

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15998

研究課題名（和文）Wnt阻害因子を用いた椎間板変性に対する予防的治療の樹立

研究課題名（英文）Development of prophylactic treatment for disc degeneration using the Wnt inhibitory factor.

研究代表者

岩田 宗峻（IWATA, MUNETAKA）

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30815626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：椎間板髄核の変性は、疼痛や運動機能障害の原因となり生活の質を低下させる要因となる。ダックスフンドやビーグル犬などに代表される軟骨異栄養性犬種では、若くして脊索細胞が消失し、軟骨細胞様細胞に置き換わる。この点がヒトの椎間板髄核と類似していることから、椎間板髄核変性の研究におけるモデル動物として認識されている。しかしながら髄核変性の病態については不明な点が多い。我々は以前に、軟骨異栄養性犬種の逸脱髄核においてWnt inhibitory factor-1（Wif-1）のmRNA発現が低下することを確認した。本研究では逸脱髄核においてWif-1タンパクの発現が低下する傾向にあることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、軟骨異栄養性犬種の椎間板髄核組織においてWif-1タンパクが発現し、さらに変性に関与している可能性が示唆された。このことは、椎間板変性に対する予防的治療の開発への最初の手掛かりになったと考える。ただし、本研究ではサンプル数や抗原抗体反応の結果に課題を残したため、より精度の高い解析を実施する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Intervertebral disc degeneration (IVDD) greatly affects the quality of life. The nucleus pulposus (NP) of chondrodystrophic dog breeds (CDBs) is similar to the human NP because the cells disappear with age and are replaced by fibrochondrocyte-like cells. Because IVDD develops as early as within the first year of life, we used canines as a model to investigate the in vitro mechanisms underlying IVDD. The mechanism underlying age-related IVDD, however, is poorly understood. We investigated that the Wnt inhibitory factor-1 (Wif-1) expression in healthy and degenerated canine NP tissues. In this study, we found that while the expression of Wif-1 protein was upregulated in degenerated NP tissues, it was downregulated in herniated NP tissues.

研究分野：整形外科科学

キーワード：椎間板髄核変性 椎間板ヘルニア 軟骨異栄養性犬種 Wnt inhibitory factor -catenin

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、軟骨異栄養性犬種 (CDB: Chondrodystrophic Breeds) の椎間板髄核変性に Wnt/ β -catenin signal pathway の活性化と、Wnt のアンタゴニストである Wnt 阻害因子の発現が関連することを見出した。椎間板ヘルニアは、椎間板髄核の変性に起因する疾患であり、骨・関節疾患の中で最も発症頻度の高い疾患のひとつである。椎間板ヘルニアによる背部痛および脊髄障害は、運動機能障害および感覚障害を引き起こし QOL の低下を招くため、髄核変性の原因解明は医学および獣医学領域において重要視されている。近年、髄核変性の病態生理に関する研究は多くなされており、様々な情報が得られるようになったが、髄核変性を阻害する方法は未だ確立されていない。それゆえ治療対象となるのは椎間板ヘルニアを発症した場合のみであるが、軽度の椎間板ヘルニアであると、神経痛や麻痺が存在しても外科的治療が適用とならず、かつ内科療法では症状が改善しない。一方、重度の椎間板ヘルニアでは外科的治療後に麻痺が残存することがある。持続する疼痛と運動機能障害により QOL が著しく低下したままの生活を強いられる患者が多数存在することから、椎間板ヘルニアの発症を未然に防ぐべく椎間板変性に対する予防的治療方法の開発が急務である。椎間板ヘルニアはヒトだけでなくイヌにおいても臨床上問題となることが半世紀ほど前から知られている。近年の獣医療の発展に伴い、イヌの長寿化が進んだことにより動物病院で治療を受ける症例が急増している。イヌのなかでも特に、ミニチュアダックスフンド、ビーグルおよびフレンチブルドッグなどに代表される CDB は好発犬種である。CDB では椎間板髄核を構成する脊索細胞が 1 歳以下で消失するとされ、プロテオグリカン産生量が低下し、髄核基質の恒常性が失われ髄核変性が早期に開始する。同様の变化はヒトと羊でのみ確認されることから、髄核変性の研究において CDB や羊がモデル動物として選択されることが多い。ヒトの髄核変性には Wnt が関連することが知られており、申請者は CDB の椎間板髄核変性にも Wnt が関連することを明らかにした。変性過程にある CDB の髄核内では Wnt/ β -catenin signal pathway が活性化しており、Wnt のアンタゴニストである Wnt inhibitory factor (Wif-1) の発現量も増加していた。一方、椎間板ヘルニアとして逸脱した髄核内では Wif-1 の発現が低下していたことから、なんらかの理由により Wif-1 の発現量が低下することにより逸脱 (椎間板ヘルニア) が生じると考えた。以上から髄核変性に関わる Wif-1 の分子生物学的機構をさらに解明し、Wif-1 を用いた椎間板変性に対する予防的治療戦略の基盤を構築したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では CDB を自然発生型の椎間板変性モデル動物と位置付け、Wnt 阻害因子を用いた椎間板ヘルニアに対する予防的治療の樹立を目指すための、研究基盤を確立することを目的とした。

本研究では Wif-1 の Wnt/ β -catenin signal pathway 阻害作用について基礎的研究を行い、Wif-1 タンパクを利用した椎間板ヘルニアの予防的治療の開発を目指した。

まずは CDB の椎間板髄核における Wif-1 タンパクの発現の有無を評価するべく病理学的解析を実施した。

3. 研究の方法

临床上健康なビーグル犬より非変性髄核組織および変性髄核組織を採取し、椎間板ヘルニア症例から逸脱髄核組織を採取した。ビーグル犬は他の実験でいずれも事前に MRI の撮像を実施した。採取した組織は 4% パラホルムアルデヒド溶液に浸漬し固定後、PBS で洗浄し、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックを作成し、5 μ m の厚さに薄切し切片を作成した。病理組織学的解析 (H-E 染色、サフラニン O 染色) および免疫組織学的解析により、変性の程度と Wif-1 蛋白陽性細胞数を評価した。

4. 研究成果

ビーグル犬より採取した非変性および変性髄核は75サンプル(n=10)、臨床症例より採取した逸脱髄核は34サンプル(n=34)であった。

CDB 由来の髄核組織でも Wif-1 蛋白が産生されていることが確認された。細胞質および核が染色され、変性髄核では非変性髄核と比較し、Wif-1 タンパク陽性細胞数が減少する傾向が確認された。免疫組織学的解析においてはアイソタイプコントロールの条件設定について改善する必要があり、今後サンプル数を増やす必要がある。また変性の程度の異なる髄核における陽性細胞数を比較することで、変性過程における Wif-1 発現の変化を評価する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------