

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592196

研究課題名(和文) 椎間板変性に由来する疼痛発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) The clarify of the pain generating mechanism derived from the intervertebral disc degeneration.

研究代表者

前野 耕一郎 (Maeno, Koichiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70403269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膜蛋白質FasLの過剰発現を行ったヒト椎間板髄核細胞不死化細胞株と、マクロファージの共培養を行った結果、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカインの産生量および、FasLの発現を調節する蛋白質であるADAM10の発現量が増大した。またラット尾椎椎間板の線維輪細胞に、IL-1 $\beta$  刺激下で脂肪細胞分泌蛋白質であるadiponectinを投与すると、adiponectin投与群で優位にTNF- $\alpha$  の発現が抑制された。FasLとADAM10は椎間板周囲の炎症性サイトカイン産生増大に関与し、また椎間板周囲の脂肪組織は、恒常的に椎間板周囲の炎症反応を抑制している可能性が示唆された。

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 that was cultured with macrophages and Fas Ligand (FasL) overexpressed intervertebral nucleus pulposus cells. Furthermore, it was found that the expression of ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) 10, which controls the expression of FasL, was also increased. And also, mRNA expression of TNF- $\alpha$  was significantly increased stimulating by IL-1 $\beta$  +adiponectin. From these results, we consider that 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. Also, the adiponectin which is an adipocyte specific hormone known to have anti-diabetic, anti-atherogenic and anti-inflammatory effects, may have inhibited permanently inflammatory reaction around the intervertebral disc.

研究分野：医歯薬学

キーワード：椎間板 Fas ligand ADAM10 マクロファージ 炎症性サイトカイン adiponectin 硬膜外脂肪

### 1. 研究開始当初の背景

腰痛の主要因の一つである脊椎疾患の発生は椎間板の変性に起因する所が大きい。椎間板が変性して椎間板内の髄核が脱出すると様々な炎症性サイトカインが放出される。椎間板ヘルニアを代表とする椎間板変性疾患において強い疼痛を引き起こされる原因の一つはこの炎症性サイトカインであると言われている。近年、膜タンパク質であるFas-ligand (FasL)が、免疫細胞において炎症反応に関与している可能性が示唆された。一方で、FasLについては椎間板髄核細胞での発現が証明されているものの、その詳細な役割は明らかにされていない。また、FasLの関与の有無に関わらず、椎間板変性に由来する腰痛や神経痛の発生に関しては、そのメカニズム自体が詳細には解明されていない。そこで本研究の当初の目的は、髄核細胞に発現する膜タンパク質FasLを中心とした遺伝子が、腰痛発生の原因である炎症性サイトカインの産生に大きく関与していると仮定し、その詳細を解析することであった。

### 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と考えられている炎症性疼痛に着目し、そのメカニズムを遺伝子レベルで解明することであった。

### 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る。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ている。まずこの FasL を、Lonza Nucleofactor system を用いた electroporation 法により 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。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 1)。

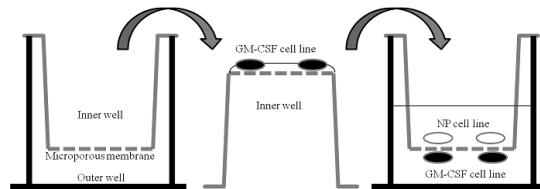


図 1. 共培養の模式図

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、蛋白融解酵素領域(metalloproteinase domain)を持つ A Disintegrin and metalloproteinase (ADAM)の一種である ADAM10 の mRNA およびタンパク発現量、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。

尚、研究実施計画では、H25 年度以降に Transposagen 社から FasL ノックアウトラットを購入して同ラットの解剖学的・組織学的評価を行うとともに、椎間板髄核細胞を採取してマクロファージとの共培養実験を行う予定であった。しかしながらノックアウトラット購入後の検疫に大幅に日数を必要とするため、実験時のラット週齢が本来行うべき実験週齢から大きく離れてしまう問題が発生した。椎間板変性の実験では、老化による椎間板変性の問題を除去するためにラット週齢は極めて重要な問題であるため残念ながらこれを断念した。そこで、研究実施計画に基づいて、ヒト椎間板髄核細胞の不死化細胞株の内在性 FasL 遺伝子発現を RNA 干渉によって抑制する実験の検討を行った。しかしながら、FasL に対する siRNA 設計の信頼度が極めて低い結果となった。siRNA の購入による実験の継続も試みたが、やはりこれも信頼度が低く、結果的に FasL 遺伝子のノックダウンそのものを断念せざるを得ない結果となった。以上の理由により FasL 関連の実験をこれ以上継続実施することが困難となった。そこで本研究の根幹である「椎間板変性」に視点を戻し、我々が以前に確立した創外固定型椎間板圧迫モデルによる椎間板変性のメカニズムの解析を進めることとした。実験では正常の Sprague Dawley ラット

ト尾椎に創外固定器を装着させて椎間板を圧迫し(図2) 圧迫期間を1日、3日、7日、14日、56日でそれぞれ解除することにより

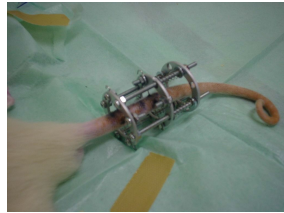


図2. 創外固定型椎間板圧迫モデル

様々な椎間板変性を呈するモデルを作成した。また、このモデルを使用して作成されたラット尾椎の変性椎間板を採取して、様々な遺伝子の mRNA 発現量を real-time RT-PCR により測定評価した。

一方で、研究最終年度である H26 年度は、研究タイトルである「椎間板変性に由来する疼痛発生メカニズムの解明」を、研究継続を断念した FasL 遺伝子とは別の視点において評価した。過去の報告から、我々は脂肪組織に含まれる adiponectin と呼ばれる脂肪細胞から分泌される分泌蛋白の持つ抗炎症作用に着目した。椎間板周囲には多くの硬膜外脂肪が存在しており、同組織内の adiponectin が椎間板変性に由来する炎症を防御すると仮説を立てた。そこでまず、実際の手術の際に採取した人の硬膜外脂肪組織における adiponectin の発現を免疫染色により確認した。さらにラット尾椎椎間板の髄核・線維輪細胞における、adiponectin 受容体の adipo R1 および adipo R2 の発現を、同様に免疫染色で確認した。さらに、ラット尾椎椎間板細胞を用いて、in vitro で IL-1 $\beta$  による炎症刺激を加えるとともに adiponectin を投与し、続発する炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を real-time RT-PCR により測定評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) NP とマクロファージの cell line との共培養における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3a)、培養

開始後 24 時間で IL-6 の発現量が(図3b) 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。

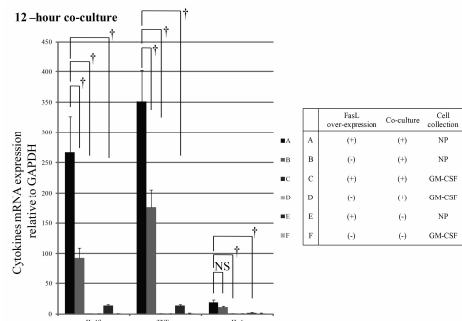


図3a. 培養開始後 12 時間での炎症性サイトカインの mRNA 発現量

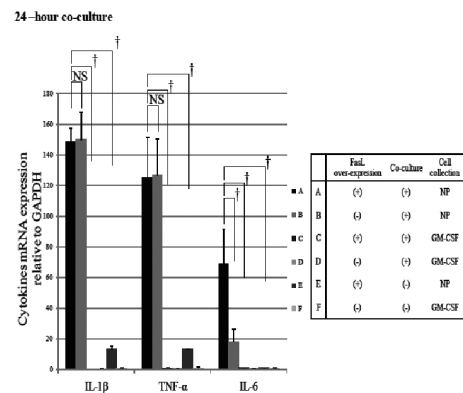


図3b. 培養開始後 24 時間での炎症性サイトカインの mRNA 発現量

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4)。



図4. 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

## (2) ADAM10 の発現量

ADAM10 についても mRNA 発現量 (図 5a)、タンパク発現量 (図 5b) と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。

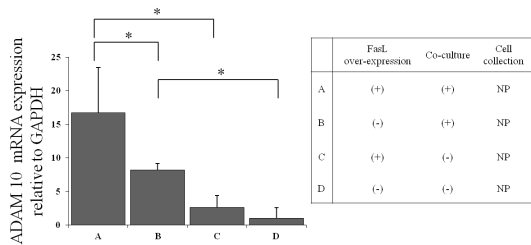


図 5a. 培養開始後 6 時間での ADAM10 の mRNA 発現量

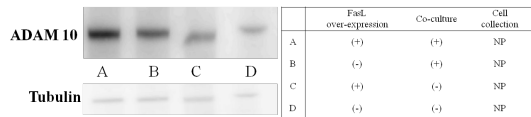


図 5b. 培養開始後 6 時間での ADAM10 のタンパク発現量

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考えられた。

一方で今回の実験結果では、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。しかしながら実際には椎間板髄核細胞からのサイトカイン産生が主体であった。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ヘシグナルを送るとい、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考えられた。以上の研究成果については後述する学術集会で発表ともに、論文作成を行った。

