

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16669

研究課題名(和文) アポトーシス応答機構を標的とした椎間板変性制御に関する統合的研究

研究課題名(英文) Integrated research on intervertebral disc degeneration control targeting apoptotic response mechanism

研究代表者

山田 勝久(Yamada, Katsuhisa)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：20771893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス誘導遺伝子caspase 3ノックアウト(casp3 KO)マウスを用いて、椎間板変性における機能解析を行った。

Casp3 KOマウス腰椎椎間板細胞に血清除去モデルを用いてアポトーシスを誘導したところ、野生型マウス椎間板細胞と比較しアポトーシスの誘導が抑制された。マウス腰椎椎間板穿刺変性モデルでは、casp3 KOマウスで野生型マウスと比較し穿刺後早期の椎間板組織変性所見が軽度であったが、加齢性自然発症椎間板変性モデルでは椎間板組織変性は同等であった。

外因性椎間板組織変性にcaspase3が強く関与しており、本遺伝子発現の抑制が椎間板組織の変性制御に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポトーシス誘導遺伝子caspase3を抑制することで、外傷性椎間板変性の進行が遅延した一方、加齢性自然発症椎間板変性は増悪し、これらは異なる病態であることが本研究で明らかとなった。また、通常細胞死に至るべくある細胞のアポトーシスを人為的に抑制することにより細胞の腫瘍化等を引き起こすことが危惧されたが、caspase 3ノックアウトマウスの椎間板組織に腫瘍化細胞の出現は認めなかった。

本研究結果より、外傷性椎間板変性に対してcaspase 3 遺伝子の発現を一過性に抑制することは、椎間板組織変性制御として有用な治療手段となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed caspase-3's role in two different types of intervertebral disc (IVD) degeneration using caspase-3 knockout (Casp-3 KO) mice.

Apoptosis was suppressed in the IVD cells of Casp-3 KO mice, but cellular senescence was enhanced. Casp-3 KO delayed IVD degeneration in the injury-induced model but accelerated it in the age-induced model. Our results suggest that this is due to different pathological mechanisms of these two types of IVD degeneration.

This would explain why the Casp-3 KO was effective against injury-induced, but not age-related, IVD degeneration. Our results suggest that short-term caspase-3 inhibition could be used to treat injury-induced IVD degeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板変性制御 アポトーシス Caspase3

1. 研究開始当初の背景

脊椎は体幹を支える主要な構成要素であり、その代表的疾病として椎間板障害が挙げられる。腰痛に加え、進行すると椎間板ヘルニアや脊柱管狭窄症、脊柱変形を続発し、自立した健康的な生活をおこなう上での障害となる。患者数が多いことも合わせ、生活の質を重視する現代社会においては克服すべき重要な疾患である。

治療には脊椎固定術や摘出術などの外科治療が普及し、一定の成果が認められるが(Yamada et al. Eur Spine J 2015)、病因に対する直接的なアプローチとはいえず、また隣接椎間障害などの術後機能障害の報告も認知され、その限界と代替医療の可能性に注目が集まっている。こうした中、近年の分子生物学、医工学分野の技術革新を背景として、より低侵襲で経済的負担の少ない、例えば注射 1 本で椎間板の退行変性を遅らせることが可能となれば、日常生活動作や生活の質を大きく改善させ、国民の福祉向上や労働生産性の向上にも貢献するものと期待される。

椎間板組織の中核を成す髄核細胞は、細胞分裂能が低く、また無血管野であり周囲からの拡散により栄養状態を維持している特殊な組織である。椎間板組織は様々な荷重・運動負荷に対し生体力学的に重要な機能を担っており、過去の報告からも椎間板変性には過度の応力集中や椎間板内圧の変化が関与していることが示唆されている。近年、椎間板の変性変化には髄核細胞のアポトーシスが大きく関与していることが報告されており、我々はこれまで生体力学的、分子生物学的側面から多面的に椎間板組織の変性メカニズムの解析および変性制御を試みる実験を行ってきた。アポトーシス誘導遺伝子 caspase 3 の発現をノックダウンすることにより、生体力学的荷重負荷環境における椎間板細胞死および椎間板組織の変性抑制が可能であることを明らかにした(Yamada et al. Am J Pathol. 2014)。また、椎間板細胞の恒常性維持に重要な遺伝子として、DNA check point に関与する遺伝子群の同定とその機能解析を行ない、髄核細胞のアポトーシスと密接に関連する細胞周期関連遺伝子をコントロールすることにより、椎間板組織の変性抑制が可能であることを証明した(Yamada et al. PLOS ONE 2013)。これまでの研究結果より、椎間板細胞に内在するアポトーシス関連遺伝子 caspase 3 の発現を制御することで、椎間板組織の変性抑制が可能であることが示唆された。

しかし本治療戦略に想定される課題として、caspase 3 はアポトーシスの最終実行因子であり、遺伝子レベルで抑制することで椎間板組織の恒常性維持に変化が生じる懸念や、アポトーシスの人為的な抑制により細胞の腫瘍化、悪性化が生じる懸念がある。また、加齢に伴う椎間板変性に対しても、本治療戦略が有効であるかを検証する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、椎間板細胞・組織の変性変化がアポトーシス応答機構を標的に遺伝子学的に制御可能かどうかを、生体力学的・分子生物学的手法およびノックアウトマウス(KOマウス)の表現型解析を用いた多面的なアプローチにより統合的に検討し、椎間板変性疾患に対する今後の臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血清除去モデルを用いた髄核細胞アポトーシス誘導 *in vitro* 試験

C57BL/6 wild type (WT)マウスと caspase 3 knock out (casp3 KO) マウスの腰椎椎間板髄核を採取し、髄核細胞を単離した。得られた髄核細胞を培養し、5-7 日間で髄核細胞コロニー(colony forming unit spherical: CFU-S) の接着を確認した。生後 6 ヶ月未満のマウスから採取した CFU-S を若年群、1 歳 2 ヶ月齢のマウスから採取した CFU-S を高齢群とした。

若年群では血清除去モデルを採用し、髄核細胞のアポトーシスを惹起した。CFU-S より培養液を除去し、無血清培地を加え 48 時間インキュベートを行った。TUNEL 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像し、髄核細胞のアポトーシスを評価した。また、高齢群の WT と casp3 KO マウスから採取した CFU-S を matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)抗体にて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像した。

(2) 外傷性椎間板変性モデルを用いた *in vivo* 試験

11 週齢 C57BL/6 WT マウスと casp3 KO マウスに対して、外傷性椎間板変性モデルを適用した。35G または 33G 針を L4/5 椎間板に穿刺貫通させ、有意な変性変化を生じる中心または背側領域貫通例だけを抽出した。術後 2、4 週で腰椎を摘出し、超高磁場 7.0 T-MRI による椎間板画像評価と病理組織学的評価により椎間板変性度を評価した。腫瘍化、悪性化の有無も組織学的に評価した。

(3) 加齢性自然発症椎間板変性モデルを用いた *in vivo* 試験

次いで、加齢性自然発症椎間板変性モデルを適用し *in vivo* 試験を行った。1 歳 2 ヶ月齢と 1

歳 6 ヶ月齢の C57BL/6 WT マウスと casp3 KO マウスの腰椎を摘出し、腰椎椎間板の 7.0 T-MRI による画像的評価と病理組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) Caspase 3 knock out マウス髄核細胞は無血清状態におけるアポトーシス誘導が抑制される

In vitro 試験における若年 CFU-S の非血清除去群では、WT 群、caspase3 KO 群ともに TUNEL 染色陽性細胞を認めず、TUNEL 染色のスコアも有意差はなかった。血清除去群では WT 群で TUNEL 染色陽性細胞が増加したが、casp3 KO 群では TUNEL 染色の細胞数、スコアともに WT 群に比べ有意に低値であった。高齢群 CFU-S の MMP-3 免疫染色では、若年 WT 群と比較して、casp3 KO 群では MMP-3 免疫染色のスコアが有意に高かった。

(2) 外傷性椎間板穿刺変性モデルでは caspase 3 knock out マウスで穿刺後早期の椎間板変性は抑制される

35G 針による外傷性椎間板変性モデルでは、穿刺後 2 週時の casp3 KO マウス穿刺椎間板の変性所見は、MRI および組織学的評価において WT マウス椎間板と比較し有意に軽度であった。穿刺後 4 週の椎間板では、WT マウス群と casp3 KO マウス群間の椎間板変性所見に有意差はなかった。より太い 33G 針穿刺椎間板では、穿刺後 2 週および 4 週において WT 群と casp3 KO マウス群間の椎間板変性所見に有意差はなかった。また、casp3 KO マウス椎間板の腫瘍化、悪性化所見はなかった。

(3) 加齢性自然発症椎間板変性モデルでは caspase 3 knock out マウスで椎間板変性が進行する

加齢性自然発症椎間板変性モデルでは、1 歳 2 ヶ月齢における casp3 KO マウスの腰椎椎間板変性所見は WT 群と比較し有意に高度であった。1 歳 6 ヶ月齢における腰椎椎間板 MRI 評価では、casp3 KO マウスは WT マウスと比較しての変性所見は有意に高度であったが、組織学的所見には 2 群間に有意差はなかった。

上記結果のまとめとして、*in vitro* 試験では WT マウス髄核細胞は血清飢餓状態においてアポトーシスが誘導されたのに対し、caspase 3 KO マウス髄核細胞ではアポトーシスの誘導が抑制された。*In vivo* 試験では、35G 針穿刺による外傷性椎間板変性の進行は、WT マウスに比べて caspase 3 KO マウスで遅延していた。しかし、より太い 33G 針穿刺による椎間板変性の進行は、WT マウスと caspase 3 KO マウスで同等であった。これらの結果から、アポトーシス誘導遺伝子である caspase 3 のノックアウトにより髄核細胞のアポトーシスが抑制されることで、外傷性の椎間板組織変性の進行が遅延したと考えられた。しかし、椎間板障害が高度であった場合の組織変性変化は WT マウスと caspase 3 KO マウスで同等であり、caspase 3 遺伝子ノックアウトによる椎間板変性抑制効果は、椎間板障害の程度によって限界があると考えられた。

一方で、*in vivo* 加齢性自然発症椎間板変性モデルでは、1 歳 2 ヶ月齢 caspase 3 KO マウスの腰椎椎間板変性所見は WT マウスに比べて有意に高度であった。これらの所見から、加齢性自然発症椎間板変性は外傷性椎間板変性とは異なる病態であることが示唆された。

高齢マウス髄核細胞を用いた *in vitro* 試験では、高齢 WT マウスに比べて高齢 caspase 3 KO マウスの CFU-S における MMP-3 発現が有意に高い結果であった。Caspase 3 をノックアウトすることで、高齢マウスの髄核細胞における細胞外基質分解酵素発現が促進され椎間板の変性変化を促進させることが推測されたが、今後さらなる検証を行う必要があると考えられた。

結論として、アポトーシス誘導遺伝子 caspase 3 をノックアウトすることで、髄核細胞のアポトーシス誘導が抑制され、外傷性椎間板変性が抑制された。しかし、椎間板障害の程度によってその効果には限界があった。その一方で、caspase 3 ノックアウトにより加齢性自然発症椎間板変性が増悪しており、加齢性の椎間板変性は外傷性椎間板変性とは異なる病態であることが示唆された。

外因性の椎間板組織変性にアポトーシス誘導因子 caspase3 が強く関与しており、本遺伝子の発現を一過性に抑制することは、椎間板組織の外傷性変性変化を制御しうる有用な治療手段となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohnishi Takashi, Yamada Katsuhisa, Iwasaki Koji, Tsujimoto Takeru, Higashi Hideaki, Kimura Taichi, Iwasaki Norimasa, Sudo Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Caspase-3 knockout inhibits intervertebral disc degeneration related to injury but accelerates degeneration related to aging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55709-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----