

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791367

研究課題名（和文）退行性椎間板疾患における炎症性サイトカイン TSLP の役割の解明

研究課題名（英文）A potential role of thymic stromal lymphopoietin in the disc degeneration.

研究代表者

大場 哲郎 (OHBA TETSURO)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70456490

研究成果の概要（和文）：

腰椎椎間板ヘルニアの自然退縮機序について、近年アレルギー疾患の炎症反応のイニシエーターとして注目されているサイトカイン TSLP が、炎症細胞の遊走に作用していることに着目し、椎間板ヘルニア病態における TSLP の役割について研究している。

1. マウスから採取した椎間板臓器に対して、Smad シグナル伝達阻害剤を加えると TSLP の発現が見られた。

2. 人の手術サンプルを解析したところ、ヘルニアサンプルには TSLP の発現が多く見られ、他方で腰椎変性疾患で固定術を施行された椎間板には多くは見られなかった。

以上の結果から、椎間板組織に恒常性に発現する TGF- $\beta$  は、これまでの報告にあるように軟骨組織の発達、維持だけでなく、正常状態において炎症反応を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Increased TSLP and phosphorylated NF- $\kappa$ B expressions were observed in HD tissue samples associated with reduced expression of phosphorylated Smad2/3 (an indicator of active TGF- $\beta$  signaling) and vice versa in posterior lumbar spinal fusion samples. The pharmacological blockade of endogenous TGF- $\beta$  activity induced TSLP, but not MCP-1, IL-6 and MMP-3, expression. Endogenous TGF- $\beta$  activity limits TSLP expression in intervertebral disc tissue in the steady states via suppression of NF- $\kappa$ B. In occurring phase of HD, TSLP production might be induced via NF- $\kappa$ B activation due to lack of endogenous TGF- $\beta$  activity by unidentified mechanisms, thereby eventually contributing to natural resorption of HD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000円	750,000円	3,250,000円
2011年度	700,000円	210,000円	910,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

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：TSLP、TGF- $\beta$ 、椎間板

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛は生涯罹患率が 60%から 80%にのぼり、発症頻度が極めて高い。また、日本における 1 日当りの腰痛症、椎間板障害、坐骨神経痛による患者の割合は入院 11,000 人、外来 155,900 人である（平成 14 年度厚生省統計情報部調査）。人口 10 万人当りの受療率では、入院 9 人、外来 122 人中であることから、腰椎疾患は高罹患率といえる。その 40%は腰椎椎間板ヘルニアが原因で、腰痛症を来す疾患の中で最も頻度が高い。

腰椎椎間板ヘルニアの病態は、正常椎間板内の含有水分量の低下により本来の弾力性が喪失し、椎間板の硬度が増す変性が基盤となる。この変性椎間板が脊柱管に突出して、神経根や馬尾を圧迫し、腰痛や下肢痛などの神経症状を発症する。

我々はこれまで腰椎椎間板ヘルニア保存例を対象に MRI 検査を施行し、経時的に脊柱管へ脱出したヘルニア塊が減少する自然退縮機序が認められることを報告した（*Spine* 1997）。退縮症例は臨床症状が次第に改善してくることから、腰椎椎間板ヘルニアの保存治療群の中で治癒または軽快してきたと考えられていた症例の多くは、この椎間板ヘルニアの自然退縮機序に起因することが示唆された。さらに、MRI の臨床分類で自然退縮しやすいタイプのヘルニア塊ほどより多くマクロファージが浸潤し、マクロファージ遊走因子である MCP-1 の発現をみることを解明した（*Spine* 1996 , *J Orthop Res* 1997）。これら炎症細胞の遊走、浸潤が椎間板ヘルニアの自然退縮の鍵であるという知見から、退縮機序の解明におい

て椎間板におけるケモカインの発現機序を明らかにすることは重要である。

我々は、サイトカイン TSLP (thymic stromal lymphopoietin) が、喘息やアトピー性皮膚炎の病態において、炎症細胞の遊走・浸潤に深く関与していること (*Nat Immunol* 2002, *Nat Immunol* 2005) に着目した。そこでマウスの椎間板組織を用いた実験により、以下の知見を明らかにした (*Arthritis Rheum.* 58 :3510-9, 2008)。

(1) 炎症性サイトカインである、TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$  が椎間板組織に作用すると、TSLP が産生誘導される。(培養上澄の ELISA、培養椎間板の Real-time PCR、免疫染色法)

(2) TSLP が椎間板組織に作用し PI3K/AKT 経路が活性化され、ケモカイン MCP-1 や MIP-1 $\alpha$  が産生される。(培養上澄の ELISA、Cytokine array 法、培養椎間板の免疫染色法)

(3) ヒトの椎間板ヘルニア手術サンプルに、TSLP の発現を認める。(免疫染色法)

(4) 椎間板を TSLP 刺激して培養した上澄は、マクロファージ遊走能をもつ。(マクロファージ遊走 Assay)

これらの結果から、TSLP が炎症細胞の遊走・浸潤を誘導することで椎間板ヘルニアの自然退縮機序に深く関与している可能性を発見した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、TSLP がどのような機序で椎間板組織から発現し、ヘルニアの自然退縮にどのような機序でどの程度作用しているかについて解明することである。

(1) マウスから採取した椎間板臓器に対して TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  の刺激をすることで培養上澄中に TSLP の産生が誘導されるが

(Arthritis Rheum. 58 :3510-9, 2008)。同時にTGF- $\beta$ を加えることでこの産生が著しく抑制された。このことから、Smadを制御することでTSLPの発現が誘導されるかどうかを解明する。

(2) これまでにTSLPの産生は主にNF- $\kappa$ Bにより制御されていることが報告されている、そこでTGF- $\beta$ →smad経路と、NF- $\kappa$ Bがどのように相互作用しているか検討する。

(3) 人の手術サンプルを解析することで、椎間板ヘルニアと、腰椎変性疾患との間でのシグナル伝達の違いを解析する。

### 3. 研究の方法

(1) マウスから椎間板を採取し、臓器培養を施行、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  また Smad3 の選択的阻害剤である HTS-466284 で刺激を加えて、6. 12. 24. 48 時間でそれぞれ椎間板組織を回収し、リン酸化 smad3・NF- $\kappa$ B シグナルの発現について免疫染色とウェスタン・ブロッティング法を用いて解析した。

また同様に培養した上澄に産生されるサイトカインの発現量について以下に示す、ELISA を使用して解析した。(mouse TSLP, MCP-1, IL-6, and MMP-3 ELISA kits (R&D Systems))

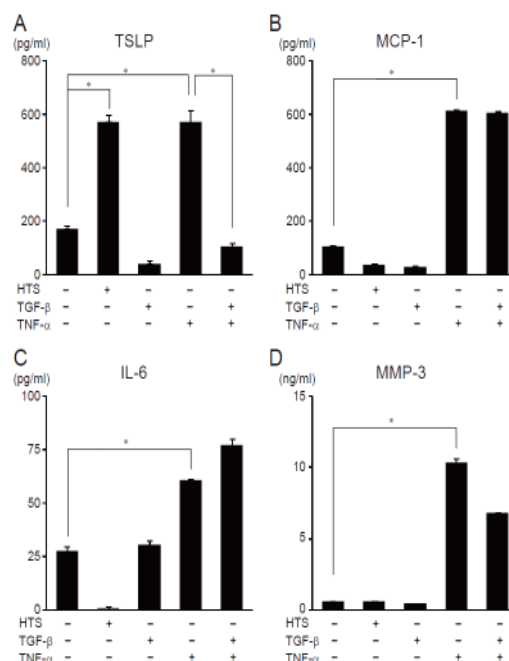
(2) 以下に示す患者の手術症例から椎間板を採取した。(The average age of the patients with HD was 57.2 years (range 35-74 years) and for degenerated disc was 68.5 (range 48-77 years). The types of HD identified were classified as subligamentous extrusion (three cases), transligamentous extrusion (two case),

and sequestration (one case). The grades of degenerated disc identified by Pfirrmann's classification were classified as grade three (three cases), grade four (two cases), or grade five (one case))

これらのサンプルの、TSLP、リン酸化 Smad3、リン酸化 NF- $\kappa$ B の発現を免疫染色およびウェスタンブロッティング法で解析した。

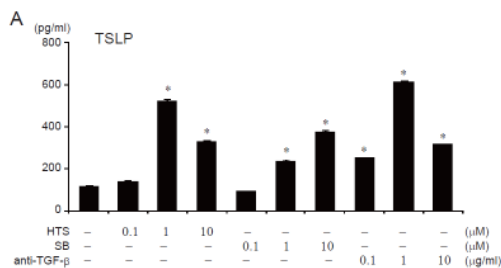
### 4. 研究成果

(1) 以下は TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  また Smad3 の選択的阻害剤である HTS-466284 で刺激を加えて、椎間板の培養上澄に産生されたサイトカインを ELISA 法で解析した結果である。グラフで示したように HTS 刺激で TSLP (図 1 : グラフ A) のみ著しい上昇がみられ、他のヘルニア退縮に重要なサイトカインについてはこの現象は見られなかった。



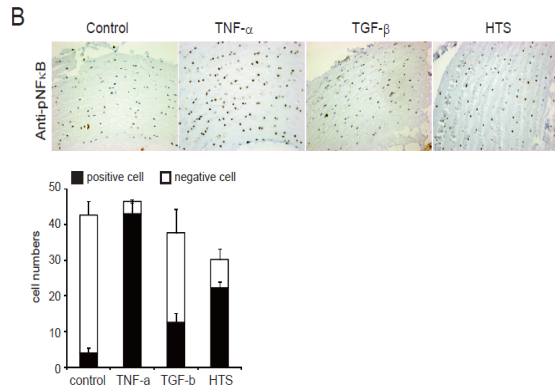
(図 1)

そこで、HTS 以外の TGF $\beta$ -Smad 経路の阻害剤として SB431542 (TGF- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor) および TGF- $\beta$  中和抗体で椎間板を刺激したところ、濃度依存性に培養上澄中に TSLP の上昇が認められた。(図 2)



(図 2)

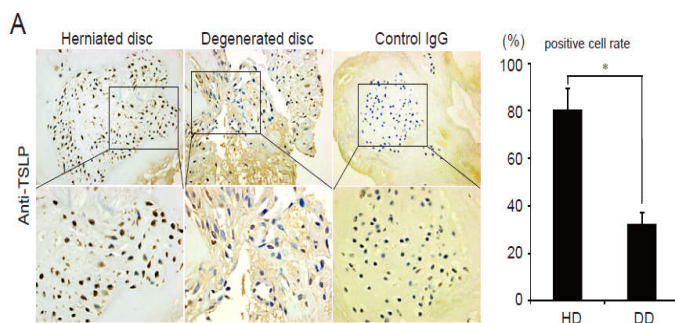
次に、HTS 刺激による TSLP 発現の経路を明らかにするため、図 3 のようなサイトカインで椎間板を刺激し、72 時間後にこれらの組織の免疫染色を行ったところ、NF- $\kappa$ B 経路の発現が明らかとなった。



(図 3)

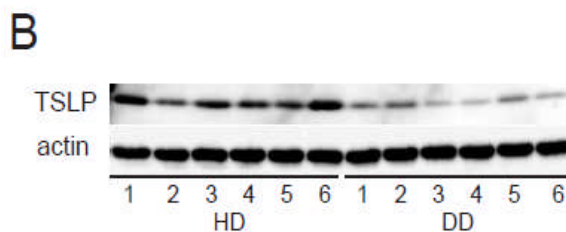
(2) 人の手術サンプルを用いた実験。

ヘルニアサンプルから回収したヘルニアサンプルと腰椎後方固定術時に採取した椎間板をそれぞれ anti-human TSLP 抗体で免疫染色したところ、ヘルニアサンプルにより多くの陽性細胞がみられた。(図 4)



(図 4)

次に同様のサンプルから蛋白を抽出して、ウェスタンブロットを施行したところ、すべてのヘルニアサンプルに TSLP の発現が強く見られた。(図 5)



(図 5)

以上の結果から、椎間板組織に恒常性に発現する TGF- $\beta$  は、これまでの報告にあるように軟骨組織の発達、維持だけでなく、正常状態において炎症反応を制御している可能性、またヘルニア発現時には、NF- $\kappa$ B 経路を介して炎症の惹起に深く関与することが示唆された。

## 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 1 件)

① Endogenous TGF- $\beta$  activity limits TSLP expression in intervertebral disc tissue via suppression of NF- $\kappa$ B. Yong Zhu, Tetsuro Ohba. Arthritis & Rheumatism (under review)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/research.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大場 哲郎 (OHBA TETSURO)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70456490

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし