

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462313

研究課題名(和文) ラット受動喫煙モデルにおける腰椎椎間板の変性メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of intervertebral disc degeneration induced by passive cigarette smoking in rat model

研究代表者

上井 浩(UEI, Hiroshi)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50451373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットに受動喫煙を行わせ、椎間板の変性を誘導したラット椎間板変性モデルに対して、喫煙椎間板プロテオミクスの解析を行った。細胞外基質の保持機構に関わるものやアポトーシス感受性亢進に関わるタンパク質が同定された。また、脱分化脂肪細胞(DFAT)を静脈内投与することで、椎間板変性の抑制効果が認められるかを検証した。喫煙ではアポトーシス感受性亢進に関わるタンパク質が発現亢進していた。DFATの全身投与は髄核内軟骨関連遺伝子の発現減少を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed a proteomic analysis of rat degenerative intervertebral discs induced by passive cigarette smoking. Expression of apoptosis-related genes were up-regulated. We also investigated the therapeutic effect of dedifferentiated fat (DFAT) cell transplantation by intravenous administration in rat models of intervertebral disc degeneration. The results suggest that autologous implantation of DFAT cells suppress down-regulated expression of intervertebral disc genes.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：椎間板変性 喫煙 脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

腰痛の日本人における生涯罹患率は非常に高く、これによる労働力の損失および経済的損失が報告されて久しい。腰痛を起こす原因は大変多いが、そのうち椎間板の変性によって起こる腰椎椎間板ヘルニアがある。さらにこの病状が進行すると変形性脊椎症に至る。脊椎変性疾患に対する脊椎内固定材料や手術手技の進歩は著しく、脊椎固定術の適応も拡大した。我が国の高齢者の健康寿命の延長という点で、脊椎固定術の果たした役割は非常に大きい。一方では固定した隣接椎間に負荷が増大し (Tokuhashi et al. Spine 2008)、隣接椎間障害や隣接椎体の骨折もしばしば経験しており、脊椎固定術の限界ともいえる (Tokuhashi et al. Osteoporosis Jpn 2009)。変形性脊椎症に至るまで椎間板変性を進行させないことが健康寿命の維持や増大する医療費の抑制にもつながる。椎間板変性のリスクファクターは多く、そのうち喫煙と腰痛の関連が指摘されている (Uei, Tokuhashi et al. Spine 2006)。椎間板変性のメカニズムについては、重量負荷、喫煙などのストレスが加わった後、変性を起こす何らかの物質が椎間板に作用して起こると考えられているが、未だ不明な点が多い。椎間板変性をもたらす原因物質や進行させる物質が具体的にわかれば、それらを抑える方法が腰痛の予防や治療につながる。しかし、変性した椎間板に対する根本的な治療は、現在までに確立されていない。脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) は患者の年齢や基礎疾患に影響されず大量調製できるため、椎間板変性症に対する治療用細胞として有用である可能性がある。

2. 研究の目的

ラットに受動喫煙を行わせ、喫煙椎間板プロテオミクスの解析を行い、椎間板変性のメカニズムの特徴を分子レベルでとらえることを試みる。また、成熟

脂肪細胞から人工的に誘導される DFAT は、MSC に類似した多能性を示し、患者の年齢や基礎疾患に影響されず調製できるため、高齢者に好発する椎間板変性症に対しても椎間板再生を含む治療効果が期待できる。自動喫煙装置により椎間板の変性を誘導したラット椎間板変性モデルに対して DFAT を静脈内投与することで、椎間板変性の抑制効果が認められるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 受動喫煙ラット椎間板変性モデルの作製

受動喫煙によるラット椎間板変性モデルの作製は概略を以下に示す。自動受動喫煙装置はアクリル樹脂製のチャンパーと、そのチャンパー内にタバコ煙を送風できる自動喫煙装置から構成される (図 1)。

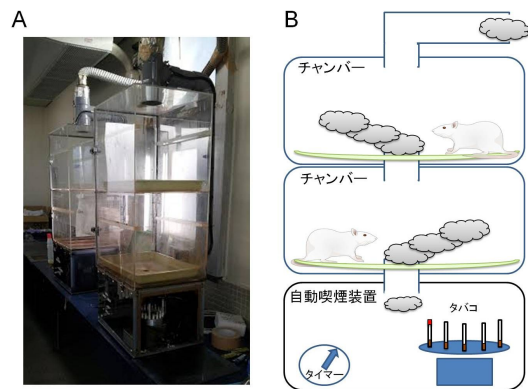


図 1. 受動喫煙ボックス

(A: 受動喫煙ボックスの写真 B: 模式図)

装置は 5 分間の喫煙送風と 5 分間の室内換気を行い、1 時間のインターバルをおき、1 日に 20 回繰り返し施行するよう設定した (Engineering System Co., Nagano, Japan)。酸素分圧連続測定装置 (MT 技研社, Tokyo, Japan) にてボックス内は酸素濃度が 20%、150mmHg を基準となるように設定した。明暗サイクルは 12 時間に設定した。タバコは両切りショートピース (JT, Inc., Tokyo, Japan) を使用した。SD ラットを上記の自動受動喫煙装置内で 8 週間飼育し椎間板変性を誘導した。

(2) 喫煙椎間板プロテオミクス解析

喫煙下および非喫煙下で 8 週飼育したものを各々喫煙群 (S8 群)、対象群 (NS8 群) とした。また喫煙下で 8 週飼育後禁煙 4 週したものを禁煙群 (S8N4 群)、その対象群を (NS12 群) とした。4 群とも各 5 匹使用した。各々のサンプルについてタンパク質除去後、タンパク質定量、SDS - PAGE、プロテオーム解析を行った。有意差のあるタンパク質について mRNA の定量を Real Time PCR で行った。また、GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を内在性コントロール遺伝子として測定し、この値でそれぞれを補正した。定量方法は絶対的定量法と相対的定量法を用いた。

(3) ラット DFAT

18 頭の SD ラットをランダムに、DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に群分けした (各群 n=6)。DFAT 群は 8 週間の喫煙下で 0 週、2 週、4 週、6 週の時点で 0.5ml リン酸化緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) にラット DFAT (1×10^6 個) を溶解し、尾静脈から静脈内投与した。DFAT 移植細胞数は、全身性の免疫制御作用が期待できる細胞数として 1×10^6 個/頭を採用した。PBS 群は、8 週間の喫煙下で 0 週、2 週、4 週、6 週の時点で PBS 0.5ml を尾静脈より投与した。Control 群は非喫煙下、非投与で DFAT 群、PBS 群と同様に 8 週間飼育した。髄核及び肺組織の mRNA 発現変化は、TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたりアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) 法にて解析した。解析遺伝子として以下の primer/probe を使用した。Sox9 (Rn01751069_mH)、aggrecan (Rn00573424_m1)、versican (Rn01493755_m1)、HGF (Hepatocyte growth factor:

Rn01442473_m1)、PGE2 (Prostaglandin E2: Rn01435535_g1)、TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene-6: Rn01753871_m1)、TGF-1 (Transforming growth factor-1: Rn00572010_m1)。GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: Rn01775763_g1) を内在性コントロール遺伝子とした。

4. 研究成果

(1) 椎間板プロテオミクス解析

喫煙椎間板プロテオミクス S8 群と N8 群においてタンパク質発現の相対的定量と、有意差を Progenesis にて解析した。同定された 139 個のタンパク質について、 $P < 0.05$ で発現に有意差のあったタンパク質は各々 S8 群で発現亢進していたものが 30 個あり、発現低下していたものが 37 個であった。この中で変化倍率の高いものとして、前者では Protein-lysine 6-oxidase や Thrombospondin-4 などの細胞外基質の保持機構に関わるものが同定され、後者では galectin-3 や protein DJ-1 などと言ったアポトーシス感受性亢進に関わるタンパク質が同定された。

