

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659706

研究課題名（和文）

変形性脊椎症の分子病態解明のための cre / lox P システムの確立を目指した研究

研究課題名（英文）

Stud aiming at elucidating the molecular mechanism behind spondylosis through establishing cre / lox P system in the field of intervertebral disc.

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):これまでに報告のない新たな変形性脊椎症のマウスモデルを確立した。本モデルにおいては変性に伴って、変形性関節症における軟骨細胞と同様の線維輪細胞の肥大化および 10 型コラーゲンの発現の増強が確認された。また本研究の過程において椎間板線維輪特異的なマーカー遺伝子の候補を同定しえた。

研究成果の概要(英文): We established a new mouse model of spondylosis. In this model, we identified that annulus fibrosus cells exhibit hypertrophic change morphologically with expression of type 10 collagen. Also we succeeded in identifying a candidate gene which can be a marker of annulus fibrosus of intervertebral disc.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎椎間板変性およびそれに続発する変形性脊椎症は、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ロコモティブシンドロームの中心的疾患であり、我々が行っている ROAD スタディでの疫学研究の結果から、国内だけでも 1100 万人の有症状患者がいると推定され、また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（男性 1 位、女性 2 位：平成 19 年度厚生労働省国民生活基礎調査）。しかしながらその原因については重労働などの過度なメカニカルストレスの蓄積以外ほとんど解明されておらず、その根本的治療法は糸口すらつかめていない。

それは脊椎・椎間板の発生や変性について分子生物学的な研究がほとんど進んでいないことに起因しており、椎体・椎間板特異的なマーカーも同定されておらず、四足歩行の実験動物での生理的な脊椎・椎間板変性モデルも未だに確立されていないことがこれまで問題であった。

我々は変形性膝関節症について、世界に先駆けてマウスモデルを確立し、高度なトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を通じた分子生物学的なアプローチにより得られた知見と、大規模コホートから得られたヒトゲノムサンプルを統合的に解析することで変形性膝関節症発症の分子メカニズムの解

明・治療標的候補分子の特定に多くの実績をあげてきた。本研究では変形性膝関節症において成功を納めてきたこれまでの研究戦略を踏襲し、変形性脊椎症の分子病態を解明する第一歩として、脊椎・椎間板特異的なマーカー遺伝子の探索を行うと同時に変形性脊椎症・椎間板変性症マウスモデルを確立することを目的とした。

## 2. 研究の目的

前述のように患者数からみても変形性脊椎症は極めて重大な医学的・社会的問題であり、今後の高齢化に伴いその患者数はさらに増加することが確実であるが、その治療法はこの数十年間ほとんど進歩しておらず、その分子病態は未だに闇に包まれている。我々は、近年の医学の劇的な進歩を支えている分子生物学的研究手法によってこの問題に切り込み、変形性脊椎症発症の分子生物学的な背景を明らかにすべく、その解析の第一歩となるような糸口を見出すことを目的に具体的には ①変形性脊椎症のマウスモデルを確立すること、②脊椎における cre / loxP システムを確立するために椎間板特異的なマーカーを同定すること、を目的として研究を遂行した。本研究により変形性脊椎症、椎間板変性症の新規治療法へ多大な貢献をすることは間違いない。

## 3. 研究の方法

### ①変形性脊椎症のマウスモデルの確立

これまでに椎間板穿刺による方法や尾椎での圧迫による椎間板変性モデルの報告があるが、いずれも非生理的であり、また実際の臨床病態を反映しているとは言いがたかった。我々は整形外科の臨床教室に所属しており、脊椎外科の知見に精通していることからより生理的で、臨床病態に近い変形性脊椎症・椎間板変性マウスモデルの確立を目指し、変形性脊椎症・椎間板変性症モデルとして、後方要素の椎間関節の不安定性を惹起することによる椎間板変性モデルや、逆に椎間関節の固定により、隣接椎間への過荷重を誘引し、隣接レベルの椎間板障害を惹起するモデルなどの作成を検討した。これらのモデルによる椎間板障害は実際の臨床の現場においても観察される現象であることから、マウスにおいても同様の現象が観察されることが期待され、実際の protocol としては 8 週前後の成体マウスを全身麻酔下に本手術と疑似手術を施行した群に分け、2 週毎のレントゲン評価による脊椎症性変化の確認と術後 8 週以降での病理組織の確認により、椎間板変

