

## 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 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23791637

研究課題名（和文） Sox9-CreERT2マウスを用いた脊椎椎間板症の病態解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文） Pathological analysis and drug discovery for vertebral disc degeneration using Sox9CreERT2 mice

研究代表者

宗 和隆 (SO KAZUTAKA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30514038

研究成果の概要（和文）：

in situ ハイブリダイゼーション法や免疫染色法を用いて TGFBR-II flox/flox マウスにおけるタモキシフェン投与後の椎間板症発症までを経時的に解析したところ、椎体形成過程での終板成長軟骨細胞の増殖および分化異常が明らかとなった。これら椎体形成異常の表現系は IGF-I 全身投与により回復しなかった。次に、新規薬物療法の開発のために、TGFBR-II flox/flox マウスより単離培養した軟骨細胞から TGFBR-II 欠失軟骨細胞を作製し、現在まで約 2000 種類の低分子化合物をスクリーニングしたものの、いまだヒット化合物を得られていない。

研究成果の概要（英文）：

in situ hybridization and immunohistochemistry showed that TGFBR-II conditional deficient mice had growth and differentiation abnormality of growth plate chondrocytes in endoplates. This abnormality was not improved by IGF-I injection. Next, to discover new drugs for the treatment of vertebral disc degeneration, we screened about 2000 chemical reagents using TGFBR-II null primary chondrocytes, and so far we have not got a target reagent yet.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：整形外科

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：TGF-beta、椎間板、低分子化合物

## 1. 研究開始当初の背景

椎間板症は我が国の骨軟骨性疾患の中で最も発症頻度の高い疾患の 1 つであり、椎間板ヘルニアや引き続き発症する変形性脊椎症の前駆状態となるが、変性した椎間板を再生させる有効な治療法は未だ確立されていない。椎間板髄核は発生学的には脊索由来であり、その細胞外基質には II 型コラーゲンとプロテオグリカンが多く、髄核細胞は軟骨細胞と共通した分子メカニズムで組織を形

成・維持しているものと考えられる。実際、現在まで軟骨に対する anabolic 効果が報告されている分泌タンパク質によって髄核細胞の基質産生量や細胞増殖が増加することが報告されている (Masuda K, et al. 2006)。またウイルスを用いた遺伝子治療として基質タンパク質遺伝子発現を誘導する転写因子 Sox9 遺伝子を導入し、椎間板変性の治療の試みも報告されている (Paul R, et al. 2003)。我々はこれまでに、ポリビニルアル

コールハイドロゲルを用いた人工髄核の開発や多孔性チタンを用いた椎間板スペーサーの開発を行い、現在一部の材料では臨床治験を実施している (So K, et al. 2007, Takemoto M, et al. 2007)。しかしこれらの材料による椎間板再建は手術による侵襲が必須である。近年、遺伝子多型解析から、椎間板ヘルニアの感受性遺伝子として Col11A1 と CLIP が同定された (Seki S, et al. 2005)。Col11A1 は TGF- $\beta$  によりその産生が誘導され、また CLIP は TGF- $\beta$  と結合することによって TGF- $\beta$  シグナルを抑制し II 型コラーゲンやプロテオグリカンの発現を顕著に低下させる。これらの知見から椎間板症の発症には TGF- $\beta$  シグナルが重要な役割を果たしていることが示唆される。京都大学医学部整形外科ではこれまで軟骨細胞のマスタ転写因子である Sox9 の機能を遺伝子改変マウスを用いて解析し、Sox9 が軟骨細胞の分化・成熟・増殖に必須の転写因子であること、II 型コラーゲンやプロテオグリカン遺伝子の発現に必須であることを明らかとしてきた (Akiyama H, et al. 2002)。Sox9 は生後においてもすべての軟骨細胞や髄核細胞に発現が認められる。よって生後の軟骨および椎間板の生理学的成熟および椎間板症の病態解明のため、タモキシフェンで Cre リコンビナーゼが発現誘導される Sox9-CreERT2 ノックインマウスを作成し (Soeda T, et al. 2010)、生後の軟骨細胞および髄核細胞において時間および空間特異的に特定の遺伝子を欠失させることができる *in vivo* 実験系を確立した (宗、未発表)。この Sox9-CreERT2 マウスを用いて生後 Sox9 発現細胞において腫瘍増殖因子ベータ II 型受容体 (TGFBR-II) 遺伝子を欠失させ TGF- $\beta$  シグナルを遮断したところ、このマウスは後側彎変形をきたした (宗、未発表)。よってこの遺伝子改変マウスは、椎間板症のモデルマウスと考えられる。

