).
 16. Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, and Kawaguchi H: β -catenin regulates PTH/PTHrP receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to its intracellular C-terminal region. *Arthritis Rheum-US* (in press).
 17. Muraki S, Akune T, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tanaka S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, and Yoshimura N: Risk factors for falls in a longitudinal population-based cohort study of Japanese men and women: The ROAD Study. *Bone* (in press, DOI: 10.1016/j.bone)
 18. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, and Akune T: Does mild cognitive impairment affect the occurrence of radiographic knee osteoarthritis? A 3-year follow-up in the ROAD study. *BMJ Open* (in press: DOI:pii: e001520. 10.1136/bmjopen-2012-001520)
 19. Takatori Y, Moro T, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Minami M, Sugimoto H, Nakamura S, Karita T, Kim J, Koyama Y, Ito H, Kawaguchi H, and Nakamura K: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted highly cross-linked polyethylene liner in primary total hip replacement: One-year results of a prospective cohort study. *J Artif Organs* (in press: DOI: 10.1007/s10047-012-0681-1)
- 〔学会発表〕 (計 27 件)
1. Sugita S, Hosaka Y, Hikata T, Akiyama H, Long F, Chung UI, Saito T, Kawaguchi H: Notch/Rbpl/Hes1 signal in chondrocytes modulates osteoarthritis development. 2012 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2012. 4.26-29 (Barcelona, Spain).
 2. Yano F, Hosaka Y, Fukai A, Saito T, Hojo H, Ohba S, Kawaguchi H, Chung UI: Prevention and repair of cartilage degeneration by a novel thienoindazole-derivative compound. 2012 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2012. 4.26-29 (Barcelona, Spain).
 3. Kawaguchi H: Endochondral ossification signal: A potential therapeutic target for osteoarthritis (Invited Lecture). 2012 Cold

- Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases. 2012. 6. 11-15 (Suzhou, China).
4. Sugita S, Hosaka Y, Saito T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Hes1, a transcriptional target of Notch signaling, modulates endochondral ossification during osteoarthritis development. 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases. 2012. 6. 11-15 (Suzhou, China).
 5. Kobayashi H, Hirata M, Itoh S, Saito T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Transcriptional induction of ADAMTS5 by NF- κ B family member RelA in chondrocytes during osteoarthritis development. 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases. 2012. 6. 11-15 (Suzhou, China).
 6. Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Fukai A, Hikata T, Akiyama H, Nakamura T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: RBPjk-dependent Notch signaling in chondrocytes modulates skeletal growth and osteoarthritis development. 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases. 2012. 6. 11-15 (Suzhou, China).
 7. Sugita S, Hosaka Y, Saito T, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H: Rbpj-dependent Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification during osteoarthritis development through transcriptional induction by Hes1 (Young Investigator Award). 2012 American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2012. 10.12-15 (Minneapolis, Minnesota, USA).
 8. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 participates in the Indian Hedgehog-mediated osteogenesis during endochondral ossification. 2012 American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2012. 10.12-15 (Minneapolis, Minnesota, USA).
 9. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Osteo-chondrogenic function of BMP is directed toward osteogenesis by Hh-Gli1 in the perichondrium. 2012 American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2012. 10.12-15 (Minneapolis, Minnesota, USA).
 10. 森田充浩、山田治基、吉村典子、伊達秀樹、岡敬之、村木重之、阿久根徹、川口 造：大規模コホートにおける変形性膝関節症に関する生化学的マーカーの有用性. 第25回日本軟骨代謝学会. 2012. 3. 9-10 (ウイル愛知、愛知) .
 11. 保坂陽子、斎藤琢、杉田守礼、深井厚、日方智宏、秋山治彦、中村孝志、中村耕三、鄭雄一、川口造：Notch/Rbpjシグナルは骨格形成と変形性関節症の進行において軟骨内骨化の後期分化過程を制御する (シンポジウム：軟骨変性) . 第25回日本軟骨代謝学会. 2012. 3. 9-10 (ウイル愛知、愛知) .
 12. 小林寛、平田真、伊藤祥三、斎藤琢、鄭雄一、中村耕三、川口造：NF- κ Bファミリー分子RelA/p65は軟骨細胞においてADAMTS5を転写誘導して変形性関節症の発症に関与する (シンポジウム：軟骨変性) . 第25回日本軟骨代謝学会. 2012. 3. 9-10 (ウイル愛知、愛知) .
 13. 村木重之、阿久根徹、岡敬之、中村耕三、川口造、吉村典子：変形性膝関節症および膝痛の危険因子 —The ROAD study. 第25回日本軟骨代謝学会. 2012. 3. 9-10 (ウイル愛知、愛知) .
 14. 吉村典子、村木重之、岡敬之、中村耕三、川口造、阿久根徹：メタボリックシンドローム構成要因が変形性膝関節症の発症・進行に及ぼす影響 —The ROAD study 3年目の追跡. 第25回日本軟骨代謝学会. 2012. 3. 9-10 (ウイル愛知、愛知) .
 15. 吉村典子、村木重之、岡敬之、川口造、中村耕三、阿久根徹：住民疫学調査ROADからみえてきた日本のOA. 第56回日本リウマチ学会総会. 2011. 4. 26-29 (グランドプリンスホテル新高輪、東京) .
 16. 岡敬之、村木重之、阿久根徹、中村耕三、川口造、吉村典子：コンピュータ自動計測を用いた定量評価に基づく3年間での膝X線画像縦断変化に関する研究 - The ROAD study -. 第85回日本整形外科学会学術総会. 2012. 5. 17-20 (国立京都国際会館、京都) .
 17. 村木重之、阿久根徹、岡敬之、中村耕三、川口造、吉村典子：変形性膝関節症の発生率およびその危険因子 - The ROAD study -. 第85回日本整形外科学会学術総会. 2012. 5. 17-20 (国立京都国際会館、京都) .
 18. 吉村典子、村木重之、岡敬之、川口造、中村耕三、阿久根徹：要介護移行の予測におけるロコチェックの有用性の検討 - The ROAD study -. 第85回日本整形外科学会学術総会. 2012. 5. 17-20 (国立京都

