

平成 22 年 03 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791035

研究課題名（和文） 椎間板変性メカニズムの解析

研究課題名（英文） The analysis of intervertebral disc degeneration mechanism

研究代表者

前野 耕一郎 (MAENO KOICHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70403269

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質 Fas-ligand を過剰発現させた椎間板髄核細胞とマクロファージ（貪食細胞）を共培養すると、細胞のアポトーシス（細胞死）変化は確認できなかったが、炎症反応の際に放出されるサイトカインの1つである IL-1 β が増加することが分かった。椎間板髄核細胞において FasL は、炎症惹起に大きく関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been proved that the proinflammatory cytokine IL-1 β increased in Fas-ligand overexpressed intervertebral nucleus pulposus cells. It was suggested that Fas-ligand greatly take part in the inducement of the proinflammatory cytokine. On the other hand, we were not able to prove that Fas-ligand take part in the cellular apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：①遺伝子、②シグナル伝達、③再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎疾患の多くは椎間板の変性に起因する所が大きい。椎間板の変性は年齢とともに進行するため、椎間板変性に起因する脊椎疾患は高齢化社会の現代において増加の一途を辿っている。椎間板変性の要因としては

椎間板髄核細胞に存在する膜タンパク質 Fas-ligand (FasL) の関与が示唆されている。FasL は TNF family に属する 2 型膜タンパク質である。人体でも精巣や眼の前房などの免疫学的特権を持つ組織の限られた細胞にのみ存在することが知られており、これらの組

織では FasL が存在することによって自己免疫細胞によるアポトーシスの誘導を防いでいると考えられている。椎間板内の髓核細胞もまた FasL を有し、免疫学的特権を持つ組織の一つであることが示唆されている。椎間板はその中心に位置する髓核が厚い線維輪と軟骨終板と呼ばれる組織によって囲まれているという解剖学的特徴をもっており、この構造が自己免疫からのバリアとして働くとともに、FasL が外界からの他因子の侵入を能動的に防御することで免疫学的特権という特別な機構を持つと考えられているのである。実際に FasL は Fas と結合することでこれを活性化させ、Fas を有する細胞にアポトーシスを引き起こさせることがよく知られている。すなわち FasL は Fas を有する多因子に対して上述のような免疫学的特権と言われる特別な防御機構を作り出しており、椎間板髓核細胞においてこの防御機構が破綻すると椎間板の変性が引き起こされると推測されている。しかしながら椎間板髓核細胞において実際に上述のようなメカニズムを証明した報告はない。すなわち椎間板が変性に至る経路を遺伝子レベルで解析した報告はみられていないという背景がある。

(2) 椎間板変性の研究には動物実験が多くなされている。本研究代表者もこれまでにラットの尾椎を用いた椎間板変性モデルの作成およびこのモデルを使用した椎間板変性メカニズムの解析に携わってきた。しかしながらラットのような小動物から採取できる椎間板髓核細胞はごく少量であるため培養そのものが困難なケースも多い。一方手術材料によるヒト椎間板細胞も、その採取状況や採取後の保管状況にばらつきがあるため細胞状態が安定していないものが多い。このような理由からか椎間板髓核細胞においては in

vitro での遺伝子レベルの解析がほとんどなされていなかった。このような背景の中、近年ヒト椎間板髓核細胞に Adenovirus vector を導入した不死化細胞株が誕生し、椎間板髓核細胞の培養操作が容易になった。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は、脊椎疾患の主要因の一つと考えられている椎間板変性に着目し、まだ明確に解明されていないそのメカニズムを遺伝子レベルで解析することである。そのために上記ヒト椎間板髓核細胞の不死化細胞株を用いて、現在までに評価困難であった椎間板髓核細胞の機能を遺伝子レベルで解析し、椎間板変性のメカニズムを詳細に分析することに主眼をおいている。

3. 研究の方法

まずヒト椎間板髓核細胞不死化細胞株を用いて RNA 干渉法による FasL の発現抑制、あるいは FasL 遺伝子の過剰発現を行った。これら FasL の発現抑制下、あるいは過剰発現下で Fas を発現するマクロファージとの共培養を行い、細胞の形態学的変化を観察するとともにアポトーシスに関与するカスパーゼシリーズの測定を行った。前述のように FasL は Fas と結合することでこれを活性化させ、Fas を有する細胞にアポトーシスを引き起こさせることがよく知られている。すなわち椎間板髓核細胞上の FasL の発現を抑制すれば Fas・FasL システムが働かないため共培養するマクロファージに容易に貪食され、逆に FasL を過剰発現すれば Fas を有するマクロファージに対する防御能が高まるのではないかという仮説を立てた上での手法である。

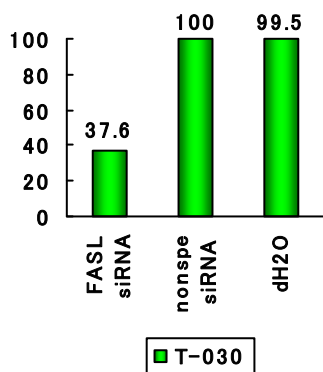
一方で FasL を発現抑制あるいは過剰発現させた椎間板髓核細胞をマクロファージと共培養した際の細胞培養液を用いて炎症性

サイトカインの測定を行った。人体では椎間板髄核が椎間板線維輪から脱出すると強い炎症反応が起こるが、この炎症反応に Fas・FasL システムが関与しているという仮説を立てた。すなわち、Fas・FasL システムには細胞アポトーシス誘導経路と炎症惹起の経路があるという仮説のもと上記研究を進めた。

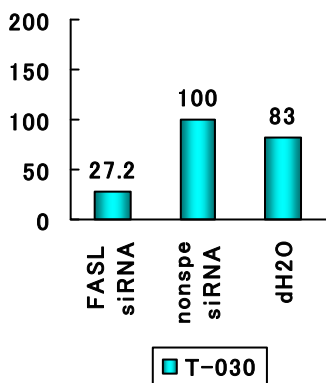
4. 研究成果

(1) siRNA を用いた FasL の発現抑制

ヒト椎間板髄核細胞不死化細胞株に siRNA を用いた FasL の発現抑制を試みると下図の如くタンパクレベルでは約 40%、RNA レベルでは約 30%の発現抑制が可能であった。



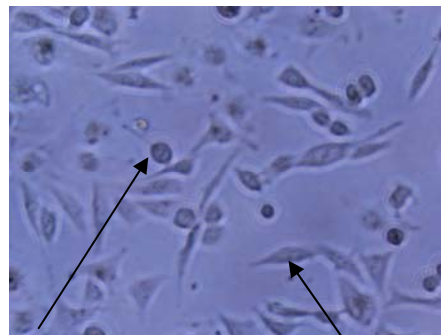
(図 1a: siRNA 導入後の FasL タンパク発現量)



(図 1b: siRNA 導入後の FasL RNA 発現量)

次に上記 FasL 発現抑制細胞とマクロファージとの共培養を行った。しかし明らかな髄核細胞に明らかな細胞形態学的変化はみられず (図 2)、またカスパーゼシリズや炎症性サイトカインにも大きな変動は見られなかつ

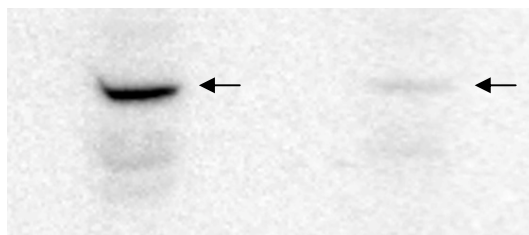
た。この結果に関する詳細は不明であるが、siRNA による FasL の発現抑制が予備実験上でも 60~70%程度であり、不完全であることが一因であるかもしれない。



マクロファージ 髄核細胞
(図 2: 共培養直後の顕鏡図)

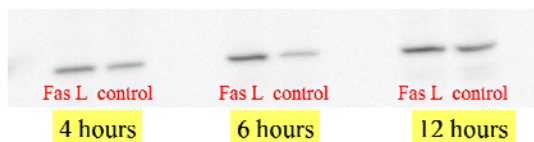
(2) FasL の過剰発現

一方でヒト椎間板髄核細胞不死化細胞株に FasL の過剰発現を試みた。



1) FasL 導入細胞 2) コントロール
(図 3a: FasL 過剰発現後の FasL タンパク発現量、Western blotting による)

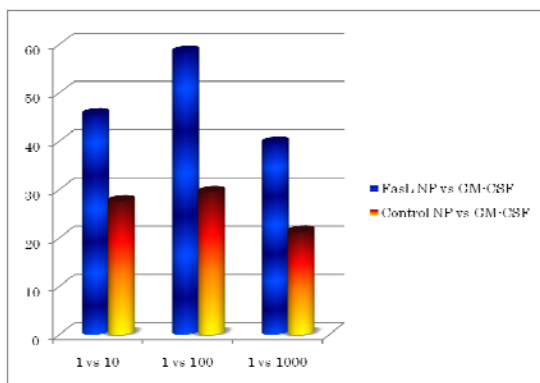
RNA レベルでも、また図 3 の如くタンパクレベルでも十分量の FasL の過剰発現が可能であった。ただ一方で FasL の発現タンパク量は 6 時間をピークに減少する傾向にあった (図 3b)。



(図 3b: FasL タンパク発現量の時間的推移、Western blotting による)

この FasL を過剰発現したヒト椎間板髄核細胞不死化細胞株をマクロファージと共培養して刺激すると、外観上の明らかな細胞アポトーシス変化は見られず、現状ではカスパーゼシリズにも大きな変動は見られなかつ

た。一方でその培養液でサイトカイン assay を行うとコントロール群に比べて FasL 過剰発現細胞では約 2 倍 IL-1 β が多く発現することが分かった(図 4)。



(図 4: ELISA による FasL 過剰発現髓核細胞とマクロファージ共培養下での IL-1 β の発現量変化、X 軸は FasL 過剰発現髓核細胞とマクロファージの細胞比率を示す)

(考察)

椎間板髓核細胞においては、Fas・FasL システムの破綻が細胞アポトーシスを引き起こし、椎間板変性の引き金になるという仮説の元に実験を進めてきた。しかし残念ながらその証拠を同定することはできなかった。最も期待を寄せていた siRNA を用いた FasL タンパクの発現抑制精度が低いことなど、結果を引き出すのに不利な要素が多かったことも一つの要因であると考え。この FasL 発現抑制系の実験に関しては今後数種類の siRNA を組み合わせた実験手法を用いて引き続き進めていきたいと考えている。一方で椎間板髓核細胞に FasL を過剰発現させると IL-1 β の発現量が増大することが分かった。IL-1 β は炎症反応に関わるサイトカインであるため、椎間板髓核細胞において FasL は炎症惹起に大きく関与している可能性が示唆された。現在 TNF α など他の炎症性サイトカインの動向についても調査中であるが、椎間板髓核細胞において Fas・FasL システムが炎症惹

起に関わっていることが証明できれば、特に急性期椎間板ヘルニアによる炎症性疼痛のメカニズムの解明につながるのではないかと考えている。

今後は上記内容にも重点をおき、椎間板髓核細胞における遺伝子レベルでの機能解析を、Fas・FasL システムの細胞アポトーシス制御経路および炎症反応制御経路の両面でさらに詳細に進めていく予定である。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前野 耕一郎 (MAENO KOICHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70403269