

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：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791365

研究課題名（和文）脊椎椎間板疾患感受性遺伝子に立脚した病態解明および治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the treatment and pathophysiology based on the susceptibility gene in lumbar disc disease.

研究代表者

関 庄二（SEKI SHOJI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：00432112

研究成果の概要（和文）：CILP Tg マウスおよびノーマルマウスの椎間板の構造を組織学的に確認すると、サフラニン-O 染色にて髄核組織の染色性が有意に Tg マウス群で低下していた。さらに MRI では、Tg マウスの腰椎 MRIT2 強調画像において、腰椎椎間板の輝度はノーマルマウスと比べて低下していたことから、明らかな椎間板変性の進行が認められた。

CILP Tgマウスの頸椎に不安定性を導入することで、頸椎椎間板変性、ヘルニアモデルを作成した。このモデルで変性誘導後の頸椎椎間板の組織学的評価を行った結果、Tg マウスで椎間板変性が進行し、また同時にTGF- β シグナルも抑制されていることが分かった。これらのことから、CILPが椎間板変性を促進している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Safranin O staining in intervertebral disc were significantly decreased in Nucleus pulposus tissues of Tg mice compared to controls. MRI analysis indicated obvious progression of degenerative intervertebral discs in Tg mice, which suggested reduction of the intensity of lumbar T2 weighted MR imaging.

The cervical intervertebral disc degeneration and hernia models were established by introducing instability into cervical vertebrae of CILP Tg mice. The histological analysis suggested that progression of intervertebral disc degeneration and regulation of TGF- β signaling. There may be a possibility that CILP enhance intervertebral disc degeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：CILP、腰椎椎間板、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

我々は腰椎椎間板ヘルニア患者 467 人、コントロール群 654 人の DNA サンプルを用いて軟骨関連遺伝子の候補遺伝子について、我々

は、遺伝子多型研究センターで収集した遺伝子多型データと高速度大量タイピングシステムを用いて、大規模な相関解析を行った。すると、cartilage intermediate layer

protein (CILP) 遺伝子の I395T において $p=0.0000068$ の相関を認めた。さらに他の遺伝子領域に疾患感受性多型が存在しないかどうかを検討するために、連鎖不平衡領域を決定したところ、CILP 遺伝子はほぼひとつの連鎖不平衡領域内に存在した。ハプロタイプに基づく解析も同時に行い、他の領域には疾患感受性多型が存在しないことを証明した。これらの解析から、CILP の I395T が腰椎椎間板ヘルニアの疾患感受性多型であることをより確実に示した。さらにウサギ髄核細胞を用いた、*in vitro* の機能解析から、CILP 蛋白の高発現が TGF- β シグナルを抑制することで、椎間板変性に関わる可能性を見出した (Seki S et al, *Nature Genet*, 2005)。我々は、CILP 遺伝子の機能および椎間板ヘルニアを起こすメカニズムについても *in vitro* で検討した。(IA レルと T アレルを持つ人でどのように椎間板ヘルニアが起こるのかを検討した。) 正常椎間板では TGF- β シグナルが亢進しアグリカン、II 型コラーゲンの発現が上昇する。変性椎間板では CILP 蛋白が多く発現し、CILP 蛋白と TGF- β が結合するため、レセプターと結合できなくなり、シグナルがストップしてしまう。特に T アレルを持つ人では TGF- β との結合力が強いため、シグナルが流れなくなると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は我々が同定した腰椎椎間板ヘルニアの疾患感受性遺伝子である CILP (cartilage intermediate layer protein) 遺伝子の機能を *in vivo* において解析することである。つまり CILP 遺伝子のトランスジェニックマウスを作成することで、椎間板ヘルニアおよび変性のメカニズムについて遺伝子レベル、蛋白レベルで解明できれば、その臨床的貢献度は計り知れないと考えられる。

3. 研究の方法

CILP トランスジェニックマウスの表現型の解析

椎間板の構造 (髄核、線維輪) を、トランスジェニック群と正常群で H-E 染色およびサフラニン-O 染色で組織学的に評価した。さらに作成した系統間ごとで脊椎椎間板を MRI で評価した。(BioView 社)

CILP トランスジェニックマウスの頸椎椎間板ヘルニアモデルの作成

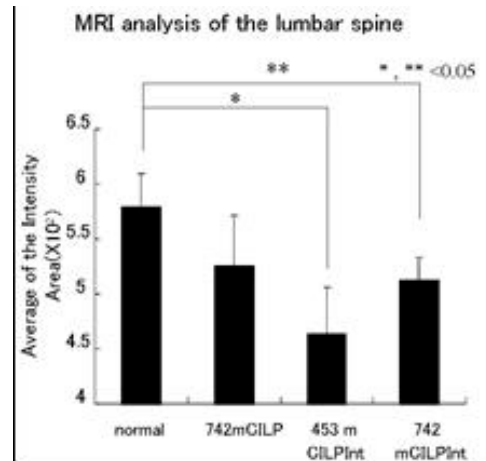
マウスの頸椎の棘突起、棘間靭帯、項靭帯を切除し、頸椎の不安定性を導入すると頸椎椎間板変性、ヘルニアができる (Miyamoto et al, spine)。このモデルを作成し、変性誘導後の頸椎椎間板を各系統でどのように変性度合

いが違うか、レントゲン上の変化、ヘルニアの程度等を組織学的に評価した。

4. 研究成果

CILP トランスジェニックマウスの表現型の解析

椎間板の構造 (髄核、線維輪) を、組織学的に確認すると、サフラニン-O 染色にて髄核組織の染色性が有意にトランスジェニックマウス群で低下していた。さらに作成した系統間ごとで脊椎椎間板を MRI で評価すると (BioView 社)、742mCILPInt、453mCILPInt のマウスの腰椎 MRIT2 強調画像において、腰椎椎間板の輝度はノーマルマウスと比べて低下していたことから、明らかな椎間板変性の進行が認められたと考えられる (下図参照)。また各系統間の腰椎レントゲン上、椎間板高の違いを有意に認めている。



CILP トランスジェニックマウスの頸椎椎間板ヘルニアモデルの作成

さらにマウスの頸椎の棘突起、棘間靭帯、項靭帯を切除し、頸椎の不安定性を導入すると正常群と比較して明らかにトランスジェニック群で変性が進行していた。またトランスジェニック群の変性が進行した椎間板において有意に TGF- β シグナルが低下していた。

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 3 件)

- ① Wang Z, Kim JH, Higashino K, Kim SS, Wang S, Seki S, Hutton WC, Yoon ST. Cartilage Intermediate Layer Protein (CILP) Regulation in Intervertebral Discs: The Effect of Age, Degeneration, and BMP-2. *Spine*, 査読有, 37 巻, 2012,

E203-208,
DOI:10.1097/BRS.0b013e31822dcf47.

- ②Nogami M, Tsuno H, Koike C, Okabe M, Yoshida T, Seki S, Matsui Y, Kimura T, Nikaido T. Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. Transplantation, 査読有, 93 巻, 2012, 1221-1229, DOI: 10.1097/TP.0b013e3182529b76.
- ③ 関 庄二, 浅沼由美子, 舛田浩一, 川口善治, 浅沼邦洋, 木村友厚 Adamts5 遺伝子と椎間板変性, 整形・災害外科, 査読無, 55 巻, 2012, 118-119

[学会発表] (計 5 件)

- ①Yasuhito Yahara, Shoji Seki, Hiraku Motomura, Yoshito Matsui, Mami Higashimoto, Syunichi Shiozawa, Tomoatsu Kimura. Effect of a selective c-Fos/AP-1 inhibitor on the human nucleus pulposus cells. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 26 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ②関 庄二, 元村 拓, 塩沢俊一, 木村友厚 c-Fos/AP-1 阻害薬 (T-5224) の軟骨および椎間板変性抑制効果 応用薬理シンポジウム, 2012 年 9 月 4 日, ベルクラシック甲府 (山梨県)
- ③Shoji Seki, Noriyuki Tsumaki, Hiraku Motomura, Yoshiharu Kawaguchi, Yoshito Matsui, Kayo Suzuki, Tomoatsu Kimura. Mechanical stress loading of cervical intervertebral disc in CILP transgenic mice promotes intervertebral disc degeneration. ISSLS, 2012 年 5 月 28 日~6 月 1 日, アムステルダム (オランダ)
- ④関 庄二, 阿部由美子, 川口善治, 浅沼邦洋, 舛田浩一, 木村友厚 ADAMTS5 遺伝子 ノックダウンにおける椎間板変性抑制効果, 第 83 回日本整形外科学術集会, 2010 年 5 月 27 日~30 日, 東京国際フォーラム (東京都)
- ⑤Shoji Seki, Noriyuki Tsumaki, Yoshiharu Kawaguchi, * Yumiko Abe, Kayo Suzuki, Akiko Iwai, Takeshi Oya, Shiro Ikegawa, and Tomoatsu Kimura. CILP, cartilage intermediate layer protein, promotes lumbar disc degeneration. ORS, 2010 年 3 月 6 日~9 日, ニューオーリンズ (アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 庄二 (SEKI SHOJI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号 : 00432112

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :