

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462254

研究課題名(和文) 加齢に伴う脊椎変性メカニズムの分子生物学的解明

研究課題名(英文) Conditional deletion of hedgehog signaling attenuates intervertebral disc degeneration and osteophyte formation

研究代表者

中村 英一郎 (Nakamura, Eiichiro)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10412644

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)：本研究では、椎間板の発生や内軟骨性骨化の過程で重要な役割を果たすHedgehogシグナルを伝達する膜蛋白のSmoothened (Smo) を時間特異的にノックアウトできるマウス(Smo CKO)を用いて椎間板変性、骨棘形成に与える影響を調査した。腰椎の椎間関節を切除した椎間板変性モデルを作成し、Smo をノックアウトしたところ、対照群では椎間板は変性し椎体終板軟骨には肥大した軟骨細胞を認め、その隅角に骨棘形成があったのに対し、Smo CKOでは椎間板変性と骨棘形成が明らかに抑制された。以上より脊椎変性における椎間板変性や骨棘形成にはHedgehog pathwayが関与している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate whether the deletion of smoothened (Smo), a key component of the hedgehog pathway in the process of endochondral ossification and intervertebral disc development, attenuates intervertebral disc degeneration and osteophyte formation in the mouse degenerative spine model. Control mice showed severe intervertebral disc degeneration, hypertrophic changes of chondrocytes in the vertebral end plate cartilage and osteophyte formation in the corner of vertebra, whereas, all these phenomena were impaired in the mice with conditional deficient of Smo, indicating that hedgehog signaling has a crucial role in the degenerative spondylosis of the spine.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学 椎間板 骨棘 脊椎変性 Hedgehog Smoothened Cre

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う退行性変化として椎間板は変性し椎体には骨棘が形成される。また、椎間板変性が起きた椎間は腰痛や脊柱管狭窄、椎間不安定性を引き起こし多くの脊椎疾患の主要な原因と考えられている。しかしながら、その根本的な原因として脊椎の構造すなわち椎体と椎間板の形成さらには変性過程について、どのような因子が関与し機能しているのか未解明な部分が多い。

椎間板は中心部の髄核と周囲を取り囲む線維輪からなり、上下の椎体と椎体終板を介し連結している。椎間板の発生過程で、髄核では脊索細胞の存在と Sonic hedgehog (Shh)の発現が確認されており、また線維輪、椎体終板の発生過程には Indian hedgehog (Ihh)が発現していることがわかっている (DiPaola CP et al, J Orthop Res 2005)。また hedgehog シグナル伝達には、膜蛋白の Smoothened (Smo)が関与しており、膜貫通蛋白である Patched (Ptc)により抑制されている。Dahia らは、出生後の髄核にも Shh が出生前と同様に発現していることを示し、また出生後の椎体終板に Ihh が発現していることを示した。(Dahia et al, spine, 2009)。以上のように、Ihh や Shh、Smo は発生初期過程において脊椎の構造である椎体や椎間板を形成する上で何らかの役割があると考えられていること、また、発生後期においても椎体終板や椎間板内に発現、機能していることが示されつつあるが、加齢に伴う椎間板の変性過程や骨棘形成における hedgehog シグナルの機能についてはわかっていない。

膝関節の変性において、関節軟骨変性に伴う骨棘形成では内軟骨性骨化の様式をたどり形成されることが示されきた。(Ono et al, Yonago Acta Medicine, 2000, Kamekura S et al, Osteoarthritis Cartilage 2005)。したがって、内軟骨性骨化過程において前肥大軟骨細胞層に発現する Ihh や Smo が、骨棘形成にかかわっていることは十分予測される。

Shh や Ihh、Smo の通常のノックアウトマウスは胎生致死もしくは生直後に死亡するため、生後におけるその遺伝子の機能や病的状態での機能について解析することは今までできなかった。しかし、近年、時間特異的、組織特異的に遺伝子欠損を起こすノックアウトマウス(コンディショナルノックアウトマウス:CKO)の技術が開発されてきており、この技術を用い Smo を時間特異的にノックアウトすることで加齢に伴う椎間板変性ならびに骨棘形成に hedgehog シグナルが与える影響ならびにそのメカニズムを解析することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、髄核に発現する Sonic hedgehog (Shh) と椎体終板に発現する Indian Hedgehog (Ihh) の双方の Hedgehog シグナル伝達に關与する膜蛋白の Smoothened (Smo) の時間特異的、組織特異的なノックアウトマウスを作成し椎間板の変性過程で Smo を欠失させ、それらがどのように機能するかを解明することである。