- 国際会館、京都).
19. 齋藤琢、川口浩：マウスモデルをベースにした変形性関節症の分子メカニズムの解明. 第30回日本骨代謝学会. 2012. 7. 19-21 (京王プラザホテル、東京).
 20. 吉村典子、村木重之、岡敬之、田中栄、川口浩、阿久根徹：高骨密度は動脈硬化および変形性腰椎症発症のリスクとなる：ROAD追跡調査より. 第30回日本骨代謝学会. 2012. 7. 19-21 (京王プラザホテル、東京).
 21. 村木重之、阿久根徹、岡敬之、田中栄、川口浩、中村耕三、吉村典子：複数回転倒の危険因子：ROAD追跡調査より. 第30回日本骨代謝学会. 2012. 7. 19-21 (京王プラザホテル、東京).
 22. 杉田守礼、齋藤琢、保坂陽子、深井厚、秋山治彦、中村孝志、鄭雄一、川口浩：Notch/Rbpj/Hes1 シグナルによる軟骨内骨化および変形性関節症の制御(優秀演題賞受賞). 第30回日本骨代謝学会. 2012. 7. 19-21 (京王プラザホテル、東京).
 23. 高取吉雄、茂呂徹、京本政之、石原一彦、川口浩、中村耕三：ポリエチレン摺動面のMPCポリマー処理(シンポジウム：人工関節成績改善に繋がる近未来の医療用素材). 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012. 10. 26-27 (名古屋国際会議場、愛知).
 24. 杉田守礼、齋藤琢、保坂陽子、秋山治彦、鄭雄一、川口浩：Notch/Rbpj/Hes1 シグナルによる軟骨内骨化および変形性関節症の制御. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(最優秀演題賞受賞). 2012. 10. 26-27 (名古屋国際会議場、愛知).
 25. 川口浩：KOACADの臨床的意義(シンポジウム：OAの画像診断と評価). 第40回日本関節病学会. 2011. 11. 8-9 (鹿児島市民文化ホール、鹿児島).
 26. 岡敬之、川口浩、村木重之、阿久根徹、中村耕三、吉村典子：単純X線画像における変形性膝関節症のコンピュータ支援診断システムKOACADの臨床利用(パネルディスカッション：関節症マーカー・画像診断と関節症の疫学). 第40回日本関節病学会. 2011. 11. 8-9 (鹿児島市民文化ホール、鹿児島).
 27. 森田充浩、山田治基、吉村典子、伊達秀樹、岡敬之、村木重之、阿久根徹、川口浩：大規模コホートにおける変形性膝関節症と関節マーカー(パネルディスカッション：関節症マーカー・画像診断と関節症の疫学). 第40回日本関節病学会.

2011. 11. 8-9 (鹿児島市民文化ホール、鹿児島).

〔図書〕(計1件)

川口浩：「再生医学叢書」第2巻 骨格系. II. 骨. 7. 線維芽細胞増殖因子-2 による骨再生(pp85-91) (編集：脇谷滋之、鄭雄一) (朝倉書店), 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40282660

(2) 研究分担者

徳永 勝士 (TOKUNAGA KATSUSHI)
東京大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40163977

阿久根 徹 (AKUNE TORU)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：60282662

竹下 克志 (TAKESHITA KATSUSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30262009

齋藤 琢 (SAITO TAKU)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：30456107

(3)連携研究者
なし