性・脊椎症発症の評価を行い、モデルの最適化を行う予定とした。また自然経過による加齢性の椎間板変性・脊椎症性変化についても検討を行った。具体的には生後 1 年以降の高齢マウスと若年マウスでのレントゲン所見および病理組織による比較検討を行い、高齢マウスでの脊椎症性変化の程度を椎間板変性モデルと比較し、手術モデルの妥当性についても評価を行った。

### ②椎間板特異的なマーカーの同定

顕微鏡下手術にてマウス椎間板組織より線維輪細胞・髓核細胞・軟骨終板を採取し、各組織において既報告の各種遺伝子の発現プロファイルに合致していることをリアルタイム PCR にて確認後、マイクロアレイベースで各組織のマーカーたりうる遺伝子の検索を行った。マイクロアレイにて得られた結果の妥当性をさらにリアルタイム PCR で確認し、得られた候補遺伝子の全身での発現パターンをさらに各種臓器の tissue panel を用いてリアルタイム PCR で解析した。また細かな椎間板内の発現局在の評価は免疫組織染色によって行った。以上の過程を経て、椎間板構造物のマーカーとなりうる遺伝子の絞り込みを行っていった。

## 4. 研究成果

### ① 変形性脊椎症のマウスモデルの確立

8 週齢の C57/B6J マウスの腰椎椎間関節を顕微鏡下に切除することにより、ヒトの椎間板変性によく類似した継時的な局所後湾の進行および椎間板変性を生じることがレントゲンおよび組織学的解析にて確認した。前述の固定隣接椎間モデルや棘上・棘間靭帯切除モデル、前縦靭帯切除モデルでは人間にみられるような椎間板変性・脊椎症性変化は見られなかった。椎間関節切除による変形性脊椎症は術後 8 週以降に顕著に認められ、椎間板腔の狭小化に加え、骨棘の形成なども認められた。組織学的には髓核組織の著しい偏在・極小化および線維輪組織の肥大が当該レベルの椎間板にて認められた。肥大した線維輪の細胞を仔細に観察すると細胞が変形性膝関節症にみられる軟骨細胞の肥大化と同様の形態学的な肥大化を呈しており、さらに同部位では 10 型コラーゲンの発現が見られた。一方で加齢モデル (1.5 年 齢) のマウスの脊椎でも同様の解析を行ったが、加齢マウスでは目立った椎間板変性および脊椎症性変化を認めず、自然経過では人間と同様の椎間板変性はマウスでは生じにくいものと考えられた。

② 椎間板特異的マーカーの同定

椎間板の髄核・線維輪に特異的なマーカーをマイクロアレイベースで検索したところ、線維輪に比較的特異性の高いマーカー遺伝子Xを同定し、椎間板線維輪のマーカーとなりうる遺伝子の同定に成功した。本マーカー遺伝子は椎間板内では線維輪のみで特異的に発現しており、また体内のほかの臓器での発現も非常に低いことが判明し、線維輪組織のマーカーたりうることを確認された。また本遺伝子は術中検体として採取したヒト非変性椎間板組織においてもやはり線維輪に発現が限局していることが確認された。

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)

① Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development.

Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Hikata T, Kobayashi H, Fukai A, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H.

Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Jan 29;110(5):1875-80

②  $\beta$ -catenin regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to the intracellular C-terminal region of the receptor.

Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H.

Arthritis Rheum. 2013 Feb;65(2):429-35.

③ GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation.

Itoh S, Saito T, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algül H, Schmid RM, Chung UI, Kawaguchi H.

J Biol Chem. 2012 Aug 24;287(35):29227-36

④ C/EBP $\beta$  and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 $\alpha$  as the inducer in chondrocytes.

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, Kawaguchi H.

Hum Mol Genet. 2012 Mar 1;21(5):1111-23

⑤ Prevalence of symptomatic lumbar spinal stenosis and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: the Wakayama Spine Study.

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.

Osteoarthritis Cartilage. 2012 Oct;20(10):1103-8

⑥ Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice.

Fukai A, Kamekura S, Chikazu D, Nakagawa T, Hirata M, Saito T, Hosaka Y, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H.

Arthritis Rheum. 2012 Jan;64(1):198-203

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[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

## 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

原 慶宏 (HARA NOBUHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00422296

小野 貴司 (ONO TAKASHI)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：00506248

### (3) 連携研究者 なし