

令和元年5月31日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03033

研究課題名(和文) 椎間板の変性に関連する腰痛性疾患の病態の解明と、低侵襲治療システムの開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of low back pain related to degeneration of intervertebral disc and development of minimally invasive treatment system

研究代表者

西田 康太郎 (Nishida, Kotaro)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：00379372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板研究にとって欠かせない、3種類の椎間板変性モデルを確立した。緩やかな変性を生じるモデルを用いて圧迫期間に伴い特に脊索由来細胞が早期に消失して非脊索由来細胞(軟骨様細胞を示唆)が相対的に増大していた。動的負荷培養装置を用いた実験では、圧負荷により代表的なメカノレセプターであるintegrinの関与が椎間板変性に関与していることが明らかとなった。脊椎後方に小皮切から挿入可能なスペーサーを作成し、周辺機器も含めて改良を行い、有効性に関して大型動物実験を行い確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰痛性疾患は社会的に極めて重要であり、その多くは椎間板変性に由来している。しかしながらその詳細はわかっておらず、研究のための椎間板変性モデルの作成無くしては先に進めない。これらのモデルを用いて椎間板変性のKey factorを特定し、それをターゲットにした分子生物学的なアプローチにより変性椎間板の再生あるいは変性の進行抑制が可能であれば社会的意義は多大である。また、腰部脊柱管狭窄症は高齢社会におけるADL障害を呈する疾患として極めて重要であり、低侵襲手術方法の開発も極めて重要と考える。

研究成果の概要(英文)：Three types of disc degeneration models, which are indispensable for intervertebral disc research, have been established. Using the model that causes gradual degeneration, especially during the compression period, the notochord-derived cells disappeared early and the non-notochord-derived cells (recommending chondroid cells) relatively increased. In experiments using a dynamic loading culture device, pressure loading revealed that the involvement of a typical mechanoreceptor, integrin, is involved in disc degeneration. We made a spacer that can be inserted from the small skin in the posterior of the spine, made improvements including peripheral equipment, and confirmed by conducting large animal experiments for efficacy.

研究分野：整形外科学、脊椎外科学

キーワード：椎間板変性 腰痛 遺伝子治療 腰部脊柱管狭窄 動物モデル 低侵襲治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省のデータによると、有訴率が最も多い疾患は腰痛であり、これら腰痛をはじめとするいわゆる退行性脊椎疾患は、社会的・医療経済的にも極めて重要な疾患である。これらの腰痛性疾患は椎間板変性との深い関連が言及されて久しいが、椎間板変性そのものの発生メカニズムや、椎間板変性と腰痛との関連に関しては詳しいことはあまり分かっていない。治療に関しても確立されたとは言いがたく、現状では対症療法が中心となっている。したがって、椎間板変性の機序や腰痛を生じる病態のさらなる解明とそれに基づいた低侵襲治療の開発が強く望まれている。

私共のグループは、これまでに変性椎間板に対する遺伝子治療研究にも従事してきた。現在までに、安全面で問題が指摘されているウイルスベクターを使用せず、物理的な刺激により椎間板内へ外来遺伝子を *in vivo* 導入する手技を確立した。さらに、特定の遺伝子発現を効率よく抑制することが可能ということで注目されている RNA 干渉と、上記の導入法を組み合わせることで、*in vivo* での特定の遺伝子発現を長期間抑制する技術も確立した。問題はどの遺伝子を対象とするかであるが、このことに関してはこれまで臨床を良く反影した椎間板変性モデルが存在せず、十分な情報が得られなかったのが現状である。そこで私共は、椎間板に静的圧迫力を持続的に加えるモデル、さらに圧迫力を途中で解除することによって緩徐な変性を再現するモデル、動的圧迫力を加えて変性を誘導する 3 種類の変性モデルを作成してきた。これまでの解析結果では、MMP-3 を中心とした異化遺伝子群の高発現や脊索細胞が早期から著減すること、メカノレセプターとして知られる integrin  $\alpha 5 \beta 1$  が変性に関与していることを明らかにした。さらに長寿遺伝子として注目されている SIRT1 遺伝子が椎間板髄核細胞にも発現していることを発見し、その後の研究で SIRT1 は変性の初期に発現が増強され、変性の進行に対抗していることを突き止め、逆に SIRT1 を外部から添加することでオートファジーの誘導を介して変性を抑制できる可能性を示唆した。自己貪食「オートファジー」は低栄養などのストレス条件下で細胞が自己の余剰蛋白や老廃物を分解、再利用して生存を図る細胞内恒常性維持機構である。我々は椎間板の発生・解剖学的特徴を顧みて、無血管組織で低栄養に曝されている椎間板の恒常性維持には自食作用であるオートファジーが重要な役割を果たしているかと仮説を立てている。

先述の腰部脊柱管狭窄症に関しても椎間板変性との関連が示唆され、椎間板変性により椎間板高が低下し、それに伴って椎間板が後方の脊柱管内へ膨隆することと、脊柱管後方の黄色靭帯が「たるむ」あるいは「たくれこむ」ことで、全体として脊柱管が狭小化することが主要原因とされる。いずれにせよ、これらの狭窄状態は体幹の姿勢によって大きく変化することがわかっており、一般的には腰椎を前屈することで椎間板後方の高さが改善し、前述の狭窄状態が大きく緩和することで症状が軽快することが知られている。狭窄状態を改善する試みとして、これまで神経組織の圧迫を直接取り除く手術が主流であった。一方、狭窄状態が腰椎の前屈位で大きく改善する事実に着目し、責任椎間の局所的な腰椎前屈状態を維持する目的で脊椎後方の棘突起間にスペーサーを留置することによって間接的に狭窄状態を改善する手術方法が近年開発されている。そこで我々は、これら鏡視下の除圧術と比較しても、はるかに低侵襲で経皮的な挿入が可能な棘突起間スペーサーを開発し、大型動物を用いた基礎実験を続けてきた。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、椎間板変性あるいは痛みの発現機序の解明という基礎的な部分から始まり、*in vitro* 実験や小動物を用いた治療方法の開発、さらに開発中の治療法に関しては大型動物を用いた前臨床試験を目標としており、全体として腰痛の基礎から臨床応用に至る包括的な研究内容となっている。具体的には、1) 椎間板変性モデルの詳細な分子生物学的解析から、椎間板変性の

メカニズムをさらに明らかにすること。2) これらのデータをもとに、遺伝子治療あるいは特定のタンパク質や抗体等を椎間板に注入することによって、椎間板変性を予防あるいは変性した椎間板を再生する方法を開発すること。3) 腰部脊柱管狭窄症に対する新たな低侵襲の治療のために開発中の棘突起間スペーサーの改良と、周辺機器の開発、大型動物を用いた基礎実験の後、臨床応用を開始するための準備とすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 椎間板変性モデルの改良と変性の抑制

ラット尾椎椎間板に創外固定器を装着し、バネにて一定の静的圧力を加える椎間板に持続的に負荷するモデルを作成した。さらに比較的緩やかな椎間板変性を再現するための改良が必要と考え、静的圧迫力を早期に解除することで、比較的軽度の変性椎間板モデルの作成が可能であった。このモデルをさらに詳細に検討し、変性の進行がまずは抑制可能かどうかを検討する。圧迫開始1日、3日、5日、7日、14日に解除して椎間板の変性度の推移をXp、MRI、組織像にて検討する。対象として、これまでに行ってきた持続的に静的圧迫力を加えるものを使用する。指標としてaggrecan、collagen type2、MMP-3、ADAMTS-5、aggrecan分解産物をRTPCR、免疫染色等で定量する。椎間板の変性が持続的に進行するものと、進行しないものを見極め、その群間における各種遺伝子発現の差異を検討し、変性の鍵となる遺伝子を特定する。緩やかに変性が進行する群を今後の再生治療の対象とする。再生治療の準備段階として、Key 遺伝子をロックダウンすべく、siRNA のデザインとオーダー、尾椎椎間板への遺伝子導入の基礎実験を開始する。前述の軽度変性椎間板モデルを用いて、これにMMP-3 を中心とした基質の異化を促す因子の発現抑制を目的としたsiRNAを作製し、単独あるいは数種類を混合したものをin vivo で椎間板細胞に直接遺伝子導入する。対象として非特異的siRNA を導入し、遺伝子導入と目的遺伝子がin vivo で発現抑制されていることを確認した後、椎間板変性の進行抑制効果、あるいは再生効果を検討する。

