

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462316

研究課題名(和文)ヘパラン硫酸脱硫酸酵素に着目した椎間板変性の病態解明と治療戦略

研究課題名(英文)The role of heparan sulfate endosulfatase (Sulf-1) for intervertebral disc degeneration

研究代表者

根尾 昌志 (Neo, Masashi)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80311736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性は加齢性の変化であることはよく知られているが、その詳細なメカニズムや関与する因子については不明な部分も多い。今回、椎間板変性におけるヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulfs)が果たす役割と、作用機序について検討を行った。結果、Sulf-1の発現は髄核を中心に加齢とともに低下し、Sulf-1ノックアウトマウスの方が野生型マウスに比し、早期に椎間板変性が進行した。また、細胞レベルではSulf-1の添加によりII型コラーゲンの発現が亢進し、それにはSmad2/3シグナルの関与が示唆された。これらの結果は、Sulf-1が今後の椎間板変性予防の新規治療への可能性を秘めていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Intervertebral disc degeneration is a prevalent disease and contributes to aging effects. The treatment of disc degeneration has been researched, and some growth factors such as OP1 and FGF18 had reported the potential of disc regeneration. However, the mechanism of disc degeneration is still to be investigated. We elucidated heparan sulfate endosulfatase (Sulf-1) expression in disc with aging and the disc degeneration in Sulf-1 knockout mice were compared with C57BL6 wild type mice in histological analysis. Finally, we investigated type II collagen expression in vitro supplemented with Sulf-1 and determined the effect of TGF Smad2/3 or BMP4 Smad1/5 cell signaling pathway. This study demonstrated Sulf-1 regulated TGF Smad2/3 cell signaling and critical for disc homeostasis by regulating type II collagen expression.

研究分野：Orthopedics

キーワード：椎間板 ヘパラン硫酸 II型コラーゲン Smad2/3

1. 研究開始当初の背景

本邦における腰痛の有訴者率は、男性では1位(8.9%)、女性では2位(11.8%)と増加傾向である。また、労働人口の8%が腰痛であり、社会経済においても損失は大きい。椎間板変性は腰痛の代表的な原因であり、椎間板変性の機序を探ることは予防や治療につながると考えられ、変性椎間板に対しての再生医療に期待が持たれている。

椎間板は髄核、線維輪と軟骨終板から構成され、椎体間に可動性と力学的負荷に対する緩衝吸収機能を併せもつ組織である。髄核は髄核細胞と細胞外基質から構成されるが、細胞密度は低く、髄核におけるプロテオグリカン(PG)と水分の減少により椎間板の力学的強度は低下し変性をきたし、加齢性的変化が特に大きく影響を及ぼすと考えられている。その変性に関与する成長因子やサイトカインについてはTGFやBMPシグナルなど、新規治療については間葉系幹細胞(MSC)を椎間板に直接注入する方法などの報告が散見されるが、依然として研究段階である。我々は、以前から関節軟骨領域においてヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulf-1)の果たす役割に注目し、Sulf-1が加齢変化や細胞シグナルの調節因子として重要であることを報告した(1,2)。また、これまでのノックアウト(KO)マウスを用いた研究で、Sulf-1 KOがSulf-2 KOに比して膝関節軟骨の変性が顕著に進行していたことを明らかとした。

2. 研究の目的

本研究では、Sulf-1の椎間板変性における作用を組織学的に観察し、その機序の一端を明らかにすること、また、変性椎間板に対する新たな治療の可能性を探ることを研究課題とした。

3. 研究の方法

椎間板変性を観察するために、C57BL6マウ

スのL5/6レベル椎間板を採取し、2歳齢までSafranin O染色および、Sulf-1の免疫染色にて組織学的評価を行った。次に、Sulf-1ノックアウトマウスの椎間板も同様に採取し、変性を組織学的に評価した。その後、変性のメカニズムを探るべく炎症のマーカーとしてiNOs, 恒常性維持の働きとしてSmad2/3, II型コラーゲンの発現に着目して、免疫組織染色のみならず、細胞レベルでシグナル伝達活性をWestern blottingを用いて評価した。

4. 研究成果

4.1 Sulf-1 と加齢性変化

椎間板の加齢変化とSulf-1の発現についてC57BL6野生株マウス(WT,)1週から2歳齢までの椎間板を用いて免疫染色を施し観察した(n=4-6)。Sulf-1の発現は1週齢から髄核を中心に発現が見られ、その後、終板や線維輪にまで発現が見られるようになった(Fig 1A)。髄核内の細胞数は経年的に減少傾向となり、マウスの椎間板もヒトの既存の報告と同様の変性過程が見られた(Fig 1B)。Sulf-1の発現は終板や線維輪も髄核と同様に加齢とともに減少傾向であったが、特に髄核内では優位に減少傾向が見られた(Fig 1C)。これらの変化はSulf-1が加齢変化に重要な役割を担っていることが示唆される結果となった。

