

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19595

研究課題名（和文）椎間板変性に起因した痛みと関連する血清中糖鎖の網羅的探索

研究課題名（英文）Global identification of glycosylation form related to pain due to intervertebral degeneration

研究代表者

須藤 英毅（Sudo, Hideki）

北海道大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：30374367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：椎間板は、体幹を支える脊柱の主要構成要素であり、その代表的疾病である椎間板性腰痛や椎間板ヘルニア等では、激しい腰痛や下肢痛によって自立した生活が困難となるが、痛みを客観的に評価する標準的手法自体は確立されていない。そこで本研究の目的は、痛みを糖鎖医学の観点から分析し、椎間板変性に起因した痛みと血清中N型糖鎖のプロファイル変化との関連性を網羅的に検討することである。方法としてウサギ椎間板に穿刺を行い、変性椎間板モデルを作製した。変性した椎間板組織と血清中糖鎖を網羅的に探索し正常組織及び血清と比較した。その結果、椎間板変性に伴う椎間板組織と血清のハイマンノース型N型糖鎖への糖鎖置換を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに椎間板を対象にした糖鎖研究の報告はなく、生体材料を用いた解析にも手法的限界があった。糖鎖は核酸や蛋白質と異なり増幅を行うことが不可能なため、小型動物組織などの少量の検体からは解析に必要な量を確保できないことも糖鎖研究の障害となっていた。

本研究は、N型糖鎖の改変という糖鎖医学的側面から椎間板変性に起因する痛みを明らかにしようとする点で従来の研究とは大きく異なる。今後は椎間板変性に起因した痛みと関連する血清中のマーカーが客観的数値として捉えることが可能になれば、痛み全般に関する病態解明や治療法に関しても今後の学術の方向を変え得る新しい研究分野が創設される可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Low back pain is a common debilitating condition which pathogenesis are poorly understood. We carried out an analysis of relationship between intervertebral disc degeneration and N-glycome in a sample of rabbit intervertebral disc and plasma. Using glycoblotting analysis, N-Glycan profiling was compared between normal and degenerated intervertebral disc. The specific N-glycan score was found to be significantly greater in degenerated intervertebral disc and plasma than in normal samples. These data provide a new insight into understanding the complex pathophysiology of low back pain related intervertebral disc degeneration and suggest glycan levels as a possible biomarker for injury/degeneration-related subtypes of low back pain.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板 糖鎖 痛み

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

椎間板は、体幹を支える脊柱の主要構成要素であり、その代表的疾病である椎間板性腰痛や椎間板ヘルニア等では、激しい腰痛や下肢痛によって自立した生活が困難となる。痛みの程度の評価には、視覚的アナログ尺度 (visual analogue scale: VAS) が多く用いられており主観的な感覚を数値化しているが、痛みを客観的に評価する標準的手法自体は確立されていない。そこでまず、椎間板変性に起因した痛みと関連する血清中のマーカー等が客観的数値として捉えることが可能になれば、痛み全般に関する病態解明や治療法に関しても、今後の学術の方向を大きく変え得る新しい研究分野が創設される可能性がある。

医学生物学分野において、核酸、蛋白質に続く第三の鎖状生命分子として糖鎖が注目されている。生体内の蛋白質は、半数以上が翻訳後修飾である糖鎖修飾により構造や機能を変化させている。例えば、血液型は赤血球表面の糖鎖構造の違いにより ABO 型に分類されており、細胞は癌化すると糖鎖構造に変化が生じる。蛋白質結合型糖鎖には、アスパラギン残基の窒素原子と結合する N 結合型糖鎖と、セリン/トレオニン残基に結合する O 結合型糖鎖があるが、特に N 型糖鎖は、細胞内シグナル伝達の調節などに関与しており、関節リウマチや変形性関節症においてそのプロファイルの変化が報告され、病態との関連性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、痛みを糖鎖医学の観点から分析し、我々が独自に開発したグライコプロッティング法を用いて椎間板変性に起因した痛みと血清中 N 型糖鎖のプロファイル変化との関連性を網羅的かつ定量的に検討することである。

3. 研究の方法

ウサギ椎間板変性モデルの作製

ウサギ椎間板変性モデルを作製し、モデル作成前後の血清及び変性椎間板と正常椎間板を用いて糖鎖プロファイル解析を実施した。

使用するウサギは、成体の日本白色家兔 (3.2-3.5kg, 20 週齢) であり、正常椎間板組織サンプルは未処置のウサギ 3 羽から採取した (n=10)。変性椎間板組織サンプルについては、ウサギ椎間板変性モデル 3 羽を作成して採取した (n=10)。モデル作成前と術後 4 週時の血清、及び、正常椎間板組織サンプルと変性椎間板組織サンプルを用いて糖鎖プロファイル解析を実施した。

ウサギ椎間板変性モデルの作成は、ウサギの椎体左側から X 線透視装置によるガイド下に 21G の穿刺針を用いて椎間板を穿刺し、経皮的に髄核を吸引した。髄核吸引は L1/2 から L4/5 の 4 椎間板に対して行い、術後 4 週で椎間板 (髄核、線維輪) を採取した。なお、モデル作成前と術後 4 週時の採血で得られた血液サンプルからは、血清を単離して分析に使用した。

グライコプロッティングと質量分析

血清サンプルについては、まず血清中のタンパクから酵素を用いて糖鎖を切離した。次に、糖鎖のみに存在するアルデヒド基をヒドラジド基を有する BlotGlyco H beads (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) で選択的に捕捉した。不純物を洗い流してから糖鎖のシアル酸残基をメチルエステル化した。その後、BOA で糖鎖を標識化してビーズから切離し、質量分析を行った。椎間板組織の取り扱いについては、髄核と線維輪の各々を細分化した後、プロテイナーゼ K (0.5 mg/ml) と共に 56 °C で 1 晩培養して糖鎖を遊離させ、以降は血清サンプルと同様の手順により実施した。

質量分析計は Ultraflex time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) を用いた。ピークの分析は FlexAnalysis v.3 (Bruker Daltonics) を使用した。内部標準物質は disialyloctasaccharide (Tokyo Chemical Industry) を使用し、糖鎖の構造の推定には GlycoMod Tool (<http://br.expasy.org/tools/glycomod/>) を使用した。

4. 研究成果

椎間板変性に伴う椎間板組織と血清のハイマンノース型 N 型糖鎖への糖鎖置換を世界で初めて

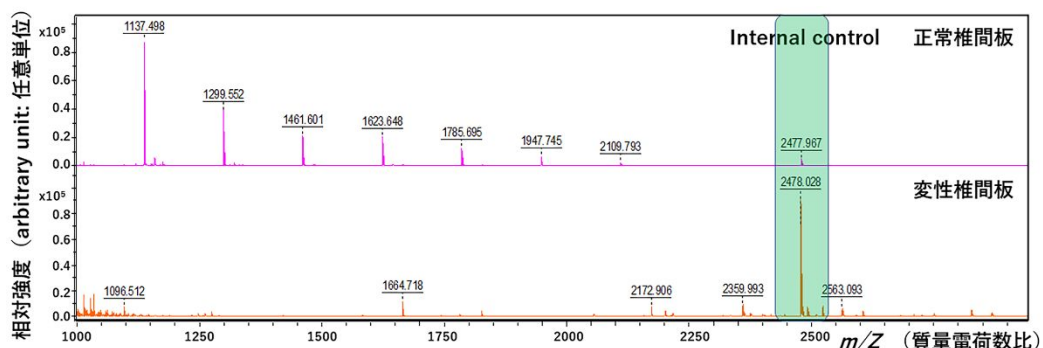


図 1. ウサギ変性椎間板における糖鎖置換

正常椎間板と変性椎間板では糖鎖ピークの違いがみられ、ハイマンノース型 N 型糖鎖への糖鎖置換を示している (ウサギ椎間板に針穿刺を行い変性を惹起させ、4 週後に変性椎間板から組織を採取)

明らかにした（図 1）。これまでに椎間板を対象にした糖鎖研究の報告はなく、生体材料を用いた解析にも手法的限界があった。糖鎖は核酸や蛋白質と異なり増幅を行うことが不可能なため、小型動物組織などの少量の検体からは解析に必要な量を確保できないことも糖鎖研究の障害となっていた。

本研究は、N型糖鎖の改変という糖鎖医学的側面から椎間板変性に起因する痛みを明らかにしようとする点で従来の研究とは大きく異なる。今後はヒト椎間板変性に起因した痛みと関連する血清中のマーカーが客観的数値として捉えることが可能になれば、痛み全般に関する病態解明や治療法に関しても今後の学術の方向を変え得る新しい研究分野が創設される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Ura K, Sudo H, Iwasaki K, Tsujimoto T, Ukeba D, Iwasaki N | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Effects of Intradiscal Injection of Local Anesthetics on Intervertebral Disc Degeneration in Rabbit Degenerated Intervertebral Disc | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Orthop Res | 6. 最初と最後の頁 1963-1971 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24347 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Ohnishi T, Yamada K, Iwasaki K, Tsujimoto T, Higashi H, Kimura T, Iwasaki N, Sudo H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Caspase-3 knockout inhibits intervertebral disc degeneration related to injury but accelerates degeneration related to aging. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 19324 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55709-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Katsuro Ura, Hideki Sudo, Daisuke Ukeba, Norimasa Iwasaki |
| 2. 発表標題 Is Discoblock Safe for Degenerated Intervertebral Discs? |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Ohnishi, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Takeru Tsujimoto, Norimasa Iwasaki |
| 2. 発表標題 The Role of the Caspase-3 Gene in Intervertebral Disc Degeneration Due to Injury and Aging: Analyses of Mechanisms |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|---|---|----|
| 研究 分担 者 | 西村 紳一郎 (Nishimura Shin-Ichiro) (00183898) | 北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101) | |