

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592191

研究課題名(和文)変形性脊椎症の原因解明と低侵襲治療の開発

研究課題名(英文)The development of minimally invasive treatment and the cause investigation of degenerative spondylosis

研究代表者

波呂 浩孝(HARO, Hirotaka)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10313264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性のメカニズムを特定することは、腰椎疾患の成因解明に極めて重要である。このイニシエーターを同定すべく実験を行った。血球の遊走や炎症反応の重要因子として注目されているヌクレオチドに着目しターゲットをATPとした。椎間板に対する機械的刺激によってATPの産生をみた。次に組織培養した椎間板にATPおよびAMPで刺激を行うと、時間・濃度依存的にVEGFの生産の増大を認め、TGF- $\beta$ の生産減少をみた。この反応はATP受容体阻害薬であるBBGおよびPPADSで阻害された。以上より、ATPが炎症のイニシエーターとして椎間板に作用し、そのレセプターはP2X4を介している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanism of disc degeneration is critical for pathogenesis elucidation of lumbar disease. The experiments was carried out in order to identify the initiator. Are focused to the target was set to ATP which is one of the nucleotides that has attracted attention as an important factor in the blood cell migration and inflammation. We have measured the production of ATP with ELISA method by mechanical stimulation and stress to the intervertebral disc. Then, VEGF production and release in supernatant of the tissue culture of intervertebral disc stimulated with ATP or AMP were increase by time and dose-dependent manner. On the contrary, TGF- $\beta$  production and release in supernatant were decreased by ATP or AMP stimulations. The reactions were inhibited by the BBG and PPADS as ATP receptor inhibitors. From the above, ATP acts on the disc as an initiator of inflammation, its receptor was suggested the possibility that via a P2X4.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板ヘルニア 退縮 炎症 ATP P2X4

1. 研究開始当初の背景

本邦の平均寿命は男性 80 才、女性 86 才超であり急速な高齢化が進んでいる。2007 年度の厚生労働省国民生活基礎調査によると、歩行困難となった要介護者の 21.5%は運動器障害が原因であった。また、その原因は変形性腰椎症、変形性膝関節症、骨粗鬆症が挙げられるが、本邦の推定患者数はそれぞれ 3,790 万人、2,530 万人、1,070 万人であり (Yoshimura N:J Bone Miner Metab 2009)、変形性腰椎症の予防や治療の推進は急務である。実際、2007 年度の厚生労働省国民生活調査では腰痛の有訴率は男性 1 位、女性 2 位であり、その 40~50%は椎間板の加齢性変化が原因といわれている。20 才を過ぎると正常椎間板内の含有水分量が低下し、弾力性が喪失し硬度が増し椎間板変性という加齢性変化がみられる。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すると強い腰痛や下肢痛などの神経症状がみられ、椎間板ヘルニアを発症する。我々は臨床研究を行い、脊柱管に脱出したヘルニア塊が減少する自然退縮機序がみられ、これらの症例は臨床症状の改善をみることを発見し報告した (Spine:1996, 1997)。さらに、椎間板退縮や変性機序を解明する目的で実験を行い、以下の事実を明らかにした。

(1) 手術検体に対して免疫組織学的検討を行った。正常椎間板は本来血管が存在せず、軟骨の基質が主な構成成分となっている。ヘルニア検体では多数のマクロファージを中心とした炎症性細胞の浸潤を認めた (Haro 他 6 名、1 番目、Spine 21: 1647-1652, 1996)。

(2) 浸潤してきたマクロファージや椎間板内の軟骨細胞が軟骨の構成要素を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP; MMP-3, MMP-7) を産生していた (Haro 他 4 名、1 番目、Spine 22:1098-1104, 1997, J Spinal Disord 12(3):295-299, 1999)。

これらの結果から、浸潤してきたマクロファージとヘルニア内の軟骨細胞の関連がこれら酵素の活性化に重要と考え、マクロファージと椎間板組織を共培養する in vitro モデルを開発した。さらに、MMP-3 および MMP-7 のノックアウトマウス由来の組織を用い解析した (図 1)。

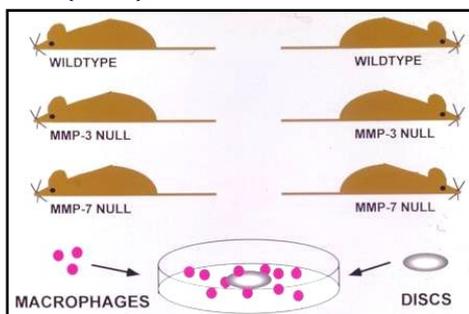


図 1.マクロファージと椎間板の共培養

(3) 椎間板の分解にはマクロファージと軟骨細胞との直接的な接触が必要であり、これ

により炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  が産生され、椎間板内軟骨細胞から MMP-3 や MMP-7 を誘導してマトリックスを分解していた (Haro, 他 6 名、1 番目、J Clin Invest 105: 133-141, 2000) (Haro, 他 5 名、1 番目、J Clin Invest 105: 143-150, 2000)。さらに、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  は、血管新生因子 (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) や MMP、セリンプロテアーゼを誘導、活性化して炎症のイニシエーターとなっていた (Haro, 他 4 名、1 番目、J Orthopaed Res 20(3): 409-415, 2002, Haro, 他 3 名、2 番目、J Orthop Res 2: 895-900, 2004)。

次いで、椎間板ヘルニアを自然発症する軟骨異栄養種 (ビーグル犬) を用い経皮的にヒトリコンピナント MMP-7 を投与して、画像、組織学、分子生物学的にその効果を検討した。その結果、

(4) MMP-7 を投与された椎間板高位では、画像上ヘルニアが消退し、組織及び分子生物学的にも変性椎間板が分解されていた (Haro, 他 6 名、1 番目、J Orthop Res. 23:412 - 9, 2005)。

また、(5) TNF family に属する TWEAK (Tumor Necrosis Factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis) が TNF- $\alpha$  と同様の経路で MMP-3 を誘導し椎間板変性促進因子として作用していた (Haro, 他 7 名、2 番目、J Orthop Res. 25:1438-46, 2007) (Haro, 他 7 名、8 番目、Spine 33:2489-94, 2008)。

(6) 血管遊走因子である VEGF の発現は高齢とともに産生が減少し、高齢者では退縮が遅延する可能性が示唆された (Haro, 他 8 名、2 番目、J Orthop Res 27:229-35, 2009)。

(7) Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は炎症性細胞の遊走に作用するが、椎間板ヘルニアにおいては、炎症性細胞からの TNF- $\alpha$  と IL-1 が椎間板に作用し TSLP が産生され、PI3K/AKT 経路を活性化し、走化性サイトカイン MCP-1 や MIP-1 の誘導が起こり、マクロファージが浸潤した (Haro, 他 11 名、2 番目、Arthritis Rheum 58:3510-19, 2008)。

2. 研究の目的

以上の研究成果から、椎間板ヘルニアの炎症においては、活性化マクロファージが MMP-7 を産生し TNF- $\alpha$  を可溶性とし、TSLP を誘導しヘルニア局所にマクロファージを浸潤、さらに、緩徐に進行する椎間板変性では TWEAK が作用すること、MMP-3 が椎間板内の軟骨分解およびヘルニア分解を促進していること、が明らかになった。

高齢化により著増している腰部脊柱管狭窄症や変形性脊椎症、また、椎間板ヘルニアの原因である椎間板変性の病態を詳細に解明し、診療及び治療の分子標的を同定することを目的としている。椎間板変性に関与する因子は様々な候補が報告されているが、我々は炎症性細胞を起因としたメカニズムを明

らかにしてきた。最近の研究で、血球の遊走や炎症反応のイニシエーターとして、各組織分野で注目されているヌクレオチドに着目しターゲットを ATP とした。よって、椎間板変性における炎症性細胞浸潤過程において、ATP の関与している可能性を探ることとした。本研究により椎間板変性促進分子を同定し、PAR-2 あるいは TNF- $\alpha$  関連因子を抑制し、腰部脊柱管狭窄症、変形性脊椎症、椎間板ヘルニアの発症を減少しうるか、in vitro 及び in vivo 実験で検討を行う。既に関節リウマチなどの疾患では生物製剤の臨床応用を成し遂げ良好な成績をあげており、より頻度が高い脊椎退行性疾患への応用を目指したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス、ラット

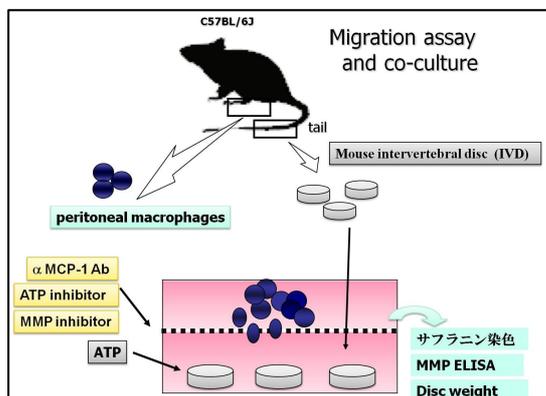
野生型マウス (C57BL/6)、6 週齢、雄 と VNUT-KO mouse 6 週齢、雄、野生型ラット (Wistar)、6 週齢、雄 を使用  
成熟マウス、ラットに対する手術及び組織摘出は全て深麻酔下で行う。実験は施設内の指定された区域で行い、個体の残存部位は全て動物実験施設 1 階の冷凍庫に短期間保管の後、焼却する。これらのマウスの飼育、実験、その後の処理については大学内で定められた実験施設で厳格に行った。

#### (2) マウスマクロファージ

3%サイオグリコレートを含んだ PBS 5ml をマウス腹腔内に注射し、4 日後に腹腔液を採取し遠沈後活性化型マクロファージを採取する。これを椎間板組織と共器官培養する。

#### (3) 椎間板器官培養

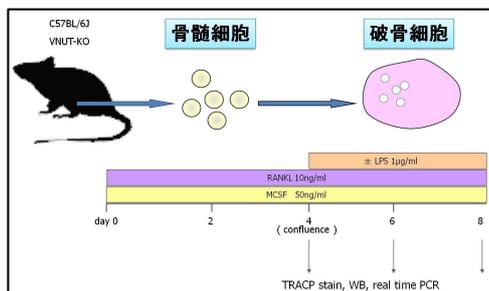
マウス尾椎から軟部組織を取り除いた後に顕微鏡下で椎間板組織を愛護的に採取する。その後、マウス腹腔より採取したマクロファージと共培養する。この培養液中に ATP 製剤を加えて 72 時間培養する。培養液中のタンパク質は ELISA 法にて、椎間板組織内の mRNA は Quantitative-PCR 法にて、タンパク質は Western Blotting 法にて定量する。



#### (4) 破骨細胞における ATP の役割検討

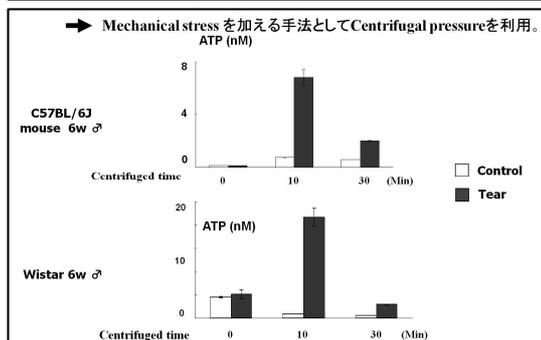
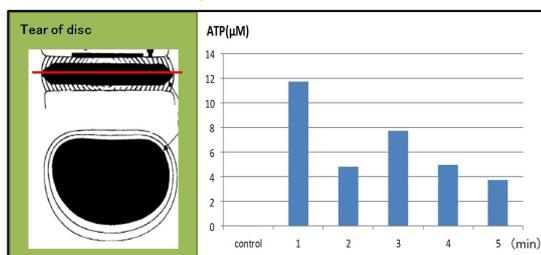
ATP の放出障害を持つ VNUT-KO マウスを使用し、ATP の破骨細胞への影響を破骨細胞分化

を TRACP 染色することにより評価した。



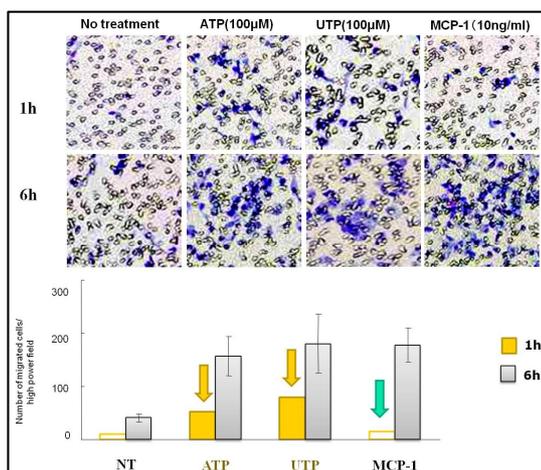
### 4. 研究成果

(1) 機械的刺激 (切断法および遠心法) にてマウス、ラット椎間板より ATP が放出されるかを検討した。



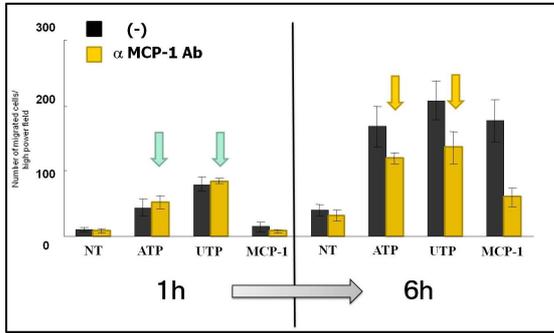
機械的刺激により椎間板より ATP が放出されることが分かった。

(2) ATP 製剤 (ATP, UTP) がマウスマクロファージの遊走を増強するか検討した。



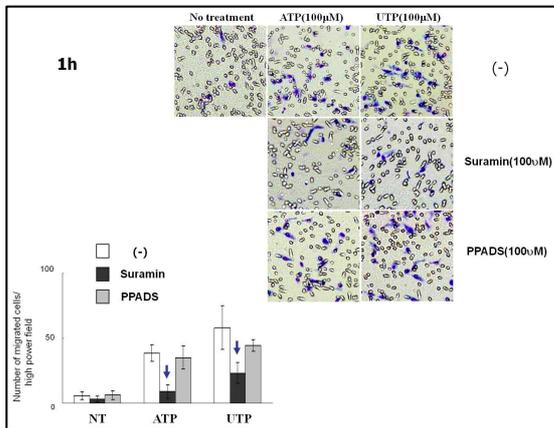
MCP-1 を positive control と使用し、ATP 製剤 (ATP, UTP) が無刺激 (No treatment) に比較して有意に遊走能を増強した。

(3) 上記のマクロファージの遊走能が抗 MCP-1 抗体による影響を受けるかを検討した。



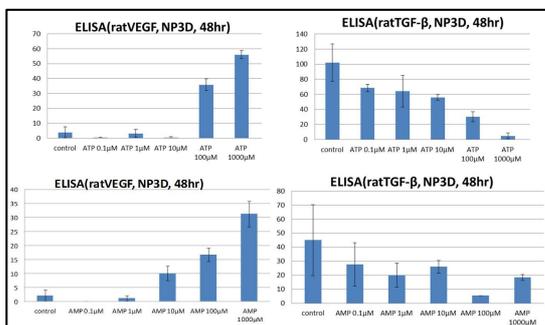
ATP 製剤 (ATP, UTP) によるマクロファージの遊走能の増強が抗 MCP-1 抗体により部分的にブロックされた。ATP 製剤 (ATP, UTP) の直接的関与とともに、ATP 製剤 (ATP, UTP) が MCP-1 の産生に関与している可能性が示唆される。

(4) 次にマクロファージの遊走能が ATP 製剤 (ATP, UTP) の阻害薬である Suramin, PPADS によって阻害されるかを検討した。



ATP 製剤 (ATP, UTP) の阻害薬である Suramin, PPADS によって、増強されたマクロファージの遊走能が抑制された。

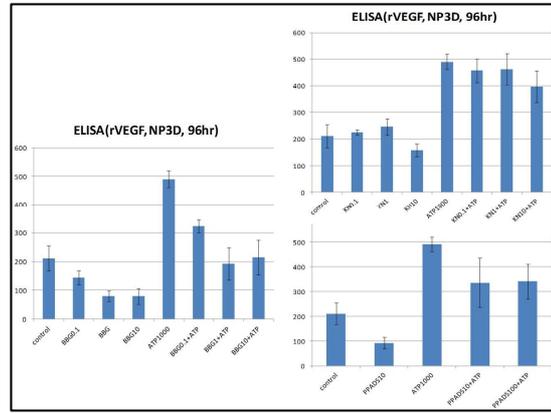
(5) 培養椎間板に対する ATP 製剤 (ATP, AMP) にサイトカイン生産性に対する影響を検討した。



ATP 製剤 (ATP, UTP) 投与によって、椎間板組織からの VEGF 産生の増加をみた。また、TGF-β の生産性については逆に減少をみた。

(6) ATP 製剤 (ATP, UTP) 投与による、椎間板組織からの VEGF 産生増加が、ATP 製剤受容体の各 antagonist によって抑制されるかを

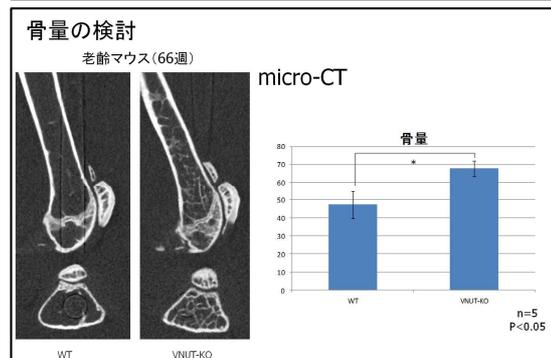
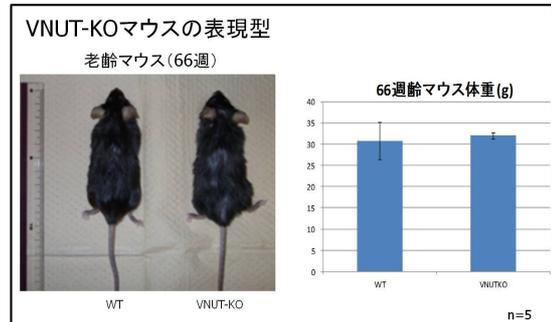
検討した。



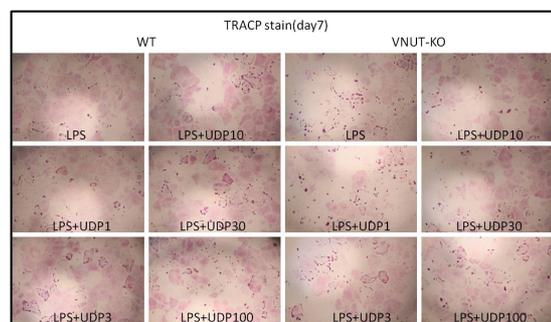
BBG (P2X4,5,7 antagonist), PPADS (P2X1,2,3,5,6, P2Y1,4,6 antagonist) では VEGF の産生抑制がみられ、KN-62 (2X7 antagonist) では抑制されなかった。

(7) 最後に、マクロファージと同じ単球系である破骨細胞への ATP の影響を検討した。WT のマウスと ATP の放出障害を持つ VNUT-KO マウスを使用し、ATP の破骨細胞への影響を破骨細胞分化を評価した。

高齢マウス (66 週齢) を飼育し、表現型と骨量を検討した。



各マウスの破骨細胞分化を検討した。



破骨細胞に外的刺激が入ると、ヌクレオチドのエクソサイトーシスを介して、サバイバルが延長する可能性が示唆された。このことが高齢の VNUT-KO マウスにおいて骨量が低下しないことの関与していると考えられた。

#### 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 3 件)

Sato E, Ando T, Ichikawa J, Okita G, Sato N, Wako M, Ohba T, Ochiai S, Hagino T, Jacobson R, Haro H. High molecular weight hyaluronic acid increases the differentiation potential of the murine chondrocytic ATDC5 cell line. J Orthop Res. 2014 Dec;32(12):1619-27. doi: 10.1002/jor.22691. Epub 2014 Sep 8. (査読あり)

Haro H. Translational research of herniated discs: current status of diagnosis and treatment. J Orthop Sci. 2014 Jul;19(4):515-20. doi: 10.1007/s00776-014-0571-x. Epub 2014 Apr 29. (査読あり)

Haro H, Nishiga M, Ishii D, Shimomoto T, Kato T, Takenouchi O, Koyanagi S, Ohba T, Komori H. Experimental chemonucleolysis with recombinant human matrix metalloproteinase 7 in human herniated discs and dogs. Spine J. 2014 Jul 1;14(7):1280-90. doi: 10.1016/j.spinee.2013.11.039. Epub 2013 Dec 1. (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

**波呂浩孝** 炎症と椎間板変性のメカニズム 第 29 回 日本整形外科学会基礎学術集会(招待講演) 2014 年 10 月 09 日~2014 年 10 月 10 日 (城山観光ホテル)鹿児島県・鹿児島市

Haro H, Fujita K, Ohba T, Ebata S. Analysis of deglutition after occipitocervical arthrodesis for cervical deformity in rheumatoid arthritis. 21st International Meeting on Advanced Spine Techniques. 2014 年 07 月 16 日~2014 年 07 月 19 日 Valencia, Spain

**波呂浩孝** 椎間板ヘルニアに対する新規治療 rhMMP-7 を用いた経皮的融解術 第 87 回日本整形外科学会学術集会 2014 年 05 月 22 日~2014 年 05 月 25 日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

[図書](計 2 件)

中村耕三 編 南江堂 ベッドサイドの高齢者運動器の診かた 2014 年 431 (146-58)

専門編集:馬場久敏 中山書店 整形外科手術イラストレイテッド脊髄の手術 2014 年 200 (118-122)

[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

波呂 浩孝 (HARO, Hirotaka)

山梨大学・総合研究部

・教授

研究者番号:10313264

(2)研究分担者

安藤 隆 (ANDO, Takashi)

山梨大学・総合研究部

・講師

研究者番号:10377492

中尾 篤人 (NAKAO, Atsuhito)

山梨大学・総合研究部

・教授

研究者番号:80318445