

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10415

研究課題名(和文)独自の圧負荷装置を用いた椎間板細胞のオートファジー機構の解明と制御方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of elucidation and control method of autophagy mechanism of disc cells using original pressure loading device

研究代表者

池田 巧 (Ikeda, Takumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40453120

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)：静水圧負荷によるメカニカルストレスのもとでオートファジー関連因子の発現を認め、椎間板細胞においてもオートファジーが生じていることが示唆された。今後検体数を増やして再現性を検討する必要がある。
さらに、オートファジー誘導剤あるいは阻害剤をゼラチンハイドロゲルに含浸させ椎間板内に注入、徐放させることで、白色家兎生体内椎間板内のオートファジーによる椎間板変性抑制効果の検討も必要である。

研究成果の概要(英文)：Expression of autophagy-related factors was observed under mechanical stress caused by hydrostatic pressure loading. This suggests that autophagy also occurs in intervertebral disc cells. It is necessary to increase reproducibility by increasing the number of samples in the future.
Furthermore, it is also necessary to investigate the effect of autophagy in the intervertebral disk in white rabbits by inhibiting disc degeneration by impregnating the gelatin hydrogel with an autophagy inducer or inhibitor and injecting it into the intervertebral disc and sustained release.

研究分野：脊椎外科

キーワード：オートファジー 椎間板細胞

1. 研究開始当初の背景

脊椎の構成体である椎間板の変性は腰痛の一因となり、臨床的に大きな問題となる。椎間板変性とは、加齢性変化に、力学的負荷、炎症性サイトカインの暴露、栄養供給機構の破綻が加わることで椎間板の構成細胞と基質が減少し、構成細胞が変化することに起因している。また、椎間板は人体最大の無血管組織であることや椎間板構成細胞の増殖能が低いことから、いったん変性すると自己修復は期待できない。

われわれは多血小板血漿をドラッグデリバリーシステムと組み合わせ、家兎椎間板変性モデルの髓核に注入し、血小板由来成長因子の徐放による椎間板再生効果を報告した(Ikeda T: Tissue Eng Part A. 2007, 2009)。その際に、家兎変性椎間板モデルから作製した組織切片に対して、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) 染色を行うと、椎間板の髓核に TUNEL 染色陽性の細胞を同定した。この TUNEL 染色陽性細胞は多血小板血漿とゼラチンハイドロゲル粒子を投与した群、対照群でも認め、椎間板変性を抑制させるためには椎間板細胞の恒常性や細胞死のメカニズムを解明し、残存する椎間板細胞の細胞死を減少させることが必須であると考えた。

近年、様々な細胞においてオートファジーによる細胞内品質管理、抗老化作用、細胞死抑制効果が報告され、加齢などによるオートファジーの低下が細胞死や組織変性に寄与していると考えられている。椎間板組織は無血管組織でもともと低酸素・低栄養状態であることから恒常的にオートファジーが生じている可能性が考えられる。われわれは、過度のメカニカルストレスによるオートファジー機構の破綻と椎間板変性が関係している可能性があると考えた。オートファジーには大きく分けてマクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー、ミクロオートファジーの3つの機構がある。中でも長期的なストレス応答反応であるシャペロン介在性オートファジー(Cuervo AM, Am J Physiol 1995)は常時ストレス下にある椎間板とより関連している可能性がある。

2. 研究の目的

われわれは静水圧を自由に設定し、持続的、もしくは種々の周期で間欠的に圧力負荷できる装置を開発し、実験を行ってきた(Tonomura H, Osteoarthritis and Cartilage 2006, 2008, Journal Orthopedics Science 2009)。この装置により、椎間板(髓核細胞・線維輪細胞・終板軟骨細胞)に対してメカニカルストレスをかけ、オートファジーを促進・阻害させるこ

とで、椎間板におけるオートファジーによる細胞内品質管理、抗老化作用、細胞死抑制効果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

椎間板細胞に対する静水圧負荷によるオートファジー誘導が椎間板におよぼす影響の検討

<方法>

1) 白色家兎の椎間板組織から椎間板細胞(髓核細胞、線維輪細胞、終板軟骨細胞)をそれぞれ単離し、単層培養、alginateを用いた三次元培養を行う。

2) 種々の周期、時間、強さ(1-30 MPa)の静水圧負荷を行い、オートファジー関連因子である Beclin1、LC3、LAMP、ATG、HIF-1、2 を Western blotting や免疫染色で検索する。マクロオートファジーで発現する隔離膜を電子顕微鏡で確認する。

3) オートファジー阻害剤である3-メチルアデニンやクロロキンを投与し、上記のオートファジー関連因子の発現の変化を確認する。

4) 椎間板構成細胞の基質産生能を評価するために real-time PCR 法を用いて各群の培養液中の sGAG、aggrecan、versican、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、SOX9 の遺伝子発現量を分析する。

5) 細胞老化マーカーの評価をするために SA Gal、P16INK4a、p27KIP、p21、p53 の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて分析する。

6) アポトーシスの評価をするために、TUNEL 染色、DNA fragmentation ELISA、Annexin V 染色、Caspase-3 の酵素活性測定、電子顕微鏡、フローサイトメトリーを用いて分析する。

7) IL-1、TNF、nitric oxide synthase (NOS) の発現の変化を Northern blotting、RT-PCR、ELISA を用いて検索する。NO 産生の変化の有無を Griess 法で解析する。

8) アポトーシス調節因子である Bcl-2、BAX の発現を Western blotting で検索する。

4. 研究成果

静水圧負荷によるメカニカルストレスのもとでオートファジー関連因子の発現を認め、椎間板細胞においてもオートファジーが生じていることが示唆された。今後検体数を増やして再現性を検討する必要がある。また、オートファジー阻害剤を投与することで髓核細胞におけるオートファジーが抑制

されるかどうかの検討やアポトーシスの有無の検討などのさらなる研究が必要である。さらに、オートファジー誘導剤あるいは阻害剤をゼラチンハイドロゲルに含浸させ椎間板内に注入、徐放させることで白色家兎生体内椎間板内のオートファジーによる椎間板変性抑制効果の検討も必要となると考える。

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 11 件)

Arai Y, Nakagawa S, Higuchi T, Inoue A, Honjo K, Inoue H, Ikoma K, Ueshima K, Ikeda T, Fujiwara H, Kubo T. Comparative analysis of medial patellofemoral ligament length change pattern in patients with patellar dislocation using open-MRI. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 査読有 25,2017,2330-2336.

【痙縮をいかに治療するか-最適な治療法選択のために】痙縮に対するITB療法 池田巧,外村仁 J Clin Rehabil 査読有 26,2017,660-664

Tomomura H, Hatta Y, Mikami Y, Ikeda T, Harada T, Nagae M, Koike H, Hase H, Kubo T. Magnetic Resonance Imaging Evaluation of the Effects of Surgical Invasiveness on Paravertebral Muscles After Muscle-preserving Interlaminar Decompression (MILD). Clin Spine Surg 査読有 30,2017,E76-E82.

Mizuno K, Mikami Y, Hase H, Ikeda T, Nagae M, Tomomura H, Shirai T, Fujiwara H, Kubo T. Innovative Technique for the Placement of the Drainage Tube for Microendoscopic Spinal Decompression. Clin Spine Surg 査読有 30,2017,E59-E63.

Nagae M, Mikami Y, Mizuno K, Harada T, Ikeda T, Tomomura H, Takatori R, Fujiwara H, Kubo T. Dislodgement and gastrointestinal tract penetration of bone cement used for spinal reconstruction after lumbosacral vertebral tumor excision: A case report. Medicine 査読有 95,2016,e5178.

Klippel-Feil 症候群に伴う頭蓋底陥入症に対して後方除圧固定術を施行した1例 橋本秀介, 外村仁, 長江将輝, 高取良太, 池田巧, 久保俊一 中部整災誌 査読有 59,2016,489-490

Horii M, Fujiwara H, Mikami Y, Ikeda T, Ueshima K, Ikoma K, Shirai T, Nagae M, Oka Y, Sawada K, Kuriyama N, Kubo T. Differences in monthly variation,

cause, and place of injury between femoral neck and trochanteric fractures: 6-year survey (2008-2013) in Kyoto prefecture, Japan. Clin Cases Miner Bone Metab 査読有 13,2016,19-24.

Mori G, Mikami Y, Arai Y, Ikeda T, Nagae M, Tomomura H, Takatori R, Sawada K, Fujiwara H, Kubo T. Outcomes in cases of lumbar degenerative spondylolisthesis more than 5 years after treatment with minimally invasive decompression: examination of pre- and postoperative slippage, intervertebral disc changes, and clinical results. J Neurosurg Spine 査読有 24,2016,367-74.

Ishibashi H, Tomomura H, Ikeda T, Nagae M, Sakata M, Fujiwara H, Tanida T, Mastuda K, Kawata M, Kubo T. Hepatocyte growth factor/c-met promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro. J Orthop Res 査読有 34,2016,709-16.

頸椎高度後彎変形と頸髄腫瘍を合併した神経線維腫症1型に対し腫瘍切除術と頸胸椎前後方固定術を施行した1例 石橋秀信, 長江将輝, 外村仁, 原田智久, 池田巧, 久保俊一 中部整災誌 査読有 58,2015,979-980

Oda R, Fujiwara H, Ichimaru K, Morihara T, Ikeda T, Kubo T. Chronic slipping of bilateral distal humeral epiphyses in a gymnast. J Pediatr Orthop B 査読有 24,2015,67-70.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

リハビリテーションの質を高めるロボット 沢田光思郎, 三上靖夫, 伊藤慎英, 池田巧, 大橋鈴世, 伊藤倫之, 相良亜木子, 前田博士, 石原健, 平野哲, 才藤 栄一 難病と在宅ケア 22,2016, 55-58

【最低限これだけマスター!すぐに使えるリハビリに「効く」クスの事典】痙縮、脳卒中、脊髄損傷ほか 池田巧 リハビリナース 8,2015,461-469

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 巧 (IKEDA TAKUMI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40453120

(2) 研究分担者

三上 靖夫 (MIKAMI YASUO)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80360030

沢田 光思郎 (SAWADA KOUSHIROU)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：40460555

長江 将輝 (NAGAE MASATERU)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：60604303

外村 仁 (TONOMURA HITOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：70604304

(3) 研究協力者

阪田 宗弘 (SAKATA MUNEHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・大学院生
井辻 智典 (ITSUJI TOMONORI)
京都府立医科大学・医学研究科・大学院生