

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 3 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591642

研究課題名（和文） 腰椎椎間板変性の原因解明と新たな治療法開発に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research on mechanism of lumbar disc degeneration and new development of treatment

研究代表者 千葉 一裕 (CHIBA KAZUHIRO)

北里大学・附置研究所・研究員

研究者番号：80179952

研究成果の概要(和文):エストロゲン受容体 α (ER α)は glucocorticoid receptor-interacting protein-1 (GRIP1) と共同し、TGF- β /MKK6/p38MAPK のシグナル系と crosstalk しながら、軟骨基質代謝に保護的作用を示すことを明らかにした。また、髄核細胞における基質代謝のメカニズムとして proxy hydroxylase (PHD)3 が TNF- α の活性を NF κ B を調節することでコントロールし、ADAMTS5, Syndecan4, MMP13 の発現に重要な役割を及ぼしていることを明らかにした。さらにヒト血清を用いた軟骨代謝マーカーの想定により、椎間板変性状態における 2 型コラーゲンの合成と分解の関係を明らかとした。

研究成果の概要 (英文) : Crosstalks between ER α /GRIP1 and TGF- β /MKK6/p38 MAPK pathway have protective roles on cartilage metabolism via regulating the extracellular matrices expression.

PHD3 controls TNF- α activity by modulating NF- κ B signaling. When PHD3 is silenced, there is a significant decrease in TNF- α -induced expression of catabolic markers that include ADAMTS5, syndecan4, MMP13, and at the same time, there is restoration of aggrecan and collagen type II expression.

In vivo study, there was a significant positive correlation between the Cobb angle and CPII in degenerative lumbar scoliosis. The results suggest degenerative lumbar scoliosis patients have higher levels of type II collagen synthesis and degradation.

These findings may lead to the development of a novel therapeutic approach for cartilage degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脊椎

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：運動器・脊椎・椎間板・退行変性・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年の急速な高齢化社会・ストレス社会の到来により、腰痛で医療機関を受診する患者は増加の一途をたどっている。2004年度国民生活基礎調査によると、腰痛の有訴者率は男で第1位、女性でも肩こりに次いで第2位と国民の健康に重大な影響を及ぼし、その通院率も男女とも第2位と膨大な医療費がその治療に費やされていることが示されている（国民衛生の動向2008年版、厚生統計協会編）。さらに腰痛は45歳以下の就労者の就業不能の最も多い原因でもあり、その休業補償と就業不能による経済的損失を合わせると治療に要する医療費の3倍にも及ぶとの試算もある。したがって腰痛は国民健康の面のみならず社会経済の面でも極めて重大な問題となっており、早急にその対策の確立が望まれている。

腰痛発症の最も頻度の高い原因のひとつとして椎間板変性を基盤とした退行変性疾患があることは良く知られている。椎間板変性が端緒となり椎間板症、椎間板ヘルニア、脊椎すべり症、変形性脊椎症や脊柱管狭窄症などさまざまな病態が生じていく。しかし、椎間板変性の原因は未だに不明である以上、退行変性腰痛に対する治療は、保存的、手術的いずれも対症的とならざるを得ず、根本的な問題解決には程遠いのが現状である。そこで椎間板変性の原因を解明し、変性過程そのものを予防・遅延あるいは逆行せしめることが可能となれば、腰・下肢痛に苦しむ患者個人のQOLを改善させるのみならず、医療経済上もその恩恵は計り知れない。

2. 研究の目的

腰痛症は、患者の日常生活動作を障害し生活の質を低下させ労働生産性の低下をもたらすなど医療のみならず社会経済上も重大な問題を生じるが、多くの腰痛症発症の要因となる椎間板変性の機序は解明されていない。その原因解明は、患者の苦痛軽減のみならず医療経済面からも極めて重要である。われわれは、数多くの研究を通じて椎間板変性機序解明ひいては新たな治療法開発の基礎となる知見の集積に努めてきた。

本研究では椎間板変性におけるエストロゲンの関与およびその分子メカニズム、また椎間板の低酸素状態における prolyl 4-hydroxylase (PHD) の発現と椎間板組織の分解系メカニズムへの関与、さらにヒト血清バイオマーカーの検討を行うことで、椎間板変性メカニズムの解明の一助とすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