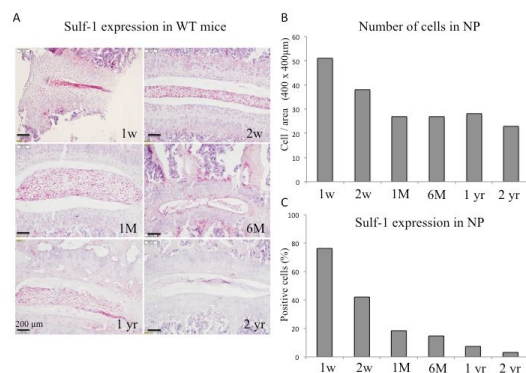


Fig. 1

4.2 Sulf-1 KO マウスにおける椎間板構造の観察

次に、Sulf-1 ノックアウト (KO)マウスを用いて椎間板の構造について WT と比較検討した。Safranin O 染色を KO と WT の椎間板に行い、組織学的に観察した。1 週齢では、Sulf-1 KO において終板の染色性が WT に比して低下しており、2 週齢ではその差が顕著となった。また、これは、椎間板の衝撃吸収性の機能が Sulf-1 KO では早期から形成されていないことを示唆する所見であった (Fig 2A, 黒矢印)。2 歳齢となると、WT では髄核はムコイド変性をきたしているものの、比較的椎間板高及び繊維輪の構造は保たれており、衝撃吸収性は維持されていることが示唆された。しかしながら Sulf-1 KO マウスでは椎間板高は減少し、髄核であった領域は粗なムコイド変性組織で置換されており、椎間板としての機能はすでに破綻していると考えられた (Fig 2B)。

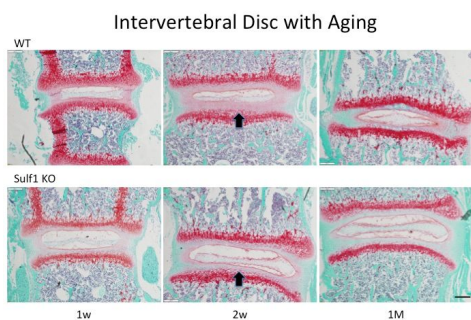


Fig. 2A

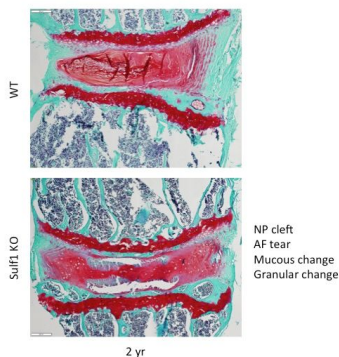


Fig. 2B

WT と Sulf-1 KO マウスの加齢変化を B00S の評価(3)を用いて scoring を行った。方法として、独立した 3 名が連続した 3 スライドを scoring し、その平均を score として採用した。その結果、Sulf-1 KO の score が 4 週齢以降 WT に比べて優位に高く変性が進行していることがわかった。(Fig 2C, *: $p < 0.05$)。これらの結果は椎間板恒常性維持に Sulf-1 が必要な因子であることが考察された。

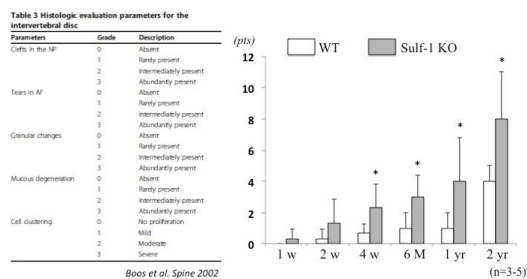
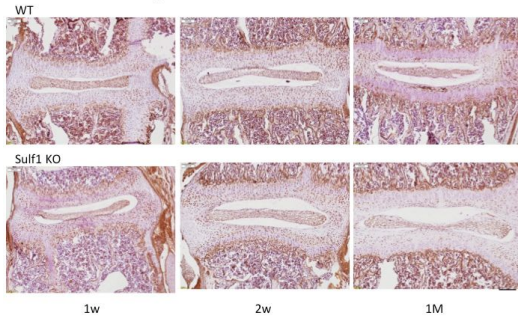


