

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17995

研究課題名（和文）椎間板変性におけるトロンビンの役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of thrombin in intervertebral disc degeneration

研究代表者

高山 義裕（TAKAYAMA, YOSHIHIRO）

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：20596994

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）：高齢化に伴い、腰痛による運動器障害はロコモティブシンドロームをもたらす要介護者の増加と関連している。腰痛の原因の一つに椎間板変性が関与しており、このメカニズムを解明することは社会的に喫緊の課題である。申請者は椎間板外層からの変性メカニズムに注目し、トロンビンの炎症と変性メカニズムについて血管新生を含めて検討した。

研究成果として、1) トロンビン受容体PAR1のマウス椎間板での発現を確認、2) トロンビン刺激によるMMP3発現、椎間板変性および、またPAR1の阻害による抑制をみた、3) トロンビン刺激によりマウス椎間板でVEGFが発現、4) 人工的マウス椎間板変性モデルにおいて血管新生が確認できた

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常椎間板は最大の無血管組織であり、その栄養のほとんどは椎体より終板を介して拡散することで得られる。外側線維輪細胞のみが周辺毛細血管より栄養されるが、変性椎間板では周辺血管より線維輪細胞のみならず、髄核細胞まで神経血管の新生が起こるとされるが詳細なメカニズムは不明であった。

仮説として、周辺毛細血管損傷と線維輪構造の損傷により椎間板外層より椎間板変性がもたらされることが考えられた。そこでトロンビンによって新たに変性をもたらす因子としてVEGFによる血管新生と外層線維輪細胞におけるマクロファージの役割、MMP3での直接的椎間板変性への作用について明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）： With the aging of the population, musculoskeletal disorders due to low back pain have been associated with locomotive syndrome and an increase in the number of people requiring nursing care. Intervertebral disc degeneration is one of the causes of low back pain, and elucidating this mechanism is an urgent social issue. The applicant focused on the mechanism of degeneration from the outer layer of the intervertebral disc and investigated the inflammation and degeneration mechanism of thrombin, including angiogenesis.

The results of the study include: 1) expression of the thrombin receptor PAR1 in mouse intervertebral discs was confirmed; 2) MMP3 expression and disc degeneration were observed upon thrombin stimulation and were also suppressed by inhibition of PAR1; 3) VEGF was expressed in mouse intervertebral discs upon thrombin stimulation; 4) angiogenesis was observed in an artificial mouse disc degeneration model. angiogenesis in an artificial mouse model of disc degeneration.

研究分野：椎間板変性

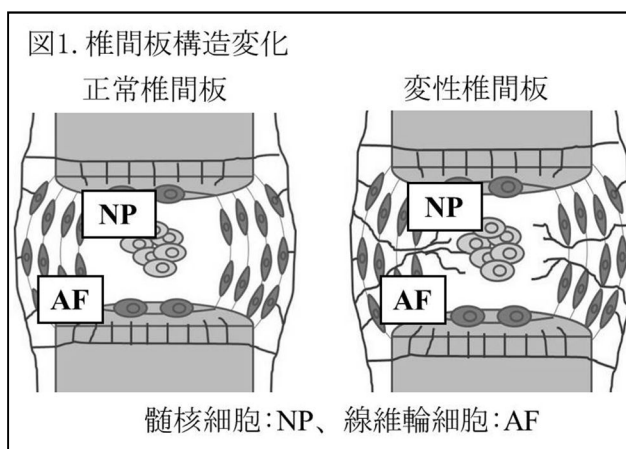
キーワード：椎間板変性 トロンビン 血管新生 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

2016年厚生労働省国民生活基礎調査によると、腰痛の有訴率は男性1位(9.2%)、女性2位(11.6%)であり、通院者率は4位(4.1%)に上る。腰痛による運動器障害をもつ高齢者は、要介護となる危険性があり、ロコモティブシンドロームにおける重要な疾患に含まれ(日本整形外科学会：ロコモティブシンドローム診療ガイド2010)、腰痛による運動器障害を軽減し、健康格差を縮小して健康寿命を延伸することは喫緊の課題といえる。

申請者の所属する研究室においては、長年腰痛の主要原因の一つである椎間板変性の変性メカニズムに着目し、椎間板の変性には炎症性サイトカインによる血管新生と炎症性細胞の浸潤が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(Wako M et al. J Orthop Res. 2007、Ohba T et al. Arthritis Rheum. 2008、Wako M. Spine2008、Ohba T et al. J Orthop Res. 2009、Fujita K et al. J Orthop Res. 2012)。

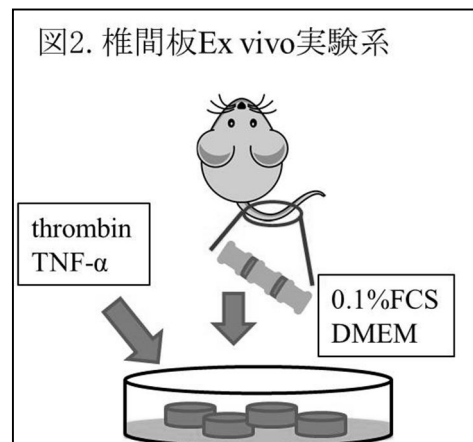
正常椎間板は外側線維輪細胞のみが周辺血管より栄養されるのみであり、最大の無血管組織として知られる(Huang YC et al. Nat Rev Rheumatol 2014)。しかし変性椎間板では周辺血管より線維輪細胞(AF)のみならず、髄核細胞(NP)まで神経血管の新生が起こる(Lee JM et al. J Orthop Res 2011)(図1)。椎間板変性は髄核と線維輪の二重構造の破綻と定義されるが、多くは内側の髄核について報告される(Huang YC et al. Nat Rev Rheumatol 2015、Sakai D. Nat Rev Rheumatol)。しかし、骨粗鬆症のモデルとして用いられるOVXマウスでは線維輪細胞の崩壊がみられるとも報告されており(Xiao ZF et al. Arthritis Res Ther 2018)、椎間板外層より起こる椎間板変性



について申請者は特に注目している。本研究は先行研究に基づき、発展させる研究である。その方法は顕微鏡を用いて5週齢のC57BL/6Jマウスより尾椎を摘出し、Ex vivoによる実験を行うものであり、申請者の所属する研究室において長年取り組んできた独自の実験方法である(図2)。

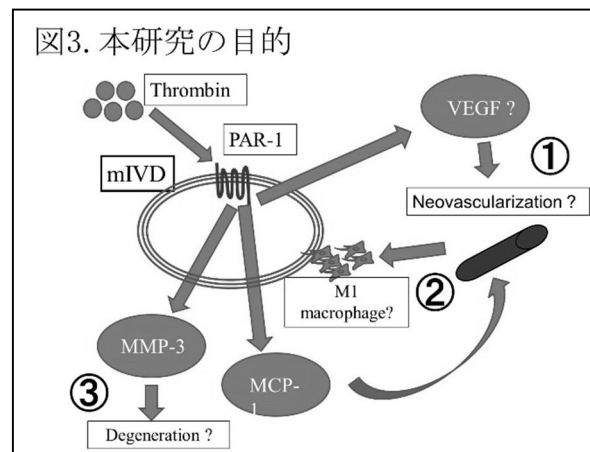
PAR1は血管内皮細胞において常に発現しており、損傷により形成されたトロンピンが早期に結合することで炎症を惹起し、この結果としてアテローム硬化が起こるとされる(Landis RC et al. Hematol Oncol Clin North Am 2007)。そのため、この炎症メカニズムをターゲットとした創薬が行われ、今日治療として用いられている。

本研究によって、トロンピンによる椎間板外層からの変性メカニズムを明らかとすることは、変性治療へのターゲットとなる分子の創薬を行って新規治療を開発し人類の健康寿命の長期化に寄与できるものと考えられる。



2. 研究の目的

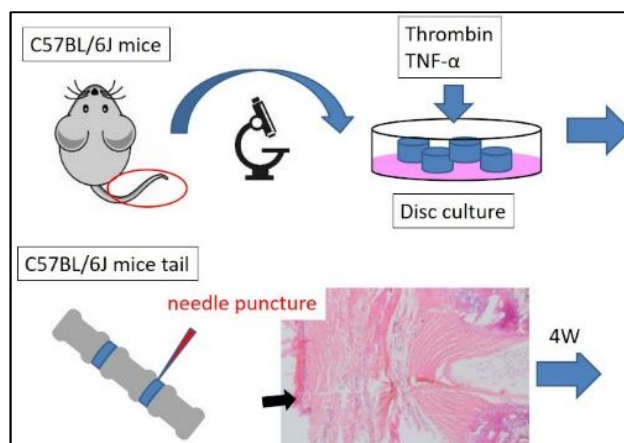
トロンビンの椎間板へ作用については炎症性サイトカインが分泌されることが報告される (Huang BR et al. Sci Rep 2017)。しかし詳細なメカニズムについては明らかにされていなかった。椎間板で変性が起こると無血管野である線維輪細胞、髄核細胞に末梢神経および血管新生が起こる (Lee JM, et al, J Orthop Res 2011)。我々は、炎症性サイトカインである TNF- α が椎間板ヘルニアにおいて Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 発現を増加させ、血管新生をもたらすことを報告した (Ohba T, et al, J Orthop Res 2009)。一方でトロンピンは血管内皮細胞の損傷において VEGF の産生を促し血管新生をもたらすことが報告されており (Sanchez A, et al, J Alzheimers Dis 2013)、椎間板においてもトロンピンが線維輪細胞や髄核細胞に作用し VEGF 産生を促すことが考えられる。そこでトロンピンによる VEGF の発現上昇について ELISA、WB で検討し、PAR1 インヒビターを用いて PAR1 を介した作用の有無をみる。次にその VEGF による血管新生能を Angiogenesis assay で検討する。さらに VEGF 発現の細胞内シグナルについては Western Blot 法で検討する。炎症や変性モデルとして用いられる穿刺モデルにおける VEGF 発現と血管新生の有無を免疫染色でみる。また、高齢マウスを用いて変性椎間板における血管新生を観察し、VEGF 発現について同様に免疫染色で検討する。これにより、椎間板変性過程においてトロンピンが炎症による血管新生の役割を担うかを明らかにする (図 3)。



3. 研究の方法

マウス椎間板を顕微鏡下に摘出し、専用培養器にて組織培養を行う

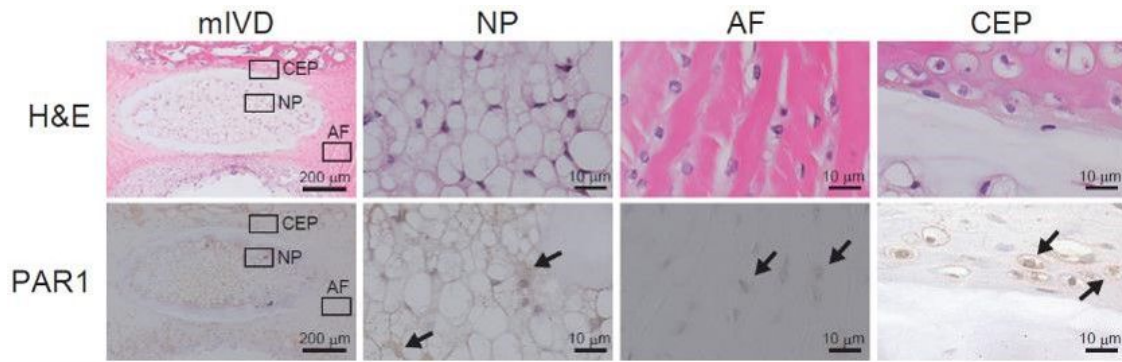
マウス尾椎間板を穿刺することにより人工的マウス椎間板変性モデルとした



- 1) トロンビンの受容体である PAR1 のマウス椎間板での発現を組織にて確認した
- 2) トロンピン刺激にて MMP3 が発現することの確認、また PAR1 の阻害によってそのことが抑制されるかの確認
- 3) トロンピン刺激により VEGF が発現されるか、PCR 法、ウエスタンブロッティング法で確認し、また組織学的検討を行った
- 4) 人工的マウス椎間板変性モデルにおける血管新生を確認した

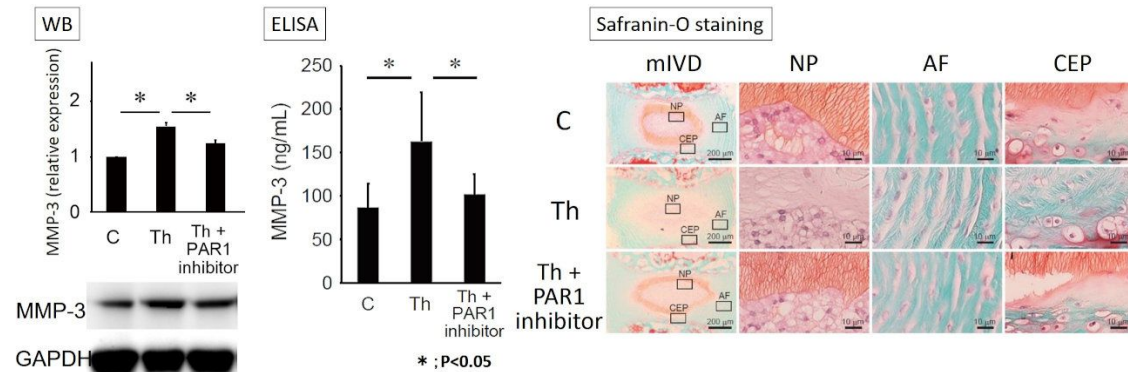
4. 研究成果

1) マウス椎間板におけるトロンピン受容体 PAR1 の発現確認



トロンピン受容体 (PAR1) は椎間板の髄核 (NP)、線維輪 (AF) にも発現する

2) トロンピン刺激による MMP3 発現の確認および椎間板変性惹起性について

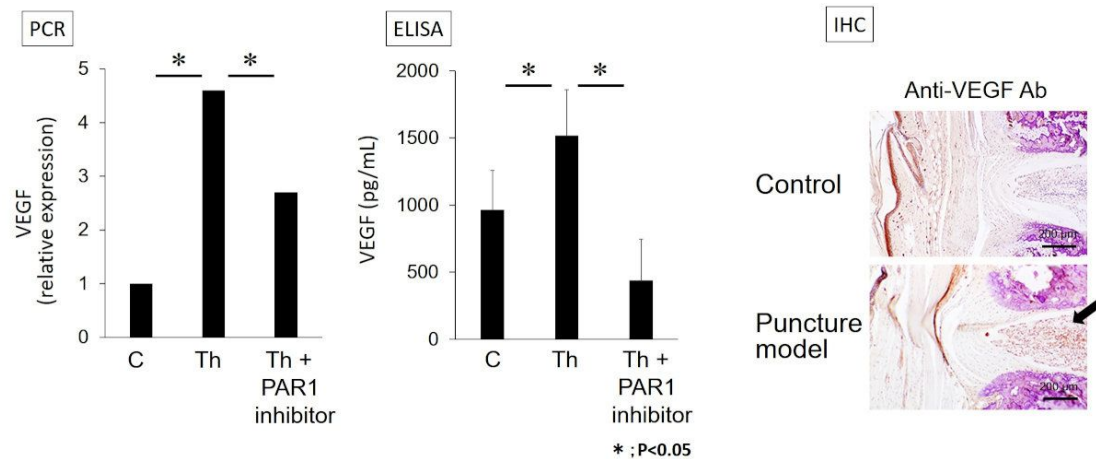


トロンピン刺激により、MMP3 の発現がみられた

この MMP3 産生は PAR1 阻害薬により抑制された

トロンピン刺激により産生された MMP3 の椎間板変性への関与が示唆された

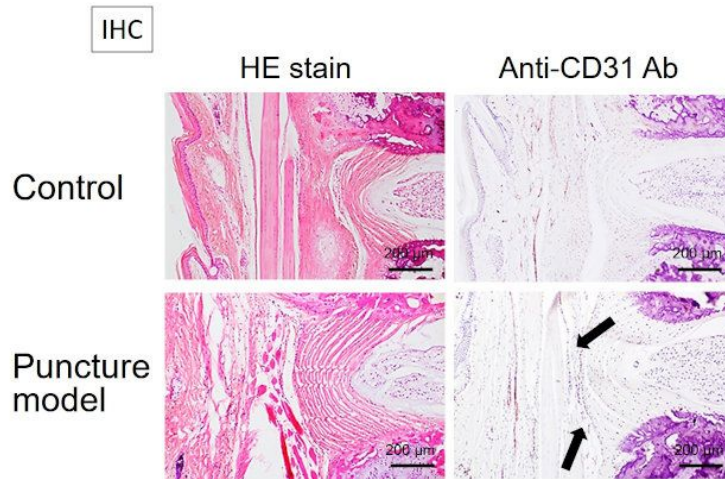
3) トロンピン刺激による VEGF の発現確認



トロンピン刺激により、VEGF の発現がみられた

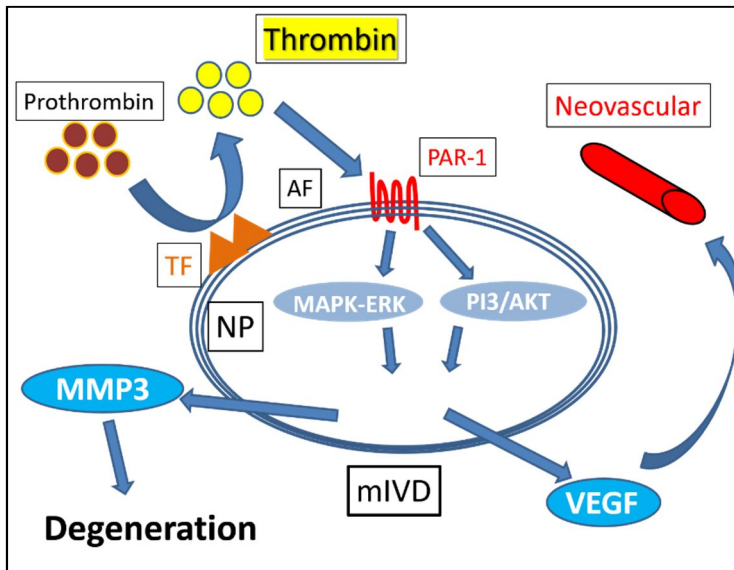
この VEGF 発現は人工的マウス椎間板変性モデルにおいても確認された

4) 人工的マウス椎間板変性モデルにおける血管新生の確認



人工的マウス椎間板変性モデルにおいて血管新生が確認された

当科における先行研究および、本研究結果より以下のようなメカニズムを考察した



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ando Takashi, Ichikawa Jiro, Fujimaki Taro, Taniguchi Naofumi, Takayama Yoshihiro, Haro Hirotaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Gencitabine and Rapamycin Exhibit Additive Effect against Osteosarcoma by Targeting Autophagy and Apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3097 ~ 3097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12113097	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 -
1. 著者名 Fujimaki Taro, Ando Takashi, Hata Takanori, Takayama Yoshihiro, Ohba Tetsuro, Ichikawa Jiro, Takiyama Yoshihisa, Tatsuno Rikito, Koyama Katsuhiko, Haro Hirotaka	4. 巻 151
2. 論文標題 Exogenous parathyroid hormone attenuates ovariectomy-induced skeletal muscle weakness in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116029 ~ 116029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koizumi Ryouyusuke, Koyama Kensuke, Wako Masanori, Ohba Tetsuro, Takayama Yoshihiro, Haro Hirotaka	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical conditions needed to acquire sustained functional remission in rheumatoid arthritis patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1751 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-020-05451-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wako Masanori, Ichikawa Jiro, Koyama Kensuke, Takayama Yoshihiro, Haro Hirotaka	4. 巻 2020
2. 論文標題 Calcific Tendinitis of the Supraspinatus Tendon in an Infant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Orthopedics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/9842489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学大学院整形外科学講座
<https://yamanashi-orthop.com/>

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