

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591743

研究課題名 (和文) 酸化ストレス制御による椎間板のアンチエイジング

研究課題名 (英文) Antiaging of intervertebral disc by controlling oxidative stress

研究代表者

田中 信弘 (TANAKA NOBUHIHO)

広島大学・病院・助教

研究者番号：20363062

研究成果の概要 (和文)：

椎間板変性の進行抑制につき、抗酸化ストレス物質である Heme oxygenase-1 (HO-1) を高発現する Bach1 ノックアウトマウスの椎間板変性モデルを用いて研究を行った。Wild type マウスと比較し、Bach1 ノックアウトマウスでは組織学的に椎間板変性の進行が抑制されており、HO-1 も高発現していた。このことから、酸化ストレスを抑制することで椎間板変性の進行が抑制できることを示し、椎間板変性に対する新しい治療法を提示した。

研究成果の概要 (英文)：

We studied to repress the progression of intervertebral disc degeneration using intervertebral disc degeneration model of Bach1 deficient mice, which highly express Heme oxygenase-1 (HO-1) that is anti-oxidant material. To compared with Wild type mice, the histological progression of intervertebral disc degeneration was repressed in Bach1 deficient mice, and they highly expressed HO-1. The result showed that inhibiting oxidative stress can repress the progression of intervertebral disc degeneration, and new therapeutic method to intervertebral disc degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：老化・椎間板変性・酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 椎間板変性は、加齢や外傷、ストレス、遺伝的要素により発生し、腰痛症や椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症などの社会的損失の大きな退行性脊椎疾患の発症に大きく関与している。これら退行性脊椎疾患は、その有病率の高さと就業年齢層に多く発症するという特性から、社会的にも大きな問題となっている。社会的損失が非常に大きなこれら

の疾患に対して変性椎間板を直接治療する方法は未だ存在せず、椎間板変性の抑制や再生を促す方法を、早急に医療へ応用することが期待されている。

(2) 椎間板は、椎体と椎体を連結して椎体間に可動性と支持性を与え、力学的負荷に対する緩衝材としての機能を併せ持つ組織である。椎間板は I 型・II 型コラーゲンの層状構造からなる線維輪と、主にプロテオグリカン

からなる髄核から形成されており、髄核におけるプロテオグリカンと水分の減少とそれに続く椎間板内圧の減少により椎間板の力学的強度が低下し、椎間板の異常可動性を生じることで、椎間関節症や線維輪の変性をきたす。

現在までに報告されている変性椎間板への再生アプローチとしては、増殖因子を含めたサイトカインを用いる方法、幹細胞を始めとした細胞を用いる方法、遺伝子を直接ターゲットとする方法などがあるが根本的な解決に至っておらず、椎間板の変性における詳細な機序、要因と同様、未だ解明されていない。

(3) 椎間板変性の進行に関与する因子のひとつとして、酸化ストレスが指摘されている。酸化ストレスは酸素を利用する生物において避けることのできないストレスであり、活性酸素と老化の関連性については以前から指摘されている。老化関連物質といわれる終末糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) は、加齢により関節軟骨への蓄積量が増加し、AGEs が蓄積することによりコラーゲンやプロテオグリカンの生成が抑制される。ヒト椎間板においても、髄核培養細胞モデルでアグリカンの分泌が AGEs の濃度・作用時間に依存して減少することが報告されている。この酸化ストレスを制御することで椎間板変性の進行を抑制できる可能性がある。

(4) 生体内での酸化ストレスに対する防御機構の一つとして、Heme Oxygenase-1 (HO-1) が注目されている。HO-1 は誘導型アイソザイムであり、通常はその遺伝子発現レベルはごく低い。しかし酸化ストレスにより強く誘導される。HO-1 は Heme を分解することで非常に強い抗酸化作用をもつ生体内抗酸化物質であるビリベルジン、ビリルビンを産生し、これらは酸化ストレスに対する防御系の重要なエフェクター分子と考えられている。この HO-1 遺伝子の発現を抑制する転写因子が Bach1 である。HO-1 による酸化ストレス防御系は Heme の代謝と Bach1 による活性制御を組み合わせた経路によりなっており、Bach1 をノックアウトすると HO-1 の発現の抑制が解除されるため、HO-1 の発現が上昇する。Bach1 ノックアウトマウスの各臓器における HO-1 の発現は、様々な組織においてタンパク質及び RNA いずれのレベルでも HO-1 の著明な高発現が認められていることが確認されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、酸化ストレスを制御することにより椎間板変性の進行を抑制することで椎間板のアンチエイジングを目指した。生体内の強力な抗酸化物質であるビリルビンを恒常的に発現することで強い抗酸化作用を有す

る Bach1 ノックアウトマウスを用いて、Wild type マウスと Bach1 ノックアウトマウスの椎間板変性モデルにおける椎間板変性の程度を比較することで、椎間板変性過程における酸化ストレス制御による椎間板変性の抑制を評価し、椎間板変性に対する治療方法を開発することを目的とした。

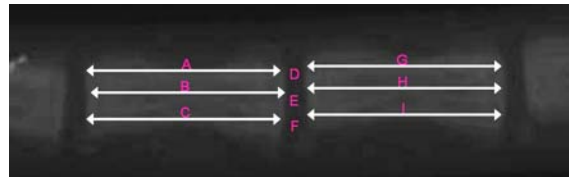
## 3. 研究の方法

### (1) 加齢性変化モデル

生後 12 週及び生後 1 年の C57/BL6/J Wild type マウス、C57BL6/J Bach1 ノックアウトマウスを用いた。

#### ① 画像的検討

尾椎椎間板の側面マイクロ単純 X 線写真を撮影し、C9-C10 尾椎椎間板及びその上下の椎体の 3 カ所の椎体高と椎間板高を測定し、Disc Height Index (DHI) を算出した。



$$\text{Disc Height Index (DHI)} = 2 \times (D+E+F) / (A+B+C+G+H+I)$$

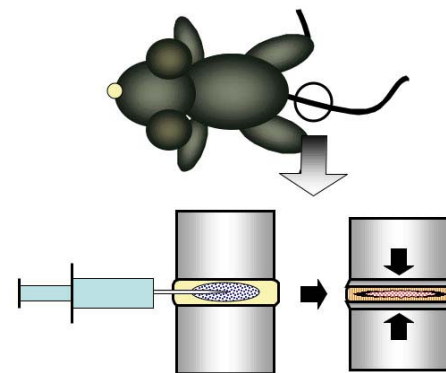
DHI の経時的変化につき比較、検討を行った。

#### ② 組織学的検討

全身麻酔下に尾椎椎間板を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて組織を固定後、EDTA にて脱灰を行い、パラフィン包埋切片を作成した。組織切片に対しヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) 及びサフラニン-O 染色を行い、加齢性変化に対するスコアを用いてスコアリングを行った。スコアの変化につき比較、検討を行った。

### (2) 椎間板変性モデル

生後 12 週の C57/BL6/J Wild type マウス、C57BL6/J Bach1 ノックアウトマウスを用いた。全身麻酔下に C9-C10 尾椎椎間板を 29G 注射針にて穿刺し、椎間板変性モデルを作成した。



術前、術後 1, 2, 4, 8, 12 週後に以下の項目について検討を行った。

#### ①画像的検討

尾椎椎間板の側面マイクロ単純 X 線写真を撮影し、C8-C9 と C9-C10 尾椎椎間板及びその上下の椎体の 3 ヲ所の椎体高と椎間板高を測定し、Disc Height Index (DHI) を算出した。C8-C9 尾椎椎間板をコントロールとし、術前の DHI に対する術後 X 線写真撮影時の DHI の割合を算出し、%DHI としてその変化を比較、検討した。

#### ②組織学的検討

全身麻酔下に尾椎椎間板を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて組織を固定後、EDTA にて脱灰を行い、パラフィン包埋切片を作成した。組織切片に対しヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) 及びサフラニン-0 染色を行い、線維輪及び髄核の構造、組織学的な変化及び髄核内におけるプロテオグリカンの損傷、変性の程度について検討を行った。椎間板穿孔による変性モデルに対するスコアを用いてスコアリングを行った。スコアの変化につき比較、検討を行った。

#### ③免疫組織学的検討

全身麻酔下に尾椎椎間板を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて組織を固定後、EDTA にて脱灰を行い、パラフィン包埋切片を作成した。抗 HO-1 抗体を用いて免疫染色を行い、酸化ストレスに対する細胞応答である HO-1 陽性細胞の数を計測して比較、検討を行った。

#### ④アポトーシス細胞の検討

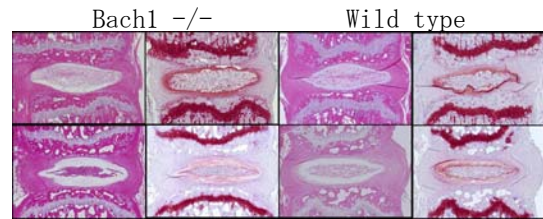
全身麻酔下に尾椎椎間板を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて組織を固定後、EDTA にて脱灰を行い、パラフィン包埋切片を作成した。TUNEL 法を用いて、アポトーシスに陥った細胞を染色、計測し、髄核内の細胞中のアポトーシス陽性細胞の割合を算出して比較、検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)加齢性変化モデル

生後 12 週のマウスと生後 1 年のマウスの DHI を比較したところ、Wild type マウスにおいても Bach1 ノックアウトマウスにおいても加齢により DHI の有意な低下を認めた。しかし、どちらの時点においても 2 群間での有意差は認めなかった。組織学的評価においては、生後 12 週では線維輪は綺麗な層状構造を取っており、破綻や走行異常はなく、細胞核は紡錘形であった。髄核内には多数の脊索細胞を認め、サフラニン-0 にて染色されるプロテオグリカンも豊富に存在していた。椎体終板は均一で血管も一様に存在していた。しかし生後 1 年においては、脊索細胞の凝集を認め、サフラニン-0 によるプロテオグリカンの染色性も低下していた。椎体終板では血管の増生と拡大を認め、一部菲薄化を認めた。組織

学的スコアリングにおいては、生後 12 週と生後 1 年では、両群ともに有意なスコアの上昇を認め、椎間板変性の進行を認めた。しかし、どちらの時点においても 2 群間での有意差は認めなかった。



上段：生後 12 週 下段：生後 1 年

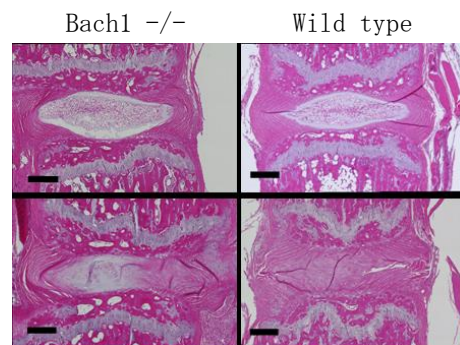
#### (2)椎間板変性モデル

##### ①%DHI の変化

%DHI は術後早期から速やかに減少し、術前及びコントロールと比較して術後 1 週以降、有意な低下を示した。2 群間の比較においては、各時点において有意差を認めなかった。

##### ②組織学的変化

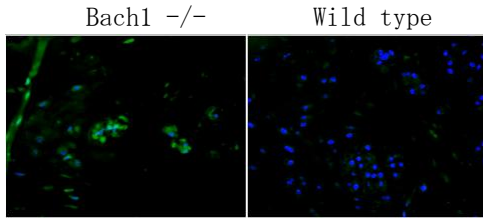
術後 2 群とも速やかに組織学的な変性の進行を認めた。線維輪では層状構造が徐々に破綻してきて途絶や走行の蛇行化を認めた。紡錘形の核は減少し線維芽細胞様の円形の細胞核の増生を認めた。髄核内には線維輪から線維芽細胞様の細胞組織が進入し、脊索細胞は減少して軟骨芽細胞様の細胞の増生を認めた。またプロテオグリカンも減少し、瘢痕様の線維性組織が増生した。組織の比較においては、術後 8 週、12 週の時点において、2 群間のスコアリング上の有意差を認め、Bach1 ノックアウトマウスにおいて椎間板変性の進行が組織学的に抑制されていた。



