

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09634

研究課題名（和文）椎間板変性に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment for intervertebral disc degeneration

研究代表者

藤田 順之（Fujita, Nobuyuki）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：30348685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：椎間板髄核様細胞株とヒト椎間板細胞において、TNF- α 刺激によって、TNF- α と COX-2の発現が有意に上昇したが、HAを添加することによって、その発現上昇は有意に抑制された。一方、ヒアルロニダーゼの添加により、TNF- α とCOX-2の発現が有意に上昇した。更に、p38、Erk1/2、p65のリン酸化が認められ、またTNF- α 刺激によるp38、Erk1/2のリン酸化は、HA添加により抑制された。ヒト変性椎間板におけるヒアルロン酸分解酵素の発現推移につき検討したところ、いずれのヒアルロン酸分解酵素も椎間板変性の進行に伴って発現が増加し、特にHYAL1において、その発現量に有意差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰椎変性疾患の原因の一つに椎間板変性が挙げられるが、現在のところ、椎間板変性を抑制する有効な治療法は確立されていない。本研究結果より、ヒアルロン酸がp38とErk1/2経路を制御することで、椎間板の炎症を抑制する可能性が示された。更に、HYAL1の発現が椎間板変性の進行と相関していることも示された。以上より、HYAL1がHA代謝を介して、椎間板変性の治療標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：RT-PCR and Western blot analysis showed that TNF- α -mediated induction of the expression of TNF- α and COX2 was clearly neutralized by HA treatment, and the expression of TNF- α and COX2 was significantly induced by hyaluronidase treatment in both cell types. Additionally, Western blot analysis showed that hyaluronidase-induced phosphorylation of p38 and Erk1/2, and that TNF- α -mediated phosphorylation of p38 and Erk1/2 was clearly reduced by HA addition. In degenerating human IVD samples, immunohistochemistry for hyaluronidase showed that the expression of hyaluronidases including HYAL1, HYAL2, and CEMIP tended to increase in accordance with IVD. In particular, HYAL1 showed statistically significant differences.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板変性 ヒアルロン酸 慢性炎症 髄核

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省「国民生活基礎調査」によると、腰痛を自覚する日本人は推定 1000 万人であり、更に、腰痛に関与する疾患の一つとして挙げられる変形性腰椎症においては、日本で 3800 万人にのぼるといわれている。超高齢化社会の到来により、これらの疾患患者の割合は更に増加し、国民の社会経済的負担は更に大きくなることが予想されるが、これらの変性疾患に対する評価と治療に関して、最近の 10 - 20 年において大きな変化はない。

これらの腰椎変性疾患の原因の一つに椎間板変性が挙げられるが、現在のところ、椎間板変性を抑制する有効な治療法は確立されていない。椎間板は脊椎に存在し、脊柱の可動性や体重の支持性を担う重要な組織であり、血管を有しておらず、人体最大の無血管組織と言われている。椎間板は外側の線維輪と内側の髄核により構成されており、共に軟骨性組織に分類されるが、発生はそれぞれ異なり、特に髄核は胎生期の脊索から分化することが知られている。

我々はその変性の進行に酸化ストレスや小胞体ストレス、特に Unfolded Protein Response の一つである Perk 経路が関与していることを見出した(Suzuki S, et al. Arthritis Res Ther. 2015, Fujii T, et al. J Orthop Res. under revision)。更に炎症性サイトカインの一つである IL-6 と、その下流の STAT3 シグナルも変性に関与していることを報告し(Suzuki S, et al. Spine. 2017)、これらを標的とする薬剤を椎間板変性に対する新規治療薬として特許出願した。特に酸化ストレスにおいては、抗酸化剤 N-acetyl cysteine (NAC)を椎間板変性治療薬として、当院で臨床研究として開始される予定ではあるが、臨床的に椎間板変性を抑止するに当たり、これらの治療薬だけでは不十分である事が予想され、異なる観点からの繊維輪における変性メカニズムの解明が必要である。

