

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 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：24592197

研究課題名(和文)メカノセプターをターゲットとした椎間板変性予防医療の開発

研究課題名(英文)application of mechanoreceptors for the care of intervertebral disc degeneration

研究代表者

土井田 稔(Doita, Minoru)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：60237170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性に機序解明に向けて、長寿遺伝子SIRT1の発現性と椎間板変性に対する抗老化作用について研究した。SIRT1は、ヒト椎間板細胞に対して低栄養状態における細胞死を抑制することが明らかとなった。また、動的負荷培養を行いメカノセプターの発現性を変性機序に関する研究を行った。メカノセプターのintegrin に注目したところ、髄核細胞の変性に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：SIRT1 prevented the apoptosis of intervertebral disc cells induced by low nutrition condition. Mechanoreceptors, integrin, involved in intervertebral disc degeneration.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板 変性 抗老化 メカノセプター

1. 研究開始当初の背景

現在、日本の人口の約 80% が生涯で 1 度は腰痛を経験すると言われており、その治療費を含めた経済損失は非常に大きい。その腰痛の主たる原因が椎間板変性にあると考えられており、日本に限らず椎間板変性に対する治療は、高齢化社会を迎える先進諸国にとって急務である。

2. 研究の目的

現在椎間板再生を目指した治療は、成長因子治療、遺伝子治療、幹細胞治療に分けられ各国で広く研究がなされている。現時点ではヒト椎間板変性に対する有効性を報告したものはない。加えて、椎間板変性が先行し続発する椎間関節障害や黄色靭帯の肥厚、腰椎の不安定性が腰痛の直接的な原因となることから、仮に変性椎間板の治療が可能になったとしても果たして、腰痛が改善するかという疑問が残る。従って我々は早期の椎間板変性の病態を解明し予防医療としての椎間板変性予防に注目し研究している。

3. 研究の方法

我々は、これまでに椎間板変性の機序解明と治療に向けた研究を重ねてきた。炎症性サイトカインである IL-1、TNF- α が椎間板細胞から独自に産生され、微量な炎症性サイトカインが互いに絶妙なクロストークを構築し、それらが自身の椎間代謝を制御していることも解明した。さらに、椎間板は無血管組織で線維輪によって閉ざされた椎間板内部は低 pH、低酸素、低栄養という過酷な環境下でありながら、高度な軸圧、念転力に打ち勝つ構造を完成させている。そこには高度に分化した細胞である髄核細胞が椎間板の恒常性の維持に深く関与していると考えられており、我々は長寿遺伝子として注目されている SIRT1 遺伝子が椎間板髄核細胞にも発現し、この SIRT1 が過酷な環境下での椎間板細胞の基質代謝、細胞

増殖能をそれぞれの椎間板変性の程度に応じて適切に制御している可能性を報告した。本研究では、SIRT1 と椎間板変性との関連を明らかにするために、培養椎間板細胞に SIRT1 蛋白を導入し低栄養状態での椎間板細胞の細胞増殖や apoptosis に与える影響について検討する。

ヒト椎間板にはダイナミックに軸圧、念転力、張力が与えられており、このダイナミックな要素が椎間板代謝に関与していることから同志社大学生命医科学部との共同研究で *in vitro* での動的負荷培養装置を開発し、ダイナミックな要素が椎間板に与える影響について研究を開始している。本研究では、メカノレセプターである integrin α 5 β 1 の機械刺激誘導椎間板変性との関連についても検討する。

4. 研究成果

a SIRT1 に関する研究

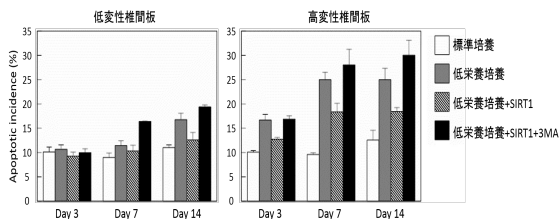
本研究では、4 群を作成した。基礎培地に 10%FBS を加えたものを標準栄養培養 (N 群)、1%FBS を加えたものを低栄養培養 (LN 群) とした。低栄養培養に 10 μ M のリコンビナントヒト SIRT1 を蛋白質導入試薬によって導入した群 (LN+SIRT1 群)、オートファジー阻害薬として 5mM の 3-methyladenine と SIRT1 を添加した群