Fig. 2C

4.3 炎症や同化作用への関与

次に Sulf-1 が炎症作用や同化作用に影響を及ぼしているかを確認するために、炎症のマーカーの一つである iNOS と同化作用の可能性を検討するため、TGF 関連シグナルの Smad2/3 の免疫染色を行った。その結果、iNOS の発現については、1 ヶ月齢までの成長段階では WT と Sulf-1 KO の間で有意差は見られなかった。Smad2/3 の発現は、WT の 2 週、1 カ月で Sulf-1 KO に比較して髄核や終板を中心に陽性細胞が多く見られた。このことは、椎間板恒常性維持に Smad2/3 が関わっていることを示唆する所見であった (Fig. 3)。

iNOs expression in Intervertebral Disc



Smad2/3 expression in Intervertebral Disc

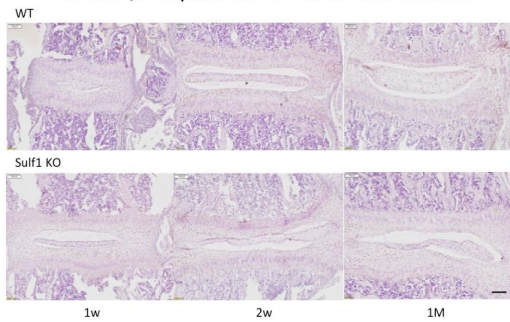


Fig. 3

4.4 Sulf-1 の作用-in vitro の検討-

4.4.1 Sulf-1 蛋白の細胞毒性について

これまでの KO マウスを用いた検討から、Sulf-1 の欠損は椎間板の変性を促進すること、また Smad2/3 細胞の伝達経路が関連している可能性が示唆された。この結果を検証することと、Sulf-1 の治療薬としての可能性を探るため、*in vitro* の検討を行った。はじめに、Sulf-1 蛋白の細胞毒性を評価するために、軟骨細胞分化株(ATDC5)を用いて、1, 10, 100, 1000 ng/ml の Sulf-1 を添加し、48 時間後に生存細胞を Muse にて計測した。その結果、測定内のどの濃度においても生存細胞は 80% 以上を保っており、アポトーシスに陥った細胞も 10%前後であった。このことはこれまで報告されているような成長因子の添加濃度レベルでは Sulf-1 は細胞毒性がないことがわかった。

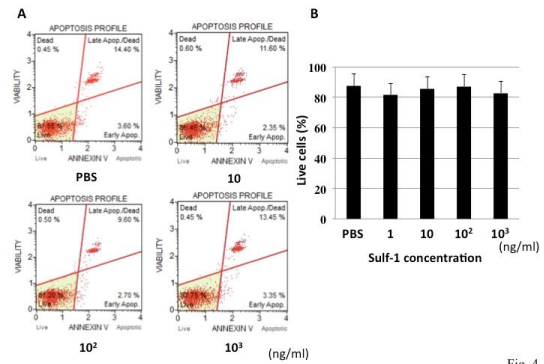


Fig. 4

4.4.2 Sulf-1 は II 型コラーゲンの発現を誘導する(real time PCR)。

次に、我々は Smad2/3 の免疫染色において Sulf-1 KO の方が優位に、発現が抑えられていた結果に基づき、その下流である II 型コラーゲンの発現に注目した。ATDC5 を 3 週間、分化誘導しながら Sulf-1 の添加による II 型コラーゲン発現への影響を real time PCR で検討した。結果、分化誘導 1 週間の時点では Sulf-1 の添加による II 型コラーゲン発現への影響は見られなかったが、2 週以降では Sulf-1 の濃度依存的に II 型コラーゲンの発現は上昇していた(Fig.5)。Sulf-1 は DNA レベルで II 型コラーゲンの発現を分化初期の段階で誘導することがわかった。

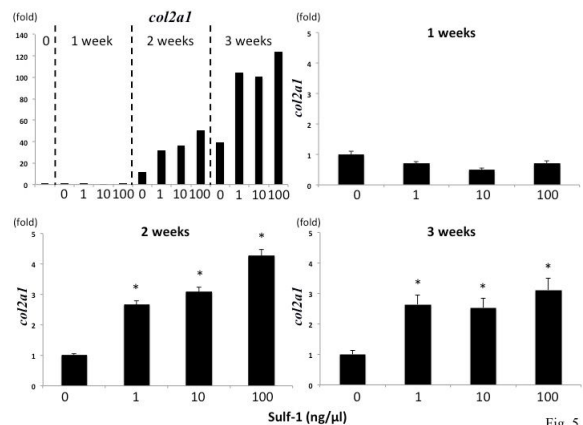


Fig. 5

4.4.3 Sulf-1 は II 型コラーゲンの発現を誘導する(immunocytochemistry)。

また、分化誘導 2 週の ATDC5 cell の平面培養における免疫細胞染色

(Immunocytochemistry)を施行したところ、Sulf-1 添加群の方が、非添加群より優位にII型コラーゲンの発現が上昇していた。これらのことから Sulf-1 は II 型コラーゲンの発現を遺伝子のみならず、蛋白レベルでも上昇させることがわかった。

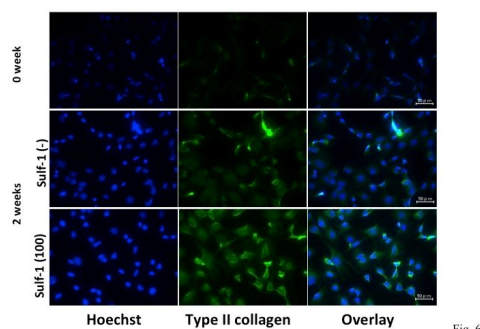


Fig. 6

4.4.4 Sulf-1 は TGFβ Smad2/3 の cell signaling を亢進する。

最後に、Cell signaling pathway の検討を行った。TGFβ 刺激後の Smad2/3 および BMP4 刺激後の Smad1/5 のリン酸化を FGF2 の刺激後 30 分、24 時間で Western blotting を用いて検討した。発現は Image J を用いて比較した。その結果、Smad2/3 のリン酸化については Sulf-1 添加群の方が 30 分後優位にリン酸化の亢進が見られたが (Fig 7A, B)、Smad1/5 については Sulf-1 添加群の方が軽度リン酸化の亢進がみられたものの、有意差はなかった (Fig. 7C, D)。

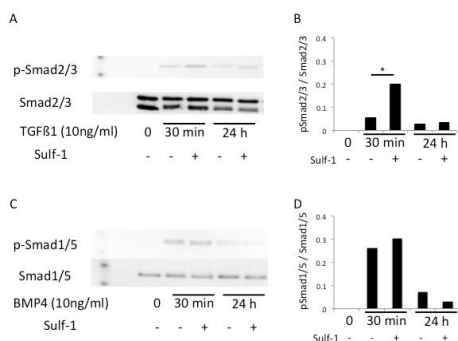


Fig. 7

まとめ

本研究により椎間板変性に Sulf-1 が関与していることが明らかとなった。Sulf-1 KO では椎間板変性が優位に進み椎間板恒常性

維持に Sulf-1 が重要な役割を担っていることがわかった。これらの変化は Sulf-1 が Smad2/3 を介して II 型コラーゲンの発現に関与していることが示唆され、新規椎間板治療の可能性を秘めていると考えられた。

参考文献

1. Otsuki S, Hanson SR, Miyaki S, Grogan SP, Kinoshita M, Asahara H, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:10202-10207.

2. Otsuki S, Taniguchi N, Grogan SP, D'Lima D, Kinoshita M, Lotz M. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R61.

3. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. *Spine* 2002;27:2631-2644.

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 1 件)

1.Expression Pattern and Role of Chondrocyte Clusters in Osteoarthritic Human Knee Cartilage. Yoshiaki Hoshiyama, Shuhei Otsuki, Shuhei Oda, Yoshitaka Kurokawa, Mikio Nakajima, Tsuyoshi Jotoku, Ryuichi Tamura, Yoshinori Okamoto, Martin K. Lotz, and Masashi Neo. *J Orthop Res*. 2015. 33, 548-55.

[学会発表](計 2 件)

1.Intra-articular injection of heparan sulfate endosulfatases (Sulfs) suppresses cartilage degeneration. Yoshiaki Kurokawa, Shuhei Otsuki, Yoshiaki Hoshiyama, Shuhei Oda, Masashi Neo. International Cartilage Repair Society. 2013.9.15 Izmir, Turkey
2. Potential of cartilage regeneration based on chondrocyte cluster in

osteoarthritis. Yoshiaki Hoshiyama,
Shuhei Otsuki, Shuhei Oda, Yoshitaka
Kurokawa, Masashi Neo International
Cartilage Repair Society. 2013.9.15 Izmir,
Turkey

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

根尾 昌志 (NEO, Masashi)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：80311736

(2)研究分担者

大槻 周平 (OTSUKI, Shuhei)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：20589840