

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18464

研究課題名（和文）成長因子GDF6の椎間板における役割の解明と椎間板変性に対する治療アプローチ

研究課題名（英文）The effect of Growth differentiation factor 6 on the intervertebral disc degeneration

研究代表者

宮崎 真吾（MIYAZAKI, SHINGO）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40824173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腰痛は生涯罹患率が約80%と報告されており、我が国において有訴率が最も多い疾患である。

医療費の高騰を招くのみならず、患者の社会参加を妨げることによる経済損失も莫大である。このため早急に解決すべき世界的な健康問題といえる。椎間板変性は腰痛の主たる危険因子とされ、腰痛のうち椎間板性疼痛由来のものが約40%占めるとされている。我々は成長因子であるGDF6に注目し椎間板変性に対する投薬治療の可能性を見出すことを目的とし実験を行った。GDF6が椎間板細胞に対する同化因子の発現低下を抑制し、炎症性サイトカインの発現を低下させることを証明し、椎間板髄核細胞保護作用で変性の抑制に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状では椎間板変性に対する治療は確立されておらず、鎮痛剤などの投薬治療に加え、椎間板を切除して固定するなどの、本来の椎間板の機能を犠牲にした外科的治療に頼らざるを得ない。現在では椎間板変性に対する遺伝子導入や幹細胞移植、成長因子の投与などの様々な生物学的療法の研究が行われている。しかしながら実臨床への使用承認を得た治療はまだ数少ない。本研究によりGDF6の椎間板内投与による椎間板変性抑制効果、椎間板性疼痛抑制効果が実証された。実臨床に応用することができれば腰痛患者の減少とそれに伴い社会経済的な側面で有意義な治療になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Lower back pain is experienced by 80% of adults, notably affecting the global workforce owing to disability which increases the socioeconomic burden. Lower back pain can be caused by multiple factors, including intervertebral disc (IVD) degeneration. We hypothesized that the co-administration of GDF-6 would decelerate IVD degeneration. The objective of this study was to elucidate the anabolic and anti-inflammatory effects of GDF-6 on human IVD NP cells and synergistic effects of GDF-6 and AC for decelerating IVD disruption on rat tail IVD tissues in an in vivo animal model. The protective effects of GDF-6 on IVDs have been reported, there have been no reports evaluating the effects of GDF-6 under inflammatory conditions in vitro, simulating IVD degeneration in vivo, and actually examining these effects in an in vivo degeneration model. Thus, this study has a high novelty with consistent results in vitro and in vivo.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板性疼痛 椎間板変性 成長因子 炎症性サイトカイン 細胞外基質合成 GDF6

1. 研究開始当初の背景

腰痛は生涯罹患率が約 80%と報告されており、我が国において有訴率が最も多い疾患である。医療費の高騰を招くのみならず、患者の社会参加を妨げることによる経済損失も莫大であり、米国では年間約 10 兆円の労働生産力が損失している。このため早急に解決すべき世界的な健康問題といえる。椎間板変性は腰痛の主たる危険因子とされ、腰痛のうち椎間板性疼痛由来のものが約 40%占めるとされている。近年腰痛治療の最先端として椎間板が注目されている。椎間板変性の機序や腰痛を生じる病態のさらなる解明とそれに基づいた椎間板機能を温存可能とする低侵襲治療の開発が強く望まれおり、遺伝子導入や幹細胞移植、成長因子の投与などの様々な生物学的療法の有効性が日々研究されている。椎間板は中心に位置する髄核、周囲を囲む線維輪、これらと脊椎椎体を隔てる軟骨終板で構成される特殊な構造の組織である。結果、椎間板髄核は人体最大の無血管組織であり、栄養供給の大部分は軟骨終板を介した椎体からの拡散に頼ることになる。そのため、加齢などに伴う軟骨終板の硬化、石灰化により容易に栄養不足に陥り、細胞外基質代謝の不均衡、椎間板細胞死さらには椎間板変性を引き起こす。椎間板の細胞外基質代謝においてプロテオグリカンやコラーゲンなどの同化促進因子には成長因子が、異化促進因子には炎症性サイトカイン、基質分解酵素などが関与している。つまり変性椎間板において基質代謝バランスは異化優位の状態となっている。このため成長因子投与の治療コンセプトはこの基質代謝不均衡を異化優位から同化優位の状態に是正することにある。成長因子は血液や滑液など生体内から発現しており、細胞増殖や細胞分化、細胞外基質合成などの生物学的活性を持っている。その性質から考え、遺伝子導入、幹細胞移植などと比較すると倫理的にも問題が少なく、投与手技も比較的容易であることなどがこの治療の長所と考えられている。1990 年代から、TGF- β 、IGF-1、BMP2、GDF5、PRP などの様々な成長因子の椎間板細胞、細胞外基質代謝に与える良好な影響が *in vitro* 実験で報告され、さらにこれらの影響がもたらす椎間板変性抑制効果についても、マウス、ラット、シープ、ラビットなどの様々な動物を使用した *in vivo* 実験でも報告されている。しかしながら現在までに臨床現場での使用承認を受けた成長因子はない。我々は GDF6 の椎間板変性、椎間板性疼痛に対する効果を検討する研究を行ってきた。GDF6 は Bone morphogenetic proteins (BMP) ファミリー (BMP13) に属し、骨、軟骨組織の分化に重要な役割を果たしている事が知られている。さらにはヒト椎間板髄核細胞、線維輪細胞、軟骨終板にも発現しており、プロテオグリカン、コラーゲンなどの細胞外基質合成や椎間板細胞増殖に関与していると報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記学術的背景を基盤とし、我々の今までの研究成果から導き出された結果を土台として、GDF6 の臨床応用を目指し、ヒト椎間板細胞における変性度別の発現度の解明と GDF6 投与がヒト椎間板細胞、細胞外基質代謝に与える影響を検討すること、また GDF6 とスキャフォールド (アテロコラーゲン) を併用した治療の可能性について検討することである。

3. 研究の方法

(*in vitro*)

10 から 70 歳代患者の椎間板摘出術および椎体間固定術の術中に採取された椎間板細胞からタンパク質を抽出し、年齢、Pfirrmann 分類による変性度別 (Grade 2、3、4) の GDF6 の発現をウェスタンブロット (WB) 法にて比較検討した。また、変性度毎に分類したヒト椎間板髄核細胞への GDF6 の投与効果を検証すべく、単層培地で椎間板髄核細胞を培養後に三次元培地 (Tapered Soft Stencil for Cluster Culture) へ 1.0×10^6 個/TASCL ずつ播種し、細胞塊を形成し、48 時間後に GDF6 (G 群、100 ng/ml) または炎症刺激として IL-1 (I 群、10 ng/ml) を投与した。さらに 48 時間後に細胞塊を回収、細胞外基質代謝と炎症性サイトカインを蛍光免疫染色と PCR で評価し、Control (C) 群、G 群、I 群、G+I 群の 4 群比較を行った。

(*in vivo*)

ラット尾椎を 20G 針で穿刺して変性椎間板モデル (P 群) を作製し、穿刺後アテロコラーゲン (AC) 2 μ L を投与した AC 群、AC と GDF6 20 μ g 投与した G+AC 群、Control (C 群) の 4 群間で穿刺後 14 日と 28 日の椎間板高と椎間板変性度および蛍光免疫染色法を用いて髄核細胞同化因子である aggrecan、Type collagen、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 について発現を比較した。

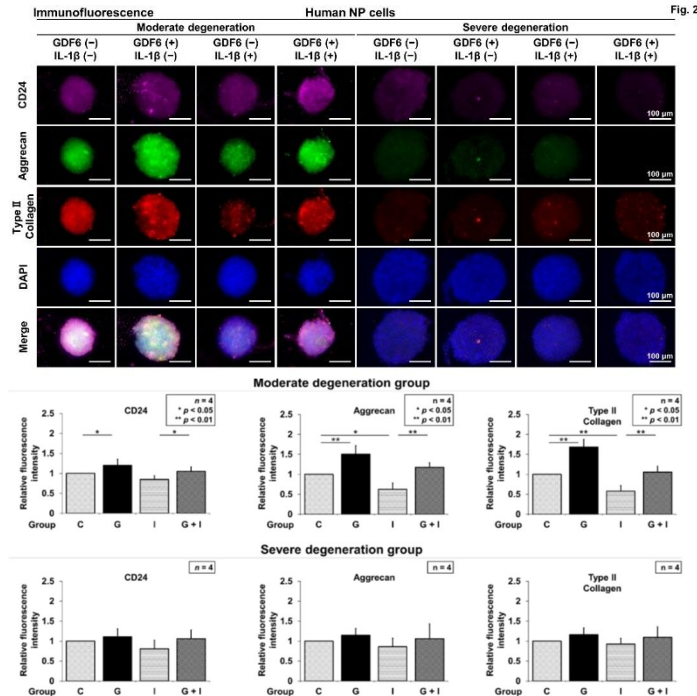
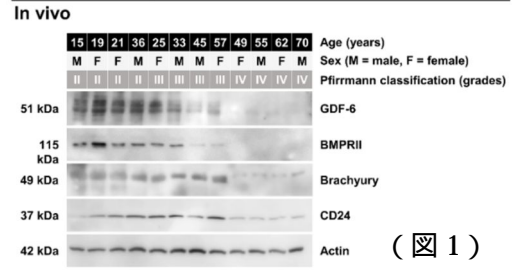
4. 研究成果

(*in vitro*)

WB 法で GDF6 の発現度は年齢と変性度が進むにつれ低下する傾向にあった。(図 1)