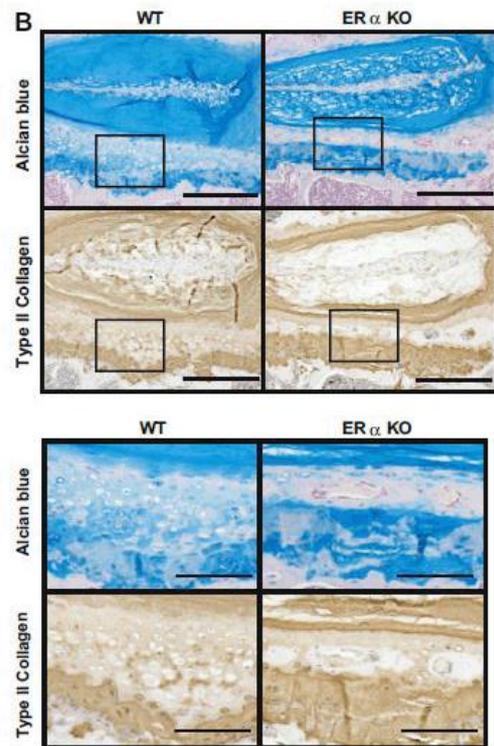
(1) エストロゲン受容体 α (ER α) を欠損したマウスの椎体軟骨終板を組織形態学的に検討した。さらに、in vitro で II 型コラーゲンの遺伝子発現に対するエストロゲンの作用の分子メカニズムを検討した。

(2) ラットおよびヒト髓核細胞を用いて低酸素環境下における PHD の発現および PDH 3 の椎間板組織への分解系への作用機序を検討した。

(3) ヒト椎間板組織の編成過程解明のため、血清バイオマーカー；hyaluronic acid (HA), keratan sulfate (KS), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), collagen type II cleavage (C2C), and procollagen type II C-propeptide (CPII) の検討を行った。

4. 研究成果

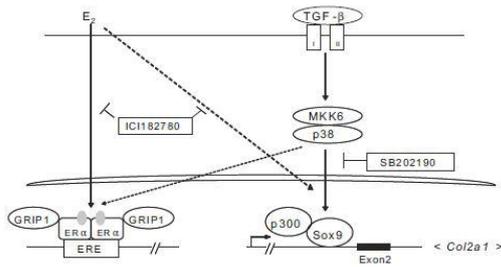
(1) ER α 欠損マウスでは軟骨細胞が減少しその軟骨終板の厚さの減少、細胞外器質の減少が見られた。



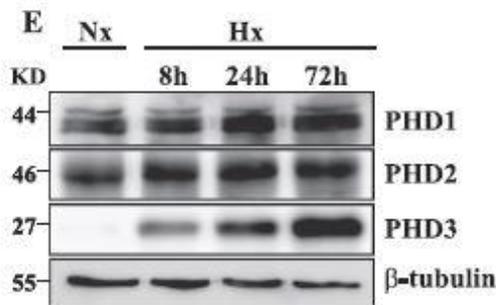
II 型コラーゲン遺伝子発現に対するエストロゲンの作用の分子メカニズムの検討では、野生型ではエストロゲンもしくは TGF- β 添加で II 型コラーゲンの発現が増加したものの ER α 欠損マウスにおいてはその増加が見られなかった。またレポーターアッセイを用いて II 型コラーゲン発現調節機構を詳細に検討した結果、dominant negative 型 ER α や p38 mitogen-activated protein kinase

(p38 MAPK) の阻害剤で II 型コラーゲンのプロモーター活性は抑制されることを見出した。更に glucocorticoid receptor-interacting protein-1 (GRIP1) は ER α および構成的活性化型 MKK6 の存在下でエストロゲン依存的にエストロゲン応答配列 (ERE) の活性化を増強することが明らかになった。

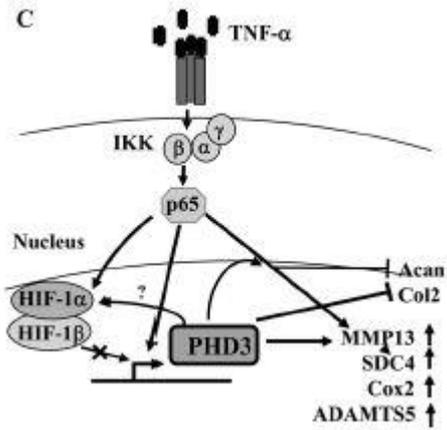
これらの結果から ER α は GRIP1 と共同して ERE を介した II 型コラーゲン遺伝子の発現を増強し、また TGF- β /MKK6/p38MAPK のシグナル系と crosstalk することが明らかとなった。



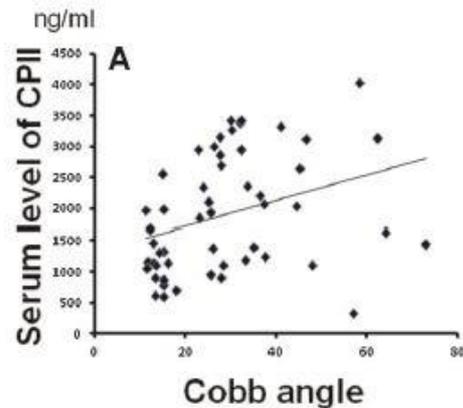
(2) PHD1, 2, 3 のサブタイプの中で、低酸素状態では PHD3 が最も強く発現が誘導された。



さらに、PHD3 の発現は TNF- α および IL-1 β によって調整を受けていること、また PHD3 は TNF- α の発現を NF κ B シグナルを介して調整しており、PHD3 は軟骨分解作用をもつ ADAMTS5、Syndecan4、MMP13 などの分解系のみならず、アグリカン、2 型コラーゲン等の合成系の調整を行い、髄核細胞の基質代謝を調整していることを明らかにした。



(3) ヒト血清中のバイオマーカーを測定し、腰椎に変性を認めた患者において、2 型コラーゲンの合成系の指標となる CPII と分解系の指標となる C2C はいずれも変性した患者において増加しており、腰椎の変形角度とも正の相関を認めたことから、椎間板の主要成分である 2 型コラーゲンの代謝が亢進していることを明らかにした。



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4件)

- ① Fujita N, Markova D, Anderson DG, Chiba K, Toyama Y, Shapiro IM, Risbud MV. Expression of prolyl hydroxylases (PHDs) is selectively controlled by HIF-1 and HIF-2 in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: distinct roles of PHD2 and PHD3 in controlling HIF-1 α activity in hypoxia. J Biol Chem(査読あり) 287(20):2012, 16975-16986.
- ② Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Miyamoto T, Ishii K, Niki Y, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Serum cartilage metabolites as biomarkers of degenerative lumbar scoliosis. J Orthop Res(査読あり) 30(8):2012, 1249-1253.
- ③ Fujita N, Chiba K, Shapiro IM, Risbud MV: HIF-1 α and HIF-2 α degradation is differentially regulated in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. J Bone Miner Res (査読あり) 27(2):2011, 401-412.
- ④ Kato M, Takaishi H, Yoda M, Tohmonda T, Takito J, Fujita N, Hosogane N, Horiuchi K, Kimura T, Okada Y, Saito T, Kawaguchi H, Kikuchi T, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K: GRIP1 enhances estrogen receptor α dependent extracellular matrix gene expression in chondrogenic cells. Osteoarthritis and Cartilage(査読あり) 18:2010, 934-941.

[学会発表] (計3件)

- ① Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Miyamoto T, Ishii K, Niki Y, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Cartilage Biomarkers in Degenerative Lumbar Scoliosis. Spine Week ISSLS, 2012, May 28, Amsterdam Netherland.
- ② 細金直文 渡辺航太 辻崇 石井賢 中村雅也 戸山芳昭 千葉一裕 松本守雄: 腰椎変性側弯症と軟骨代謝マーカーの関連. 41回日本脊椎脊髄病学会. 平成24年4月19-21日. 福岡県久留米市
- ③ Chiba K (1番目) 他7名: Polymorphisms in genes encoding extracellular matrix proteins are associated with susceptibility to lumbar disc herniation. International Society for

the study of the Lumbar Spine .
2010. April 15. Auckland, New Zealand.

[図書] (計1件)

- ① 辻崇, 千葉一裕, メディカルビュー社, 運動器の痛みを取る・やわらげる、2012年、p280-282

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 一裕 (CHIBA KAZUHIRO)
北里大学・附置研究所・研究員
研究者番号: 80179952

(2)研究分担者

辻 崇 (TSUJI TAKASHI)
北里大学・附置研究所・研究員
研究者番号: 60296639

細金 直文 (HOSOGANE NAOBUMI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 10365306