3. 研究の方法

(1) コンディショナルノックアウトマウス(CKO)の作成

本研究は CreER(T)-loxP システムを用いている。Cre がタモキシフェン投与下に全細胞に作動する Rosa-CreER(T)マウスと、Smo flox/flox (Smo fl/fl)マウスと交配させることにより、Rosa-CreER(T)-Smo fl/fl (Smo CKO)マウスの作成を行った。

また、Cre ER(T)-loxP システムが正常に作動するか確認するため、Cre による活性化部位に LacZ が発現する Rosa-LacZ マウスを使用して検討した。タモキシフェンを生後3週目、5週目、屠殺3日前、屠殺前日に腹腔内注射し、屠殺後、椎体並びに椎間板を採取し LacZ 染色を行った。

(2) 椎間板変性モデルの作成

腰椎椎間での不安定性による椎間板変性・骨棘形成を誘導するモデルとして、椎間関節切除モデルを作成した。8週齢でマウスの第4腰椎両側下関節突起と第5腰椎棘突起を切除し、さらに抗重力運動をさせるため術後1週間から8週間、高さ1mのクライミングケージ内で飼育した。

タモキシフェンは図1のように生後3週目、5週目、手術3日前、手術前日に腹腔内注射した。そして術後9週目に屠殺して組織学的な検討を行った。

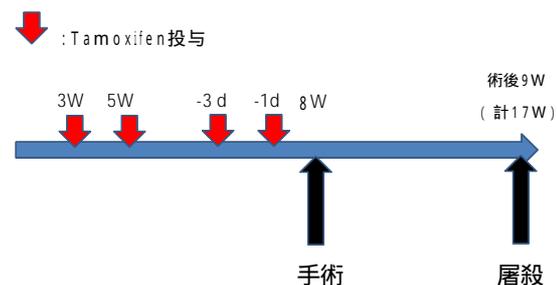


図1 実験の流れ

(3) 組織学的評価

マウス屠殺後、マウスの腰椎・仙椎部を摘出し4%パラホルムアルデヒド(PFA)にて固定、EDTAにて3週間脱灰を行い段階的に脱水後、パラフィン包埋を行った。包埋後、腰

仙椎を矢状面で7 μmの厚さに薄切した。組織学的にはHE染色とサフランin 0染色を行った。

(4) 椎間板変性の評価

椎間板変性の評価としてMasuda分類を用いた。Masuda分類は、線維輪、線維輪と髄核の連続性、髄核細胞数、髄核細胞外基質のそれぞれについて、1点:正常、2点:軽度の変性、3点:中～高度の変性とし、その合計(4点～12点)で椎間板変性の程度を評価している。

4. 研究成果

(1) Cre-loxP システムの作動確認

Rosa-CreER(T)は生後3週、5週、術前3日前、1日前のタモキシフェン投与にて、椎体や椎体終板、椎間板に効率的なリコンビネーションが起こることをLacZ染色にて確認した。

また、Smo CKO マウスにおいて、E14.5やP1でのタモキシフェン投与ではWtとくらべ、CKOマウスの四肢、体幹の成長は阻害され短躯、短肢であったが、タモキシフェン投与を生後3週以降で行った場合には、成長過程においてWtとCKOには身長、体重、四肢の長さなど成長障害ならびに形態異常の違いは認めなかった。

(2) 椎間板変性モデルの椎間板変性と骨棘形成

椎間板変性モデルによる椎間板変性と骨棘形成の程度を確認するため、コントロールとしてCreER(T)を持たないSmo fl/fl (Cre-)マウスを用いて上記プロトコールでタモキシフェン投与を行い、生後8週時点で第4腰椎下関節突起・第5腰椎棘突起切除を行い、術後9週目で屠殺し、HE染色ならびにSafranin 0染色を行った。

コントロール群では、図2のように髄核細胞の減少、線維輪の不整や断裂を認めた。また椎体終板軟骨に肥大した軟骨細胞とその隅角に骨化した領域を認めた(図3、4)。



図2 コントロールマウスの術後9週目の椎間板変性(HE染色)

