

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462252

研究課題名(和文) 椎間板変性におけるWntシグナルとアラキドン酸カスケードとの分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of Wnt signal and arachidonic acid cascade in intervertebral disc degeneration

研究代表者

檜山 明彦 (HIYAMA, Akihiko)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00514382

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)：腰痛患者における医療費は膨大であり、腰痛に伴うADL障害は社会問題となっている。これまで炎症性サイトカインによる椎間板変性のメカニズムが報告されていたが、今回の解析からTNF- $\alpha$ -PGE2/EP受容体を介したpathwayがWntシグナルを活性化させ、椎間板細胞分化を誘導した可能性が示唆された。これらのシグナルは炎症誘導に関与する重要な転写シグナルであり、椎間板細胞におけるWntシグナルの分子スイッチとして働く可能性が考えられた。今後はTNF- $\alpha$ -PGE2シグナルによるWntシグナルの活性化をレセプター部位で抑制できれば、椎間板変性における新たな分子標的治療薬に繋がる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although the mechanism of intervertebral disc degeneration by inflammatory cytokines has been reported so far, the results showed that pathway mediated by TNF- $\alpha$ -PGE2 / EP receptor activates Wnt signal and induces intervertebral disc cell differentiation. These signals are important transcription signals involved in induction of inflammation and it was considered possible to act as a molecular switch of Wnt signal in intervertebral disc cells. In the future, if activation of Wnt signal by TNF- $\alpha$ -PGE2 signal could be suppressed at the receptor site, it could be possible to lead to a new molecular targeted therapeutic agent in disc degeneration.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：腰痛 椎間板変性 Wnt シグナル PGE2 TNF- $\alpha$  分子学的解析

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における腰痛の有訴者率(男性1位、女性2位)からもわかる通り、その患者人口の多さから腰痛患者に対する医療費は膨大であり、労働力への影響力も大きい。臨床現場においては、腰痛患者の初期治療には、一般的にNSAID/COX2阻害薬が強力な炎症増悪因子であるプロスタグランジン(PGE<sub>2</sub>)を含むアラキドン酸カスケードの生合成阻害するメカニズムを利用して使用され、疼痛軽減に寄与している。

しかしながら、これまでの所COXやPGE<sub>2</sub>が椎間板変性症の進行を促進するシグナル機構については解明されていない。

これまで我々の研究室では椎間板変性がおこる仕組み(特にWntシグナルに注目)と、その治療戦略について研究を行ってきた。

Wntシグナルは、形態形成誘導因子や増殖分化調整因子など発生・分化など多様な機能を持つことから椎間板変性機序にも関与している可能性が高い。

Wntシグナルの活性化により椎間板細胞老化が引き起こされ、細胞増殖が抑制される事を報告した。また椎間板変性過程には、椎間板内の炎症が変性進行を促進していると考えられている。この根拠に椎間板ヘルニア患者や慢性腰痛を有する患者の椎間板内には、pro-inflammatory cytokineであるIL(インターロイキン)やTNF- $\alpha$ などが高発現していること、これらのサイトカインが椎間板の細胞外マトリックス産生を抑制していることが報告されている。

### 2. 研究の目的

プロスタノイドのうちPGE<sub>2</sub>は炎症や疼痛など多彩かつ、時に相反する作用を有する。近年、その受容体であるEP受容体のアイソフォームが、軟骨分化や軟骨代謝の特異的シグナル伝達に関与しており、軟骨変性過程において重要な役割をはたす事が報告されて

いる。

しかしながら椎間板細胞におけるその機能や発現については未知である。そこで本研究では、椎間板変性のおこる仕組みを解明するとともに、新たな創薬を開発するためWntシグナルとアラキドン酸カスケードとの分子メカニズムを明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

椎間板変性に関わるWntシグナルと疼痛関連シグナルカスケードであるアラキドン酸カスケードの関連について*in vitro*での分子学的検討を行い、椎間板細胞レベルでの解析をおこなった。

実験はSprague-Dawleyラットから採取した椎間板細胞(髄核細胞、線維輪細胞)を用いて各種実験に使用した。

実験1: 培養細胞に対して炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ 刺激によるCOX-2の転写活性や遺伝子発現、蛋白発現をそれぞれ解析した。

