

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591627  
 研究課題名 (和文) 内因性炎症性サイトカインの制御を図った新しい椎間板再生アプローチ  
 研究課題名 (英文) Disc regeneration aiming at suppression of inflammatory cytokines  
 研究代表者  
 宮本 敬 (MIYAMOTO KEI)  
 岐阜大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：20313885

研究成果の概要：軟骨分解を促進する作用を持つカルパインに着目し、その作用を制御することによる椎間板再生アプローチの可能性を追求した。まずはカルパインの椎間板組織（ウシ尾椎椎間板、ヒト椎間板）における局在を検証した。ウシ尾椎椎間板、ヒト椎間板組織ともに、 $\mu$ カルパイン、mカルパインの存在が認められた。ヒト椎間板細胞においては、カルパインの存在濃度が変性するに従って増加する傾向が明らかとなった。次いで、細胞外マトリックスを分解する作用のあるカルパインの阻害物質が、炎症性サイトカインの存在下での *in-vitro* 椎間板変性モデルでの細胞外マトリックス代謝にいかなる影響を与えるか、について検証した。炎症性サイトカインを付加することにより、細胞外マトリックス蓄積量が有意に低下し、MMP 3 の培養液中の濃度も上昇する一方、カルパインの阻害物質であるカルバスタチンを付加しても、細胞外マトリックス産生低下に有意な影響がみられなかった。カルパインがアグリカンを切断する際の切断端を認識する抗体を用いたウエスタンブロッティング解析において、ウシ、ヒトともに、切断端の存在が明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費        | 間接経費     | 合計          |
|---------|-------------|----------|-------------|
| 2006 年度 | 1, 100, 000 | 0        | 1, 100, 000 |
| 2007 年度 | 1, 100, 000 | 330, 000 | 1, 430, 000 |
| 2008 年度 | 700, 000    | 210, 000 | 910, 000    |
| 年度      |             |          |             |
| 年度      |             |          |             |
| 総計      | 2, 900, 000 | 540, 000 | 3, 440, 000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学、骨・軟骨代謝学、生体関連物質、加齢医学、病態モデル

## 1. 研究開始当初の背景

変性椎間板を再生させるための手段として、細胞外マトリックス産生を惹起させる成長因子のたんぱく質直接投与、成長因子を産生させる遺伝子導入、賦活化した細胞投与などが知られていた。マトリックス分解を制御することによる変性椎間板再生アプローチが

有効であると思われるが、これについては報告が少ない状況であった。当初は成長因子と椎間板変性環境の相互作用を検証することを目的としたが、成長因子の安定した入手が困難である状況もあり、軟骨分解を促進する作用を持つカルパインに着目し、その作用を制御することによる椎間板再生アプローチ

の可能性を追求した。

## 2. 研究の目的

(1) 変性椎間板における細胞外マトリックスの合成、分解のインバランスという状態を正確に理解するために、炎症性サイトカインの働きによって細胞外基質分解を促進させることが近年知られてきたカルパインの椎間板組織（ウシ尾椎椎間板、ヒト椎間板）における局在、その拮抗物質の局在、変性した椎間板（ヒト椎間板）におけるそれらの局在を検証した。

(2) 細胞外マトリックスを分解する作用のあるカルパインの阻害物質が、炎症性サイトカイン（インターロイキン $\alpha$ ）の存在下での *in-vitro* 椎間板変性モデル（ウシ尾椎椎間板、アリジネートビーズ培養）での細胞外マトリックス代謝にいかなる影響を与えるか、について検証した。

(3) カルパインが実際に椎間板における細胞外マトリックス分解に関与したか否かを検証する目的にて、カルパインによるアグリカンの切断端の椎間板組織における存在を、ウシ尾椎椎間板、ヒト椎間板を用いて調査した。

## 3. 研究の方法

(1) ウシ尾椎椎間板、ヒト椎間板組織を用い、 $\mu$ カルパイン、mカルパイン、カルパスタチンの抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法、免疫染色法を用いて、それら局在を検証した。抗体は市販の抗体を用いた。(Mouse Anti-Calpain ( $\mu$ -Calpain) Large Subunit Monoclonal Antibody/ CHEMICON®, Rabbit Anti-Calpain (m-Calpain) Large Subunit Polyclonal Antibody/ CHEMICON®, Mouse Anti-Calpastatin Polyclonal Antibody/ SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)

(2) ウシ尾椎の椎間板細胞をアリジネートビーズに包埋した 3 次元培養システムを用い、炎症性サイトカイン（インターロイキン $\alpha$ ）を付加することにより、*in-vitro* 椎間板変性モデルを作成した。インターロイキン $\alpha$ の存在下での椎間板細胞の細胞外マトリックスにおけるプロテオグリカン産生・蓄積量の変化をDMMB法を用いて測定した。炎症反応の産物であるMMP 3の培養液中の濃度を測定した。

(3) カルパインがアグリカンを切断した際に遊出されるとされるアグリカンの切断端を認識する抗体（ウシ：ポリクロナール抗体、ヒト：モノクロナール交代）を用いて椎間板組織から抽出したプロテオグリカンのウエスタンブロッティング解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) ウシ尾椎椎間板、ヒト椎間板組織ともに、 $\mu$ カルパイン、mカルパイン、カルパスタチンの存在が認められた。細胞質内への局在が明らかであったが、細胞外マトリックスにおいても微量の存在が示唆された。軟骨細胞において、カルパインが細胞内に存在するという事実と類似した結果であった。また、ヒト椎間板細胞においては、カルパインの存在濃度が変性するに従って増加する傾向が明らかであった。

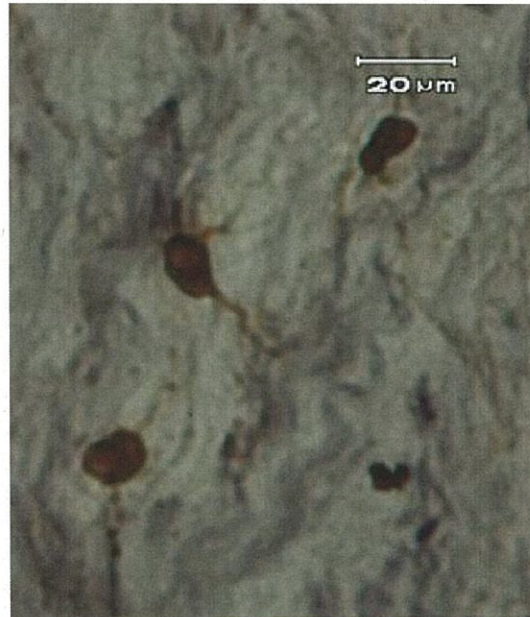


図1 m カルパインのウシ椎間板髄核組織における局在（免疫染色法）。mカルパインが髄核組織において細胞質に存在していることが明らかとなった。細胞外基質における存在は明らかではなかった。



図2 mカルパインのウシ椎間板線維輪組織における局在(免疫染色法)。mカルパインが線維輪組織において細胞質に存在していることが明らかとなった。細胞外基質における存在は明らかではなかった。



図3  $\mu$ カルパインのヒト椎間板(線維輪)における局在(免疫染色法, Mouse Anti- $\mu$ -Calpain, Large Subunit, Monoclonal Antibody/ CHEMICON®使用)。 $\mu$ カルパインが細胞質に存在していることが明らかとなった。核における染色性及び細胞外基質における存在は明らかではなかった。



図4 mカルパインのヒト椎間板(線維輪)における局在(免疫染色法, Rabbit Anti-m-Calpain, Large Subunit, Polyclonal Antibody/ CHEMICON®)。mカルパインが細胞質に存在していることが明らかとなった。核における染色性及び細胞外基質における存在は明らかではなかった。

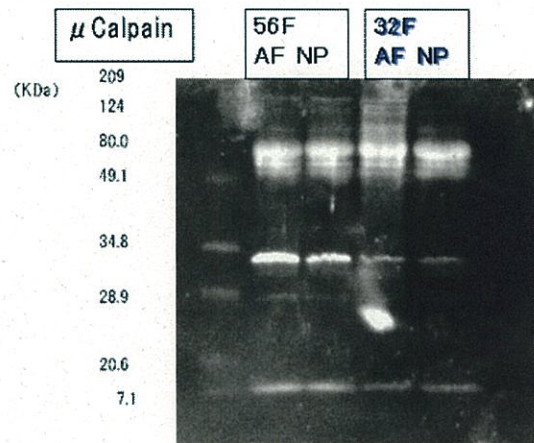


図5  $\mu$ カルパインのウエスタンブロッティング結果(56歳女性、32歳女性の線維輪、髄核のサンプルが解析されている、図3と同じ抗体を使用)。56歳のサンプルにおいて、線維輪(AF)、髄核(NP)ともに、 $\mu$ カルパインの発現が大きいことが明らかである。加齢による椎間板の変性がカルパインの発現に関与していることが示唆された。なお、同等の結果は他のサンプルにおいても証明されている。

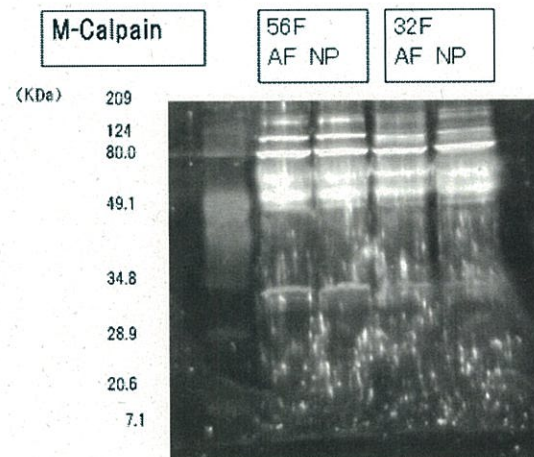


図6 mカルパインのウエスタンブロッティング結果(56歳女性、32歳女性の線維輪、髄核のサンプルが解析されている、図4と同じ抗体を使用)。56歳のサンプルにおいて、線維輪(AF)、髄核(NP)ともに、mカルパインの発現が大きいことが明らかである。加齢による椎間板の変性がカルパインの発現に関与していることが示唆された。なお、同等の結果は他のサンプルにおいても証明されている。

(2) ウシ尾椎の椎間板細胞をアリジネートビーズに包埋した3次元培養システムにおいて、炎症性サイトカイン（インターロイキン $\alpha$ ）を付加することにより、プロテオグリカン産生・蓄積量が有意に低下した。さらに、炎症反応の産物であるMMP 3の培養液中の濃度も有意に上昇した。カルパインの阻害物質であるカルパスタチンを付加しても、インターロイキン $\alpha$ による細胞外マトリックス産生低下に有意な影響がみられなかった。

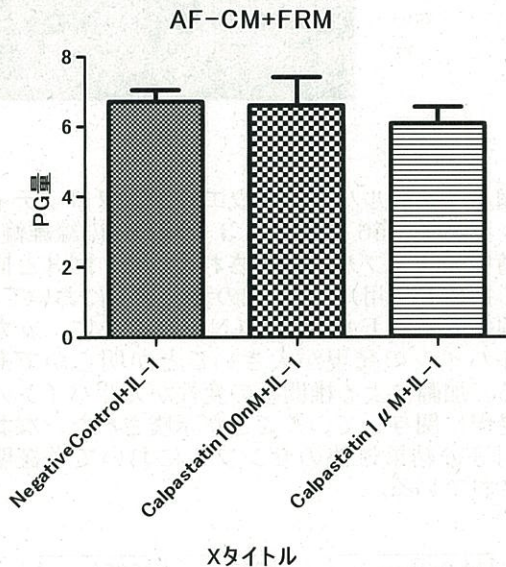


図7 牛椎間板線維輪細胞をおアルジネートに包埋して炎症性サイトカインであるIL1ベータを加えた。カルパインの阻害物質であるカルパスタチンあり、なしの2条件にてプロテオグリカン蓄積量を比較した。カルパスタチンによる有意な影響はみられなかった。

(3) カルパインがアグリカンを切断する際の切断端を認識する抗体（ウシ：ポリクロナール抗体、ヒト：モノクロナール抗体）を用いたウエスタンブロッティング解析において、ウシ、ヒトともに、切断端の存在が明らかとなった。ヒト椎間板においては、その濃度が変性に従って有意に高くなる傾向が示唆された。

#### 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）

〔学会発表〕（計 1 件）

Miyamoto, K; An, HS; Urban, JP; Chujo, T; Akeda, K; Masuda, K  
 LOW OXYGEN TENSION AND BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-7 SYNERGISTICALLY STIMULATE EXTRACELLULAR MATRIX PRODUCTION BY HUMAN

#### INTERVERTEBRAL DISC CELLS

国際腰椎学会 2007年6月11日 香港

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮本 敬

岐阜大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20313885

##### (2) 研究分担者

清水克時

岐阜大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90170969

##### (3) 連携研究者