

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861337

研究課題名(和文) 椎間板の恒常性維持及び変性に至る分子生物学的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms maintaining homeostasis of intervertebral disc and leading to degeneration

研究代表者

藤田 順之 (Fujita, Nobuyuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30348685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜型プロテオグリカンであるSyndecan-4 (SDC-4)の髄核における発現に着目し、SDC-4が低酸素環境下で必要不可欠である転写因子Hypoxia Inducible Factor-1alphaにより発現制御され、更にSDC-4は軟骨基質産生に必須であるSox9の発現制御している事を見出した。SDC-4はその細胞膜上のGAGを介して、BMP等の成長因子をtrapすることが知られており、これらのシグナル調節を介して組織恒常性の維持に關与している事が予想された。今後、本結果が椎間板変性のメカニズム解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The experiments described in this investigation demonstrated for the first time that in NP cells, expression of SDC4 was controlled by oxemic tension. Our studies also revealed that HIF-1alpha and not HIF-2 alpha controlled hypoxic regulation of SDC4 expression. A second major observation was that SDC4 modulated the expression of Sox9, a key transcriptional regulator of aggrecan expression in NP cells. These findings lend strong support to the hypothesis that in the hypoxic intervertebral disc, SDC4 is important in homeostatic maintenance of the NP.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板 腰椎変性疾患 椎間板変性

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省「国民生活基礎調査」によると、腰痛を自覚する日本人は推定 1000 万人であり、また、日本整形外科学会の提唱する locomotive syndrome の三大要因の一つである腰部脊柱管狭窄症の国内患者数は 240 万人と言われており、日本における超高齢化社会の到来により、腰椎疾患患者数は更に増大傾向である。これらの腰椎疾患の原因に加齢に伴う椎間板変性が挙げられるが、現在のところ椎間板変性に至る分子メカニズムは完全には解明されておらず、変性を抑制する有効な治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

椎間板は脊椎に存在し、脊柱の可動性や体重の支持性を担う重要な組織であり、人体最大の無血管組織と言われている。椎間板は外側のコラーゲン線維から成る線維輪と内側のゼリー状の髄核から構成される軟骨性組織であるが、髄核は線維輪と異なり胎生期の脊索から分化する特徴を持つ。これらの解剖学的特徴により、髄核は低酸素環境に存在すると言われている。これまでにラット線維輪および髄核組織からそれぞれ RNA を抽出し、また、他の 13 種類の臓器からも同様に RNA を抽出して、マイクロアレイ解析を行った。これらの解析結果から、髄核には他の組織と比較して数多くの低酸素関連分子が高発現していることが判明した。その中で、膜型プロテオグリカンの一つである Syndecan-4 (SDC-4) が特異的に髄核に発現していることも見出した。SDC-4 はこれまでに変形性関節症や椎間板変性等で ADAMTS-5 と協調して Aggrecan の degradation に関与しているという報告があるが、実際にその生理的な機能は明らかにされていない。本研究の目的は髄核における SDC-4 の生理的な役割を検討することである。

3. 研究の方法

SDC-4 の発現が髄核細胞の低酸素環境下にて誘導されるか否かを検討した。次に低酸素環境にて必須の転写因子である Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1alpha および HIF-2alpha による制御をレポーターアッセイ、PCR、Western blot にて検討した。更に SDC-4 が軟骨性組織の master molecule である SOX9 の発現制御に関与している可能性を検討した。

GAG antagonist である Surfen を髄核細胞培養下に添加し、transfection された SOX9 応答性 Aggrecan promoter の activity が上昇するか否かを検討した。最後に髄核細胞において SDC-4 の発現を knockdown し、SOX9 の発現を PCR および Western blot にて検討した。

4. 研究成果

髄核細胞内において SDC-4 は低酸素培養下にてその発現が誘導された。更に SDC-4 の promoter 領域に Hypoxia responsive element を同定し、同 element に mutation を加え、reporter assay を行ったところ、低酸素にて

誘導される活性は有意に抑制された。更に HIF-1alpha の gain of function および loss of function study を行ったところ、SDC-4 の低酸素による発現制御は HIF-1alpha に依存している事が示唆された。

更に HIF-1alpha の発現制御に PHD2 が関与していることが既知であったため、髄核細胞における PHD2 の loss of function study を行ったところ、PHD2 の発現低下に伴い、SDC-4 の発現が誘導されることを確認した(図 1)。

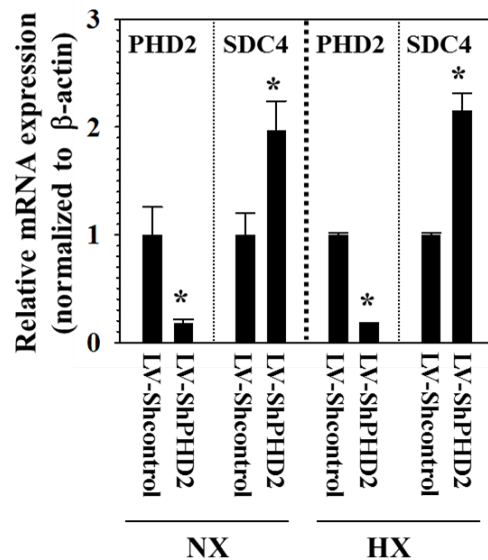


図1. Real-time RT PCR解析. 髄核細胞で PHD2 の発現を低下させると SDC4 の発現が上昇している

また、Surfen を髄核細胞培養下に添加したところ、SOX9 応答性 Aggrecan promoter の activity が上昇した。最後に髄核細胞において SDC-4 の発現低下とともに、SOX9 の発現が上昇した(図 2)。

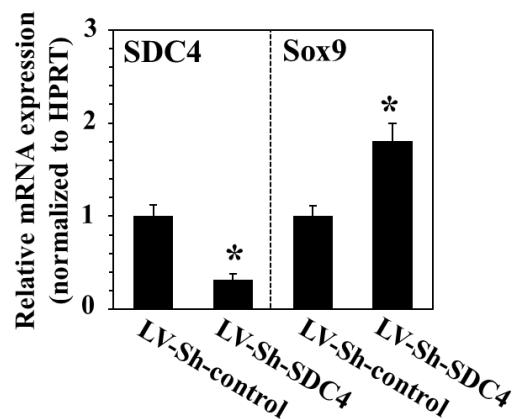


図2. Real-time RT PCR解析. 髄核細胞で SDC4 の発現を低下させると Sox9 の発現が上昇している。

これらの結果は SDC-4 が椎間板変性のメカニズムの中で catabolic 作用を持つ一方で、生理的には低酸素による制御を受け、SOX9 の発

現制御を介して恒常性維持に関与している事を示唆している(図3)

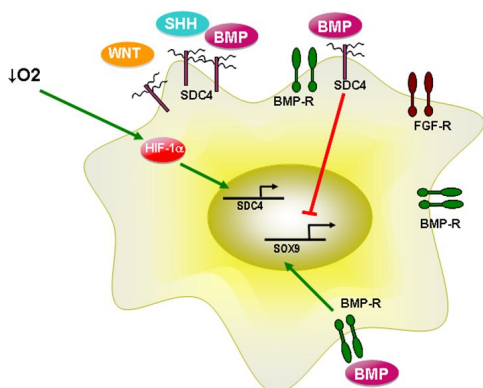


図3. 髄核細胞におけるSDC-4の役割

椎間板の恒常性維持機構のメカニズムおよび椎間板変性に至るメカニズムは現在のところ明らかにされていないが、超高齢化となる日本において、将来の創薬に向けてこれらのメカニズムの解明は必須である。本研究で椎間板における生理的な Syndecan-4 の機能解析および発現制御のメカニズムを明らかにすることにより、低酸素環境下における恒常性維持機構のメカニズムの一端を明らかにする上に、HIF および SOX9 という共に essential な転写因子の関係も明らかにされ、基礎医学の面からも有意義であると考えられる。更に椎間板変性における HIF の役割を in vivo で明らかにすることは今後の椎間板変性のメカニズムの解明に向けて大いに役立つものと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Ishii K, Kaneko Y, Funao H, Ishihara S, Shinohara A, Nakanishi K, Hikata T, Fujita N, Iwanami A, Hosogane N, Watanabe K, Nagura T, Nakamura M, Toyama Y, Matsumoto M. "A Novel Percutaneous Guide Wire (S-Wire) for Percutaneous Pedicle Screw Insertion: Its Development, Efficacy, and Safety" Surg Innov. (Epub ahead of print), 2014.
2. Fujita N, Hirose Y, Tran CM, Chiba K, Miyamoto T, Toyama Y, Shapiro IM, Risbud MV. HIF-1-PHD2 axis controls expression of syndecan 4 in nucleus pulposus cells. FASEB J. 2014, 28, 2455-65. 査読有
3. Maeno S, Hashimoto D, Otani T, Masumoto K, Fujita N, Saito S. A Novel Surgical Technique for Patellar Fracture: Application of Extra-articular Arthroscopy With Hanger-Lifting Procedure. Arthrosc Tech. 2013, 2, e275-9. 査読有

4. Tian Y, Yuan W, Fujita N, Wang J, Shapiro IM, Risbud MV. Inflammatory Cytokines Associated with Degenerative Disc Disease Control Aggrecanase1/ADAMTS-4 Expression in Nucleus Pulposus Cells through MAPK and NF- $\kappa$ B. American Journal of Pathology. 2013, 182, 2310-21. 査読有
5. Tran CM, Fujita N, Huang BL, Ong JR, Lyons KM, Shapiro IM, Risbud MV. HIF-1 and CCN2 form a Regulatory Circuit in Hypoxic Nucleus Pulposus Cells: CCN2 Suppresses HIF-1 Level and Transcriptional Activity. Journal of Biological Chemistry. 2013, 288, 16761-74. 査読有

[学会発表](計10件)

1. N. Fujita, R. Watanabe, S. Suzuki, T. Hikata, K. Watanabe, K. Ishii, T. Miyamoto, Y. Toyama, M. Matsumoto. Brachyury is an essential transcription factor for maintaining homeostasis in notochordal cells. 61th Annual Meeting Orthopaedic Research Society. March 28-31, 2015 Las Vegas, USA.
2. R. Watanabe, N. Fujita, S. Suzuki, T. Hikata, K. Watanabe, K. Ishii, T. Miyamoto, Y. Toyama, M. Matsumoto. Follistatin-like protein 1 regulates the expression of type II collagen via BMP pathway in notochordal cells. 61th Annual Meeting Orthopaedic Research Society. March 28-31, 2015. Las Vegas, USA.
3. S. Suzuki, N. Fujita, R. Watanabe, T. Hikata, K. Watanabe, K. Ishii, T. Miyamoto, Y. Toyama, M. Matsumoto. Reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration. 61th Annual Meeting Orthopaedic Research Society. March 28-31, 2015. Las Vegas, USA.
4. N. Fujita, N. Hosogane, K. Ishii, T. Hikata, K. Watanabe, Y. Toyama, T. Miyamoto, M. Matsumoto. Molecular characterization of chordoma cell line U-CH1-N: Applications for intervertebral disc research. 41th The international Society for the Study of the Lumbar Spine. June 3-7, 2014. Seoul, Korea.
5. N. Fujita, T. Hikata, K. Watanabe, K. Ishii, A. Iwanami, M. Nakamura, Y. Toyama, M. Matsumoto. Association between psychological disorder and low back pain after decompression surgery for lumbar spinal stenosis. 41th The international Society for the Study of

- the Lumber Spine. June 3-7, 2014. Seoul, Korea.
6. N. Fujita, Y. Hirose, CM. Tran, K. Chiba, T. Miyamoto, Y. Toyama, IM. Shapiro, MV. Risbud. HIF-1-PHD2 Axis Controls Expression of Syndecan-4 in Hypoxic Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc: Evidence of Context Dependent Function in Health and Disease. 60th Annual Meeting Orthopaedic Research Society. March 15-18, 2014. NewOrlines, USA.
  7. N. Fujita, N. Hosogane, K. Ishii, T. Hikata, Y. Toyama, M. Matsumoto, T. Miyamoto. Molecular characterization of chordoma cell line U-CH1-N: Applications for intervertebral disc research. 60th Annual Meeting Orthopaedic Research Society. March 15-18, 2014. NewOrlines, USA.
  8. N. Fujita, Y. Hirose, CM. Tran, K. Chiba, T. Miyamoto, Y. Toyama, IM. Shapiro, MV. Risbud. HIF-1-PHD2 Axis Controls Syndecan-4 Expression in Hypoxic Nucleus Pulposus Cells: Syndecan-4 Regulates Sox9 Level. 2nd International Spine Research Symposium of the Philadelphia Spine Research Society. November 6-8, 2013. Philadelphia, USA.
  9. N. Fujita, K. Ishii, Y. Kaneko, S. Ishihara, H. Funao, H. T. Hikata, N. Hosogane, Y. Toyama, M. Matsumoto. Short- to Middle-term outcomes of MIS-TLIF for isthmic spondylolisthesis - comparative study with conventional PLIF-. 3th Annual Meeting of Pacific and Asian Society of Minimally Invasive Spine Surgery. August 1-3, 2013. Miyazaki, Japan.
  10. N. Fujita, S. Gogate, K. Chiba, M. Matsumoto, Y. Toyama, IM. Shapiro, M. Risbud. Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) Modulates Catabolic Effects of TNF-alpha on Cells of the Nucleus Pulposus through co-activation of NF-kappaB/p65 Signaling. 40th The international Society for the Study of the Lumber Spine. May 13-17, 2013. Scotdale USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田順之 (FUJITA, Nobuyuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30348685