実験2: 椎間板細胞中のEP受容体のアイソフォーム(EP-1、EP-2、EP-3、EP-4)の遺伝子やタンパク発現について解析した。

またSprague-Dawleyラット椎間板組織中のプロスタノイド構成分子の発現と局在を免疫染色にて検討を行った。

実験3: TNF- $\alpha$ 刺激後のEP受容体の遺伝子発現・蛋白発現をそれぞれ解析した。

実験4: Tcf binding motifをもつレポータープラズミドであるTopflashを椎間板細胞に遺伝子導入しTNF- $\alpha$ (10 ng/ml) PGE<sub>2</sub>(50  $\mu$ M)それぞれで刺激後の転写活性を評価した。

実験5: TNF- $\alpha$ (10 ng/ml) PGE<sub>2</sub>(50  $\mu$ M)24時間刺激後のWnt関連遺伝子の遺伝子発現について解析した。

実験6: Topflashを遺伝子導入後に

TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub>刺激をおこない、各EP受容体のagonist、antagonistを添加しWntの転写活性を評価した。

#### 4. 研究成果

実験1: TNF $\alpha$  刺激によりCOX-2(-1432/+59) レポーターの転写活性は上昇したにもかかわらずNF $\kappa$ Bのbinding siteが欠失したCOX-2(-220/+59) reporterではTNF $\alpha$  刺激による発現が誘導されなかった。

またNF $\kappa$ BやCOX-2のinhibitor(MG132やCelecoxib)を用いた発現解析の結果から、椎間板細胞におけるTNF $\alpha$ によるWntシグナルの活性化はNF $\kappa$ Bシグナルによる直接的作用とCOX-2/PGE<sub>2</sub>シグナルを介した間接的作用がそれぞれシグナル調整に関与している可能性が示唆された。

実験2: Sprague-Dawleyラットから採取した髄核細胞、線維輪細胞ともにEP受容体(EP-1、EP-2、EP-3、EP-4)の遺伝子発現を認めた。またEP-2、EP-3、EP-4の遺伝子発現は髄核細胞よりも線維輪細胞で発現が強かった。髄核細胞中ではEP-1、EP-4、EP-3、EP-2の順に遺伝子発現が高かった。

実験3: TNF $\alpha$  刺激によりEP3、EP4受容体の遺伝子発現や蛋白発現はそれぞれ有意に上昇した。

実験4: 髄核細胞、線維輪細胞ともにTNF $\alpha$ (10ng/ml、24時間)、PGE<sub>2</sub>(50 $\mu$ M、24時間)刺激後においてTopflashの転写活性の上昇を認めた。

実験5: TNF $\alpha$ (10ng/ml)、PGE<sub>2</sub>で刺激後Wnt関連遺伝子の発現上昇を認めた。

実験6: agonist、antagoni

stを用いたgain-of-functionやloss-of-functionによる検討から、椎間板細胞における炎症性サイトカインやアラキドン酸カスケードにおけるWntシグナルへの影響は、EP受容体のうちEP3が最も関与している可能性が示唆された。

以上の解析から、TNF $\alpha$ -PGE<sub>2</sub>/EP受容体を介したpathwayがWntシグナルを活性化させ、椎間板細胞分化を誘導した可能性が示唆された。

これらのシグナルは炎症誘導に関与する重要な転写シグナルであり、椎間板細胞におけるWntシグナルの分子スイッチとして働く可能性が考えられた。

今後はTNF $\alpha$ -PGE<sub>2</sub>シグナルによるWntシグナルの活性化をレセプター部位で抑制できれば、椎間板変性における新たな分子標的治療薬に繋がる可能性が考えられた。

#### 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)

[雑誌論文](計1件)

Hiyama A et al. Response to Tumor Necrosis Factor-mediated Inflammation Involving Activation of Prostaglandin E<sub>2</sub> and Wnt Signaling in Nucleus Pulposus Cells J Orthop Res. 2015 ; 33(12): 1756-68. 査読有

[学会発表](計2件)

第31回日本整形外科基礎学術集会  
2016年10月13日~10月14日  
椎間板変性におけるWntシグナル伝達経

路の活性制御と椎間板炎症

福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

ORS 2017 Annual Meeting

2017年3月19日~3月22日

CCAAT/enhancer binding protein Regulates the Expression of Tumor Necrosis Factor in the Nucleus Pulposus Cells  
San Diego Convention Center (アメリカ・San Diego)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜山 明彦(HIYAMA, Akihiko)

0)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 00514382

(2) 研究分担者

酒井 大輔(SAKAI, Daisuke)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 10408007