#### (2) 椎間板変性における脊索細胞の役割と治療への応用

椎間板は脊索から分化して形成され、人間においては幼児期に椎間板内から脊索細胞が消失する。一方、脊索細胞が髄核内に残存するげっ歯類等では、椎間板変性が生じにくいことが知られ、また基質の合成能も高い。したがって椎間板変性における脊索細胞の役割が注目されている。脊索細胞が椎体内から消失する際にはアポトーシスが原因ではなく、力学的ストレスが原因との報告があり、実際に静的圧迫力を椎間板に持続的に負荷するモデルにおいては、早期に脊索細胞が髄核から消失することを確認している。したがって、上記の多様な変性度の椎間板が作製可能なモデルを用いて、あるいはin vitro で椎間板組織に精密な動的負荷をかけることが可能な培養装置を用いて脊索細胞がどのように消失するかを検討する。脊索細胞についてはGalectin-3、Cytokeratin-8 の免疫染色にて同定し、脊索細胞のアポトーシス、活動性について、生死染色と増殖静止マーカーのp16INK4A の多重蛍光免疫染色にて評価する。圧負荷あるいは動的圧迫の場合にはその頻度も変化させて、経時的に上記により脊索由来細胞数の変化を計測する。0.5, 1.0 1.3Mpa, 0.1, 1.0 Hz の圧負荷を数日間与えることで椎間板変性を誘発可能であることは確認済みである。まずは上記の組織培養装置を用いて椎間板細胞のメカノレセプターとして知られる integrin 5 1 をブロックする(現時点ではそのリガンドであるfibronectin 抗体を使用)ことで脊索由来細胞の消失が抑制できるかどうかを判定する。さらに上記のブロックにより椎間板変性の抑制が可能であるかに関しても前述の方法で評価する。

#### (3) 腰部脊柱管狭窄症に対する棘突起間スペーサーの挿入

棘突起間スパーサーの改良と前臨床試験既に進行中のプロジェクトの続きであり、大型動物実験（ブタ）の結果として安全性や有効性に関しては問題のないことが確立しつつある。しかし、スパーサーと棘突起の接触部に骨融解を生じた例を経験したため、金属性（チタン）では硬すぎるとの結論を得た。したがって金属より柔らかく、骨の硬さに近い素材（ピークと呼ばれる樹脂素材を予定）を用い、さらにより弾力を持たせるためデザインの一部変更を加えたスパーサーの作成を依頼した。ブタを用いた学外での実験として骨との接触部の変化に関して長期間（3ヶ月）のフォローを行った。全身麻酔下、透視下に小皮切を介して腰椎棘突起間にスパーサーを挿入する。術前、術後1、3、7、14日に血液を採取して炎症反応等をチェックする。同時に毎日動物を観察し、神経障害等の有害事象がないかどうかを確認する。3ヶ月目に経皮的に同様の小皮切からスパーサーを除去する。動物を屠殺後、腰椎を回収し、実際にスパーサーの接触部分の棘突起の溶骨性変化を確認する。既存のチタン性金属スパーサーを対象として溶骨性変化を比較検討する。同時にスパーサーの挿入や除去に必要な機器の開発/改良も進める。力学的強度試験や毒性試験も同時に施行する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 椎間板変性モデルを用いて

より早期の椎間板変性を観察するために圧負荷を1日もしくは7日間加えた後に解除した群を作成した。圧迫期間に伴い細胞数は減少し、なかでも髄核では脊索由来細胞が特に早期に消失して非脊索由来細胞（軟骨様細胞を示唆）が相対的に増大していた。死細胞は大半が非脊索由来細胞において観察され、MMP群の発現も大半の脊索由来細胞が消失した椎間板で増大することが明らかとなった。この研究結果は、椎間板変性の発生には脊索由来細胞の消失だけでなく非脊索由来細胞の増大が関与する可能性を示しており、脊索由来細胞と非脊索由来軟骨様細胞との関係についてさらなる検討が必要であると考えられる。

動的負荷培養装置を用いた実験では、圧負荷により代表的なメカノレセプターであるintegrinの発現が増大していたことから、integrinを介した椎間板基質代謝の影響や細胞死への関与について解析を進めた。動的圧迫負荷による髄核の細胞数減少やMMP-3発現増大といった反応が、integrin 5 1に対する阻害剤を添加することで抑制されたことから、椎間板に負荷される機械的ストレスが、integrin 5 1を中心とするメカノレセプターを介して細胞内の生化学的変化に変換し、初期の椎間板変性に関与していると考えられた。さらに、脊索由来細胞のマーカーであるbrachyuryの発現性は軟骨系細胞の分化に必要なsox9と比較して動的圧迫により著しく低下するが、integrin 5 1阻害によりその発現低下が回避されていることから、機械的ストレスによる椎間板変性はintegrin 5 1を介しており、さらに脊索由来細胞に大きく影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 椎間板変性のkey遺伝子としてMMP-3を最有力候補としてあげていたが、もっと上流での遺伝子発現をターゲットとすべく、The mammalian target of rapamycin (mTOR)シグナル経路に着目した研究を開始した。mTOR経路は細胞の成長と恒常性維持に重要であることが知られ、mTORはRaptorと複合したmTORC1とRictorと複合したmTORC2を形成する。mTORC1はAktに制御を受け、蛋白合成に関わるp70/S6Kを調節し、細胞自食機構オートファジーを抑制する。椎間板髄核細胞株を用いたRNA干渉法によるmTORシグナル経路解析を施行した結果、Raptor干渉群ではAktを活性化しつつ、mTORC1関連経路のみを抑制できた。Raptorを介した選択的なmTOR経路の抑制は、抗老化、MMP-3の抑制をはじめとしたより広い範囲の基質分解抑制効果に加え、細胞生存に関わるAktの活性化を介して細胞死も抑制できる可能性が示唆された。したがって、今後の椎間板治療のタ

ターゲットとしてRaptorを使用予定とする。ラット尾椎椎間板を用いたin vivo基礎実験が開始されている。

(3)腰部脊柱管狭窄症に対する棘突起間スペーサーの開発に関しては現在も継続している。スペーサーは棘突起間に挿入するスクリュウ形状部分に2重螺旋構造を取り入れ、ネジ山の形状改良を加えた。さらに全体の形を見直し、より簡便に小さい労力で挿入できるように、スクリュウ形状部分の先を細くして、変曲点を持たせる構造とした。PEEK素材ではX線透視下で全く視認できないため、可視化のためにマーカーを改善し、周辺機器も種々の改良を加えた。

また棘突起間スペーサーそのものの市場縮小に準じて、本スペーサーを骨癒合を目的としたスペーサーへ改変することを決断した。そのために周辺機器を新たに開発し、スペーサーのデザインも大きく変更、大型動物を用いた基礎実験を行った。3ヶ月後にはほぼ全例(N=6椎間)でスペーサー内への骨形成を認め、骨癒合が得られることが確認できた。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計3件)

Kakiuchi Y, Yurube T, Kakutani K, Takada T, Ito M, Takeoka Y, Kanda Y, Miyazaki S, Kuroda R, Nishida K. Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction. *Osteoarthritis Cartilage*, 査読あり、1-19, 2019

Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, Kakiuchi Y, Takeoka Y, Miyazaki S, Kuroda R, Nishida K. Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction. *Osteoarthritis Cartilage*, 査読あり、2134-2146, 2017

### [学会発表](計13件)

M. Ito, Autophagy plays protective roles against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation, 45th The International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2018

Y. Kanda, The fate of notochordal cell in intervertebral disc degeneration induced by dynamic compressive load through integrin  $\alpha 5 / \beta 1$  mechanotransduction, International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2018

T Yurube, Involvement of autophagy in intervertebral disc degeneration and its possible contribution to the maintenance of notochordal cell homeostasis, The 44th International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2017

M. Ito, Inhibition of autophagy through ATG5 knock down induces apoptosis and senescence in human intervertebral disc cells, The 44th International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2017

神田祐太郎、椎間板動的圧迫負荷が脊索由来髄核細胞に及ぼした影響、第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2018

伊藤雅明、ATG5のノックダウンによるオートファジーの抑制はヒト椎間板細胞のアポトーシスとセネッセンスを誘導し、細胞数を減少させる、第46回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2017

由留部崇、椎間板髄核におけるオートファジーの重要性とその脊索表現型保持への関与の可能性、日本脊椎脊髄病学会学術集会、2017

伊藤雅明、mTORシグナル経路への選択的な干渉はオートファジーとAktの活性化を誘導し、ヒト椎間板細胞における細胞死、老化と細胞外気質分解を抑制する、日本脊椎脊髄病学会、2016

由留部崇、椎間板では他の筋骨格系組織よりもオートファジーの関与が大きく、その活性は変性とともに減少する：オートファジー制御による椎間板変性予防の可能性、日本脊椎脊髄病学会、2016

Ito M., Selective interference of mTOR signaling is protective against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix degradation with autophagy induction, The 43ed The International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2016

西田康太郎、棘突起間スパーサーの開発、日本腰痛学会（招待講演）、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：棘突起間インプラント

発明者：西田康太郎

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：2017-0678

出願年：平成 29 年 3 月 30 日

国内外の別：国内（平成 30 年に PCT 出願あり）

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：角谷 賢一郎

ローマ字氏名：Kenichiro Kakutani

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：10533739

研究分担者氏名：由留部 崇

ローマ字氏名：Takashi Yurube

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：10514648

研究分担者氏名：高田 徹

ローマ字氏名：Toru Takada

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：医学研究員

研究者番号(8桁)：00598526

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。