上段：術前 下段：術後 12 週

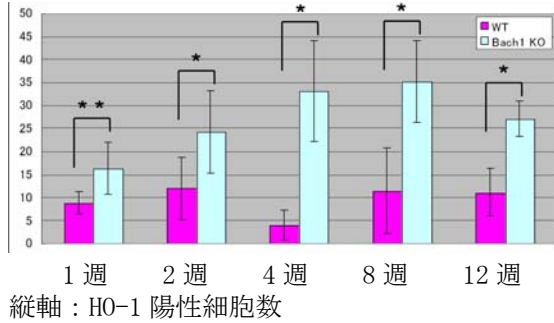
##### ③免疫組織学的評価

髄核内の HO-1 陽性細胞数を測定し、その数を比較した。術前は 2 群とも HO-1 陽性細胞はほとんど認められなかったが、術後 1 週以降、両群とも髄核内に HO-1 陽性細胞を認めた。Bach1 ノックアウトマウスでは術後全ての時点において HO-1 陽性細胞数は Wild type マウスに比べて有意に多く認めた。



HO-1 陽性細胞を緑色に染色  
核は DAPI にて青色に染色

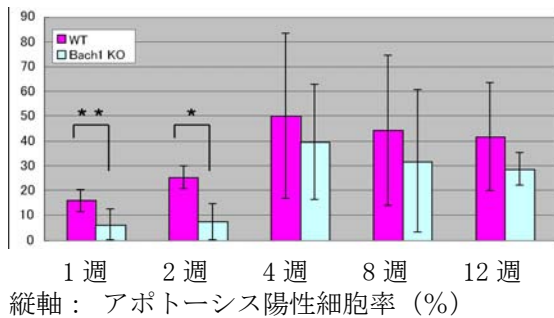
\* :  $p < 0.01$  \*\* :  $p < 0.05$



#### ④アポトーシス細胞の検出

髄核内の細胞数, アポトーシス陽性細胞数を測定し, アポトーシス陽性細胞数の割合を算出し比較した. 術後 1 週, 2 週の時点において, Bach1 ノックアウトマウスにおいてアポトーシス陽性細胞の割合が低く, 術後早期の髄核細胞のアポトーシス誘導が抑制されていた.

髄核内アポトーシス陽性細胞率



#### ⑤結論

Bach1 ノックアウトマウスにおいて, HO-1 が高発現することで酸化ストレスが抑制され, その結果として組織学的に椎間板変性の進行が抑制された. 術後早期に髄核内の細胞のアポトーシスの割合が低く抑えられたことから, 酸化ストレスを抑制することで椎間板の細胞のアポトーシス誘導が抑制され, 椎間板変性の進行が抑制されたと考えられる. 本研究により, 酸化ストレスの抑制が椎間板変性の進行を抑制することが証明できた. 酸化ストレスを抑制するという, 椎間板変性に対する新しい治療法の足がかりとなった.

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. Ohta Ryo, Heme oxygenase-1 modulates degeneration of the intervertebral disc in Bach 1 deficient mice, 2011 Orthopaedic Research Society Annual Meeting, 13-16 Jan 2011, Long Beach U.S.A
2. 大田亮, Bach1 ノックアウトマウスにおける酸化ストレスによる椎間板変性抑制効果, 第 47 回広島脊椎脊髄セミナー, 2010 年 11 月 27 日, 広島市
3. 大田亮, Bach1 ノックアウトマウスにおいて Heme oxygenase-1 は椎間板変性を調整する, 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010 年 10 月 15 日, 京都市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 信弘 (TANAKA NOBUHIHO)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号 : 2 0 3 6 3 0 6 2

##### (2) 研究分担者

中西 一義 (NAKANISHI KAZUYOSHI)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号 : 6 0 4 0 3 5 5 7

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・病院・教授  
研究者番号 : 7 0 1 7 7 2 4 4

望月 由 (MOCHIZUKI YU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 1 0 2 8 4 1 9 2

(平成 20 年 10 月まで)

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :