

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592162

研究課題名(和文) 椎間板のアンチエイジングを具現し得る新しい生物学的治療の開発

研究課題名(英文) Development of New Biological Therapy for Regeneration of Degenerated Intervertebral Discs

研究代表者

宮本 敬 (MIYAMOTO, Kei)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20313885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板の老化抑制(アンチエイジング)する方法を開発すべく、椎間板変性における抗炎症剤の薬効発現、カルパインの役割を検証した。また、椎間板変性の存在する胸腰椎移行部における黄色靭帯骨化巣におけるカルパインの発現も検証した。セレコキシブ、インドメタシンの2種類の薬剤とも、炎症性サイトカインを用いた培養ウシ椎間板細胞における炎症性マーカーの細胞培養液への湧出を阻害した。インターロイキン添加によるカルパイン生成はインドメタシン追加添加によって抑制されない一方、セレコキシブ追加添加により著明に抑制された。黄色靭帯におけるカルパインおよびその阻害物質の発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：Influences of anti-inflammatory drugs and calpain on intervertebral disc (IVD) degeneration were investigated in order to develop new biological treatment for degenerated IVD. Additionally, expression of calpain was examined in ossification of yellow ligament (OYL) at thoracolumbar region associated with IVD degeneration. While Celecoxib and Indomethacin decreased production of inflammatory products in cultured bovine IVD cells with addition of interleukin-1, Celecoxib decreased expression of calpain in cultured medium. This suggested that use of calpain has some role in the anti-inflammatory function of Celecoxib for degenerated IVD. Expression of calpain in OYL was shown, suggesting that regulation of calpain can have a role in inhibition of development in OYL.

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：calpain intervertebral disc degeneration anti aging spine yellow ligament

1. 研究開始当初の背景

【1】椎間板変性は腰痛、下肢痛み、歩行障害など、種々の症状をきたし、中高齢者のせ QOL を著明に減少させる原因となる病態である。この病態に対する治療法として、終末期椎間板変性（不安定性、椎間板腔）という時期において、椎間板摘出や椎間固定という侵襲の大きな外科的治療を要する場合がおおきい。一方、軽度椎間板変性に対する侵襲の小さな保存的薬物治療について、まだまだ開発されていないのが現状である。椎間板の老化を抑制（椎間板のアンチエイジング）する方法は高齢者の QOL を著明に改善する効果が期待できるが、まだ明らかとされていない。カルパインは椎間板の老化に関連すると考えられているが、この働きを抑制することによって椎間板の老化を抑制することが可能かどうか、よく知られていない。

【2】胸椎・腰椎移行部において椎間板変性の存在する部分に存在する黄色靭帯骨化症はそのサイズによって、脊髄症状を発生し、歩行障害を呈するなど、QOL に大きな影響を与える疾患としてよく知られている。また、本疾患に対する治療として、保存的薬物療法は存在せず、侵襲の大きな外科的治療を要する場合が多い。黄色靭帯骨化発生機序に関する研究は散見されるが、黄色靭帯骨化におけるカルパインの発現およびその役割については全く報告がないのが現状である。

2. 研究の目的

【1】椎間板の老化（炎症を培養ウシ椎間板細胞に惹起させて椎間板変性状態としてシミュレートした）においてカルパインの制御がいかなる効果をもつか、また、各種抗炎症剤 (Celecoxib, Indomethacin) がいかなる効果をもつかを検討した。

【2】黄色靭帯骨化におけるカルパインの発現について検討を行った。

3. 研究の方法

【1】培養ウシ椎間板にインターロイキン等炎症性サイトカインを添加して炎症を惹起させ、カルパインの発現、炎症性産物 (ADAMTS4, ADAMTS5, MMP1, MMP3, NO, PGE<sub>2</sub>) の産生 (ELISA アッセイ, EIA アッセイ) 等について検討した。また、各種抗炎症剤の炎症抑制効果について検討した。

【2】ヒト胸椎・腰椎移行部において椎間板変性の存在する部分に存在する正常黄色靭帯、あるいは黄色靭帯骨化巣を採取し、カルパインの発現について検討 (免疫染色) を行

った。

4. 研究成果

【1】椎間板の老化を抑制（椎間板のアンチエイジング）する試みとして、培養ウシ椎間板にインターロイキン等炎症性サイトカインを添加して炎症を惹起させた。この際にカルパインの発現の増加を認めた (図1)。炎症発現においてカルパインがなんらかの役割を有していることが示唆される結果であった。

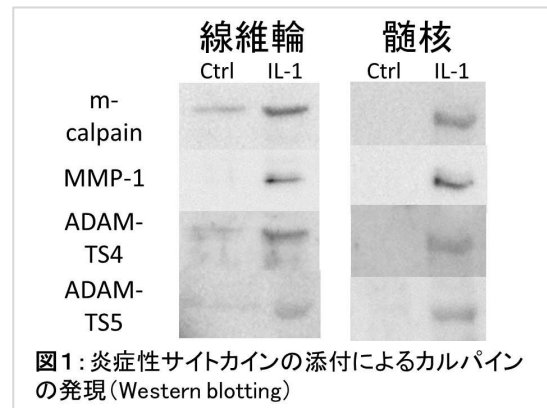


図1: 炎症性サイトカインの添付によるカルパインの発現 (Western blotting)

また、Celecoxib, Indomethacin の2種類の薬剤とも、明らかな毒性を示さない一方、炎症性マーカーの細胞培養液への湧出を阻害 (PGE<sub>2</sub>: 50-70%, NP: 20-35%, MMP3: 20-50%, ADAMTS4: 0-50%) する傾向を示した (図2)。よって、これらの薬剤が椎間板における炎症を鎮静化させる役割を持つことが明らかであった。

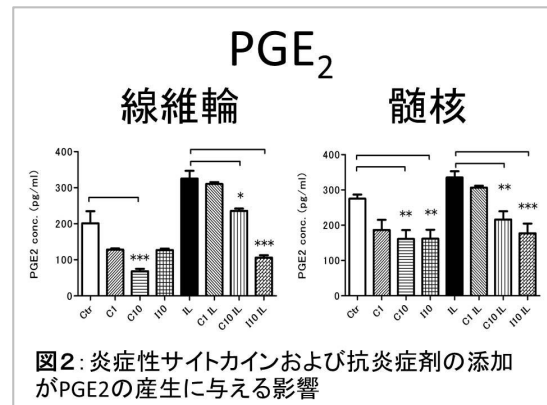


図2: 炎症性サイトカインおよび抗炎症剤の添加がPGE<sub>2</sub>の産生に与える影響

また、インターロイキン添加によるカルパイン生成は Indomethacin 追加添加によって抑制されない一方、Celecoxib 追加添加により著明に抑制された (図3)。

## 髄核

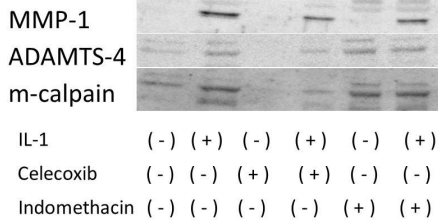


図3: 炎症性サイトカインおよび抗炎症剤の添加がカルパインの産生に与える影響

このことより, Celecoxib による椎間板における炎症制御において, カルパインが何らかの役割を有していることが推察された. 一方, カルパインの役割を阻害するカルパスタチンはシミュレートされた椎間板変性において炎症性マーカーの産生に有意な影響を与えることが確認できない結果であった.

【2】これまでの, 我々のヒト膝関節軟骨, ヒト椎間板における結果と同様に, 黄色靭帯骨化巣にmカルパイン,  $\mu$ カルパインの発現を認めた(図4).

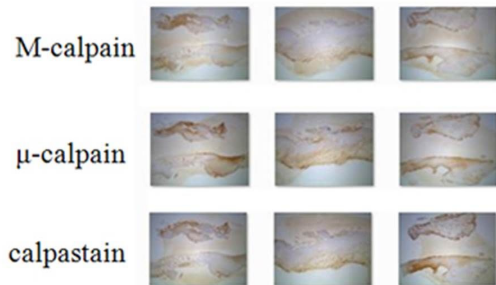


図4: 黄色靭帯骨化症におけるカルパイン, カルパイン阻害物質の発現

この所見にて, 脊髄の圧迫因子となりうる黄色靭帯骨化症の骨化進展にカルパインが関連していると思われ, カルパインの作用阻害により, 黄色靭帯骨化症の骨化進展を予防することができる可能性も考えられ, 患者のQOL改善に向けた新しい治療も実現しうる可能性が示唆された.

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

福田章二, 宮本敬, 鈴木毅一, 井上俊之, 喜久生健太, 清水克時. ヒト椎間板変性におけるカルパインの影響. 中部日本整形外科・災害外科学会雑誌 査読なし Vol.55 No.5, P94, 2012

〔学会発表〕(計2件)

宮本敬. 高齢者における腰痛下肢痛の診断・説明・治療. 第9回老化と生活習慣病を考える会. 2014.5.29, 岐阜市

Kei Miyamoto. Surgical treatment for infected spine using spinal instrumentation, 23rd Myanmar Orthopaedic Society Biennial Conference, 2014.2.8, Myanmar

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

岐阜大学整形外科 基礎研究 脊椎脊髄研究 ホームページ

<http://hosp.gifu-u.ac.jp/seikei/>

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 敬 (MIYAMOTO, Kei)

岐阜大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20313885

(2)研究分担者

清水 克時 (SHIMIZU, Katsuji)  
岐阜大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90170969

(3)連携研究者