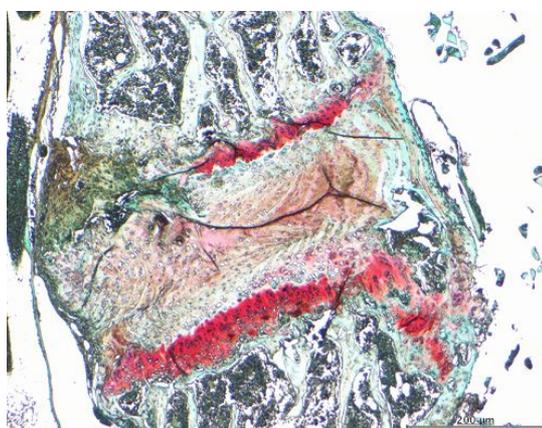


図3 コントロールのマウスにおける骨棘形成(Safranin 0染色)

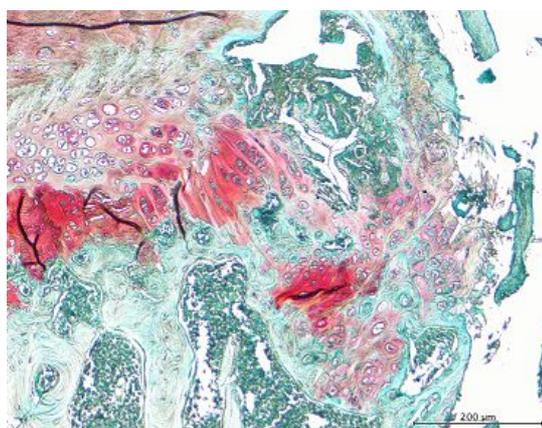


図4 コントロールのマウスにおける骨棘形成(Safranin 0染色 隅角部拡大)

(3) Smo CKOにおける椎間板変性モデルでの椎間板変性と骨棘形成

次いで、Smo CKOマウスでも同様に上記プロトコールでタモキシフェン投与を行い

ながら、生後 8 週時点で第 4 腰椎下関節突起・第 5 腰椎棘突起切除を行い、術後 9 週目で屠殺し、HE 染色ならびに Safranin O 染色を行った。

コントロールでは、先述のような椎間板変性や終椎体終板軟骨に肥大した軟骨細胞やその隅角に骨化した領域を認めたのに対し、Smo CKO マウスではそれらの変化が無い、もしくは明らかに変性が抑制されていた。(図 5、図 6)。

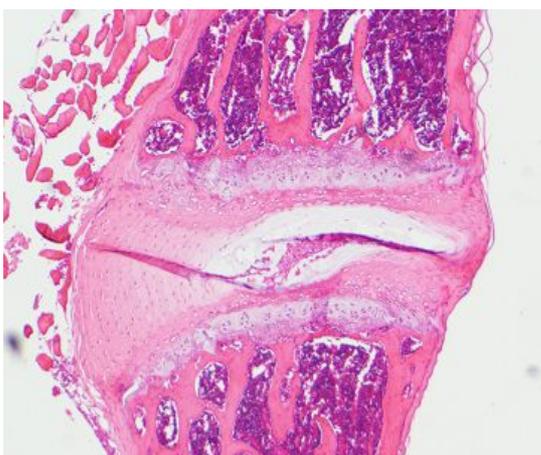


図 5 Smo CKO マウスの術後 9 週での椎間板変性と骨棘形成 (HE 染色)

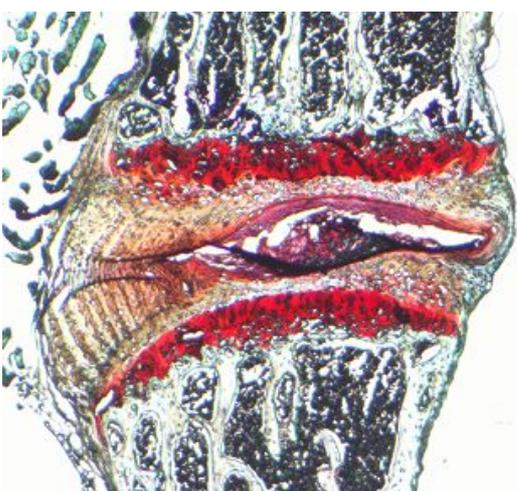


図 6 Smo CKO マウスの術後 9 週での椎間板変性と骨棘形成 (Safranin O 染色)

(4) Smo CKO とコントロールにおける椎間板変性の程度の比較

それぞれのマウスで変性の程度に幅があるため、椎間板変性の程度を Masuda 分類で検討し、コントロール群と Smo CKO 群で比較した。図 7 のようにコントロール群 (n=20) では 9 点以上が 40%で、5-8 点が 40%と全体の 80%に変性が見られたのに対して、Smo CKO 群 (n=10)では 9 点以上は 10%で 5-8 点が 40%と Smo cKO 群で椎間板変性が有意に抑制され、また正常である 4 点が実に 40%に

みられた。

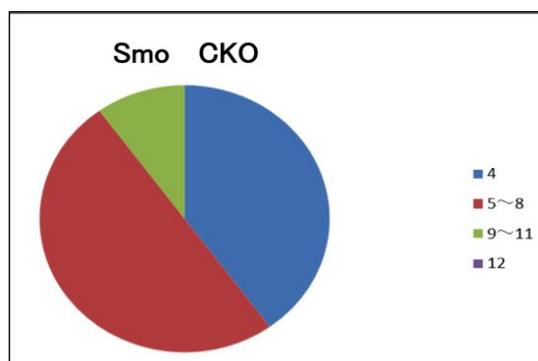
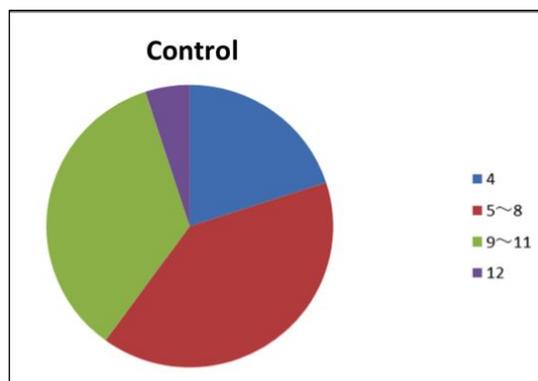


図 7 Masuda 分類による変性スコアの比較

また、骨棘について見てみると、今回の椎間板変性モデルにおいて、その不安定な椎間可動性によりコントロールマウスには椎体終板軟骨に肥大した軟骨細胞が多数現れ、その隅角に骨化した領域を認めた。一方、Smo を CKO した結果、肥大軟骨細胞はほとんど見られない、もしくはコントロールと比べ有意に少量であり、また、終板隅角の骨棘形成もほとんどみられない、もしくは有意に抑制されていた。一般に内軟骨性骨化の過程では前肥大軟骨細胞層に Ihh や Smo が発現し肥大軟骨細胞への分化 Type X コラーゲンや VEGF の発現 血管侵入 破骨細胞や骨芽細胞により骨化へと進むプロセスが見られるが、椎間板変性と共にみられる骨棘形成においても同様のプロセスが関与していることが強く示唆された。つまり、Smo をノックアウトすることによる hedgehog シグナルの遮断が、椎体終板における肥大軟骨細胞への分化 血管侵入 骨化へと進むプロセスを抑制したと考えられた。

以上のように、脊柱管狭窄症などに見られる椎間板変性や骨棘形成には hedgehog シグナルが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

高田真一郎、中村英一郎、佐羽内 研、大友 一、加納深吉、塚本学、村井哲平、酒井昭典 Smoothened コンディショナルノックアウトマウスを用いた変形性関節症における骨棘形成過程の解明 第32回日本骨代謝学会学術総会 2014年7月24日 大阪府大阪市

Takada S, Nakamura E, Sabanai K, Otomo H, Kanoh S, Tsukamoto M, Murai T, Sakai A. Investigation of osteophyte formation in osteoarthritis using smoothed conditional knockout mice. Osteoarthritis Research Society International 2014, Apr. 25 2014, Paris France

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 英一郎 (NAKAMURA, Eiichiro)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10412644

(2)連携研究者

佐羽内 研 (SABANAI, Ken)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：70644863

山根 宏敏 (YAMANE, Hirotoishi)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：50721693