

平成 24 年 3 月 31 日

平成 23 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

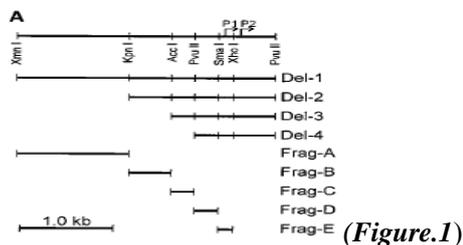
研究者所属・職 東海大学・助教
氏 名 檜山 明彦

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名	Wnt/ β -catenin シグナルによる椎間板変性症の病態解明
(英文名)	Investigation to determine the cause of intervertebral disc degeneration by Wnt/ β -catenin signal
2. 研究実施期間	平成 23 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日
3. 助成金額	1,000,000 円
4. 研究の目的	<p><u>椎間板変性は加齢にともない椎間板の髄核部に存在する髄核細胞の減少が引き起こすとされ、変性の進行が腰痛や下肢痛の大きな原因になっている。</u></p> <p>我々は、これまでに椎間板中の Wnt/β-catenin シグナルの活性化により椎間板細胞の老化を引き起こし、細胞増殖を抑制することを報告した (Hiyama, Arthritis and Rheum, Journal of cellular physiology, 2010.)。</p> <p>この減少には、細胞増殖や細胞成長の促進に必須な転写因子 c-myc, cyclin-D1 遺伝子の関与が考えられた。そのうち c-myc は細胞の生命活動にきわめて重要であり、細胞周期や分化に伴い、多くの転写因子によって厳密に制御されている。</p> <p>また c-myc は様々な組織細胞に変化する ips 細胞を作るのに用いた 4 遺伝子(山中 4 因子)の一つであり、最近では、皮膚細胞から軟骨細胞を作製するテイルクェット・リプログラミングに用いられる遺伝子の一つと報告されている。しかしながら、c-myc 遺伝子に対してどのようなシグナルクロストークが働いているのかは椎間板において分かっておらず、その分子学的な調節機構を解明する事は、新たな治療薬(椎間板変性症における)の開発に繋がる可能性が示唆される。</p> <p>更に、椎間板の変性変化には椎間板細胞の老化やアポトーシスが関与している可能性が示唆されているが、この過程にも同様に Wnt シグナルが関与し、シグナル調整の破断が病態を引き起こしている可能性がある。</p> <p>そこで本研究では、<u>椎間板細胞を用いた分子学的基礎研究から Wnt シグナル活性化によるシグナル調整の解明と c-myc の椎間板変性への作用機構の分子基盤を解析する事で、椎間板再生応用(実用に足る治療法の確立)や疾病バイオマーカーの探索(新たな診断法)、アンメットニズを満たすための革新的新薬(Wnt シグナル阻害剤)を開発する事を目的とした。</u></p>

5. 研究概要報告

1. Sprague-Dawley ラット椎間板組織中の c-myc 発現を Immunohistochemistry (免疫学的組織染色法) を用い解析をおこなった. 実験は, 新生ラット (生後 2 日) (n=25) 成熟ラット (12 週) (n=25) を屠殺後, 椎間板切片を HE で評価し,同時にペルオキシダーゼを用い, 免疫組織染色 (DAB 法) を行った. その結果, 椎間板組織内の c-myc の局在(髄核・線維輪との比較)が確認された.
2. 次に Sprague-Dawley ラット椎間板組織中・培養細胞の c-myc 遺伝子・蛋白質発現を解析し椎間板組織・細胞中の c-myc の発現を遺伝子・蛋白レベルで確認した. さらにラット椎間板を用いて,1 継代後の椎間板細胞を 96-well plate に播種し, 培養 24 時間後に一次抗体 c-myc 抗体を用いた後, 2 次抗体蛍光色素 (Alexa Fluor 594) を用い, 抗原抗体反応の後で励起波長を当てて蛍光発色させ蛍光顕微鏡で椎間板細胞中の c-myc の局在箇所 (核・細胞質)を検討した.
3. その後, c-myc による椎間板細胞への影響を検討するため, Sprague-Dawley ラットから採取した椎間板細胞を用いて, トランスフェクションの前日に椎間板細胞を 24well /plate に播き, 24 時間後に Lipofectamine 2000 を用いて目的遺伝子を導入した.その際に Luciferase reporter plasmids や内部標準として pRL-TK plasmid を用いた. 遺伝子導入後, 24 時間培養した細胞を回収し, 細胞抽出液を用いて Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega)により Luciferase 活性を測定した. 目的遺伝子は, Wnt シグナルの活性化による c-myc の転写抑制の制御領域を解明するため(c-myc 遺伝子の上流のどの部位が c-myc 遺伝子の転写に影響を与えるか調べるため), 様々の長さに欠失させた Del-1(-2263/+513), Del-2(-1055/+513), Del-3(-605/+513), Del-4 (-348/+513)の deletion plasmid (Del-1-4) (**Figure.1**) (**Tong-Chuan He. Science.1998**) を用い, 椎間板細胞に遺伝子導入後に LiCl (Wnt/ β -catenin activator)を添加後のそれぞれの reporter 活性を評価した.



その結果, LiCl による Wnt シグナルの活性化によりそれぞれ c-myc の転写活性が抑制されることが分かった.さらに, 椎間板細胞外マトリックスである Aggrecan の転写活性も c-myc の expression plasmid を用いた結果, c-myc によって転写活性が抑制される事が示唆された.これは遺伝子・蛋白質レベルでも同様な結果が得られた.

4. これまでに椎間板中の Wnt/ β -catenin シグナルの活性化により椎間板細胞の老化を引き起こし, 細胞増殖を抑制することを報告したが (**Hiyama. Arthritis and Rheum, Journal of cellular physiology, 2010.**), 今回 c-myc を用いた gain of function, loss of function の MTT assay の結果解析から, 椎間板細胞の増殖・抑制は Wnt シグナルを介した c-myc の regulation が関与している可能性が示唆された.

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 東海大学整形外科学・助教
氏 名 檜山 明彦

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。
檜山 明彦、○椎間板細胞における Wnt/ β -catenin シグナルの機能解析
第25回日本軟骨代謝学会、平成24年3月10日

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。