

ラット椎間板構成細胞の遺伝子発現プロファイル解析：
新たな構成細胞 marker 遺伝子と
受動喫煙による発現変動遺伝子
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系整形外科学専攻

沼口 俊平

修了年 2015 年

指導教員 徳橋 泰明

【目的】

腰痛は日常生活の訴えの中で最も多い症状であり、椎間板(IVD)変性は腰痛の原因の1つである。IVD変性の発生に関連する因子には、年齢、性別、職業、喫煙などが挙げられ、腰痛とたばこの関連については報告が多い。腰痛患者の70%が喫煙者であり¹、喫煙の頻度や喫煙量、喫煙期間と腰痛症発生率とが相関する²。しかしながら一方で、腰痛と喫煙との関連がないという報告も多く認められる³。

このように、喫煙とIVD変性については未だ因果関係が明らかになっていない。我々は以前より受動喫煙ラットを作製し、IVD変性について研究を行ってきた。最近、受動喫煙ラットのIVDについて、詳細な組織学的検討を行ったところ、受動喫煙により軟骨終板の軟骨細胞にアポトーシスが起きていることを見出した。また、線維輪(AF, annulus fibrosus)と軟骨終板(CEP, cartilage endplate)の細胞外基質が低下し、髄核(NP, nucleus pulposus)内ではⅡ型コラーゲンやプロテオグリカンの減少により髄核構築が破壊することがわかった(中橋ら、論文投稿中)。そこで、我々は受動喫煙がラット椎間板に及ぼす変化を詳細に解析するため、NPとAFとCEPとを別々に採取し、各々で起こる変化を詳細に調べることにした。本研究ではAF/CEP細胞とNP細胞とを個別に解析し、より組織間の違いを明確化する目的で行った。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、AF/CEP細胞では、NP細胞にはない特徴的な遺伝子発現があることを見いだした。さらに受動喫煙がもたらす発現変化遺伝子についても、新たな知見を見いだした。

【材料と方法】

生後8週のおス Sprague-Dawley ラットに8週間受動喫煙させた群6頭と、非喫煙コントロール群6頭から腰椎を採取した。各ラット腰椎5椎間からIVDを切離し、線維輪+軟骨終板(AF/CEP)と髄核(NP)に分け採取した。各々よりtotal RNA抽出後、ラット27342遺伝子のマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その後、リアルタイムPCRを行い、mRNA発現量変化の検証を行った。遺伝子の日内変動解析実験では、生後8週のおス Sprague-Dawley ラットを8週間受動喫煙させた群12頭と、非喫煙群15頭を作製した。受動喫煙最終日後、両群ともに約6時間おきに解剖を5回行い、上述の様にRNAを抽出し、mRNA発現定量を行った。

【結果と考察】

本研究で、我々はラット椎間板の包括的 mRNA 発現解析から、次の 2 点を新たに見いだした。第一点は AF/CEP と NP について新しい遺伝子発現 marker とその特徴を見出した。第二点は椎間板内組織の概日リズムの発見と受動喫煙によるその変化である。

今までの椎間板構成細胞の報告は AF と NP との比較であった^{4,5}。我々は今回、AF に CEP を加えて NP と比較している。新たな比較解析、AF/CEP と NP 間の発現遺伝子比較から、10 倍以上発現量が異なる遺伝子が 112 個見つかった。そのうち 96 個が AF/CEP 細胞で高発現を示した。それらには細胞外マトリックス関連遺伝子の他、炎症・免疫関連遺伝子、プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビター、細胞増殖関連遺伝子など、多数の生理機能分子が新たに見いだされた。従来の報告にない、数多くの AF/CEP マーカーを見つけた理由は、多くが CEP に由来するためと考えられる。さらに、AF/CEP では多様なプロテアーゼの産生とそれらの制御因子の産生が同時に観察され、細胞外基質のコントロールなど AF/CEP 細胞が活発に行っていると考えられた。一方、NP 細胞では新規に、Mir490 などの noncoding RNA の高発現や神経細胞由来の遺伝子発現が特徴的であった。また desmosome のような細胞間接着に関わる遺伝子発現も特徴的に見出された。最近、Mir490 については、cyclin D1 や c-Fos の遺伝子発現を抑制し、癌細胞増殖抑制に関連すると報告がある^{6,7}。ヒト椎間板変性では、肥満ホルモンであるレプチンが NP 細胞に作用すると、cyclinD1 の誘導をとおして起こる NP 細胞の増殖が変性の機序とも言われている⁸。ラット NP 細胞でも同様のことが起こることから⁹ Mir490 は NP 細胞の異常増殖を抑制し、恒常性維持に働いているとも考えられる。そして受動喫煙でその発現が低下することから、椎間板変性に寄与する可能性がある。このように、新規 marker 遺伝子を数多く見出せたことは、ラット 27,342 全ゲノムを対象としたマイクロアレイ解析を実施できたためと考える。

第二の注目点は、椎間板における概日リズム関連遺伝子の発現である。受動喫煙によって AF/CEP と NP 共に nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (Nr1d1)、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl)、neuronal PAS domain protein 2 (Npas2)、D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein (Dbp)などの時計遺伝

子や時計関連遺伝子が複数発現変化することがわかった。それらの発現日内変動を調べたところ、時計遺伝子や時計関連遺伝子は椎間板組織細胞においても日内変動を示し、かつ受動喫煙によりその多くは-6~-9時間の位相変化が起きた。NPでは日内変動が消失する遺伝子(Arntl、Dbp)も認められた。ラット肺の時計遺伝子はすでに日内変動することが示されているが¹⁰、今回、AF/CEP細胞やNP細胞に時計遺伝子の日内変動発現を見出したのは、我々が初めてである。また、タバコの煙によりラット肺でも、時計遺伝子や時計関連遺伝子の発現が変化することも近年報告され、我々のラット肺や椎間板と同じ位相変化を示した¹¹。マウス肺でも同様の報告があり^{12;13}、遺伝子によっては位相変化は見られず、振幅の低下が見られるものもあった¹³。我々のラットNP細胞でも受動喫煙によって、日内変動の消失が見られる遺伝子もあり、受動喫煙による影響は遺伝子や組織に依存すると思われる。受動喫煙がどのようなメカニズムで概日リズムの位相変化を起こすかは、まだよくわかっていない。受動喫煙は、椎間板 clock の日内変動に影響し、椎間板変性への易罹患性に関与するかもしれない。実際、受動喫煙で椎間板変性につながる遺伝子発現変化は、プロテアーゼやプロテアーゼインヒビターによく見られた。AF/CEPではMmp3、Ctsk、Mmp13が亢進する一方で、A2m、Serping1も亢進が見られ、組織の恒常性維持にむけて相反する反応が同時に起こっていると考えられた。一方NPでは発現低下する遺伝子が多く、機能低下が示唆された。

ラット椎間板組織 mRNA 発現の包括的解析から、新たな NP marker、特に CEP marker を見だし、各細胞の新たな特徴を提示した。またこれらの細胞には clock が存在し、受動喫煙によって日内変動の位相変化を起こすことが明らかとなった。clock の日内変動位相変化は、椎間板細胞の機能維持や変性に関連する可能性があり、今後、椎間板変性の予防や予後改善に向けて興味深い示唆を与える。日内変動の位相変化は、夜間勤務や時差ぼけにみられる体調不良と深い関係がある。本研究は椎間板変性や腰痛に限らず、広く日内変動の位相変化と疾病の易罹患性、受動喫煙と疾病の易罹患性について、クロストークする経路の可能性を示唆した。

引用文献

1. Kostova V, Koleva M. 2001. Back disorders (low back pain, cervicobrachial and lumbosacral radicular syndromes) and some related risk factors. *J Neurol Sci* 192:17-25.
2. Frymoyer JW, Pope MH, Costanza MC, et al. 1980. Epidemiologic studies of low-back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 5:419-423.
3. Goldberg MS, Scott SC, Mayo NE. 2000. A review of the association between cigarette smoking and the development of nonspecific back pain and related outcomes. *Spine (Phila Pa 1976)* 25:995-1014.
4. Lee CR, Sakai D, Nakai T, et al. 2007. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J* : 16:2174-2185.
5. Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, et al. 2010. Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes. *Arthritis Res Ther* 12:R22.
6. Gu H, Yang T, Fu S, et al. 2014. MicroRNA-490-3p inhibits proliferation of A549 lung cancer cells by targeting CCND1. *Biochem Biophys Res Commun* 444:104-108.
7. Li S, Xu X, Hu Z, et al. 2013. MicroRNA-490-5p inhibits proliferation of bladder cancer by targeting c-Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 441:976-981.
8. Li Z, Shen J, Wu WK, et al. 2012. Leptin induces cyclin D1 expression and proliferation of human nucleus pulposus cells via JAK/STAT, PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *PLoS One* 7:e53176.
9. Zhao CQ, Liu D, Li H, et al. 2008. Expression of leptin and its functional receptor on disc cells: contribution to cell proliferation. *Spine (Phila Pa 1976)* 33:E858-864.
10. Sukumaran S, Jusko WJ, Dubois DC, et al. 2011. Light-dark oscillations in the lung transcriptome: implications for lung homeostasis, repair, metabolism, disease, and drug action. *J Appl Physiol* 110:1732-1747.
11. Gebel S, Gerstmayer B, Kuhl P, et al. 2006. The kinetics of transcriptomic changes induced by cigarette smoke in rat lungs reveals a specific program of defense, inflammation, and circadian clock gene expression. *Toxicol Sci* 93:422-431.
12. Vasu VT, Cross CE, Gohil K. 2009. Nr1d1, an important circadian pathway regulatory gene, is suppressed by cigarette smoke in murine lungs. *Integr Cancer Ther* 8:321-328.
13. Hwang JW, Sundar IK, Yao H, et al. 2014. Circadian clock function is disrupted by environmental tobacco/cigarette smoke, leading to lung inflammation and injury via a SIRT1-BMAL1 pathway. *Faseb J* 28:176-194.