(LN+SIRT1+3MA 群) の計 4 群を作成した。

MDC 吸光度によるオートファジー活性は 72 時間後で N 群に比べ LN 群で高値を示し LN+SIRT1 群ではさらに有意に上昇していたが、LN+SIRT1+3MA 群は同程度であった (LN 群 : +66%, LN+SIRT1 群 : +136%, LN+SIRT1+3MA 群 : +21%)。LC-3 の免疫組織学的染色でも同様の傾向であった。アポトーシス率は N 群に比べ各群ともに高値を示したが、LN+SIRT1 群で LN、LN+SIRT1+3MA 群より各調査日で有意に低値であった (14 日目 ; N 群 : 13%, LN 群 : 25%, LN+SIRT1 群 : 18%, LN+SIRT1+3MA

群：30%)。

図 1



caspase3 と 9 は LN 群に比べ LN+SIRT1 群で低下し、さらに LN+SIRT1+3MA 群は LN+SIRT1 群より上昇していた。総生存細胞数は N 群に比べ 3 日目では各群で有意に低下し、14 日目では LN, LN+SIRT1+3MA 群で有意に低下していたが、LN+SIRT1 群は同程度であった (14 日目 ; LN 群 : -61%, LN+SIRT1 群 : -12%, LN+SIRT1+3MA 群 : -77%)。

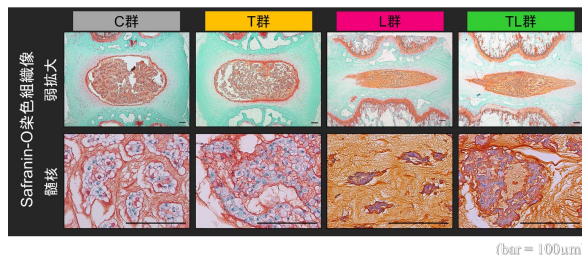
ヒト髄核細胞において低栄養条件下でアポトーシスが誘導され、さらに外因性 SIRT1 は低栄養条件下でオートファジーを亢進しアポトーシスを抑制する事で細胞生存に寄与する事が示唆された。

b 動的負荷培養に関する研究

椎間板組織像

静置培養した Control 群、静置培養に Integrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤を添加した T 群、1.3MPa, 1Hz の動的負荷を加えた L 群、動的負荷に Integrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤を添加した T L 群を作成した。

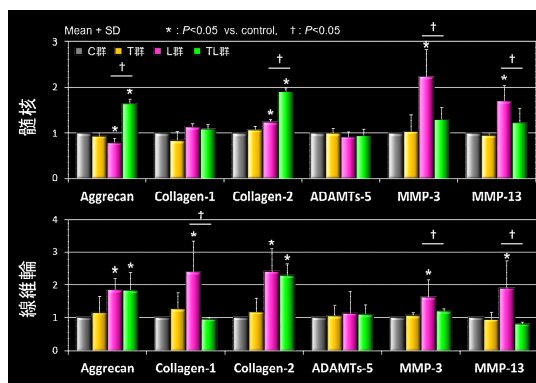
L 群では椎間板変性が誘導されていることが明らかとなり、L 群に比して TL 群で変性が弱いことも明らかであった。また、変性所見は主に髄核で見られ線維輪では見られていなかった。



遺伝子発現(mRNA expression)

遺伝子発現は、髄核では同化亢進と異化亢進が見られた。Integrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤を投与した群では、髄核の同化は亢進され異化が抑制された。また、線維輪では同化亢進は維持され、異化は抑制された。

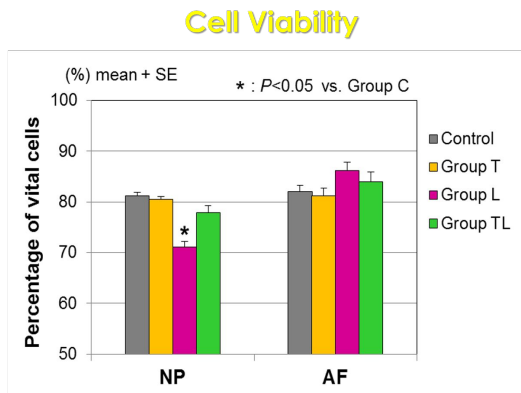
以上から、1.3MPa, 1Hz の動的負荷培養は髄核を中心とした椎間板変性を誘導し、線維輪での変性は殆ど見られなかった。この動的圧負荷誘導椎間板変性は、メカノレセプターである Integrin $\alpha 5\beta 1$ が髄核の同化抑制、異化亢進といった生化学的变化に関与していることが示唆され、椎間板細胞を取り巻く力学的環境変化を椎間板細胞内に伝達し椎間板変性を惹起していることが予想された。



