

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09480

研究課題名（和文）アディポネクチンによる椎間板変性・炎症に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment against intervertebral disc degeneration and inflammation using adiponectin

研究代表者

張 鍾穎（Zhang, Zhongying）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00824195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：アディポネクチンは脂肪組織から分泌される抗炎症作用を有するホルモンで、肥満、炎症性疾患や軟骨疾患に関与し、様々な生理学的、病理学的過程への関与を有する。しかし椎間板への機能は不詳である。本研究ではアディポネクチン作動薬アディポロンのヒト椎間板やラット椎間板変性モデルへの効果を調査した。アディポロンは炎症や細胞外基質異化を抑制し、AMPK経路中のp65のリン酸化を抑制した。アディポロンの椎間板内注射は放射線学的な椎間板高の低下、組織学的な変性進行、炎症性サイトカインや細胞外基質異化タンパクの産生を抑制した。

以上の結果からアディポロンは早期の椎間板変性抑制への新たな治療法となりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰痛は日本の有訴率の第一位であり早急に解決すべき世界的な健康問題である。椎間板変性は腰痛の主たる独立した危険因子だがその発生機序は明らかではない。変性椎間板に対する現在の治療の多くは切除を中心とした手術療法であり、結果的に椎間板を破壊し本来の機能を失うため、椎間板機能温存と組織再生を両立する新たな治療法の開発が急務であり、成長因子製剤投与や遺伝子導入、幹細胞移植等の生物学的治療の有効性が日々研究されている。本研究からアディポロンは抗炎症作用や細胞外基質異化抑制作用により早期の椎間板変性抑制への新たな治療法となりうると考えられた。アディポロンは経口投与可能であり、臨床応用しやすいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Adiponectin, a hormone secreted by adipocytes, has anti-inflammatory effects and is involved in various physiological and pathological processes such as obesity, inflammatory diseases, and cartilage diseases. However, the function of adiponectin in intervertebral disc (IVD) degeneration is not well understood. This study aimed to elucidate the effects of AdipoRon, an agonist of adiponectin receptor, on human IVD cells, and on rat tail IVD degeneration model. AdipoRon treatment downregulated gene expression of proinflammatory and catabolic factors. Furthermore, AdipoRon suppressed p65 phosphorylation in the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway. Intradiscal administration of AdipoRon alleviated the radiologic IVD height loss, histomorphological degeneration, production of extracellular matrix catabolic factors and proinflammatory cytokines. Therefore, AdipoRon could be a new therapeutic candidate for alleviating the early stage of IVD degeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アディポネクチン アディポロン 椎間板 椎間板変性 穿刺モデル 脊椎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰痛は日本の有訴率の第一位であり、米国では全労働人口の1%が腰痛のために就労できずにいる。その経済的損失は年間1000億ドルに達しており、腰痛は早急に解決すべき世界的な健康問題である。椎間板変性は腰痛の主たる独立した危険因子であるが、その発生機序は未だ明らかではない。変性椎間板に対する現在の治療の多くは切除を中心とした手術療法であり、結果的に椎間板を破壊し本来の機能を失うことになる。実際、手術により腰痛がかえって増悪してしまう例もみられる。従って、椎間板の機能を温存しつつ組織を再生させる新たな治療法の開発が急務であり、成長因子製剤の投与や遺伝子導入、幹細胞移植といった生物学的治療の有効性が日々研究されている。脂肪織は大きな内分泌組織であり様々な生理活性物質(アディポカイン)を分泌している。そのうちの一つであるアディポネクチンは抗糖尿病効果、抗アテローム効果や抗炎症効果をもつことが報告されている。

アディポネクチンの椎間板における発現や作用についての研究は少ない。我々はアディポネクチンが椎間板細胞でも抗炎症作用を有し、抗炎症作用を通じて椎間板変性を抑制しようと考えた。

2. 研究の目的

アディポネクチン受容体アゴニストであるアディポロンを用いてアディポネクチンが椎間板の炎症や変性へ及ぼす影響を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

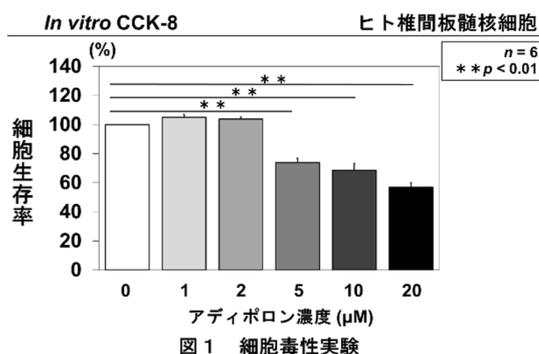
(1) 脊椎手術を施行された10~70歳代22例から椎間板細胞を採取・培養してin vitro実験に用いた。まず始めにアディポロンの細胞毒性をCell Counting Kit-8 (CCK-8)を用いて調査した。

(2) 次にヒト椎間板細胞を三次元培地TASCL (Tapered Soft Stencil for Cluster Culture) に培養した後に4グループ(Control群: C群, アディポロン投与群: A群, IL-1投与群: I群, アディポロン+IL-1投与群: A+I群)に分け、細胞外基質代謝や炎症性サイトカインへの影響や炎症経路のタンパク発現をRT-PCR, 蛍光免疫染色, Western Blotting法を用いて調査した。また、IL-1刺激によるP65のリン酸化のピーク時間も調査した。

(3) in vivo実験としてラット尾椎針穿刺椎間板変性モデルで4グループ間(Control群: C群, 穿刺のみ群: P群, アディポロン群: A群, 穿刺後アディポロン投与群: P+A群)で椎間板高, 組織像, 蛍光免疫染色での細胞外基質異化因子, 炎症性サイトカイン, 炎症経路を比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞毒性試験では5 μ M以上の濃度で有意に細胞毒性をもつことが示された(p<0.001)。



(2) RT-PCRではA+I群ではI群と比較して細胞外基質異化因子MMP-13, ADAMTS-4や炎症性サイトカインTNF-, IL-6の発現が有意に抑制された(p<0.005)。蛍光免疫染色ではA+I群ではI群と比較してTNF-, ADAMTS-4の発現が有意に抑制された(p<0.05)。Western Blotting法でもA+I群ではI群と比較してMMP-13, ADAMTS-4, TNF-, IL-6の発現が有意に抑制された(p<0.03)。p65のリン酸化はIL-1刺激後15分でピークを認めた。Western Blotting法, 蛍光免疫染色ともA群およびA+I群はI群よりp-AMPK発現が増加し(p<0.01), A+I群はI群よりp-NFkB発現が有意に減少した(p<0.01)。

ヒト椎間板髄核細胞

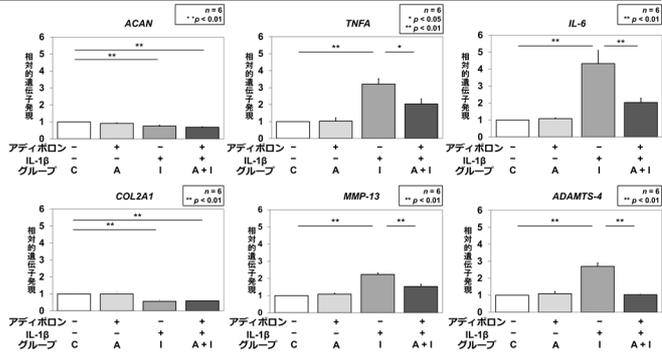


図 2-1 in vitro RT-PCR

ヒト椎間板髄核細胞

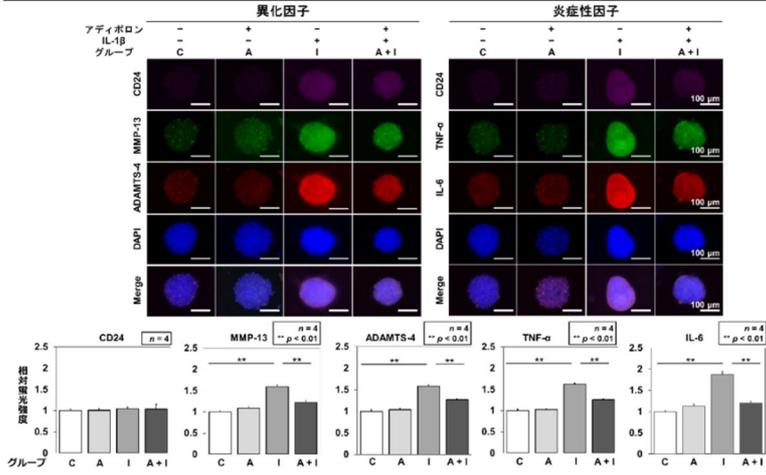


図 2-2 in vitro 蛍光免疫染色

ヒト椎間板髄核細胞

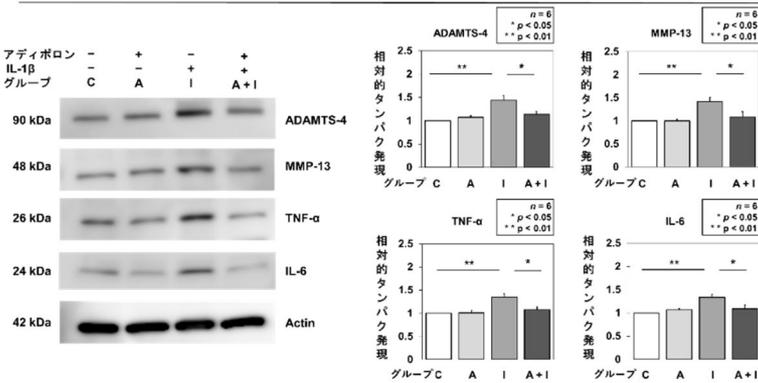
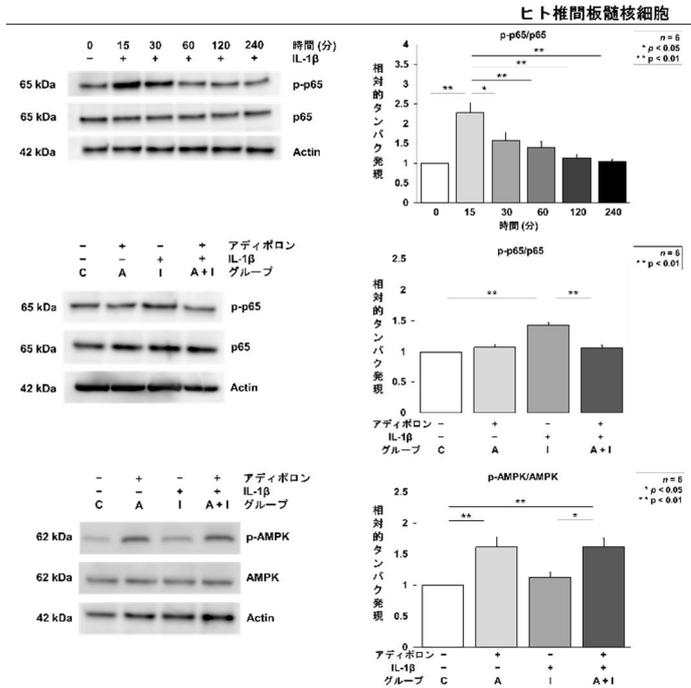
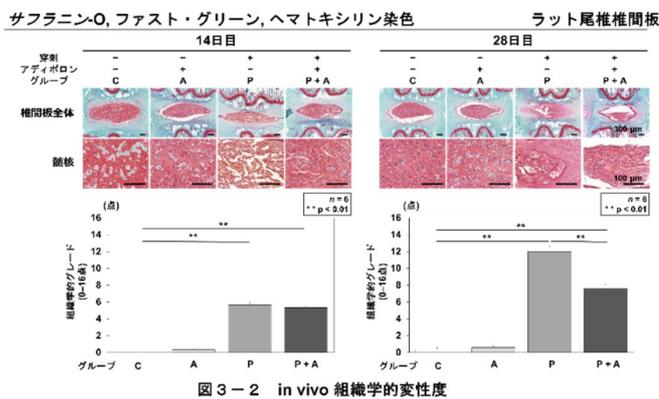
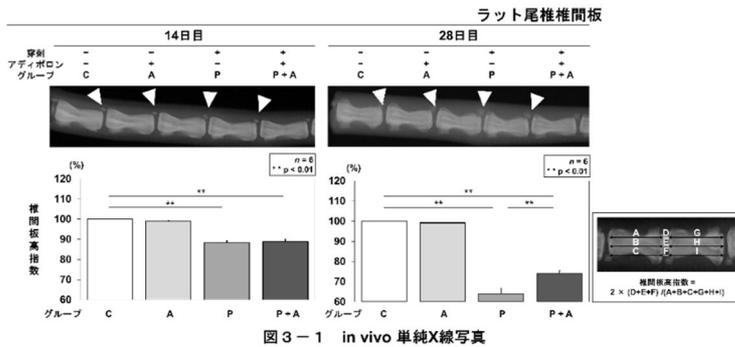


図 2-3 in vitro Western blotting



(3) P, P+A 群とも穿刺後 14, 28 日で C, A 群より有意に椎間板高は低下・組織学的変性進行を認めた ($p < 0.05$) が, P+A 群では穿刺後 28 日で P 群より有意に椎間板高値・組織学的変性進行抑制を認めた ($p < 0.05$). 蛍光免疫染色法で細胞外基質異化因子, 炎症性サイトカインの発現度, AMPK 経路の p-p65 は穿刺後 14, 28 日では P, P+A 群は C, A 群より有意に高値であった ($p < 0.05$) が, 穿刺後 28 日では P+A 群は P 群より有意に低値であった ($p < 0.05$). p-AMPK は穿刺後 14, 28 日とも P+A, A 群は C, P 群より有意に高値であった ($p < 0.05$)



ラット尾椎椎間板

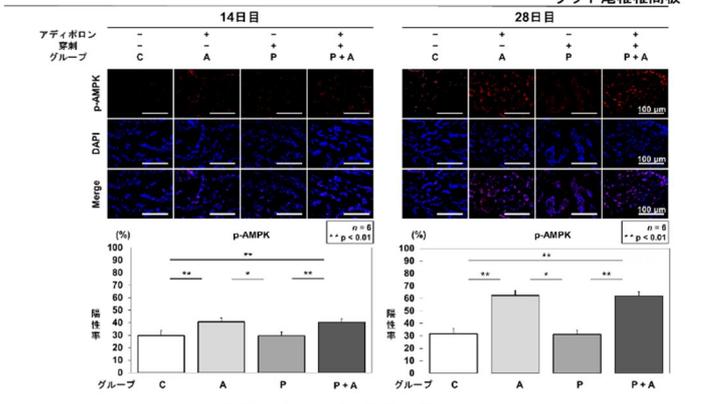
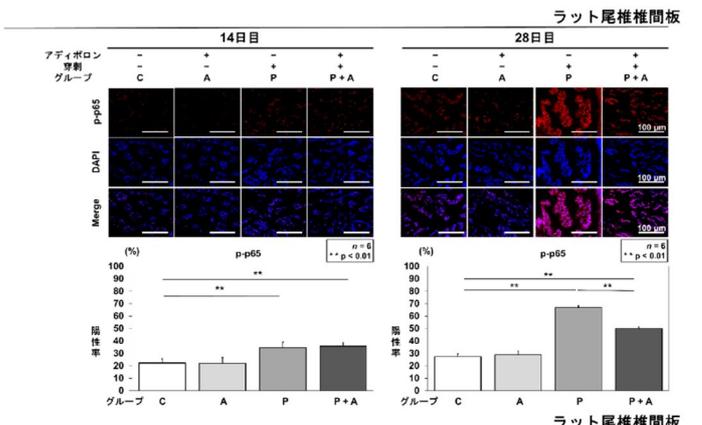
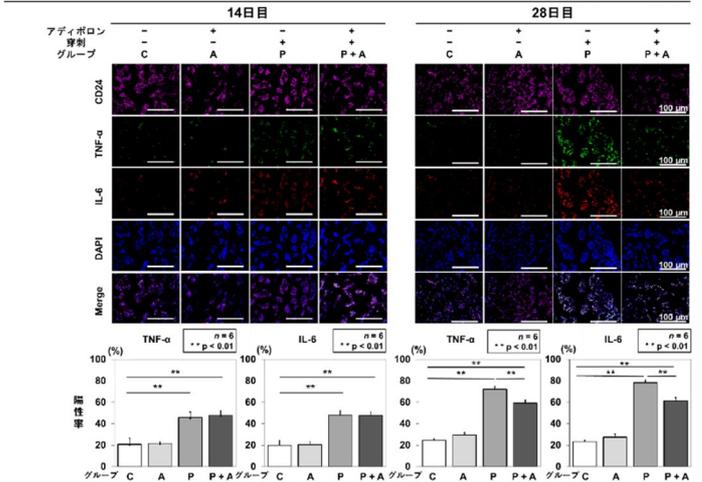
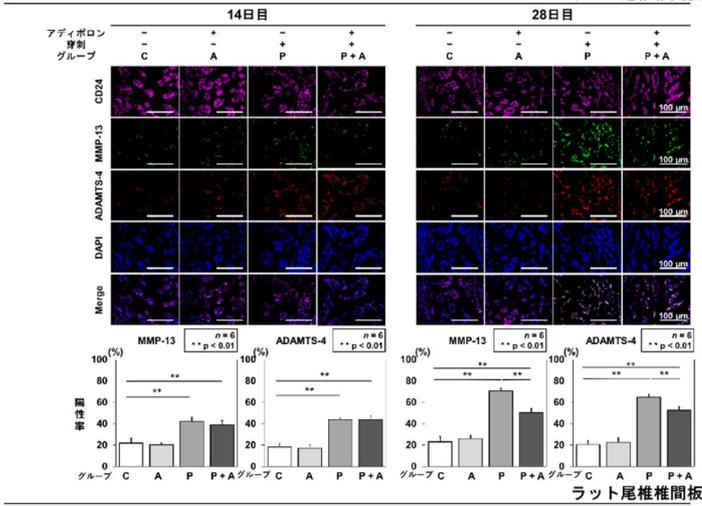


図 3-3 in vivo 蛍光免疫染色

以上よりアディポロンは細胞外基質異化因子や炎症性サイトカインの発現低下を通して椎間板変性進行の防止や予防に有用な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 Ohnishi Hiroki, Zhang Zhongying, Yurube Takashi, Takeoka Yoshiki, Kanda Yutaro, Tsujimoto Ryu, Miyazaki Kunihiro, Matsuo Tomoya, Ryu Masao, Kumagai Naotoshi, Kuroshima Kohei, Hiranaka Yoshiaki, Kuroda Ryosuke, Kakutani Kenichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Anti-Inflammatory Effects of Adiponectin Receptor Agonist AdipoRon against Intervertebral Disc Degeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8566 ~ 8566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24108566	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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 大西洋輝; 張鍾穎; 由留部崇; 武岡由樹; 垣内裕司; 辻本龍; 宮崎邦彦; 松尾智哉; 劉正夫; 黒田良祐; 角谷賢一朗
2. 発表標題 アディポネクチン受容体アゴニストAdipoRonの椎間板細胞へ与える影響に関する研究
3. 学会等名 第51回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohnishi H, Zhang Z, Ryu M, Matsuo T, Miyazaki K, Takeoka Y, Kakiuchi Y, Yurube T, Kuroda R, Kakutani K
2. 発表標題 Effect of Adiponectin receptor agonist AdipoRon on human intervertebral disc cell in a three-dimensional cell culture and rat tail puncture model
3. 学会等名 48th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西洋輝, 張鍾穎, 由留部崇, 武岡由樹, 宮崎邦彦, 松尾智哉, 劉正夫, 熊谷直利, 黒島康平, 平中良明, 黒田良祐, 角谷賢一朗
2. 発表標題 アディポネクチン受容体アゴニストAdipoRonの椎間板細胞へ与える影響に関する研究
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohnishi H, Zhang Z, Hiranaka Y, Kuroshima K, Kumagai N, Ryu M, Matsuo T, Miyazaki K, Takeoka Y, Yurube T, Kuroda R, Kakutani K
2. 発表標題 The efficacy of Adiponectin receptor agonist AdipoRon against intervertebral disc degeneration on rat tail puncture model
3. 学会等名 69th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西洋輝；張鍾穎；宮崎邦彦；辻本龍；神田裕太郎；垣内裕司；山本潤哉；由留部崇；高田徹；黒田良祐；角谷賢一朗
2. 発表標題 三次元細胞培養を用いたアディポネクチン受容体アゴニストAdipoRon投与に対するヒト椎間板細胞へ与える影響の検討
3. 学会等名 第50回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西洋輝；張鍾穎；由留部崇；垣内裕司；神田裕太郎；辻本龍；宮崎邦彦；高田徹；土井田稔；黒田良祐；角谷賢一朗
2. 発表標題 三次元細胞培養を用いたアディポネクチン受容体アゴニストAdipoRon投与に対するヒト椎間板細胞へ与える影響の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohnishi H; Zhang Z; Miyazaki K; Tsujimoto R; Kanda Y; Kakiuchi Y; Yamamoto J; Yurube T; Takada T; Kuroda R; Kakutani K
2. 発表標題 Effect of Adiponectin receptor agonist AdipoRon on human intervertebral disc cell in a three-dimensional cell culture
3. 学会等名 47th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohnishi, H , Zhang, Z , Ryu, M , Matsuo, T , Miyazaki, K , Tsujimoto, R , Kanda, Y , Kakiuchi, Y , Yurube, T , Takada, T , Kuroda, R , Kakutani, K
2. 発表標題 Effects Of Adiponectin Receptor Agonist Adiporon On Human Intervertebral Disc Cell In A Three-Dimensional Cell Culture System And Rat Tail Puncture Model
3. 学会等名 68th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Ohnishi, Zhongying Zhang, Takashi Yurube, Yuji Kakiuchi,Junya Yamamoto, Yutaro Kanda, Ryu Tsujimoto, Kunihiko Miyazaki, Toru Takada, Ryosuke Kuroda, Kenichiro Kakutani
2. 発表標題 Effect of Adiponectin receptor agonist AdipoRon on human intervertebral disc cell in a three-dimensional cell culture
3. 学会等名 The 67th, Annual Meeting, Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西洋輝; 張鍾穎; 由留部崇; 武岡由樹; 宮崎邦彦; 松尾智哉; 劉正夫; 熊谷直利; 黒島康平; 平中良明; 黒田良祐; 角谷賢一朗
2. 発表標題 ラット穿刺モデルを用いた アディポネクチン受容体アゴニスト AdipoRon の椎間板細胞へ与える影響に関する研究
3. 学会等名 第52回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ohnishi H , Zhang Z, Hiranaka Y, Kuroshima K, Kumagai N, Ryu M, Matsuo T, Miyazaki K, Takeoka Y, Yurube T, Kuroda R, Kakutani K
2. 発表標題 Preventive effects on intervertebral disc degeneration of Adiponectin receptor agonist AdipoRon in a rat tail puncture model
3. 学会等名 49th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ohnishi H, Zhang Z, Hiranaka Y, Kuroshima K, Kumagai N, Ryu M, Matsuo T, Miyazaki K, Takeoka Y, Yurube T, Kuroda R, Kakutani K
2. 発表標題 Adiponectin receptor agonist AdipoRon prevents the progression of intervertebral disc degeneration in a rat tail puncture model
3. 学会等名 Biospine AP 2023 meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	角谷 賢一朗 (Kakutani Kenichiro) (10533739)	神戸大学・医学研究科・特命准教授 (14501)	
研究分担者	由留部 崇 (Yurube Takashi) (10514648)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	垣内 裕司 (Kakiuchi Yuji) (40849212)	神戸大学・医学部附属病院・医員 (14501)	

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