

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09594

研究課題名(和文) トロンビンによる椎間板変性メカニズムにおける新規制御因子の解析

研究課題名(英文) Novel Regulatory Factors of Intervertebral Disc Degeneration in the Mechanism by Thrombin

研究代表者

波呂 浩孝 (HARO, HIROTAKA)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10313264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：今までに椎間板変性や炎症惹起の起点を視点とした研究は少なく、メカニズムは未解明であった。本研究では、炎症活性化の原因因子の一つとしてトロンビンとPAR-1受容体の活性化システムを解明することを目的とした。研究成果として、1) マウス椎間板におけるトロンビン、TF、PAR1の発現を確認できた。2) トロンビン刺激にてMCP-1の産生促進され、このMCP1がマクロファージの遊走を促すことが分かった。3) 細胞内シグナルとしてpAKT、pP42/44が重要であることを突き止めた。4) トロンビン刺激によりMMP3が発現しこれが椎間板変性に関与している可能性を示せた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

椎間板変性は腰痛の原因の一つとして考えられているが、治療法は確立していない。本研究のテーマであるトロンビンをターゲットとした治療方法は全く新しい理論であり、手術治療の前段階である中間的治療となり、内服や点滴などの投与方法が可能となる。

抗トロンビン薬はFDAに認可されすでに市販されている薬剤であり、本邦でも多くの疾患(血栓症、急性冠症候群など)で使用経験があり、既存の使用量では一定の安全性が担保されている。既存の手術療法/局所注入療法は、施設基準によって脊椎疾患の専門施設に限局される。しかし、抗トロンビン療法は侵襲が低いだけでなく、広く一般の医療機関に安価に行える治療として期待される。

研究成果の概要(英文)：Until now, few studies have focused on the origin of intervertebral disc degeneration and inflammation induction from the viewpoint, and the mechanisms have not yet been elucidated. In this study, we aimed to elucidate the activation system of thrombin and PAR-1 receptors as one of the causative factors of inflammatory activation. Our findings include: 1) thrombin, TF, and PAR1 expression in mouse intervertebral discs was confirmed; 2) thrombin stimulation stimulates the production of MCP-1, which in turn promotes macrophage migration; 3) pAKT and pP42/44 are important as intracellular signals; and 4) thrombin and PAR-1 are involved in the activation of the PAR-1 receptor. 4) Thrombin stimulation induces MMP3 expression, which may be involved in intervertebral disc degeneration.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板変性 トロンビン MCP-1 PAR1 MMP3

## 1. 研究開始当初の背景

2016年厚生労働省国民生活基礎調査によると、腰痛の有訴率は男性1位(9.2%)、女性2位(11.6%)であり、通院者率は4位(4.1%)に上る。また、要支援者の原因の最多は運動器障害(22.3%)である。本邦は長寿国として知られるが、健康寿命と生命寿命との解離は男性9.1年、女性12.7年と高齢者の要介護の需要が増加している。腰痛による運動器障害を軽減し、健康格差を縮小して健康寿命を延伸することは急務である。これまで、椎間板変性による炎症や知覚神経侵入が腰痛の原因の1つであり(Miyagi M:Spine 2014)、当該椎間板治療が腰痛の軽減をもたらすことが報告された(Ohtori S:Spine 2009)。

正常椎間板は本来血管が存在せず、軟骨の基質が主な構成成分となっている。そのため、正常椎間板が変性する過程でどのような炎症が起こり進展していくのかは未解明である。その問題点を解決する糸口として、我々を含む国内外の複数のグループより、変性椎間板において線維輪(AF)に血管浸潤が起こることが報告された(van Uden S et al. Biomater Res 2017, Huang YC et al, Nat Rev Rheumatol 2014)。さらに我々は椎間板ヘルニア患者に自然退縮をみることをMRIで明らかにし、造影剤を使用したMRIで増強効果をみる症例は退縮率が高いことを報告した。椎間板ヘルニアの手術検体には多数のマクロファージを中心とした炎症性細胞の浸潤を認めた。また、マウス椎間板に炎症サイトカインによる刺激を与えることで、VEGFの産生を増加させ、血管新生が促されることを明らかにした(J Orthop Res、2009)。一方、椎間板変性のメカニズムは未解明である。炎症惹起のサイトカインとしてTNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6が、血管新生のサイトカインとしてVEGF、PDGFなどが報告されているが、それぞれの報告は独立しており、相互関係は未解明である。