喫煙後禁煙椎間板プロテオミクス

S8 群と S8N4 群と N12 群の 3 群においてタンパク質発現の相対的定量と有意差を Progenesis にて解析した。4875 個のペプチドより 194 個のタンパク質が同定された。この 194 個のタンパク質について喫煙後禁煙による効果を確認できたのは S8 群と S8N4 群で 2 倍以上有意差のあったタンパク質 62 個であった。変化倍率の高いものとして、Serpin H1、Matrix Gla protein などの細胞外基質タンパク質

の発現亢進が認められた。一方、Annexin など喫煙で低下していたタンパク質が亢進しており、禁煙してもその発現は低下したままで回復することとはなかった。

(2) ラット DFAT

軟骨初期分化マーカーである Sox9 の mRNA 発現は Control 群に比べ、PBS 群で有意に低下した ($P < 0.05$)。DFAT 群では、喫煙による Sox9 発現低下が抑制される傾向があり、PBS 群に比べ有意に高値を示した ($P < 0.05$)。アグリカンの mRNA 発現は Control 群に比べ、PBS 群で有意に低下した ($P < 0.05$)。DFAT 群では、喫煙によるアグリカンの発現低下が抑制される傾向があり、PBS 群に比べ有意に高値を示した ($P < 0.01$) (図 2)。

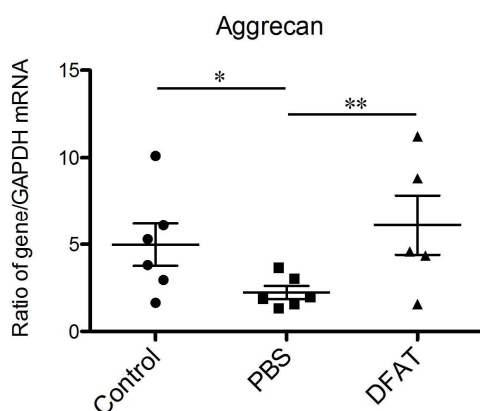


図 2 髄核アグリカンの遺伝子発現解析

パーシカンの mRNA 発現も同様の傾向が認められたが、各群間に統計学的有意差は認められなかった。以上の結果から、8 週間の受動喫煙により髄核内軟骨関連遺伝子の発現減少が認められ、DFAT の全身投与はこの減少を抑制することが示唆された。また DFAT の椎間板変性抑制メカニズムとして肺組織からの免疫制御因子の発現、分泌が関与している可能性が示唆された。DFAT は椎間板変性症に対する細胞治療ソースとして有望であると考えられた。

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 2 件)

間世田優文, 山口裕美, 黒田和道, 三俣昌子, 徳橋泰明, 江角真理子: ヒト変性椎間板に関するプロテオーム解析. 日大医学雑誌 (査読あり). 75 巻 1 号 Page16-21 (2016.02)

大瀧宗典, 松本太郎, 加野浩一郎, 徳橋泰明: ヒト脱分化脂肪細胞の軟骨分化能の検討. 日大医学雑誌 (査読あり). 74 巻 5 号 Page246-252 (2015.10)

〔学会発表〕(計 3 件)

宮方啓行, 松本太郎, 徳橋泰明: 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける脱分化脂肪細胞 (DFAT) 静脈内投与の治療効果. 日本脊椎脊髄病学会. 2016 年 4 月 14 日 ~ 16 日. 幕張メッセ国際会議場 (千葉県千葉市)

小山公行, 宮方啓行, 風間智彦, 上井浩, 徳橋泰明, 松本太郎: 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける脱分化脂肪細胞 (DFAT) 静脈内投与の治療効果. 日本整形外科学会基礎学術集会. 2015 年 10 月 21 日 ~ 22 日. 富山国際会議場 (富山県富山市)

宮方啓行, 松本太郎, 風間智彦, 小山公行, 上井浩, 徳橋泰明: 受動喫煙によるラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. 日本炎症・再生医学会. 2015 年 7 月 21 日 ~ 22 日. 虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上井 浩 (UEI, Hiroshi)
 日本大学・医学部・助教
 研究者番号: 50451373

(2) 研究分担者

徳橋 泰明 (TOKUHASHI, Yasuaki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：80188739