## 2. 研究の目的

Sox9-CreERT2 マウスを用い生後の軟骨細胞において選択的に腫瘍増殖因子ベータ II 型受容体 (TGFBR-II) を欠失させた遺伝子改変マウスを作製し椎間板の異常を伴う脊柱後側彎変形を認めた。この椎間板症モデルマウスの脊椎および椎間板の組織学的解析やインスリン様成長因子-I の全身投与の効果の解析、*in vitro* での TGFBR-II 欠失軟骨細胞を用いた合成低分子化合物 5000 種類の硫酸化グリコサミノグリカン産生を指標とした化合物スクリーニングと、ヒット化合物の TGFBR-II 欠失マウスおよび椎間板変性家兎モデルへの全身投与による椎間板変性に対する治療効果を検討し、椎間板症の新規治療薬の開発をめざす。椎間板研究は骨軟骨の研究に比して報告も少なく、未だ途上の分野で

ある。ヒト椎間板ヘルニアの遺伝子多型解析から TGF- $\beta$  シグナルの椎間板症への関与は明らかであり、その病態解析を分子生物学的に解明する本研究は治療法の開発の点でも重要である。また髄核細胞において細胞外基質産生誘導する低分子化合物の探索は、椎間板症に対する現実的な薬物治療に結びつき社会的意義も大きい。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず、TGFBR-II flox/flox/Sox9-CreERT2 マウスの椎間板および脊椎を、*in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫染色法を用いてタモキシフェン投与後の椎間板症発症までを経時的に解析しその分子機構を解明する。次にこの椎間板症モデルマウスを椎間板症に対する *in vivo* 治療モデルとして活用するため、軟骨細胞や髄核細胞に対してプロテオグリカンの産生を誘導し anabolic 効果を有するインスリン様成長因子-I (IGF-I) を全身投与する。TGF- $\beta$  シグナル遮断による椎間板症や脊柱変形に対し、IGF-I の有効性を X 線およびマイクロ CT による画像解析、*in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫染色法を含めた組織学的解析により明らかとする。次に、変性椎間板症に対しての新規薬物療法の開発のために、TGFBR-II flox/flox マウスより軟骨細胞を単離培養し、*in vitro* において Cre リコンビナーゼを用いて TGFBR-II 欠失軟骨細胞を作製する。この細胞に 5000 種類の低分子化合物を添加し、硫酸化グリコサミノグリカンの産生を誘導する低分子化合物を比色定量法で網羅的にスクリーニングする。ヒット化合物が家兎椎間板より単離培養した髄核細胞の硫酸化グリコサミノグリカンの産生を誘導することを *in vitro* で確認後、TGFBR-II 欠失マウスおよび椎間板変性家兎モデルに全身投与し、椎間板変性に対する治療効果を明らかとする。

(1) 生後 2 ヶ月の TGFBR-II flox/flox/ Sox9-CreERT2 マウスの腹腔内にタモキシフェン 2 mg を 3 日間連日投与し 1 週後、2 週後、3 週後、4 週後、6 週後に屠殺、X 線にて脊柱の変形を確認後、胸腰椎を摘出しパラホルムアルデヒド固定後、脱灰、パラフィン切片を作製する。またマイクロ CT で椎体および椎間板腔を 3 次元的に画像解析する。コントロール群としてコーンオイルを投与したマウスも同様に胸腰椎を経時的に摘出する。組織学的解析として、ヘマトキシリン/エオジン染色、アルシヤンブルー染色を行う。さらに  $^{35}\text{S}$  ラベル cRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫染色法によって、I 型、II 型および X 型コラーゲン、アグリカン、cartilage oligomatrix