2. 研究の目的

我々は椎間板、特に繊維輪における変性の進行に酸化ストレスや IL-6/STAT3 が関与していることを報告したが (Suzuki S, et al. Arthritis Res Ther. 2015, Suzuki S, et al. Spine. 2017)、変性のメカニズムは多様であり、異なる観点からの繊維輪における変性メカニズムの解明が必要であった。軟骨組織においてはヒアルロン酸が豊富に含まれ、これらの枯渇が軟骨組織の変性に関与していることが知られている。本邦では、臨床上也変形性膝関節症患者へのヒアルロン酸注射が有効であることも示されているが、渉猟し得た限り、椎間板におけるヒアルロン酸代謝の報告はない。CD44 や二つの hyaluronidases (HYAL1 と HYAL2) の他に、最近、Hyaluronan-binding Protein Involved in HA Depolymerization (HYBID) が皮膚や関節における滑膜において、ヒアルロン酸代謝に関与していることが報告されている (Yoshida H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)。本研究では椎間板、特に繊維輪の変性における HYBID の発現及び機能解析を HYAL1 と HYAL2 と共に *in vitro* にて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

培養実験では、椎間板髄核様細胞株 U-CH1-N と、術中の椎間板組織から抽出したヒト椎間板細胞を用いた。変性惹起刺激として TNF- α (50ng/ml) を添加した。HA の機能を評価するため、HA (1.0mg/ml) を直接培養液に添加し、阻害実験としては HA 分解能を持つヒアルロニダーゼ (0.1%) を添加し、TNF- α 、IL6、ADAMTS4、ADAMTS5、COX2 の mRNA およびタンパク発現を評価した。その下流シグナルに対しては Western blot を用いて p38、Erk1/2、JNK、p65 のリン酸化を評価した。

4. 研究成果

U-CH1-N とヒト椎間板細胞において、TNF- α 刺激によって、TNF- α 自体と COX-2 の mRNA およびタンパクレベルで発現が有意に上昇したが、HA を添加することによって、その発現上昇は有意に抑制された。一方、ヒアルロニダーゼの添加により、TNF- α と COX-2 の mRNA およびタンパク発現が有意に上昇した。U-CH1-N において、ヒアルロニダーゼ添加により p38、Erk1/2、p65 のリン酸化が認められ、また TNF- α 刺激による p38、Erk1/2 のリン酸化は、HA 添加により抑制された。次に、ヒト変性椎間板におけるヒアルロン酸分解酵素 (HYAL1、HYAL2、CEMIP) の発現推移につき、免疫染色によって検討した。術中に採取した変性椎間板組織を用い、変性の程度は術前画像検査に基づく Pfirrmann 分類で評価したところ、いずれのヒアルロン酸分解酵素も椎間板変性の進行に伴って発現が増加し、特に HYAL1 において、その発現量に有意差を認めた。*In vitro* においても、U-CH1-N とヒト椎間板細胞に TNF- α 刺激を加えると、HYAL1 と CEMIP の mRNA およびタンパク発現が有意に上昇することを確認した。本研究結果より、ヒアルロン酸が p38 と Erk1/2 経路を制御することで、椎間板の炎症を抑制する可能性が示された。更に、HYAL1 の発現が椎間板変性の進行と相関していることも示された。以上より、HYAL1 が HA 代謝を介して、椎間板変性の治療標的分子となる可能性が

示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamamoto T, Suzuki S, Fujii T, Mima Y, Watanabe K, Matsumoto M, Nakamura M, Fujita N	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy of hyaluronic acid on intervertebral disc inflammation: An in vitro study using notochordal cell lines and human disc cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田 順之
2. 発表標題 腰部脊柱管狭窄症の基礎と臨床
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本竜也、鈴木悟士、藤井 武、美馬 雄一郎、渡辺航太、松本守雄、中村雅也、藤田順之
2. 発表標題 椎間板変性におけるヒアルロン酸代謝
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya Yamamoto, Satoshi Suzuki, Takeshi Fujii, Yuichiro Mima, Kota Watanabe, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Nobuyuki Fujita
2. 発表標題 Hyaluronic acid metabolism in intervertebral disc degeneration
3. 学会等名 ORS Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分 担 者	堀内 圭輔 (Horiuchi Keisuke) (30327564)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・整形外 科学・准教授 (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------