生細胞染色

研究を進める過程で、組織像において髄核細胞の形態をもった細胞が急激に減少し、一方で軟骨様の形態を持つ細胞集塊が局所

的に見られるようになった。髄核細胞の apoptosis による細胞減少を疑い、生細胞染色を行ったところ、L 群で有意に生細胞率は減少し、TL 群でその傾向は消失していた。



このことは、動的負荷が Integrin $\alpha 5\beta 1$ 髄核細胞の細胞死を誘導しているものと理解される。ただし、細胞死をきたしている率は 30%に留まり、多くの細胞が生存していることが読み取れる。以上から、髄核細胞が動的負荷を受けた際に、その形態を変化させメカニカルストレスを許容しているものと考えられる。このことは、唯一二足歩行を行う人類の椎間板に髄核細胞が極端に少ないという、特徴を裏付ける可能性があり更なる研究を継続しており今後研究成果を報告していきたい。

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)

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Kato Y, Yurube T, Hirata H, Miyazaki S, Terashima Y, Maeno K, Takada T, Doita M, Kurosaka M, Inoue N, Masuda K, Nishida K. Functional

Impact of Integrin $\alpha 5\beta 1$ on the Homeostasis of Intervertebral Discs: A Study of Mechanotransduction Pathways Using a Novel Dynamic Loading Organ Culture System. Spine J. 2015 Mar 1;15(3):417-26. doi:10.1016/j.spinee.2014.12.143. Epub 2014 Dec 27.

[学会発表] (計 5 件)

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Zhang Z, Yamamoto J, Hirata H, Doita M, Kurosaka M, Nishida K.; Biologic responses of rat intervertebral discs to mechanical loading using a dynamic organ culture system.

International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2012.5. Amsterdam, Netherlands

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Zhang Z, Yamamoto J, Hirata H, Doita M, Kurosaka M, Nishida K.; Biologic Response of Rat Intervertebral Disc to Dynamic Compression -Analysis of Mechanoreceptors in Dynamic Organ Culture System. The 58th Annual Meeting of Orthopedics Research Society, 2012.2 San Francisco, California, USA

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Yamamoto J, Hirata H, Miyazaki S, Doita M, Kurosaka M, Nishida K.; The Role of $\alpha 5\beta 1$ Integrin in the Mechanically Initiated Intervertebral Disc Degeneration, Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013.1. Texas, USA

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Takada T, Maeno K, Yurube T, Zhang Z,

Yamamoto J, Hirata H, Miyazaki S. Doita M, Kurosaka M, Nishida K. The role of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the mechanically initiated intervertebral disc degeneration. The 59th Annual Meeting of Orthopedics Research Society, San Antonio Texas 2013

Kurakawa T, Kakutani K, Morita Y, Terashima Y, Miyazaki S, Hirata H, Yurube T, Takada T, Maeno K, Doita M, Kurosaka M, Masuda K, Inoue N, Nishida K. Functional Integrin $\alpha 5 / \beta 1$ Mechanotransduction in Intervertebral Discs and a Novel Dynamic Loading Tissue Culture System. The 60th Annual Meeting of Orthopedics Research Society, New Orleans Louisiana 2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

土井田 稔 (Doita, Minoru)
神戸大学・医学研究科・医学研究員
研究者番号：6 0 2 3 7 1 7 0

(2)研究分担者

西田 康太郎 (Nishida, Kotaro)
神戸大学・医学研究科・講師
研究者番号：0 0 3 7 9 3 7 2

角谷 賢一郎 (Kakutani, Kenichiro)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：1 0 5 3 3 7 3 9

前野 耕一郎 (Maeno, Koichiro)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：7 0 4 0 3 2 6 9