

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007 年度～2008 年度

課題番号:19591740

研究課題名(和文) 椎間板変性発症メカニズムの解明—終末糖化産物(AGEs)の生物学的役割—  
 研究課題名(英文) The analysis of the mechanisms how the intervertebral discs develop into the degenerative discs -The role of Advanced glycation end-products (AGEs) in the molecular biology of disc degeneration-

研究代表者

朴 珍守 (Park Jin Soo)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 10368938

研究成果の概要:

ウシ椎間板髄核で AGEs、RAGE の存在が確認され、その RAGE は、AGEs-RAGE complex における受容体としての機能を持った RAGE であることが確認された。IL-1 $\beta$  の刺激により、機能のある RAGE の発現が増加し、炎症による RAGE の発現の増加が AGEs-RAGE complex を活性化させることにより、椎間板の変性が加速する可能性が示唆され、病的な椎間板変性と関連がある可能性が考えられた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野:整形外科学

キーワード:(1)Advanced Glycation End products (2) Receptor for AGEs (3)Inflammation  
 (4)Bovine disc (5)若年性椎間板変性 (6)椎間板性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

Advanced glycation end products (AGEs: 終末糖化産物)とは、糖と蛋白が糖化反応を経て生成される物質であり、種々の病態との関連が報告されている。我々は、椎間板変性との関連に関し、AGEs の蓄積により AGEs-RAGE complex が活性化し、ヒト椎間板髄核内のアグリカン含有量が低下することを報告し、AGEs の蓄積が椎間板変性の一因であることを報告した。ヒト椎間板髄核は、解剖検体より入手し使用していたが、それは、ある程度変性を起こした髄核であった。つまり、AGEs の蓄積による椎間板変性は、加齢性

変化として自然な経過である可能性もあり、椎間板性疼痛や若年性椎間板変性など、いわゆる疾病を引き起こす病的な椎間板変性と、AGEs-RAGE complex の関連は不明確なままであった。

一方、関節軟骨細胞においては、炎症性サイトカインが RAGE の発現を増加させ、軟骨を変性へと導くという報告がある。そこで、椎間板においても同様に、炎症性サイトカインにより、RAGE の発現が増加し、AGEs-RAGE complex がさらに活性化し、変性を加速させるのではないかと仮定し研究をすすめた。炎症性サイトカインは、変性のない椎間板にも

発現が確認されている、IL-1 $\beta$ を使用した。

まず、変性の比較的少ない椎間板組織として、椎間板ヘルニア細胞を使用した。IL-1 $\beta$ の刺激により、RAGEの発現は増加したが、アグリカンの発現にばらつきが大きく、評価不可能であった。椎間板ヘルニアには、髓核と線維輪が含まれており、細胞外基質であるアグリカンの量的な評価は困難であることが確認された。

変性のない髓核を使用することが必要であるが、ヒト椎間板では、変性のない髓核を入手することは難しく、ヒト椎間板組織と類似した性質を持つとされる、ウシ椎間板髓核を使用することとした。

## 2. 研究の目的

ウシ椎間板髓核において、炎症がAGEs-RAGE complexに及ぼす影響を解明する。

## 3. 研究の方法

ウシ尾椎の椎間板組織6検体を用いた。椎間板全体を病理学的検査に使用し、髓核を単層培養して用いた。

(1) 病理学的検討: Hematoxylin and Eosin (H&E)染色、Safranin-O染色、および、抗AGEs抗体、抗RAGE抗体による免疫染色を行った。

(2) AGEsに対する反応の確認: 単層培養した髓核を、0.1mg/mlのAGEsで6日間刺激を行った。2日毎に培養液は交換した。6日後に、Real-time PCR法にて、アグリカンの発現量を測定し検討した。

(3) IL-1 $\beta$ によるRAGE発現への影響: 単層培養した髓核を、0.5ng/mlのIL-1 $\beta$ で2日間刺激を行い、Real-time PCR法にて、RAGEの発現量を測定し検討した。また、細胞免疫染色にて、RAGEの発現を検討した。

(4) IL-1 $\beta$ とAGEsの相互作用: 単層培養した髓核を、以下の4群に分けて2日間刺激を行い、Real-time PCR法にて、アグリカンの発現量を測定し検討した。Group1. AGEs (-)、IL-1 $\beta$  (-)。Group2. AGEs (-)、IL-1 $\beta$  (+)。Group3. AGEs (+)、IL-1 $\beta$  (-)。Group4. AGEs (+)、IL-1 $\beta$  (+)。さらに、Group4では、RAGE中和抗体を用い、RAGEのシグナルをブロックする実験を追加した。

## 4. 研究成果

(1) 病理学的には、ウシ椎間板髓核は、軟骨細胞で構成され、脊索細胞はほとんど認められなかった。また、免疫染色にて、髓核内にAGEs、RAGEの存在が確認された。(図1A-1E)。

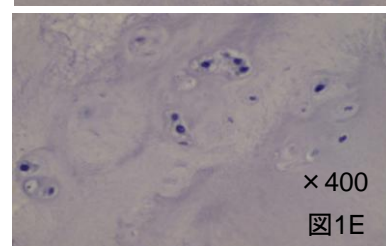
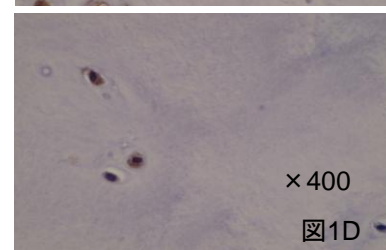
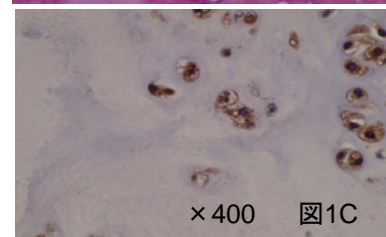
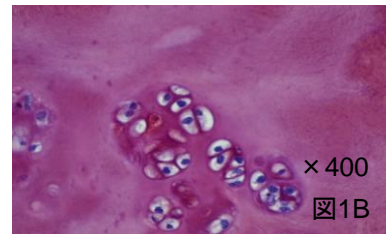
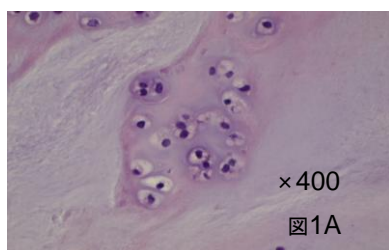


図 1A-1E: ウシ椎間板髓核組織。1A: H&E染色、1B: Safranin-O染色、1C: 抗RAGE抗体による免疫染色、1D: 抗AGEs抗体による免疫染色、1E: Negative control。

(2) AGEsの6日間の刺激により、Aggrecanは82.1% (p=0.0002)と有意に減少した。(図2)。

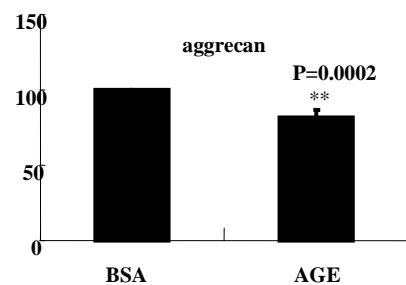


図 2

これら(1)、(2)の結果から、ウシ椎間

板には AGEs に反応する RAGE が存在し、AGEs-RAGE 系の実験に、ウシ椎間板髄核が使用可能であることが確認された。

(3) 2 日間の IL-1 $\beta$  の刺激により、RAGE の発現は、Real time PCR 法において、166.5% (p=0.0015) と有意に増加した。(図 3A)。また、細胞免疫染色でも、明らかな RAGE の増加が認められた。(図 3B-D)。

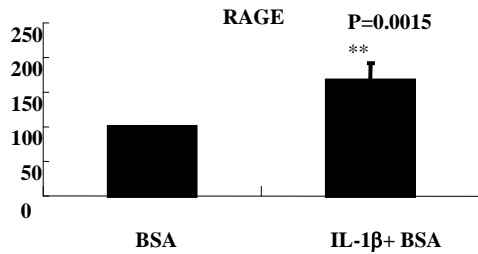


図 3 A

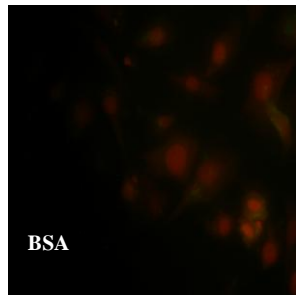


図 3 B

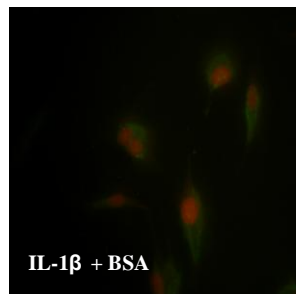


図 3 C

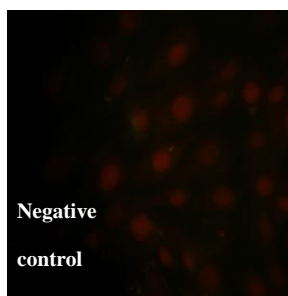


図 3 D

(4) Group2、3、4 における、アグリカンの発現量は、Group1 と比較すると、それぞ

れ、100.9%、103.2%、73.6% (p=0.011) であり、Group4 でのみ、有意にアグリカンの発現量が減少した。(図 4A)。また、Group4 において、RAGE のシグナルをブロックすると、アグリカンの発現量は、91.4%となり、アグリカンを減少させる効果はブロックされることが確認された。(図 4B)。

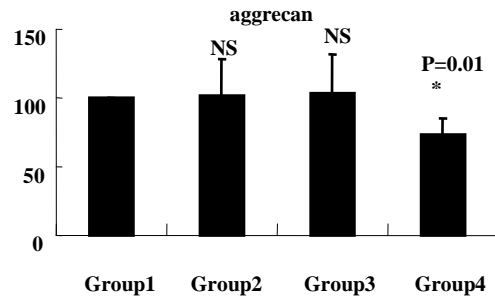


図 4 A

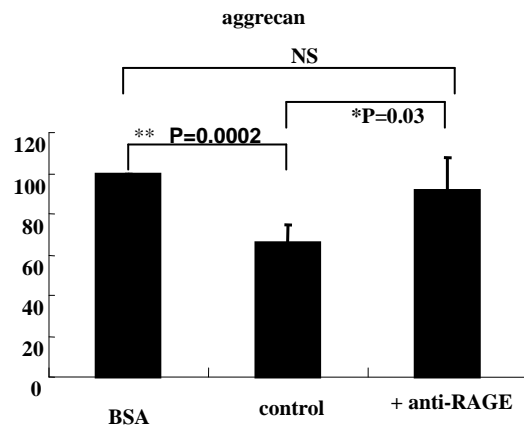


図 4 B

以上のことから、ウシ椎間板髄核で AGEs、RAGE の存在が確認され、また、その RAGE は、AGEs-RAGE complex における受容体としての機能を持った RAGE であることが確認された。IL-1 $\beta$  の刺激により、機能のある RAGE の発現が増加し、2 日間という極短期間において、IL-1 $\beta$  で炎症を惹起させ、AGEs を作用させると、髄核のアグリカン含有量が有意に低下し、それは RAGE signaling を介していることが確認された。炎症などによる RAGE の発現の増加が AGEs-RAGE complex を活性化させることにより、椎間板の変性が加速する可能性が示唆され、病的な椎間板変性と関連がある可能性が考えられた。

椎間板において、RAGE の発現の増加が、椎間板変性を助長する可能性が示唆された。今回の実験では、RAGE の発現は、炎症という化学的な刺激である、IL-1 $\beta$  で増加することが確認された。今後、椎間板変性と関連が報告

されている様々な因子、例えば物理的な圧迫刺激などにより、椎間板での RAGE の発現がどのように影響を受けるかなどへの研究の発展が考えられる。

#### 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)

1. Tatsuhiro Yoshida, Jin Soo Park, Kimiaki Yokosuka, Kotaro Jimbo, Kei Yamada, Kimiaki Sato, Masayoshi Takeuchi, Sho-ichi Yamagishi, Kensei Nagata. Up-regulation in Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) in inflammatory circumstances in Bovine Coccygeal Intervertebral Disc Specimens in vitro. Spine 2009; Now printing  
査読あり
2. 横須賀公章、永田見生、朴珍守、神保幸太郎、佐藤公昭、山岸昌一. 椎間板変性の生化学—終末糖化産物 (AGEs) と椎間板変性 脊椎ジャーナル 20 巻 1 号 37-42、2007 年  
査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 吉田龍弘 他.  
ウシ椎間板髄核組織における AGEs (Advanced glycation end products)、RAGE (AGEs 受容体) の発現—AGEs と若年性椎間板変性—  
第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会.  
平成 20 年 10 月 24 日. 京都、日本
2. Tatsuhiro Yoshida et al.  
Role of advanced glycation end-products (AGEs) in the Pathogenesis of disc degeneration.  
World forum for spine research.  
平成 20 年 1 月 24 日. 京都、日本
3. 横須賀公章 他.  
終末糖化産物 (AGEs) と椎間板変性 (終末糖化産物の椎間板髄核細胞に与える影響).  
第 15 回日本腰痛学会.  
平成 19 年 11 月 10 日. 大阪、日本

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

朴 珍守 (Park Jin Soo)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：10368938

##### (2) 研究分担者

永田 見生 (Nagata Kensei)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：50140687

佐藤 公昭 (Sato Kimiaki)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：90268912

山田 圭 (Yamada Kei)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：00299512