## (3) ラット尾椎創外固定型椎間板圧迫 モデルによる椎間変性の評価

圧迫期間が異なることで X 線や MRI による椎間板変性の程度も明らかに異なり (図 6)。

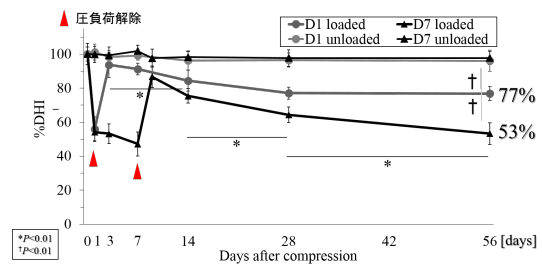


図 6. 単純 X 線による椎間板高の変化

特に 1日の圧迫と7日以上での圧迫では異化遺伝子と同化遺伝子の同行にも変化が出現すること明らかとなった (図 7a) (図 7b)。 またラットでは脊索由来細胞と呼ばれる胎生期細胞の消失が椎間板変性の契機となる重要な変化であることが示唆された。また、ラットでは脊索由来細胞と呼ばれる胎生期細胞の消失が椎間板変性の契機になる重要な変化である可能性が示唆された。以上の研究成果については後述する学術集会で発表ともに、論文作成を行った。

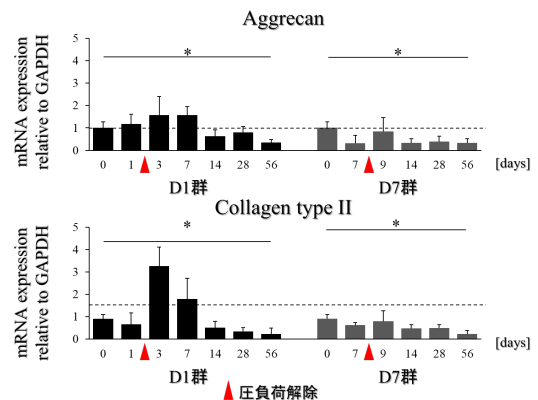


図 7a. 同化遺伝子の mRNA 定量

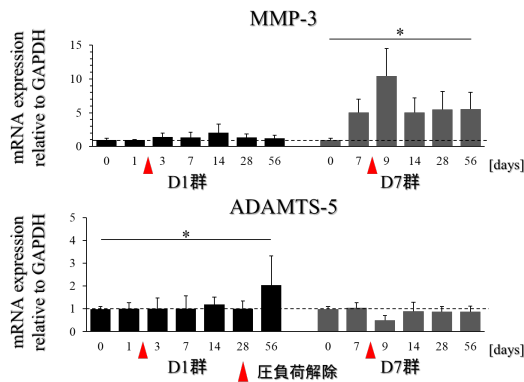


図 7b. 同化遺伝子の mRNA 定量

#### (4) 椎間板細胞における adiponectin の抗炎効果について

まず、手術材料における人の硬膜外脂肪組織において adiponectin の発現を (図 8a) またラット尾椎椎間板の髄核・線維輪細胞において adiponectin 受容体の adipo R1 および adipo R2 の発現を (図 8b) 免疫染色で確認した。

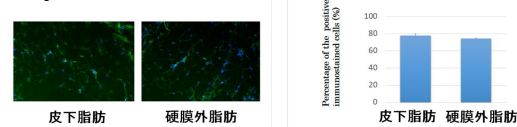


図 8a. 人の硬膜外脂肪組織における adiponectin の発現

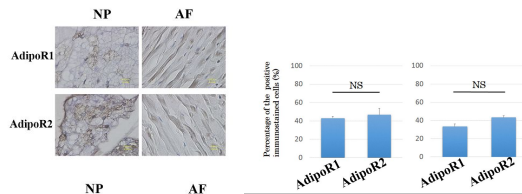


図 8b. ラット尾椎椎間板の髄核・線維輪細胞において adiponectin 受容体の adipo R1 および adipo R2 の発現

このラット尾椎椎間板細胞に in vitro で IL-1 $\beta$  による炎症刺激下に adiponectin を投与すると、線維輪細胞においては、コントロールに対して adiponectin 投与群で優位に TNF- $\alpha$  の発現が抑制されていた(図 9)。

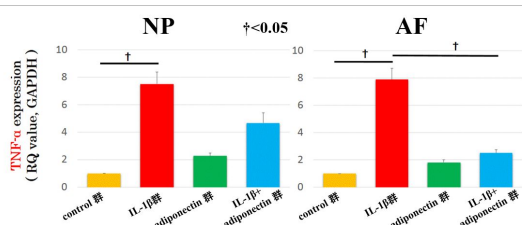


図 9. ラット尾椎椎間板の髄核・線維輪細胞における、IL-1 $\beta$  刺激下での炎症性サイトカインの発現量

これらの結果から、椎間板周囲の脂肪組織は、椎間板線維輪細胞に発現する adiponectin 受容体を通して、恒常的に椎間板周囲に発生する炎症反応を制御している可能性が示唆された。以上の成果については後述する学術集会において発表を行った。

#### 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 2 件)

Hirata H, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Yamamoto J, Kurakawa T, Akisue T, Kuroda R, Kurosaka M, Nishida K. A rat tail temporary static compression model reproduces different stages of intervertebral disc degeneration with decreased notochordal cell phenotype. J Orthop Res.2014 Mar;32(3):455-63.

Yamamoto J, Maeno K, Takada T Kakutani K, Yurube T, Zhang Z, Hirata H, Kurakawa T, Sakai D, Mochida J, Doita M, Kurosaka M, Nishida K. Fas ligand plays an important role for the production of pro-inflammatory cytokines in intervertebral disc nucleus pulposus cells. J Orthop Res.2013 Apr;31(4):608-15

[学会発表](計 6 件)

Terashima Y, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Yurube T, Kurakawa T, Miyazaki S, Ito M, Iguchi T, Kurosaka M, Nishida K. Anti-inflammatory effects of adiponectin on the intervertebral disc cells. The 61<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS), 2015.3.28-31, Las Vegas, USA

寺嶋良樹, 角谷賢一朗, 前野 耕一郎, 平田裕亮, 蔵川拓外, 宮崎真吾, 伊藤雅明, 由留部崇, 高田徹, 黒坂昌弘, 西田康太郎 椎間板細胞に対する adiponectin の抗炎効果 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014.10.9-10, 鹿児島県鹿児島市

Hirata H, Yurube T, Kakutani K,

Maeno K, Takada T, Yamamoto J,  
Kurakawa T, Miyazaki S, Kurosaka M,  
Nishida K. Loss of notochordal cells  
triggers extracellular matrix  
degradation. The 41<sup>th</sup> Annual Meeting  
of the International Society for the  
Study of the Lumbar Spine (ISSLS),  
2013.5.13-17, Scottsdale, USA

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y,  
Yurube T, Takada T, Maeno K, Doita M,  
Kurosaka M, Masuda K, Inoue N,  
Nishida K. The Functional Integrin  
 $\alpha 5\beta 1$  Mechanotransduction in Rat  
Intervertebral Discs under Dynamic  
Loading. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting of  
the Orthopaedic Research Society  
(ORS), 2014.3.15-18, New Orleans,  
USA

山本潤哉、前野耕一郎、高田徹、角谷賢  
一郎、由留部崇、張鍾穎、平田裕亮、蔵  
川拓外、酒井大輔、持田讓治、土井田稔、  
黒坂昌弘、西田康太郎 共培養モデルを  
用いた椎間板ヘルニアにおける疼痛発生  
機序の検討 第27回日本整形外科学会  
基礎学術集会, 2012.10.26-27, 愛知県名  
古屋市

Yamamoto J, Maeno K, Takada T  
Kakutani K, Yurube T, Zhang Z, Hirata  
H, Kurakawa T, Miyazaki S, Sakai D,  
Mochida J, Doita M, Kurosaka M,  
Nishida K. Fas Ligand on Human  
Nucleus Pulposus Cells Plays an  
Important Role in the Production of  
Pro-inflammatory Cytokines. The 59<sup>th</sup>  
Annual Meeting of the Orthopaedic  
Research Society (ORS), 2013.1.26-29,  
San Antonio, USA

## 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

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

土井田 稔 ( Minoru, Doita )  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号 : 60237170

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

山本 潤哉 ( Junya, Yamamoto )  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

平田 裕亮 ( Hiroaki, Hirata )  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

蔵川 拓外 ( Takuto, Kurakawa )  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

寺嶋 良樹 ( Yoshiki, Terashima )  
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生