

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2009
課題番号：18300169
研究課題名（和文） 治療遺伝子を用いた腰痛に対する低侵襲治療システムの開発
研究課題名（英文） Development of minimally invasive system for treatment of low back pain using therapeutic gene
研究代表者
土井田 稔（DOITA MINORU）
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：18300169

研究成果の概要（和文）：腰痛の原因のひとつに椎間板変性がある。本研究では腰椎椎間板の変性過程を解明することにより、遺伝子治療による新たな腰痛治療法について研究を行った。椎間板の変性モデルを作成し、椎間板の変性過程において、変性を促進する特定の遺伝子が発現していることを明らかにした。これらの遺伝子の発現を抑制し、さらに椎間板器質を再生させる遺伝子を導入することにより、最小侵襲での腰痛治療の開発を可能にした。

研究成果の概要（英文）：The degeneration of lumbar vertebral disc is supposed to be a cause of chronic low back pain. We demonstrated the pathomechanism of disc degeneration and developed a gene therapy for the treatment of disc degeneration. This study successfully proposed the less invasive treatment for chronic low back pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：椎間板変性、遺伝子治療、RNA 干渉、超音波、再生医療、蛋白分解酵素、Fas-Ligand

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の国民生活基礎調査によると腰痛は有訴者率の最も高い疾患であり、患者本人はもとより治療費を含めた社会に対する損失も大きい大変重要な疾患である。腰痛の原因として、椎間板の変性が深く関与していることが知られているが、椎間板の変性そのものを治療する方法は現存しない。従って、より小さな侵襲で、椎間板の本来の

機能をできるだけ温存するような新たな治療法の開発が望まれている。

最近、幹細胞や自家軟骨培養細胞移植を応用した軟骨の再生医療が進歩し、臨床応用も行われている。しかし、変性椎間板においては臨床応用可能な再生医療は未だ確立していない。変性組織を再生させうる手段として遺伝子を用いた手法があり、

血管細胞などにはすでに応用されている。しかし一方で、ウイルスベクターを用いることに対する安全面での懸念やコストの問題もあり、解決すべき問題点も数多く残っている。以上より、ウイルスベクターや高価な機材を用いずに安全かつ効率的に遺伝子を導入する方法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、臨床応用可能なより安全で効率の高い遺伝子導入法を開発を行い、その手法を応用して治療遺伝子を椎間板内に導入することにより変性椎間板を再生させることである。また、RNA干渉法と呼ばれる新しい手法を椎間板に応用する。RNA干渉とは、ある遺伝子配列を標的として人工的に作られた短いRNA鎖（siRNA）が存在するとき、この遺伝子発現を特異的にブロックする方法である。本研究の目的のひとつは、遺伝子導入により椎間板の再生を促進させることと同時にRNA干渉法により椎間板の変性に関連する負の要素（遺伝子発現）をブロックすることにより、効率よく椎間板の再生を促進させることが可能で椎間板性腰痛の有力な治療法を開発し、安全で長期的に最も有効となりうる低侵襲腰痛治療法を確立することである。

3. 研究の方法

1) 治療遺伝子の決定とプラスミドの作成と正常椎間板をもちいたin vivo治療遺伝子導入実験

in-vivoの研究として、麻酔下にラット尾椎椎間板にマイクロシリンジを用いてマイクロバブルと標識遺伝子をコードするネイキッドプラスミド(naked plasmid)の混合液を注入し、その後超音波を照射する。一定期間後(1週間)にラットを屠殺し、髄核を回収し、髄核における導入遺伝子の発現を評価する。次に変性した椎間板についても遺伝子の導入が可能かどうかを調査するために、椎間板変性モデルを用いて同様の実験をする。次に、標識遺伝子導入で明らかにした最適の超音波強度とマイクロバブルの濃度を用いて治療遺伝子の導入を行う。有用な治療遺伝子の同定を行った後に治療遺伝子を椎間板内に導入し、椎間板再生に必要な基質(プロテオグリカンやタ

イプ2コラーゲンなど)の合成や量を評価する。

(1) 有用な治療遺伝子の同定

現在までに報告されている基質(特にプロテオグリカンおよびタイプ2コラーゲン)の合成を刺激するような増殖因子(TGF- β 1, BMP-2, IGF-1など)や基質の分解を抑制する因子(TIMP-1など)を導入した遺伝子を培養細胞内にin vitroで導入する基礎実験を行う。

(2) プラスミド(plasmid)の作成

(3) 新たに作成したプラスミドをもちいてin vitroあるいはin vivoで遺伝子導入し、基質の産生などの生物学的効果について評価する

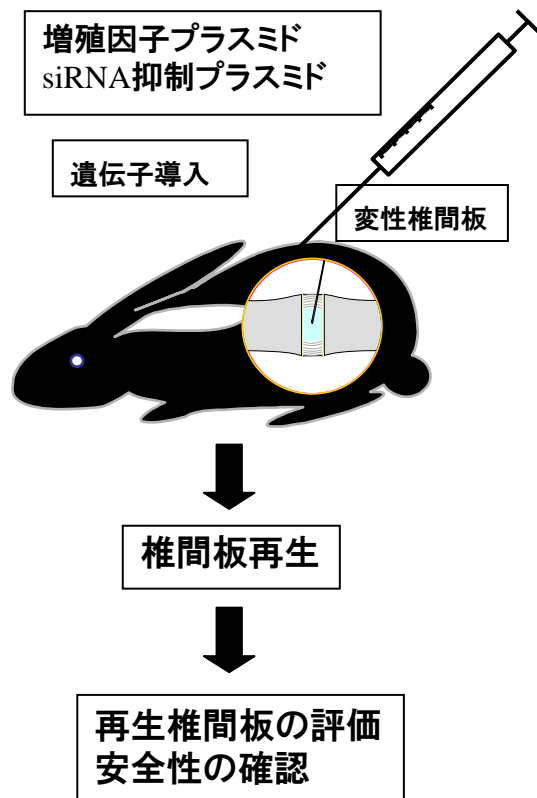
2) RNA干渉を応用した内因性遺伝子の発現抑制実験

治療を目的とした遺伝子(in vitro + in vivo)の決定

RNA干渉とは、ある遺伝子配列を標的として人工的に作られた短いRNA鎖（siRNA）が存在するとき、この遺伝子発現を特異的にブロックする方法である。この方法を用いて椎間板変性に関連する負の要素の遺伝子をブロックすることで変性椎間板の遺伝子治療への有効性を検討する。

現在までに報告されているcDNA配列から標的とする遺伝子発現を抑制するためのsiRNAをデザインし、このsiRNAをコードするplasmidを作成、超音波コントラスト法により椎間板内に遺伝子導入する。免疫特権の維持に重要な役割をもつFas ligandや椎間板変性に重要なタンパク質分解酵素発現を抑制するためにデザインしたsiRNAを導入する。実際に標的とした遺伝子の発現がブロックされているかどうか、Western blotting、半定量PCR法、蛍光免疫染色法などで確認する。

標的とした遺伝子の発現をブロックすることによる、椎間板への効果を経時的にMRIあるいは組織形態学的に観察し、その遺伝子の役割について評価する。



3) 椎間板変性モデルの作成と評価方法の確立

臨床応用する前段階として動物実験を行う。まず、椎間板変性モデルとして創外固定を用いた軸圧による変性モデルを作成する。

SDラットの尻尾に椎間板にバネを用いて持続的に圧迫力かける創外固定器を取り付ける。骨格的に成熟した12週齢雄Sprague-Dawleyラット48匹を用いた。第8-10尾椎体にイリザロフ型創外固定器を装着し、1.3 Mpaの持続的な静的圧迫負荷をそれぞれ0 (sham), 7, 28, 56日間ずつ加えた。第8/9, 9/10尾椎間を圧迫群、第11/12, 12/13尾椎間を対照群とした。

画像診断学的解析: 単純X線像を創外固定器装着前と椎間板回収前で撮影した。単純X線像ではMasudらが提唱したDisc Height Index (DHI)を用いて、各群の椎間高を経時的に比較検討した。また、MRIを同様に撮像し、Pfarrmannらが提唱したT2強調画像での椎間板輝度を基にした分類法を用いて、各群の変性度を経時的に比較検討した。

組織学的解析: 椎間板と椎体を一塊とした組織標

本を作成した。Hematoxylin and eosin (H-E)染色とSafranin-O染色を行い、Masudらが提唱した組織学的分類法を用いて、各群の変性度を比較検討した。

細胞生物学的解析: ①回収した椎間板髄核組織からRNAを抽出し、real-time RT-PCR法を用いて、異化遺伝子群 (MMP-1a, -2, -3, -7, -9, -13, ADAMTS-4, -5), 同化遺伝子群 (TIMP-1, -2, -3), 細胞外基質遺伝子群 (Aggrecan, Collagen type-1, -2)の発現量を計測した (各群6匹)。内在性コントロールとしてGAPDHの発現量を計測して細胞当たりの遺伝子発現量を求めたうえ、対照群を基準とした圧迫群のmRNA発現量を算出した。②タンパクレベルでの遺伝子発現を確認するため、MMP-3, ADAMTS-4, TIMP-1, -3の免疫染色を行い、陽性細胞の検出率を比較検討した。

4) 椎間板変性モデルに対する治療遺伝子 (therapeutic gene) の導入とその効果の評価

最も効率よく椎間板基質の合成を促進する増殖因子の遺伝子を組み込んだプラスミドを変性モデル動物の変性椎間板内に注入する。経時的に椎間板の基質合成の増加の程度を定量する。また、マイクロコイルを用いたMRIを撮影し、画像上での椎間板の再生を評価する。同時に病理組織標本を作成して、免疫組織化学的にも椎間板再生の状態を評価する。RNA干渉法を用いて、siRNAを組み込んだプラスミドを変性椎間板内に注入し、椎間板の再生に及ぼす効果を上記と同様に評価検討する。

さらに、超音波コントラスト法を用いて椎間板基質の合成を促進する増殖因子の遺伝子を組み込んだプラスミドを変性椎間板内に注入すると同時にsiRNAを組み込んだプラスミドを注入し、再生の促進と変性の抑制の相乗効果による変性椎間板の再生を評価する。遺伝子導入した変性椎間板の再生の評価は、1, 3, 6, 12ヶ月後に行い、導入遺伝子の効果持続期間についても検討する。遺伝子を注入した実験動物の血液検査、全身臓器

の病理組織検査を行い、椎間板への遺伝子導入が全身に及ぼす影響について検討を加える。また、遺伝子導入後の動物を定期的に検査し、最長1年間にわたり異常がないことを検討した上でこの治療法の安全性を確認する。

4. 研究成果

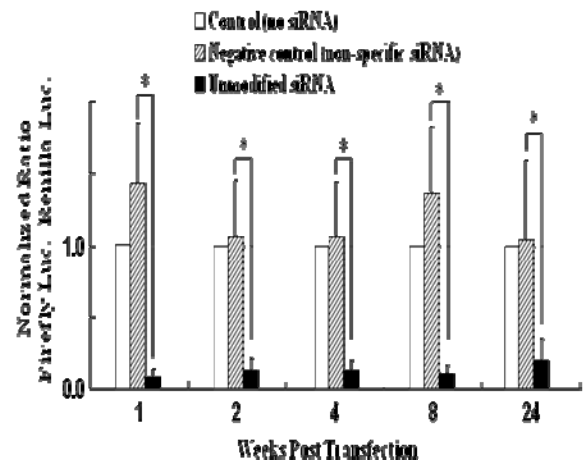
研究1：椎間板への遺伝子導入の研究

SD ラット尾椎椎間板から髓核を採取し、酵素処理によって細胞を分離、培養した。標識遺伝子として GFP あるいは Luciferase (蛍光シイタク) を用い、培養細胞に上記の標識遺伝子をコードする plasmid を導入した。さらに、ラット尾椎椎間板にマイクロシリンドジを用いて micro-bubble と標識遺伝子をコードする naked plasmid の混合液を注入した。その後超音波を照射することで遺伝子を導入した。標識遺伝子としては GFP あるいは Luciferase を用いた。超音波を照射することで比較的高い効率で遺伝子導入が可能であることが判明した。

研究2：RNA干渉を応用した内因性遺伝子の発現抑制実験

SD ラット尾椎椎間板の培養細胞に蛋白分解酵素 (MMP-3) 遺伝子をブロックするために同じ siRNA をコードする plasmid を同様の方法で導入した。1週間後、内在性 MMP-3 遺伝子の発現が特異的に down regulate されたことが確認できた。長期間の調査では、約8週間にわたって、RNA干渉の効果が続くことが確認できた。

さらに、ラット尾椎椎間板に標識遺伝子をコードする naked plasmid の混合液を注入し遺伝子を導入した。次に標識遺伝子をブロックするための siRNA をコードする plasmid を、同様の方法で先述の plasmid とともに椎間板へ in-vivo 導入し、標識遺伝子の発現が down regulate された。

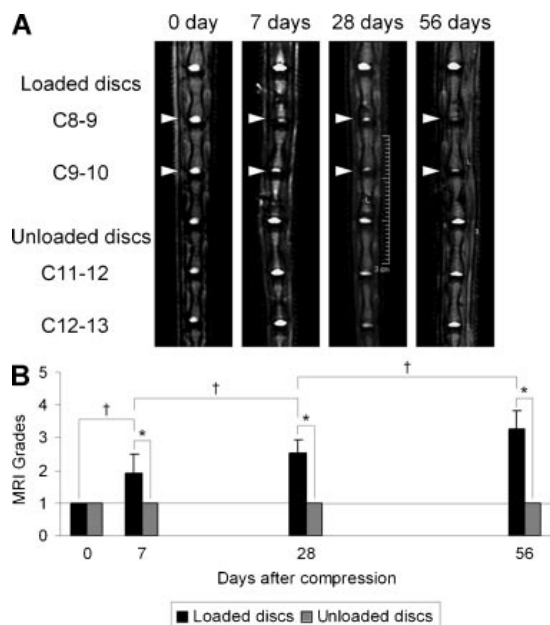


研究3：椎間板変性モデルの作成と変性機序

SD ラットの尻尾に椎間板に創外固定器を装着し、持続的に圧迫を加えて椎間板変性モデルを作成した。

画像診断学的解析：単純X線像では圧迫期間に相関して椎間板高が低下し、有意なDHIの減少が確認された。MRIでは圧迫に伴い椎間板輝度が低下し、Pfarrmann分類でも変性度の差が有意にみられた。

組織学的解析：圧迫群では対照群と比較して、髓核細胞の減少と細胞外基質の増加、線維輪の破綻がみられた。Masudaらの組織学的分類でも圧迫群と対照群で変性度に明らかな有意差を認め、圧迫群で経時的に変性度が增大していた。



細胞生物学的解析：①Real-time RT-PCR法によるmRNA発現解析では、全ての異化遺伝子群

において経時的な増大を認めた。MMP-1a, -3, -7, -9, -13, ADAMTS-4 が術後 7 日目より有意に発現上昇を来し, MMP-2, ADAMTS-5 は術後 56 日で有意となった。特にMMP-3 は早期より高値を呈した。同化遺伝子群では, TIMP-1, -2 が計測期間中に有意の増大を示さなかったのに対し, TIMP-3 では術後 7 日より有意かつ持続的に発現が低下していた。細胞外基質遺伝子群では, Collagen type-1 の経時的な増加とAggrecan, Collagen type-2 の減少を認めた。②免疫染色では, MMP-3 陽性細胞数の術後 7 日よりの有意な増加, ADAMTS-4 及びTIMP-1 の術後 28 日よりの有意な増加, TIMP-3 の術後 7 日よりの有意な減少を認めた。

まとめ

治療遺伝子を用いて変性椎間板を再生させることで椎間板性腰痛を治療することを目的とした研究を行った。cDNA 配列から標的とする遺伝子発現を抑制するための siRNA をデザインし、ラット尾椎の椎間板内に超音波コントラスト法により遺伝子導入した。siRNA による特定遺伝子の発現抑制効果は 24 週間という長期間に認められた。この手法により椎間板変性の進行を抑制させることができる可能性が示唆された。続いて、椎間板の圧迫による変性モデルを作成し、X-P, MRI によりモデルの妥当性を証明した。次に、本変性モデルでは、圧迫群では、同化遺伝子群に比べ異化遺伝子群が上昇する不均衡が経時的に増大することが判明した。以上のことから異化遺伝子の発現上昇が椎間板変性の問題であることを明らかにした。

以上の研究結果から、超音波コントラスト法を用いて椎間板基質の合成を促進する増殖因子の遺伝子を変性椎間板内に注入すると同時に siRNA を組み込んだプラスミドを注入し、再生の促進と変性の抑制の相乗効果による変性椎間板の再生が可能になることを明

らかにした。この成果から治療遺伝子を用いた腰痛に対する低侵襲治療システムの構築が可能になると考えられる。

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 9 件)

- ①Yurube T, Nishida K, Doita M, 他 9 名. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 gene up-regulation in a rat tail compression loading-induced disc degeneration model. J Orthop Res, 2010, in press
- ②Suzuki T, Nishida K, Doita M, 他 5 名. Sustained long-term RNA interference in nucleus pulposus cells in vivo mediated by unmodified small interfering RNA. Eur Spine J. 2009 ;18(2):263-70.
- ③Nishida K, Doita M, 他 5 名. Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders. Eur Spine J. 2008 Suppl 4:459-466.
- ④Kaneyama S, Nishida K, Doita M, 他 5 名. Fas ligand expression on human nucleus pulposus cells decreases with disc degeneration processes. J Orthop Sci. 2008 Mar;13(2):130-5. Epub 2008
- ⑤西田康太郎, 前野耕一郎, 土井田稔, 他 3 名. 椎間板の免疫特権と腰痛との関係. 日本腰痛学会雑誌; 14(1); 50-57, 2008. (査読なし)
- ⑥西田康太郎, 土井田稔, 下村隆敏, 前野耕一郎, 他 2 名. 腰椎変性疾患に対する分子生物学的アプローチの現状と腰部脊柱管狭窄症治療の応用の可能性. 脊椎脊髄ジャーナル 21 巻 4 号; 309-315, 2008. (査読なし)
- ⑦西田康太郎, 角谷賢一郎, 土井田稔, 他 5 名. RNA干渉を介した椎間板内の特異的遺伝子に対する発現抑制 -超音波コントラスト法による椎間板への遺伝子導入の応用-. 日本整形外科学会雑誌; 1(7); 537-544, 2007. (査読あり)
- ⑧西田康太郎, 土井田稔, 角谷賢一郎, 他 3 名. 変性椎間板に対するアプローチ(遺伝子治療の観点から). 脊椎脊髄ジャーナル; 20(1); 12-20, 2007) 脊椎脊髄ジャーナル; 20(1); 12-20, 2007. (査読なし)
- ⑨Kakutani K, Nishida K, Doita M, 他 5 名. Prolonged Down Regulation of Specific Gene Expression in Nucleus Pulposus Cells Mediated by RNA interference in vitro. J Orthop Res, 24(6), 1271-1278, 2006

〔学会発表〕(計 13 件)

国際学会

①Yurube T, Nishida K, Doita M, 他 7 名.
Pathomechanism of disc degeneration in a rat-tail model: Long-term compression loading resulted in progressive imbalances between major catabolism and anabolic gene expression. 55th Orthopaedic Research Society Las Vegas, USA, 2.21-24, 2009

②Yurube T, Nishida K, Doita M, 他 5 名.
MMP-3 gene expression of static compression induced disc degeneration model in vivo. 35th International Society for the Study of the Lumbar Spine, Geneva, Switzerland, 5.26-31, 2008

③Takada T, Nishida K, Doita M, 他 3 名.
Macrophage infiltration into the disc induces IL-6 expression and correlates with mechanical hyperalgesia in the herniated disc model. 35th International Society for the Study of the Lumbar Spine, Geneva, Switzerland, 5.26-31, 2008

④Kaneyama S, Nishida K, Doita M, 他 5 名.
Loading force induced VEGF receptor upregulation and Fas ligand down-regulation in intervertebral disc -possible mechanisms of angiogenesis in disc degeneration. 34th International Society for the Study of the Lumbar Spine, Hong Kong, China, 6.10-14, 2007

⑤Kakutani K, Nishida K, Doita M, 他 6 名.
Prolonged RNA interference in nucleus pulposus cells could be due to lower cell proliferation activity and has a potential to be used for treatment of degenerative disc diseases. 33rd International Society for the Study of the Lumbar Spine, Bergen, Norway, 6.13-17, 2006

⑥Kakutani K, Nishida K, Doita M, 他 4 名.
Down regulation of specific gene expression in nucleus pulposus cells mediated by vector based RNA interference in vitro. 52nd Orthopaedic Research Society, Wasington, USA, 2.20-23, 2006

国内学会

①由留部崇, 西田康太郎, 前野耕一郎, 土井田稔, 他 5 名、持続的な圧負荷は椎間板髄核における異化・同化遺伝子群の不均衡を経時的に増大させる—ラット尾椎椎間板変性モデルを用いた椎間板変性機序の解明—、第 38 回日本脊椎脊髄病学会、神戸、2009 年 4 月 23 日-25 日

②由留部崇, 西田康太郎, 前野耕一郎, 土井田稔, 他 6 名、基質代謝関連遺伝子の発現変動からみた椎間板変性の機序—ラット椎間板静的圧迫モデルを用いた長期の検討—、

第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、2009 年 11.5-11.6

③鈴木哲平, 西田康太郎, 前野耕一郎, 土井田稔, 他 2 名、In vivo 椎間板への RNA 干渉を用いた内因性遺伝子に対する長期間の発現抑制の試み、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2009 年 10 月 23 日-24 日

④金山修一, 西田康太郎, 土井田稔, 他 3 名、ラット尾椎椎間板圧迫モデルにおける髄核での血管新生因子の発現と変化—変性椎間板における血管新生との関与について—、第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007 年 10 月 25 日-26 日

⑤鈴木哲平, 西田康太郎, 土井田稔, 他 3 名、siRNA を介した RNA 干渉による長期間の特異的遺伝子の発現抑制—超音波コントラスト法による椎間板内への in vivo 遺伝子導入の応用—、第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007 年 10 月 25 日-26 日

⑥西田 康太郎, 土井田 稔, 他 6 名、椎間板変性の病態の解明と治療にむけた試み—分子生物学的アプローチを用いて—、第 80 回日本整形外科学会学術総会、神戸、2007 年 5 月 24 日-27 日

⑦角谷賢一郎, 西田康太郎, 土井田稔, 他 6 名、RNA 干渉を椎間板変性研究に応用する試み、第 35 回日本脊椎脊髄病学会、東京、2006 年 4 月 21 日-22 日

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井田 稔 (DOITA MINORU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60237170

(2) 研究分担者

西田 康太郎 (NISHIDA KOTARO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00379372

前野 耕一郎 (MAENO KOICHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70403269