そこで、我々は、炎症と血管新生を同時に誘導するサイトカインとしてトロンピンに注目し、トロンピン分子が炎症のイニシエーターとして作用することを報告した。1)トロンピンによって炎症が惹起され、凝固亢進状態となり腫瘍細胞の転移が促進することを骨肉腫モデルで明らかにした(Cancer、2012, J Bone Miner Res、2018)、2)骨折後の炎症ではトロンピンが骨芽細胞に作用し、マクロファージを骨折部に遊走させ治癒を早めていること(Bone、2016)を解明した。

組織因子(TF)は生理的な血液凝固カスケードの開始分子であり、トロンピンを産生する。白血球は通常の末梢血ではTFを発現しない。しかし、単球・マクロファージ系細胞は炎症刺激下で活性化されTFを発現する。そのTFがトロンピンを産生し、凝固反応を誘導する。VEGFは血管透過性を亢進させ、さらに血管内皮細胞でのTFの発現を増加する。

## 2. 研究の目的

椎間板変性は腰痛の原因の一つとして考えられているが、治療法は確立していない。本研究のテーマであるトロンピンをターゲットとした治療方法は全く新しい理論であり、手術治療の前段階である中間的治療となり、内服や点滴などの投与方法が可能となる。

抗トロンピン薬(アンチトロンピン III、プラザキサ®)はFDAに認可されすでに市販されている薬剤であり、本邦でも多くの疾患(血栓症、急性冠症候群など)で使用経験があり、既存の使用量では一定の安全性が担保されている。既存の手術療法/局所注入療法は、施設基準によって脊椎疾患の専門施設に限局される。しかし、抗トロンピン療法は侵襲が低だけでなく、広く一般の医療機関に安価に行える治療として期待される。

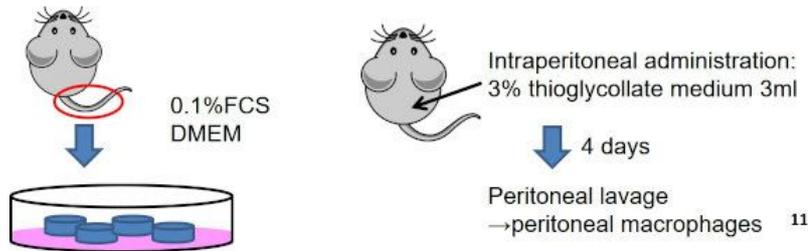
これまで椎間板変性における多数の研究が報告されている。しかし、椎間板変性や炎症惹起の

起点を視点とした研究はなく、メカニズムは未解明である。本研究では、その原因論ともいうべき炎症活性化の原因因子の1つとしてトロンピンと PAR-1 受容体の活性化システムを解明し、その延長上にある抗サイトカイン療法を確立し、根治的椎間板変性治療への応用を目標とした。

### 3. 研究の方法

マウス椎間板を顕微鏡下に摘出し、専用培養器にて組織培養を行う

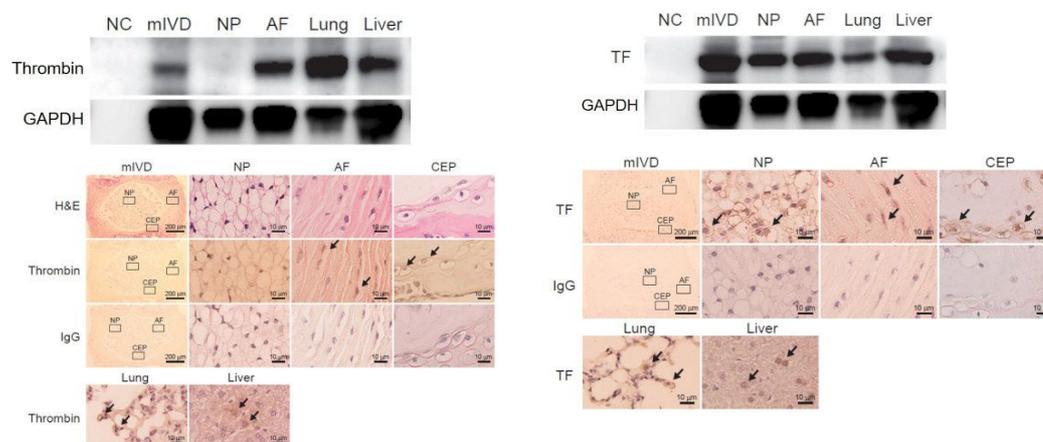
マウスマクロファージは、チオグリコレートで刺激した腹腔マクロファージを回収する



- 1) マウス椎間板におけるトロンピンおよび TF の発現をウエスタンブロッティング法および、病理学的検討を行った
- 2) トロンピンの受容体である PAR1 が各臓器、および椎間板での発現を PCR、ウエスタンブロッティング法および、病理学的検討を行った
- 3) 椎間板へのトロンピンの刺激にて、どのようなサイトカインが産生されるかをサイトカインプロテインアレイで同定する。そのサイトカインを PCR、ウエスタンブロッティング法、ELISA 法で定量した
- 4) トロンピン刺激により産生されるサイトカイン (MCP-1) がマクロファージの遊走を促進するかをマイグレーションアッセイによって確認した
- 5) トロンピン刺激の椎間板における細胞内シグナルをウエスタンブロッティング法で確認し、この経路の阻害が MCP-1 の産生を抑制するかを ELISA で確認した
- 6) トロンピン刺激により実際に椎間板に変性を起こしうるかを確認し、その原因サイトカインの検討をする

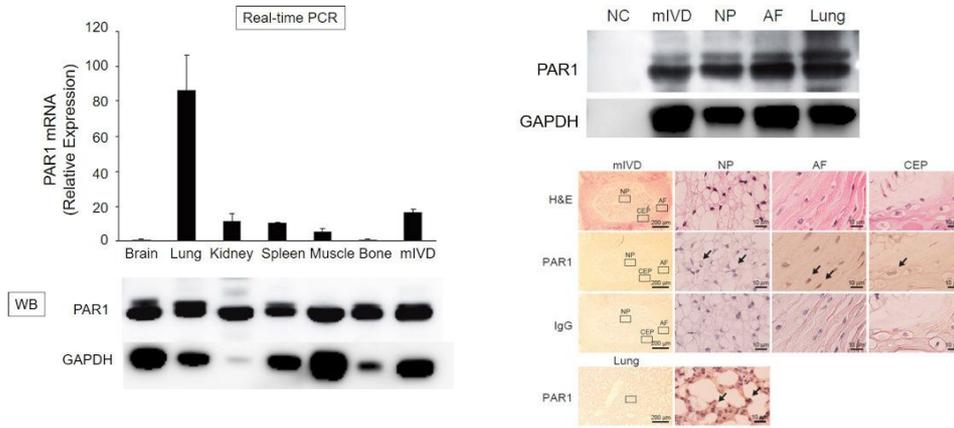
### 4. 研究成果

- 1) マウス椎間板におけるトロンピンおよび TF の発現確認



トロンピンは椎間板の線維輪 (AF) に発現し、TF は髄核 (NP) \ AF とともに発現する

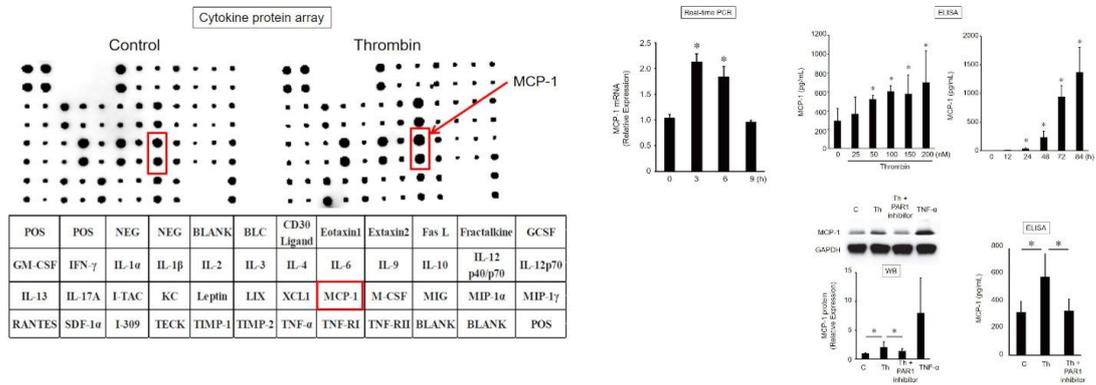
## 2) マウス椎間板におけるトロンピン受容体 (PAR-1) の発現確認



PAR-1 は各臓器に比較しても椎間板に発現がみられる

PAR-1 は椎間板のNP、AFともに発現する

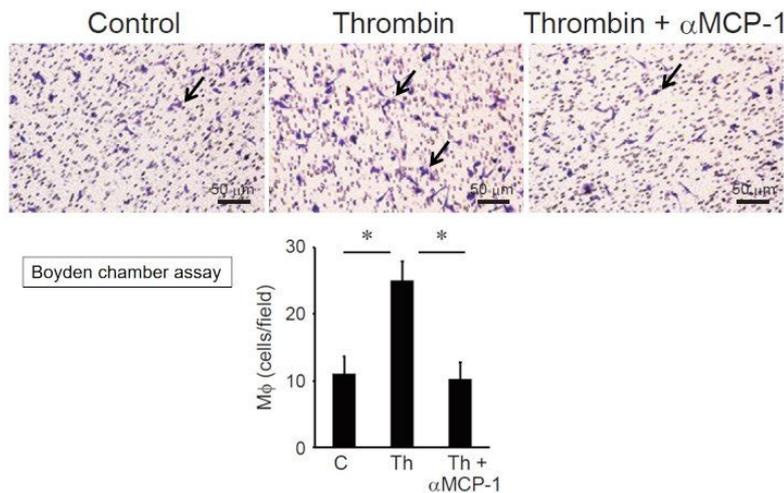
## 3) トロンピン刺激による椎間板からのサイトカイン産生を確認する



椎間板へのトロンピン刺激にて MCP-1 の産生が有意に増加していた

トロンピン受容体である PAR-1 をブロックすることによりこの産生は抑制された

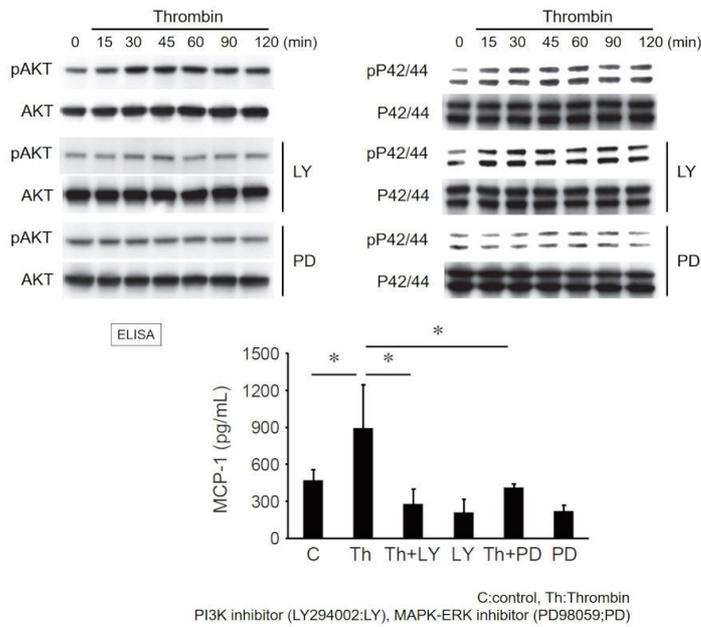
## 4) 椎間板から産生されたマクロファージの遊走



椎間板から産生された MCP-1 はマクロファージの遊走を促進させた

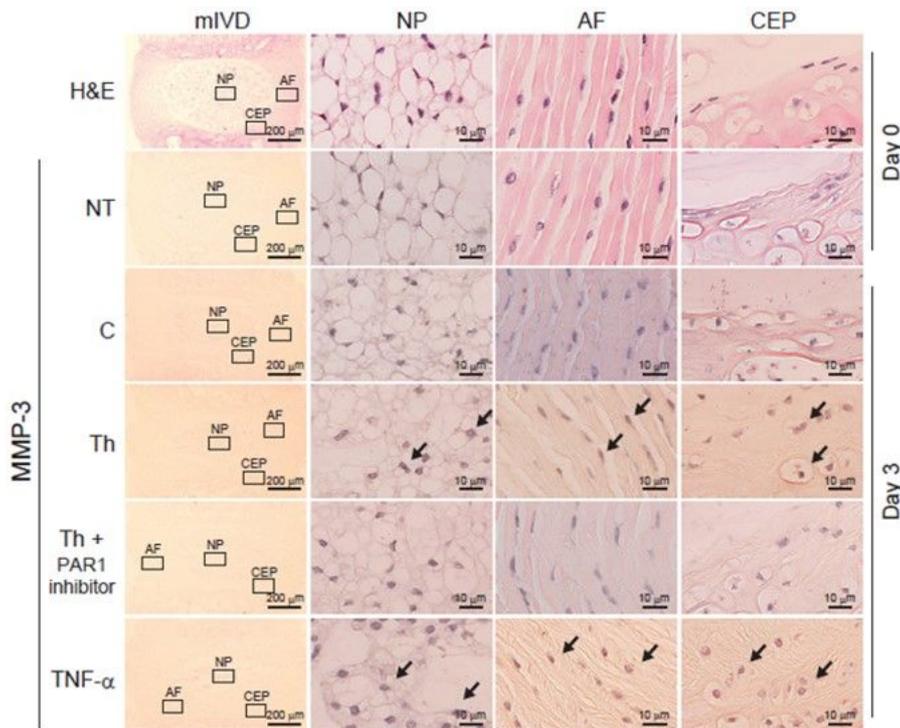
このマクロファージの遊走は MCP-1 の中和抗体によって抑制された

### 5) トロンビン刺激による椎間板の細胞内シグナルの確認



トロンビン刺激により、pAKT と pP42/44 の経路が活性化された  
各阻害薬の実験により、pAKT がより上流であることが示唆される  
pAKT, pP42/44 の両者の活性化が MCP-1 の産生に關与している

### 6) トロンビン刺激による椎間板変性の確認



トロンビン刺激により、培養マウス椎間板は変性した  
トロンビン刺激により、MMP3 が産生された  
この MMP3 産生は PAR1 阻害薬により抑制された  
トロンビン刺激により産生された MMP3 の椎間板変性への關与が示唆された

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kameyama Keigo, Ohba Tetsuro, Endo Tomoka, Katsu Marina, Koji Fujita, Kensuke Koyama, Oda Kotaro, Tanaka Nobuki, Haro Hirotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Radiological Assessment of Postoperative Paraspinal Muscle Changes After Lumbar Interbody Fusion With or Without Minimally Invasive Techniques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Global Spine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2192568221994794	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 Ohba Tetsuro, Akaike Hiroshi, Fujita Koji, Oda Kotaro, Tanaka Nobuki, Tomokazu Matsuoka, Sakurai Daiju, Haro Hirotaka	4. 巻 5
2. 論文標題 Risk Factors and Assessment Using an Endoscopic Scoring System for Postoperative Respiratory Complications after Anterior Cervical Decompression and Fusion Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine Surgery and Related Research	6. 最初と最後の頁 10~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22603/ssrr.2020-0104	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 Inose Hiroyuki, Kato Tsuyoshi, Ichimura Shoichi, Nakamura Hiroaki, Hoshino Masatoshi, Togawa Daisuke, Hirano Toru, Tokuhashi Yasuaki, Ohba Tetsuro, Haro Hirotaka, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Risk factors for subsequent vertebral fracture after acute osteoporotic vertebral fractures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Spine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00586-021-06741-3	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 Banno Tomohiro, Yamato Yu, Oba Hiroki, Ohba Tetsuro, Hasegawa Tomohiko, Yoshida Go, Arima Hideyuki, Oe Shin, Mihara Yuki, Ushirozako Hiroki, Takahashi Jun, Haro Hirotaka, Matsuyama Yukihiro	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Preoperative Thoracic Curve Magnitude and L4 end Vertebra were Risk Factors for Subjacent Disc Wedging after Selective Thoracolumbar/Lumbar Fusion with L3 as the Lowest Instrumented Vertebra in Lenke type 5 Curve Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/BRS.0000000000003961	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 Ohba Tetsuro, Koyama Kensuke, Oba Hiroki, Oda Kotaro, Tanaka Nobuki, Haro Hirotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical Importance, Incidence and Risk Factors for the Development of Postoperative Ileus Following Adult Spinal Deformity Surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Global Spine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2192568220976562	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 波呂浩孝	4. 巻 32
2. 論文標題 腰椎椎間板ヘルニアに対する化学的融解術 ヒトリコンピナントMMP-7の臨床応用に向けて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脊椎脊髄ジャーナル	6. 最初と最後の頁 1053-1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.5002201278	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hirotaka Haro
2. 発表標題 Chemonucleolysis with Recombinant Human MMP-7
3. 学会等名 34TH Annual Meeting of North American Spine Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotaka Haro
2. 発表標題 Strategy for treatment of osteoporosis associated with spinal disorders
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of Taiwan Spine Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波呂浩孝
2. 発表標題 事上磨練 - ask what you can do for spinal disorders-
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学大学院整形外科科学講座 <a href="https://yamanashi-orthop.com/">https://yamanashi-orthop.com/</a> <a href="https://yamanashi-orthop.com/">https://yamanashi-orthop.com/</a>
---

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	安藤 隆  (ANDO TAKASHI)  (10377492)	山梨大学・大学院総合研究部・講師   (13501)	
研究分担者	小山 勝弘  (KOYAMA KATSUHIRO)  (30313779)	山梨大学・大学院総合研究部・教授   (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------