protein、Sox9 の発現を検討する。また髄核細胞の BrdU による細胞増殖およびアポトーシスも組織化学的に経時的に検討する。

(2) 生後 2 ヶ月の TGFBR-II flox/flox/Sox9-CreERT2 マウスの腹腔内にタモキシフェン 2mg を 3 日間連日投与し、4 週後脊柱変形を確認する。このマウスにヒトリコンビナント IGF-I 5mg を連日 2 週間尾静脈から注射投与する。対照群は尾静脈から生理食塩水を注射したタモキシフェン投与 TGFBR-II flox/flox/Sox9-CreERT2 マウス、タモキシフェン非投与 (コーンオイル投与) TGFBR-II flox/flox/Sox9-CreERT2 マウスに生理食塩水を注射したマウスおよび IGF-I を注射したマウス群とし、計 4 群を IGF-I 注射または生理食塩水投与後 2 週、4 週で屠殺、X 線にて脊柱のアライメントを解析する。胸腰椎を摘出しパラホルムアルデヒド固定後、脱灰、パラフィン切片を作製する。組織学的解析として、ヘマトキシリン/エオジン染色、アルシヤンブルー染色を行う。さらに  $^{35}\text{S}$  ラベル cRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫染色法によって、I 型、II 型および X 型コラーゲン、アグリカン、cartilage oligomatrix protein、Sox9 の発現を検討する。また髄核細胞の BrdU による細胞増殖およびアポトーシスを組織化学的に検討する。

(3) 生後 1-3 日の TGFBR-II flox/flox マウスの肋軟骨を摘出し、トリプシンおよびコラゲナーゼにて軟骨細胞を単離する。96 ウェル培養プレート 1 ウェルあたり  $5 \times 10^4$  個の細胞を播種し a-MEM 培地で 24 時間培養する。Adenovirus-Cre を MOI=5 となるように各ウェルに添加し感染させ、さらに 48 時間培養し TGFBR-II 遺伝子を欠失した軟骨細胞を作製する。a-MEM 培地を交換後、各ウェルに合成低分子化合物を最終濃度  $10^{-6}\text{M}$  となるように添加し、さらに 48 時間培養する。各ウェルの硫酸化グリコサミノグリカン量は、プロテアーゼを用いて消化後 DMMB 色素液で発色させ吸光度 530nm で比色定量する。コントロールとして DMSO 添加ウェルを作製しておき、コントロールと比べて 2 倍以上の硫酸化グリコサミノグリカン産生を誘導する化合物をヒット化合物としてスクリーニングとする。ヒット化合物は 2 次スクリーニングとして、日本白色家兎の椎間板からコラゲナーゼ処理にて単離した初代髄核細胞に添加し、DMMB による比色定量で硫酸化グリコサミノグリカン産生量が 2 倍以上であるものを選択する。以上により選択された合成低分子化合物を、上述の研究計画 2 と同様に、生後 2 ヶ月の TGFBR-II flox/flox/Sox9-CreERT2 マウスの腹腔内にタモキシフェン 2mg を 3 日

間連日投与し 4 週後、脊柱変形を確認したマウスの尾静脈から 1 週間連日注射投与する。対照群は生理食塩水を注射したタモキシフェン投与 TGFBR-II flox/flox/Sox9-CreERT2 マウスとする。化合物注射後 2 週、4 週で屠殺、X 線にて脊柱のアライメントを解析し、胸腰椎を摘出しパラホルムアルデヒド固定後、脱灰、パラフィン切片を作製する。組織学的解析として、ヘマトキシリン/エオジン染色、アルシヤンブルー染色を行う。さらに  $^{35}\text{S}$  ラベル cRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫染色法によって、I 型、II 型および X 型コラーゲン、アグリカン、cartilage oligomatrix protein、Sox9 の発現を検討する。また髄核細胞の BrdU による細胞増殖およびアポトーシスも組織化学的に検討する。さらに 5 ヶ月齢日本白色家兎の第 4 / 5 椎間板を 18 ゲージ注射針で損傷させた外傷性椎間板症モデルを作製する。椎間板損傷 8 週後に、上記の合成低分子化合物を 1 週間連日静脈投与する。コントロールは生理食塩水を静脈投与する。投与開始後 4 週、8 週で屠殺し、X 線にて椎間板腔の高さを計測比較する。腰椎を摘出し、固定後メチルメタクリレート樹脂包埋し硬組織切片を作製する。ヘマトキシリン/エオジン染色、ファンギーソン染色を行い、椎間板変性に対する合成低分子化合物の効果を解析する。家兎椎間板変性についての X 線学的、組織学的評価方法はすでに発表済みである (So K, et al. 2007)。

#### 4. 研究成果

椎間板症は我が国の骨軟骨性疾患の中で最も発症頻度の高い疾患の 1 つであり、椎間板ヘルニアや引き続き発症する変形性脊椎症の前駆状態となるが、変性した椎間板を再生させる有効な治療法は未だ確立されていない。近年の知見から椎間板症の発症には TGF- $\beta$  シグナルが重要な役割を果たしていることが示唆されている。当研究室では生後の軟骨および椎間板の生理学的成熟および椎間板症の病態解明のため、タモキシフェンで Cre リコンビナーゼが発現誘導される Sox9-CreERT2 ノックインマウスを作成し、生後の軟骨細胞および髄核細胞において時間および空間特異的に特定の遺伝子を欠失させることができる *in vivo* 実験系を確立した。この Sox9-CreERT2 マウスを用いて生後 Sox9 発現細胞において腫瘍増殖因子ベータ II 型受容体 (TGFBR-II) 遺伝子を欠失させ TGF- $\beta$  シグナルを遮断したところ、このマウスは後側彎変形をきたした。平成 *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫染色法を用いてタモキシフェン投与後の椎間板症発症までを経時的に解析したところ、椎体形成過程での終板成長板軟骨細胞の増殖および分化異常

が明らかとなった。さらに、このマウスの長管骨成長板も著明な増殖・分化障害を呈していることが明らかとなった。これら椎体形成異常の表現系が IGF-I 全身投与により回復するかどうかを検討したところ、TGF- $\beta$  シグナル遮断による表現系は全く回復しなかった。よって椎間板変性および椎体形成異常により惹起される脊椎症に対しては、新規の治療薬が必要であることが示唆される。

次に、新規薬物療法の開発のために、生後 1～3 日の TGFBR-II flox/flox マウスの肋軟骨を摘出し、トリプシンおよびコラゲナーゼにて軟骨細胞を単離した。96 ウェル培養プレート 1 ウェルあたり  $5 \times 10^4$  個の細胞を播種し  $\alpha$ -MEM 培地で 24 時間培養し、Adenovirus-Cre を MOI=5 となるように各ウェルに添加し感染させ、さらに 48 時間培養し TGFBR-II 遺伝子を欠失した軟骨細胞を作製した。 $\alpha$ -MEM 培地を交換後、各ウェルに合成低分子化合物を最終濃度  $10^{-6}$ M となるように添加し、さらに 48 時間培養する。各ウェルの硫酸化グリコサミノグリカン量は、プロテアーゼを用いて消化後 DMMB 色素液で発色させ吸光度 530nm で比色定量した。コントロールとして DMSO 添加ウェルを作製しておき、コントロールと比べて 3 倍以上の硫酸化グリコサミノグリカン産生を誘導する化合物をヒット化合物としてスクリーニングとした。現在まで約 2000 種類の低分子化合物をスクリーニングしたもの、いまだヒット化合物を得られていない。また、2 次スクリーニング用として、日本白色家兎の椎間板からコラゲナーゼ処理にて初代髄核細胞の単離を試みているが、現在まで、スクリーニングに十分量の椎間板髄核細胞の単離に成功しておらず、単離条件の検討中である。

#### 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)

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宗 和隆 (SO KAZUTAKA)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30514038

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし