

## 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 05 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791380

研究課題名（和文） 椎間板髄核細胞のアポトーシスを誘発する遺伝子シグナル伝達の解明

研究課題名（英文） The clarify of the signal transduction which induces the apoptosis of nucleus proposes cells

研究代表者

前野 耕一郎 (KOICHIRO MAENO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70403269

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質であるFasLの過剰発現を行ったヒト椎間板髄核細胞の不死化細胞株と、ヒトマクロファージの細胞株による共培養実験を行った。その結果、IL-1 $\beta$ , NF- $\alpha$ , IL-6などの炎症性サイトカインの産生量がコントロール群に対して有意に増大していた。さらにFasLの細胞表面での発現を調節するADAM10と呼ばれるタンパク質の発現も増大しており、FasLとADAM10は一連の炎症性サイトカインの発現に重要な働きをしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The production of pro-inflammatory cytokines was found to be far larger at the co-culture group of macrophages and intervertebral nucleus pulposus cells with over-expression of Fas Ligand (FasL) which is transmembrane protein. Furthermore, it is found that the expression of ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) 10, which controls the expression of FasL, also increases. FasL and ADAM10 play an important role in the production of pro-inflammatory cytokines coming from interaction of the intervertebral nucleus pulposus cells and macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

日本で最も有訴率の高い疾患は腰痛と言われている。腰痛の原因は様々だが、最大要因とも言われる脊椎疾患の多くは椎間板の変性に起因する所が大きい。椎間板の変性は椎間板ヘルニアや脊柱支持機構の破綻を生み出す主な要因であり、放置すると腰痛のみ

ならず脊柱管内を走行する神経組織が刺激されて様々な神経症状を引き起こす原因ともなりえる。遺伝子レベルでの椎間板変性の要因には椎間板髄核細胞に存在する膜タンパク質である Fas-ligand (FasL) の関与が示唆されている。FasL は同じ膜タンパク質である Fas と結合することで、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知られている。よって Fas を持つ他の免疫細胞に対する FasL を持つ椎間板髄核細胞の能動的防御機構（免疫学的特権とも言われている）が何らかの原因で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。

また最近になって、この Fas/FasL の反応が、上述のようなアポトーシスの誘導だけではなく、マクロファージとの相互作用による Pro-inflammatory cytokine の産生にも関与している可能性が示唆されている。加えて近年、細胞接着阻害領域 (Disintegrin domain) と蛋白融解酵素領域 (metalloproteinase domain) を持つ、A Disintegrin and metalloproteinase (ADAM) の一種がこの Fas/FasL システムを介した一連の細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。特にこの ADAM の 1 つである ADAM10 は FasL の細胞外領域に結合した細胞膜結合型酵素であり、FasL の細胞外領域を切り離すことで細胞膜上の FasL の発現制御に関与していると報告されている。

以上のこれまでの報告から我々は、椎間板髄核細胞に発現する FasL と ADAM10 の 2 つの分子が、椎間板髄核細胞とマクロファージの相互作用によって惹起される細胞アポトーシスの誘導や炎症反応に関与していると考えた。現在までに椎間板髄核細胞の変性経路や、痛みとして直接臨床症状に直結するような椎間板髄核細胞周囲で引き起こされる炎症反応の経路を遺伝子レベルで詳細に解析した報告は見られない。そこで本研究の目的は、上記学術的背景や、我々が現在までにラット尾椎を用いた椎間板変性モデルの作成にたずさわって、同モデルにおける各種遺伝子の動向調査を進めてきたという背景から、以下の様に設定した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記背景をベースとして、脊椎疾患の主要因である椎間板変性と、そこから引き起こされる炎症疼痛に着目し、そのメカニズムを遺伝子レベルで解析することとした。

## 3. 研究の方法

ヒト椎間板の髄核不死化細胞株 (NP cell line) は作成元である東海大学整形外科教室に研究の主旨を説明し、一部を譲渡して頂いていた。また FasL plasmid は金沢大学の須田先生のご厚意により譲渡して頂いた。まずこの FasL を、Lonza Nucleofactor system を用いて NP cell line に過剰発現させた。Negative control として、FasL plasmid に組み込まれているベクター部分のみを同じ手順で過剰発現させた細胞群を作成し、FasL 非過剰発現群として使用した (図 1 a, b)。

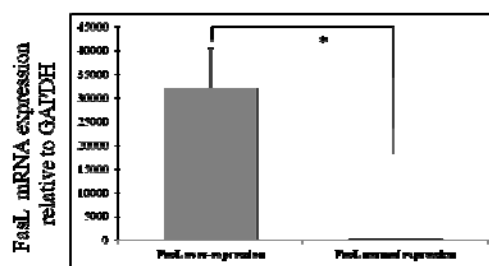


図 1a. 過剰発現後の FasL 発現量 (mRNA)

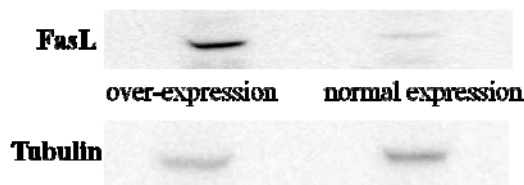


図 1b. 過剰発現後の FasL 発現量 (タンパク)

FasL を過剰発現させた NP cell line とヒトマクロファージの cell line である Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) cell line を、両面からの細胞同士が接触可能な 0.4μm pore を有する polyester membrane の別々の面にそれぞれ接着共培養させた (図 2)。比較対照群として、FasL 非過剰発現群を用いた共培養群、NP cell line および GM-CSF cell line の単独培養群を設定した。共培養開始後 6 時間の Caspase-1 (炎症性サイトカイン IL-1β の前駆体)、Caspase-8 (Fas/FasL 反応によって活性化される、細胞アポトーシスのイニシエーター) および ADAM10 の mRNA および

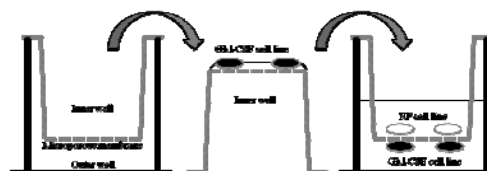


図 2. 共培養の模式図

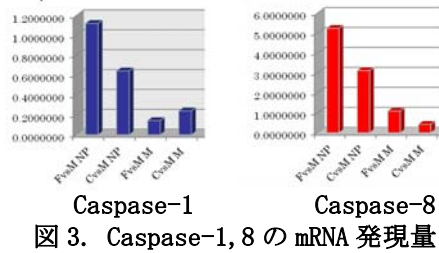
タンパク発現量、共培養開始後 12 時間後と 24 時間後の炎症性サイトカイン (IL-1β, TNF-α, IL-6) の mRNA およびタンパクの発現量を評価した。尚、細胞共培養の時間についてはいくつかの試験的調査を行った上で設定した。mRNA 発現量は real-time RT-PCR、タンパク発現量は Western Blotting で評価した。また各タンパクの局在は蛍光免疫染色で評価した。

## 4. 研究成果

### (1). Caspase 発現量

Caspase-1、Caspase-8 の mRNA 発現量は、FasL を過剰発現させた NP cell line と

GM-CSF cell line の共培養条件下(下図の FvsM)で最も有意に増加していた。またその発現はマクロファージ(M)からではなく髄核細胞(NP)側からであった(図3)。



### (2). 炎症性サイトカインの発現量

全ての炎症性サイトカインの mRNA 発現量は、単独培養群と比較すると共培養群において有意に増加していた。なかでも FasL を過剰発現させた NP cell line と GM-CSF cell line の共培養群では、培養開始後 12 時間で IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の発現量が(図4a)、培養開始後 24 時間で IL-6 の発現量が(図4b)、それぞれ FasL を過剰発現させていない NP cell line と GM-CSF cell line の共培養群に対して有意に増加していた。

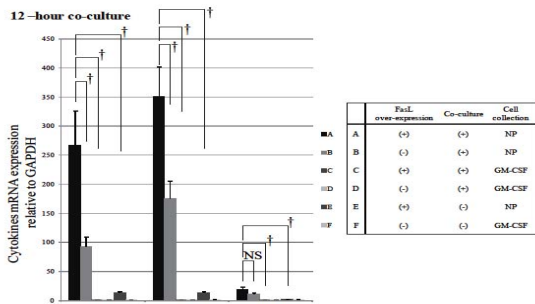


図4a. 培養開始後 12 時間での炎症性サイトカインの mRNA 発現量

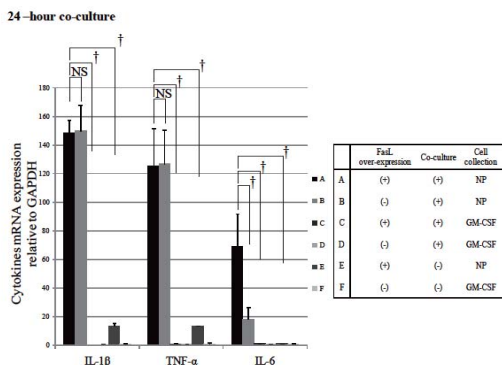


図4b. 培養開始後 24 時間での炎症性サイトカインの mRNA 発現量

タンパク発現量も、単独培養群と比較すると共培養群において全ての炎症性サイトカインにおいて増加していた。特に FasL を過剰発現させた NP cell line と GM-CSF cell line の共培養群においては、培養開始後 12 時間で IL-1 $\beta$  が、培養開始後 24 時間で IL-6 が、

それぞれ mRNA 発現量と同様に増加していた。一方で TNF- $\alpha$  のタンパク発現量は mRNA よりやや遅れ、培養開始後 24 時間で増加していた。尚、これら全ての炎症性サイトカインは GM-CSF cell line からではなく、NP cell line 側からの産生が主体であった(図5)。

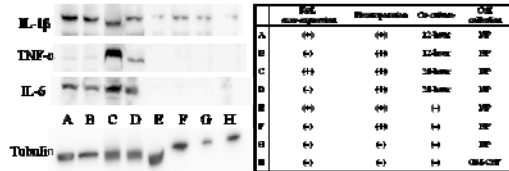


図5. 培養開始後、12 時間、24 時間での炎症性サイトカインのタンパク発現量

### (3). 蛍光免疫染色法による局在評価

また FasL を過剰発現させた NP cell line と GM-CSF cell line の共培養条件下において蛍光免疫染色を行うと、FasL の発現する細胞に一致して IL-6 の発現が認められた(図6)。

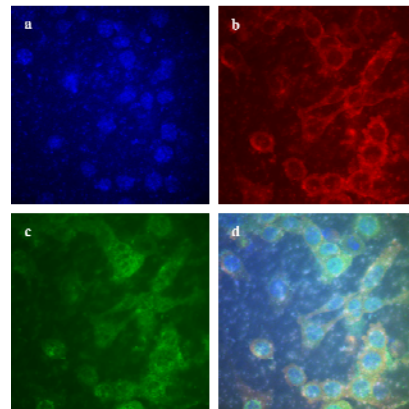


図6. 蛍光免疫染色

a. DAPI 染色、b. IL-6、c. FasL、d. merged

### (4). ADAM10 の発現量

ADAM10 についても mRNA 発現量(図7a)、タンパク発現量(図7b)ともに単独培養群と比較して共培養群で有意に増加していた。なかでも、やはり FasL を過剰発現させた NP cell line と GM-CSF cell line の共培養群において発現増加が有意であった。

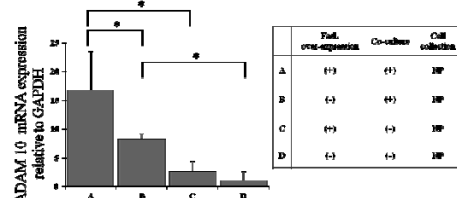


図7a. 培養開始後 6 時間での ADAM10 の mRNA 発現量

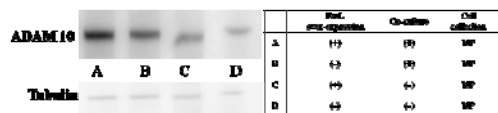


図 7b. 培養開始後 6 時間での ADAM10 のタンパク発現量

上述の結果より、同じ共培養でも特にFasLを過剰発現させると明らかに炎症性サイトカインの発現増加が見られることと、FasLを過剰発現させた椎間板髄核細胞の単独培養では炎症性サイトカインの発現増加がほとんどみられないことから、やはりFasLは椎間板髄核細胞とマクロファージがコンタクトする際において、炎症反応の惹起に大きく関与していると言える。

一方で今回の実験結果では、Caspase-1, Caspase-8や全ての炎症性サイトカインが椎間板髄核細胞を中心に産生されていた。FasLはFasと結合することで、Fasを発現する細胞にアポトーシスを誘導するため、一般的には炎症性サイトカインの産生もFasLを過剰発現させた椎間板髄核細胞側ではなく、マクロファージ側が中心になると推測される。この理由についてはADAM10の関与を考えた。近年、ADAM10によって膜タンパク質であるFasLの細胞外部分が切離されると、切離されて残存したFasLを起点として自己の細胞内へシグナルを送るという、いわゆるreverse signalingが活性化することが示されている。本研究の結果から考えても、FasLを発現する椎間板髄核細胞内でreverse signalingが活性化された結果、椎間板髄核細胞内で炎症性サイトカインが産生されたとして矛盾しないと思われた(図8)。

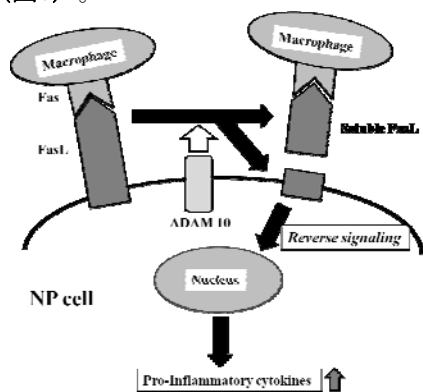


図8. Reverse signalingの模式図

以上より、椎間板髄核細胞に発現する FasL と ADAM10 の 2 つ の 分 子 は、椎間板髄核細胞とマクロファージの相互作用によって惹起される炎症性反応に大きく関与しているものと考えられた。

以上の研究成果をまとめて現在、学術論文に投稿中である。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 発表(代表)者: 山本潤哉、前野耕一郎  
表題: 椎間板ヘルニアにおける炎症性反応には髄核細胞に発現する Fas ligand が関与する。-椎間板ヘルニアの疼痛発生機序解明に向けて-  
第 41 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 2012. 04. 19-21, 久留米
- ② 発表(代表)者: 山本潤哉、前野耕一郎  
表題: Fas-Ligand plays an important role in the production of pro-inflammatory cytokines in human nucleus pulposus cells.  
第 58 回米国整形外科研究会議 (ORS), 2012. 02. 04-07, USA, San Francisco
- ③ 発表(代表)者: 山本潤哉、前野耕一郎  
表題: ヒト椎間板髄核細胞において Fas ligand は炎症性サイトカイン産生に関与する。  
第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011. 10. 20-21, 群馬
- ④ 発表(代表)者: 山本潤哉、前野耕一郎  
表題: Fas-Ligand plays an important role in the production of pro-inflammatory cytokines in human nucleus pulposus cells.  
第 38 回国際腰痛研究学会議 (ISSLS), 2011. 6. 14-18, Sweden, Gothenburg

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前野 耕一郎 (KOICHIRO MAENO)  
神戸大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 70403269

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 研究協力者

西田 康太郎 (KOTARO NISHIDA)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 00379372

角谷 賢一郎 (KENICHIRO KAKUTANI)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 10533739

山本 潤哉 (JUNYA YAMAMOTO)  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生