蛍光免疫染色では Pfirrmann Grade 2、3 の G 群で C 群と比較して aggrecan、Type collagen の発現の亢進を認めたが、Grade 4 では G と C 群間に差を認めなかった。PCR でも同様に Grade 2、3 の G 群で C 群と比較して aggrecan、Type collagen の発現亢進を認めたが、Grade 4 では G と C 群間に差を認めなかった。さらに PCR では Grade 2、3 の I 群と比較して G+I 群で IL-6、TNF- α 、MMP-3、ADAMTS-4 の発現が減少していたが、Grade 4 では I と G+I 群間に差を認めなかった。(図 2)

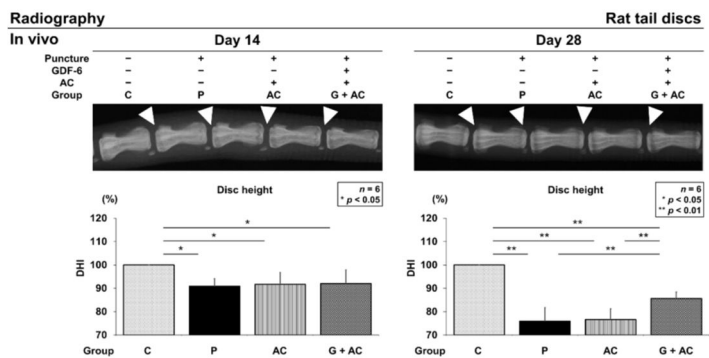
Western blotting Human IVD NP tissues



(in vivo)

P、AC、G+AC 群とも穿刺後 14、28 日で C 群と比較して有意に椎間板高は低下したが、G+AC 群では穿刺後 28 日で P、AC 群と比較して有意に椎間板高は高値であった。

同様に P、AC、G+AC 群とも穿刺後 14、28 日で C 群と比較して椎間板変性の進行を認めたが、G 群では穿刺後 28 日で P、AC 群と比較して有意に椎間板変性の進行抑制を認めた。(図 3)



蛍光免疫染色法で aggrecan、Type collagen の発現度は穿刺後 14 日では 4 群間で有意差を認めなかった。穿刺後 28 日では P、AC、G+AC 群とも C 群と比較して有意に低下していたが、G+AC 群は P、AC 群と比較して有意に高値であった。TNF- α 、IL-6 の発現は穿刺後 14 日では P、AC 群が C 群と比較して有意に高値であったが、G+AC 群は C 群と比較して有意差を認めなかった。穿刺後 28 日では P、AC、G+AC 群とも C 群と比較して有意に高値であったが、G+AC 群は P、AC 群と比較して有意に低値であった。

加齢・変性により椎間板での GDF6 発現は減少する。また、三次元培養下に若年で変性度の低い髄核細胞に GDF6 を投与することで細胞外基質の発現亢進と炎症性サイトカインの低下を認めた。動物実験においてはラット尾椎を用いた椎間板変性モデルにおいて椎間板高の低下および変性の進行を抑制した。また GDF6 は椎間板変性による同化因子の発現低下を抑制し、炎症性サイトカインの発現を低下させた。GDF6 の椎間板髄核細胞保護作用は変性の抑制に繋がる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Miyazaki Kunihiko, Miyazaki Shingo, Yurube Takashi, Takeoka Yoshiki, Kanda Yutaro, Zhang Zhongying, Kakiuchi Yuji, Tsujimoto Ryu, Ohnishi Hiroki, Matsuo Tomoya, Ryu Masao, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Protective Effects of Growth Differentiation Factor-6 on the Intervertebral Disc: An In Vitro and In Vivo Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11071174	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 宮崎 邦彦、宮崎 真吾
2. 発表標題 三次元培地を用いた成長因子Growth differentiation factor 6 (GDF6) 投与による椎間板細胞に与える影響の検討
3. 学会等名 脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 邦彦、宮崎 真吾
2. 発表標題 Efficacy of growth differentiation factor-6 on three-dimensionally cultured human intervertebral disc cells and a rat tail puncture model
3. 学会等名 The International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 邦彦、宮崎 真吾
2. 発表標題 Efficacy of growth differentiation factor-6 on three-dimensionally cultured human intervertebral disc cells and a rat tail puncture model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎邦彦、宮崎真吾
2. 発表標題 三次元培地を用いた成長因子Growth differentiation factor 6投与がヒト椎間板細胞に与える影響の検討
3. 学会等名 第50回脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎邦彦、宮崎真吾
2. 発表標題 Efficacy of growth differentiation factor-6 on three-dimensionally cultured human intervertebral disc cells and a rat tail puncture model
3. 学会等名 48th ISSLS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎邦彦、宮崎真吾
2. 発表標題 成長因子growth differentiation factor - 6(GDF6)がヒト椎間板細胞に与える影響について
3. 学会等名 第35回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎邦彦、宮崎真吾
2. 発表標題 The efficacy of growth differentiation factor-6 on the three-dimensionally cultured human Intervertebral disc cells and rat caudal disc model
3. 学会等名 ORS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎邦彦、宮崎真吾
2. 発表標題 三次元培地を用いた成長因子Growth differentiation factor 6投与がヒト椎間板細胞に与える影響の検討
3. 学会等名 第49回脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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