

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10393

研究課題名(和文) 椎間板加齢性変化の現象解明と抗サイトカイン治療の開発

研究課題名(英文) Clarification of age-related changes in intervertebral discs and development of new anti-cytokine therapy

研究代表者

波呂 浩孝 (HARO, Hirotaka)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10313264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腰痛による運動器障害を軽減し、健康格差を縮小して健康寿命を延伸することは喫緊の課題といえる。椎間板変性に伴う炎症や知覚神経侵入が腰痛の原因の一つと報告されている。本研究では、炎症惹起の新しいメカニズムとしてPAR-1アゴニストによる刺激を仮定し、マウス椎間板でのPAR-1受容体発現を示した。また、この刺激により放出されたサイトカインにより、実際にマウスマクロファージの遊走能を増強することを証明した。これらの結果は、椎間板変性過程の惹起や炎症活性化の解明につながるものである。さらに、この経路をブロックすることにより腰痛の新しい治療法を目指していくこととなる。

研究成果の概要(英文)：It is an urgent task to reduce physical disorder caused by low back pain, reduce health inequality and extend healthy life span. Inflammation associated with disc degeneration and sensory nerve invasion are reported as one cause of low back pain. In this study, as a novel mechanism of inflammation induction, PAR-1 agonist stimulation was assumed and PAR-1 receptor expression in mouse intervertebral disc was shown. In addition, it proved that the migration ability of mouse macrophages is actually enhanced by cytokines released by this stimulation. These results lead to clarification of disc degenerative processes and activation of inflammation. Furthermore, we aim to become a new treatment for low back pain by blocking this molecule.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板変性 PAR-1 椎間板器官培養 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

2013 年厚生労働省国民生活基礎調査によると、腰痛の有訴率は男性 1 位(9.2%)、女性 2 位(11.8%)であり、通院者率は 4 位(4.2%)に上る。また、要支援者の原因の最多は運動器障害(20.7%)である。本邦は平均寿命男性 79.6 才、女性 86.3 才(2010 年)の長寿国として知られるが、一方で日常生活に支障をきたす期間は男性 9.1 年、女性 12.7 年と高齢者の要介護の需要が増加している。腰痛による運動器障害を軽減し、健康格差を縮小して健康寿命を延伸することは喫緊の課題といえる。

椎間板変性に伴う炎症や知覚神経侵入が腰痛の原因の一つであり (Miyagi M:Spine 2014)、当該椎間板治療が腰痛の軽減をもたらすことが報告されている (Ohtori S:Spine 2009)。20 才台から正常椎間板は水分含有量が減少し、その弾力性が減少して硬度が増した椎間板変性を起こす。変性椎間板は脊柱管に突出して、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。我々はこれまで多くの椎間板ヘルニア、椎間板変性の臨床及び基礎研究を行い、以下の知見を明らかにした。

(1) 腰椎あるいは胸椎、頸椎椎間板ヘルニア患者には自然椎間板ヘルニア退縮がみられ、造影 MRI で増強効果をみる症例は退縮率が高いことを報告した (Haro 他 5 名、3 番目、Spine 23:67-73, 1998) (Haro 他 5 名、5 番目、Spine 23:990-5, 1998) (Haro 他 5 名、1 番目、J Neurosurg Spine 8:300-4, 2008)。

(2) 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)。

(3) 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 SpinalDisord 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(図 1)。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。

(4) 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、

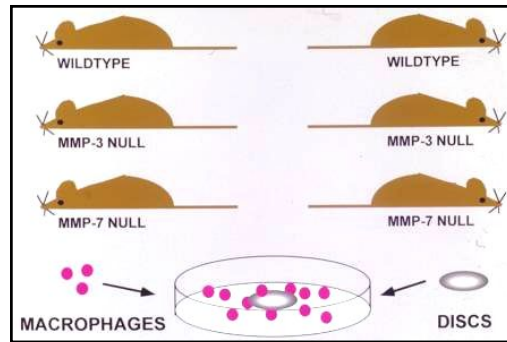


図 1.マクロファージと椎間板の共培養  
炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  は、血管新生因子 (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)や MMP、セリンプロテアーゼを誘導、活性化して炎症のイニシエーターとなっていた(Haro、他 4 名、1 番目、J Orthopaed Res 20(3): 409-415, 2002, Haro、他 3 名、2 番目、J Orthop Res 2: 895-900, 2004)。

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

(5) 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)。

(6) 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 OrthopRes. 25:1438-46, 2007) (Haro、他 7 名、8 番目、Spine 33:2489-94, 2008)。

(7) 血管遊走因子である VEGF の発現は加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)。

(8) 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)。

(9) 椎間板変性における炎症性サイトカイン (TWEAK、TNF $\alpha$ ) 刺激によって誘導される走化性サイトカイン MCP-1 と分解酵素 MMP-3 は年齢差がみられ、加齢とともに発現が減少する (Haro、他 10 名、11 番目、J Orthop Res 30:599-605, 2012)。

(10) 椎間板内 TGF $\beta$  は NF $\kappa$ B 活性を抑制して TSLP 発現を制限する (Haro、他 8 名、8 番目、J Orthop Res 31:1144-9,

2013)。

(11) ビーグル犬椎間板はヒトと同様の椎間板細胞組成を示し、炎症性サイトカイン刺激で分解酵素が誘発された。また、犬椎間板変性においては、Runx2 発現の増大が  $\beta$ -catenin 集積をもたらすことを明らかにした (Haro, 他 9 名, 4 番目, PLoS One 8:e63120, 2013) (Haro, 他 8 名, 6 番目, J Cell Physiol Jun 11, 2014)。また、これまでの研究から、椎間板ヘルニアの退縮には MMP-7 が炎症を起動するための重要因子であることを明らかにした。そこで、

(12) 産学共同でヒトリコンビナント MMP-7(KTP-001)を創薬し、米国で臨床治験を実施している。これまでに、ヒト椎間板ヘルニア検体とビーグル犬椎間板投与実験では、椎間板の分解による有効性が確認された。また、組織障害性はみられなかった (Haro, 他 8 名, 1 番目, Spine J 14:1280-90, 2014) (Haro, 1 番目, J Orthop Sci 19:515-20, 2014)。

## 2. 研究の目的

椎間板変性には、血管新生、炎症性細胞の浸潤、炎症性及び走化性サイトカインの発現、分解酵素の活性化と発現誘導など多岐のメカニズムが関与することが明らかになった。しかし、変性過程の惹起や炎症活性化の開始についての研究は報告がない。椎間板内には炎症誘導作用を有するプロテアーゼ受容体 PAR(protease-activated receptor)-2 の発現がみられ、炎症性サイトカイン Interleukin(IL)-1 の発現を誘導し分解酵素 MMP-3 および MMP-13mRNA の発現を促進する (Iida R:Spine 2009)。一方、我々はリン酸タンパクである Osteopontin(OPN)を MMP-3,MMP-7,トロンピンが切断し活性化することを報告した (Haro, 他 5 名, 3 番目, J Biol Chem 27:28261-7, 2001)。OPN は炎症性細胞の走化能を有する。よって、椎間板変性過程の惹起や炎症活性化のメカニズムに MMP による PARs の活性化に関与している可能性がある。

今回の申請では、PARs のなかで過去の報告にある PAR-2 とともに (1) PAR-1 の発現を確認すること。(2) PAR-1 を活性化するリガンドの同定。および (3) その分子メカニズムを明らかにすること。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス、ラット

野生型マウス (C57BL6)、5 週齢、雄を使用。

成熟マウス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 (図 2)。

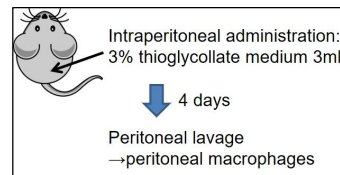


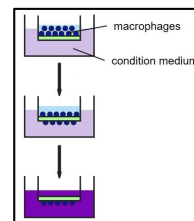
図 2 マウスマクロファージ採取

### (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 PAR-1 アゴニスト製剤を加えて 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) マクロファージ遊走能評価

Boyden chamber assay を原法とし、トランスウェル上層にマクロファージを、下層に PAR-1 アゴニストでマウス椎間板を刺激した上清 (Condition medium) とし、コントロールと比較することによってマクロファージの遊走能を評価 (図 3 Boyden chamber assay する (図 3))。



## 4. 研究成果

### (1) PAR-1 の椎間板における発現を確認。

マウスから摘出した主要臓器を RNA とし、逆転写から real-time PCR 法にて PAR-1 遺伝子発現を確認した。同様にマウスから摘出した主要臓器からタンパクを抽出し PAR-1 の発現をウエスタンブロット法にて確認した。結果：椎間板においても十分量の遺伝子およびタンパク発現がみられた (図 4)。

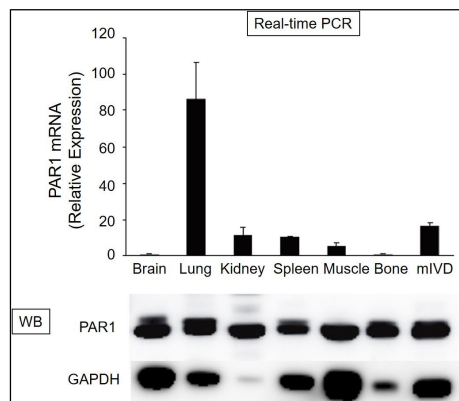


図 4 PAR-1 の発現

(2) 椎間板組織内の PAR-1 の局在。

摘出した椎間板を線維輪細胞 (AF)、髄核細胞 (NP) および椎体終板軟骨細胞 (CEP) に分けてタンパク質の抽出を行った。PAR-1 の発現をウエスタンブロット法にて確認した。同様に各組織内での局在性をみるために免疫組織学的検討を行った。結果: NP、AF、CEP 細胞すべてにおいて PAR1 発現みた (図 5)。

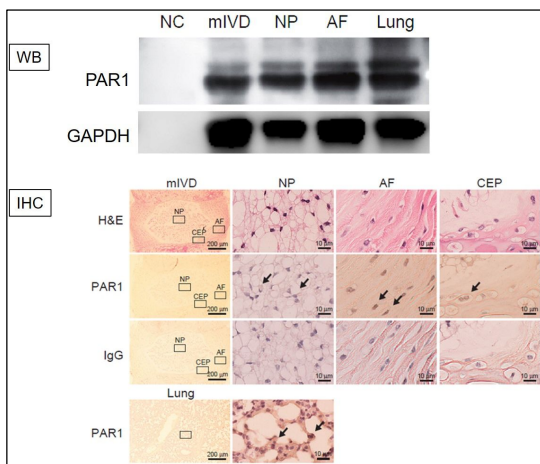


図 5 椎間板組織内の PAR-1 の局在

(3) PAR-1 agonist 誘導性サイトカインのマクロファージ遊走能評価

マウス椎間板を PAR-1 agonist で刺激した上清を Boyden chamber assay の下層、マウス腹腔マクロファージを上層に培養し、遊走を定量化した。結果: PAR-1 agonist で刺激した上清はコントロールに比較して有意にマクロファージの遊走能を増強した (図 6)。

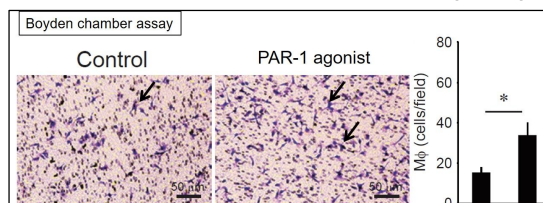


図 6 マクロファージ遊走能評価

## 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 7 件)

Comparative study of the paraspinal muscles after OVF between the insufficient union and sufficient union using MRI. Katsu M, Ohba T, Ebata S, Haro H. BMC Musculoskelet Disord. 2018 May 14;19(1):143. (査読有)  
Prevalence and key radiographic spinal malalignment parameters that influence the risk for gastroesophageal reflux disease in patients treated surgically for adult spinal deformity. Ohba T, Ebata S, Koyama K, Haro H. BMC Gastroenterol. 2018 Jan 10;18(1):8. (査読有)

Application of neurite orientation dispersion and density imaging or diffusion tensor imaging to quantify the severity of cervical spondylotic myelopathy and to assess postoperative neurologic recovery. Okita G, Ohba T, Takamura T, Ebata S, Ueda R, Onishi H, Haro H, Hori M. Spine J. 2018 Feb;18(2):268-275. (査読有)  
Influence of Postoperative Hypertension on the Development of Spinal Epidural Hematoma. Ohba T, Ebata S, Haro H. Orthop Surg. 2017 Nov;9(4):386-390. (査読有)

Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Halo Immobilization Is an Effective Treatment for Nonunion Following Traumatic Spondylolisthesis of the Axis. Oda K, Ohba T, Ebata S, Haro H. J Neurol Surg Rep. 2017 Oct;8(4):e119-e122. (査読有)

Comparison of serum markers for muscle damage, surgical blood loss, postoperative recovery, and surgical site pain after extreme lateral interbody fusion with percutaneous pedicle screws or traditional open posterior lumbar interbody fusion. Ohba T, Ebata S, Haro H. BMC Musculoskelet Disord. 2017 Oct 16;18(1):415. (査読有)

Role of Weekly Teriparatide Administration in Osseous Union Enhancement within Six Months After Posterior or Transforaminal Lumbar Interbody Fusion for Osteoporosis-Associated Lumbar Degenerative Disorders: A Multicenter, Prospective Randomized Study. Ebata S, Takahashi J, Hasegawa T, Mukaiyama K, Isogai Y, Ohba T, Shibata Y, Ojima T, Yamagata Z, Matsuyama Y, Haro H. J Bone Joint Surg Am. 2017 Mar 1;99(5):365-372. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

招待講演、2018/6/28、『骨粗鬆症性脊椎疾患の診断と治療』第 55 回日本リハビリテーション医学会学術集会、福岡市、波呂浩孝  
一般演題、2018/5/2、"Role of weekly teriparatide administration in osseous union enhancement after lumbar interbody fusion for osteoporosis-associated lumbar degenerative disorders." Global Spine Congress 2018、シンガポール、波呂浩孝  
ランチョンセミナー、2018/3/16、『骨粗鬆症性脊椎疾患に対する 3 大学共同研究の知見』第 58 回関東整形災害外科学会、

東京都、波呂浩孝  
ランチョンセミナー、2017/11/3、『骨粗鬆性脊椎疾患の診断と治療』第25回日本腰痛学会、東京都、波呂浩孝  
シンポジウム/パネルディスカッション、2017/8/25、『腰椎椎間板ヘルニアによる腰部神経根症に対する低侵襲治療の開発』第28回日本抹消神経学会学術集会、名古屋市、波呂浩孝  
一般演題、2017/3/19、TGF- Limits T hymic Stromal Lymphopoietin Production In Mouse Myoblast Cells Upon TNF- Stimulation By Suppressing NF- B Pathway、ORS、2017、アメリカ、安藤隆、波呂浩孝、他  
招待講演、2017/3/9、Strategy for treatment of osteoporosis associated spinal disorders、第8回 Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section、神戸市、波呂浩孝

〔図書〕(計 3件)

『骨粗鬆症性脊椎骨折に対する手術療法の術後生存率と生命予後因子』臨床整形外科 Cutting edge、2018年、総ページ数：358、大場哲郎、江幡重人、波呂浩孝  
『椎間板の炎症と変性』整形・災害外科、2017年、総ページ数：354、大場哲郎、若生政憲、小山賢介、波呂浩孝  
『今日の整形外科治療指針』脊髄炎、2016年、総ページ数：952、波呂浩孝

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等  
山梨大学医学部 整形外科  
<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

波呂 浩孝 (HARO, Hirotaka)  
山梨大学・大学院総合研究部・教授  
研究者番号：10313264

(2)研究分担者

原 康 (HARA, Yasushi)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：00228628

安藤 隆 (ANDO, Takashi)  
山梨大学・大学院総合研究部・講師  
研究者番号：10377492

大場 哲郎 (OHBA, Tetsuro)

山梨大学・大学院総合研究部・助教  
研究者番号：70456490

(3)連携研究者

高山 義裕 (TAKAYAMA, Yoshihiro)  
山梨大学・大学院総合研究部・助教  
研究者番号：20596994

(4)研究協力者

なし