

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19791045

研究課題名(和文)

椎間板変性に対する脊索性髄核の役割

研究課題名(英文)

Role of notochord for intervertebral disc degeneration

研究代表者

辻 崇 (TSUJI TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60296639

研究成果の概要(和文): 脊索細胞を含む脊索性髄核は椎間板組織の恒常性を保つ為に重要な役割を担い、脊索細胞が髄核から消失すること、すなわち脊索性髄核から線維軟骨性髄核への移行が細胞外基質代謝に影響を及ぼすと仮定し研究を行ったところ、脊索性髄核は TGF - 1 と TIMP - 3 を発現することによって椎間板の恒常性維持に寄与している可能性が示された。また、脊索性髄核の終末期には TGF などのサイトカインの低下にともなう ADAMTS4/TIMP - 3 比の不均衡が基質代謝に変化を及ぼし線維軟骨性髄核に移行する可能性が示された。

研究成果の概要(英文): The levels of expression of TIMP - 3 in the notochordal NP were significantly lower in 160 week old rabbits than those in 4 week old rabbits. The decrease in the expression of TIMP - 3 possibly mediated in part by TGF - 1 cause an imbalance of ADAMTS4/TIMP - 3 ratio at the transition period from the notochordal to the fibrocartilaginous NP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：脊椎

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：椎間板、変性、髄核、脊索

1. 研究開始当初の背景

腰痛発症の最も頻度の高い原因のひとつとして椎間板変性を基盤とした退行変性疾患があることは良く知られている。椎間板変性

が端緒となり椎間板症、椎間板ヘルニア、脊椎すべり症、変形性脊椎症や脊柱管狭窄症などさまざまな病態が生じていく。しかし、椎間板変性の原因は未だに不明である以上、退

行変性腰痛に対する治療は、保存的、手術的いずれも対症的とならざるを得ず、根本的な問題解決には程遠いのが現状である。そこで椎間板変性の原因を解明し、変性過程そのものを予防・遅延あるいは逆行せしめることが可能となれば、腰・下肢痛に苦しむ患者個人の QOL を改善させるのみならず、医療経済上もその恩恵は計り知れない。

2. 研究の目的

髄核は胎生期に脊柱の原基となる間葉系細胞を本来の位置に誘導するという重要な役割を果たす脊索の遺残であり、ヒト椎間板の変性は 10 歳代後半に髄核内に遺残した脊索細胞が消失し、周囲の内層線維輪から軟骨様細胞が侵入する時期、すなわち脊索性髄核から軟骨性髄核への転換期に一致して始まると言われている。また、脊索性髄核が生涯にわたり残存する種と早期に軟骨性髄核に置換する種があり、後者では椎間板変性が早期に生じ、椎間板ヘルニアや脊柱管狭窄症による下肢麻痺を生じやすいことが知られている。従って、われわれは脊索性髄核が椎間板変性に対して抑制的に働く機能を有している可能性が高いと考え、その機能について検討することさらにヒト椎間板変性に応用して検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 経年的組織学的変化の半定量的評価

L4-L5 椎間板組織(4 週齢 : n=7、160 週齢 : n=7) を使用した。経年的組織学的変化は 5 つの部位(前方外層線維輪、前方内層線維輪、髄核、後方内層線維輪、後方外層線維輪)でヒト椎間板組織の経年的変化の最も詳細な分類の 1 つである Boos らのグレード分類を一部変更して評価した。家兔を測定して得られた値は過去に報告されているヒトの値と

比較検討した。さらに髄核における脊索様細胞の有無を評価した。髄核内のランダムにサンプリングした 3 点で顕微鏡 200 倍の 1 視野あたりの脊索細胞の数および割合を検討した。

(2) 免疫組織学的検討

L4-L5 椎間板組織(4 週齢 : n=3、160 週齢 : n=3) を使用した。抗体は TIMP-3 に対するモノクローナル抗体(clone136-13H4)を用いて ENVISION キット(Dako)で染色した。

(3) 半定量的 RT-PCR

4 週齢の髄核および線維輪の TGF-1, TIMP-1, -2, -3 を評価した。さらに髄核における TGF-1, ADAMTS4, ADAMTS5, TIMP-3 の 4 週齢と 160 週齢の経時的変化を評価した。

(4) サイトカインの TIMP-3 および ADAMTS4 mRNA に及ぼす影響

30mg の髄核組織(4 週齢 : n=5) をアスコルビン酸(25 μ g/ml) 添加無血清培地に TGF-1 を 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml 添加した群および IL-1 を 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml 添加した群を作成し 24 時間培養後に RNA を抽出し TIMP-3 と ADAMTS4 の mRNA 量を上記方法で半定量的に比較検討した。

4. 研究成果

(1) 家兔椎間板においてもヒトにおいて報告されている加齢性変化、すなわち chondrocyte proliferation, mucous degeneration, tear and cleft formation, granular change が家兔椎間板においても確認された。経年的組織学的変化の半定量的評価により、4 週齢の家兔はヒトの胎児から 2 歳に相当し、160 週齢の家兔は 11 歳から 30 歳、とりわけ 11 歳から 16 歳に相当することが明らかとなった。

(2) 4 週齢の免疫染色では髄核および線維輪

の両方の細胞で TIMP-3 が陽性であったが、160 週齢では髄核および線維輪ともに TIMP-3 の染色を認めなかった。

(3)4 週齢の家兎を用いて TGF- 1、TIMP-1,2,3,mRNA の発現を髄核と線維輪で比較すると、髄核において有意に強く発現していた。髄核における mRNA の発現レベルは加齢とともに変化し、髄核における TGF- 1 と TIMP-3mRNA は 4 週齢と比較して 160 週齢において有意に低値を示した。一方 ADAMTS4 の mRNA の発現は 4 週および 160 週齢で明らかな差を認めなかった。ADAMTS5 の mRNA は両群とも検出されな

いか極めて微量であった。
(4)髄核の器官培養実験の結果では、TIMP-3 の mRNA の発現は TGF- 1 添加により容量依存的に増加したが、IL-1 の影響は受けなかった。一方 ADAMTS4 の mRNA の発現は TGF- 1 添加の影響を受けなかったが、IL-1 添加によって増加した。

以上の結果から、脊索性髄核は TGF - 1 と TIMP - 3 を発現することによって椎間板の恒常性維持に寄与している可能性が示された。また、脊索性髄核の終末期には TGF などのサイトカインの低下にともなう ADAMTS4/TIMP - 3 比の不均衡が基質代謝に変化を及ぼし線維軟骨性髄核に移行する可能性が示された。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Watanabe K, Matsumoto M, Ikegami T, Nishiwaki Y, Tsuji T, Ishii K, et al. Reduced postoperative wound pain after lumbar spinous process splitting

laminectomy for lumbar canal stenosis: a randomized controlled study. J Neurosurg Spine. 2011 Jan;14(1):51 -8. (査読有)

2. Nakamura M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, et al. Cordotomy for patients with thoracic malignant astrocytoma. J Neurosurg Spine. 2010 Oct;13(4):418 -23. (査読有)

3. Watanabe K, Matsumoto M, Tsuji T, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, et al. Ball tip technique for thoracic pedicle screw placement in patients with adolescent idiopathic scoliosis. J Neurosurg Spine. 2010 Aug;13(2):246 -52. (査読有)

4. 辻崇, 戸山芳昭. 【初診外来における初期診療】腰痛. 診断と治療. 2010.03;98:292 -7. (査読無)

5. Matsumoto M, Watanabe K, Ishii K, Tsuji T, Takaishi H, Nakamura M, et al. Posterior decompression surgery for extraforaminal entrapment of the fifth lumbar spinal nerve at the lumbosacral junction. J Neurosurg Spine. 2010 Jan;12(1):72 -81. (査読有)

6. 辻崇, 千葉一裕. 【高齢者の腰痛診療】高齢者腰部脊柱管狭窄症の診断と治療 特に手術適応とその成績について . Orthopaedics. 2009.05;22(6):60 -7. (査読無)

7. Matsumoto M, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, et al. Nocturnal leg cramps: a common complaint in patients with lumbar spinal canal stenosis. Spine . 2009 Mar 1;34(5):E189 -94. (査読有)

8. Matsumoto M, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, et al. Risk factors for closure of lamina after open -door laminoplasty. J Neurosurg Spine. 2008 Dec;9(6):530 -7. (査読有)

9. 辻崇, 千葉一裕. 【腰下肢痛・しびれ 診断と治療】 腰下肢痛・しびれに対する手術 棘突起縦割式椎弓切除術. (査読無)

Orthopaedics(0914-8124); 2008. p. 34-9.

10. Tsuji T, Asazuma T, Masuoka K, Yasuoka H, Motosuneya T, Sakai T, et al. Retrospective cohort study between selective and standard C3-7 laminoplasty. Minimum 2-year follow-up study. Eur Spine J. 2007 Dec;16(12):2072-7. (査読有)

11. 辻崇, 千葉一裕. 【高齢者の痛み 腰痛】 高齢者の腰痛で鑑別すべき疾患とその治療 椎間板ヘルニア. Geriatric Medicine; 2007. p. 981-5. (査読無)

12. Sakai T, Tsuji T, Asazuma T, Yato Y, Matsubara O, Nemoto K. Spontaneous resorption in recurrent intradural lumbar disc herniation. Case report. J Neurosurg Spine. 2007 Jun;6(6):574-8. (査読有)

13. 辻崇, 千葉一裕. 【高齢者の脊椎脊髄疾患】 加齢による影響と変化 基礎と臨床 脊椎・脊髄の加齢性変化 椎間板の加齢と変性. 脊椎脊髄ジャーナル; 2007. p. 386-90. (査読無)

14. Tsuji T, Chiba K, Imabayashi H, Fujita Y, Hosogane N, Okada Y, et al. Age-related changes in expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 associated with transition from the notochordal nucleus pulposus to the fibrocartilaginous nucleus pulposus in rabbit intervertebral disc. Spine. 2007 Apr 15;32(8):849-56. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

1. Haruki Funao, Takashi Tsuji, Kota Watanabe², Ken Ishii¹, Hironari Takaishi¹ Masaya Nakamura¹, Morio Matsumoto¹, Yoshiaki Toyama¹, Kazuhiro Chiba

Comparison of spinopelvic sagittal alignment between lumbar canal stenosis and degenerative spondylolisthesis. Annual Meeting of AAOS. 2010, March 9-13. New Orleans, USA

2. Kato Masanori, Fujita Nobuyuki, Takaishi Hironari, Takito Jiro, Kimura Tokuhiko, Hosogane Naobumi, Tsuji, Takashi; Matsumoto, Morio, Toyama Yoshiaki, Chiba Kazuhiro. Type II Collagen Gene Expression of Intervertebral Disc in Ovariectomized Rats. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2008.3.2. San Francisco, CA USA.

3. Tsuji T, Chiba K, Fujita N, Miyake A, Kato M, Watanabe K, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, Matsumoto M, Toyama Y. Expression of TIMP-3 and Aggrecanases associated with transition from notochordal nucleus pulposus to fibrocartilaginous nucleus pulposus in rabbit intervertebral disc. International Society for the study of the Lumbar Spine 2007.6.10. Hong Kong, China.

4. 辻崇 千葉一裕 廣瀬裕一郎 渡邊航太 石井賢 高石官成 中村雅也 松本守雄 戸山芳昭. 腰椎椎間板ヘルニア 449例の臨床的特徴. 日本脊椎脊髄病学会 2007.4.26. 金沢.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辻 崇 (TSUJI TAKASHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60296639

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし