

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591733

研究課題名（和文） 椎間板細胞の再生を目指した細胞周期制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of cell cycle in nucleus pulposus cells for the treatment of intervertebral disc degeneration

研究代表者

須藤 英毅（SUDO HIDEKI）

北海道大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：30374367

研究成果の概要（和文）：椎間板障害に対する治療には従来から脊椎固定術や摘出術などの外科的治療が普及し一定の成果が確認できているが、その限界と代替医療の可能性に注目が集まっている。本研究では椎間板細胞を単離・継代し、血清非存在下における発現変動遺伝子の網羅的探索を行い、さらに得られた遺伝子群の発現を椎間板組織内で抑制させる機能解析を行った。その結果病理学およびMRIにて椎間板組織の変性を抑制されていることが確認され、細胞周期をコントロールすることで椎間板組織の変性を抑制しうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although the etiology of intervertebral disc degeneration is poorly understood, one possible approach for the treatment includes regulation of cell cycle in nucleus pulposus cells. We investigated the cell cycle effects of nucleus pulposus cells in intervertebral disc degeneration. Our findings indicate that regulation of cell cycle in intervertebral disc cells is effective in preventing intervertebral disc degeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：整形外科，脊椎外科，椎間板，細胞周期，再生医学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会における運動器の役割に注目が集まる中、体幹を支える中心ともいえる脊椎は運動器の重要な構成要素であり、関連した疾病としての椎間板障害はその代表疾患である。椎間板障害により惹起される症状の一つに腰痛があるが、一生涯に7割以上のひとが腰痛を自覚するとされ、病院受診の原疾患として腰痛症は最多といわれる。高齢者社

会の到来とともに腰痛は介護面、また自立した健康的な生活をおこなう上での大きな障害として認知され、骨粗鬆症とともに現代医学において社会的にも克服すべき重要なテーマである。

椎間板障害に対する治療には従来から脊椎固定術や摘出術などの外科的治療が普及し一定の成果が確認できているが、術後の新たな隣接椎間板障害の出現や機能障害の報

告が広く認知され、その限界と代替医療の可能性に注目が集まっている。椎間板障害の原因について、当研究者らはこれまで脊椎 instrumentation を使用した各種脊椎再建モデルによる生体力学試験を行い、これによって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を生体力学的見地から証明した。この成果を国際学会や評価の特に高い国際学術専門誌を通じて多く発表してきたが、さらに椎間板変性のメカニズムを分子生物学的側面から解明しようと着想に至り実験を開始した（科学研究費補助金若手研究 B。平成 17 年度～平成 19 年度。アポトーシス関連遺伝子を用いた椎間板組織の細胞周期・老化変性の制御機構の解明。研究費 3,800,000 円）。これまで、椎間板の変性変化には椎間板細胞のアポトーシスが関与している可能性があることが示唆されていたが、その詳細なメカニズムは依然不明であった。そこでアポトーシスにおいて直接的な役割を果たす遺伝子群と、椎間板細胞を用いた遺伝子導入実験を行い、椎間板細胞のアポトーシス誘導機構の解析とこれらが椎間板変性に及ぼすメカニズムについての検討を行った。その結果、椎間板細胞のアポトーシス抑制効果と椎間板細胞の遺伝子レベルでの変性制御の可能性を証明した。これら椎間板変性のメカニズムに対する分子生物学的考察を深め、椎間板細胞の細胞周期関連遺伝子をコントロールすることにより、椎間板組織の変性制御・再生を目指して研究をさらに発展させようと着想に至った。

2. 研究の目的

椎間板細胞は非増殖細胞である心筋細胞に似ており、終末分化した状態に近く、その細胞分裂能は低い。また角膜組織と同様に、中心部は無血管野で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もあるが、その詳細な細胞増殖・維持機構は依然不明である。本研究の目的は細胞周期関連遺伝子の発現・活性を調べ、その細胞周期制御機構と椎間板組織変性抑制効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

13 週令 SD ラットから椎間板細胞を単離・継代した後、血清存在、非存在下で培養した。血清飢餓開始 48 時間後に細胞を回収し、RNA を回収し、DNA マイクロアレイを使用して発現変動遺伝子の網羅的探索を行い、GO ontology 解析、KEGG pathway 頻度解析を行った。さらに統計学的に有意差のあった細胞周期関連遺伝子群に対して PCR アレイをし、再確認を行った。さらにこれら遺伝子群から short interfering RNA を作成し、ウサギ椎間板組織内に invivofectamine 併用下に in

vivo 導入して、組織学的評価と MRI による評価を行った。

4. 研究成果

(in vitro 試験) 血清飢餓により誘導される遺伝子群によるパスウェイ頻度解析の結果として Pathways in cancer などの pathway 群が有意に変化し、GO terms in the biological process として、Response to environmental stimulus, Regulation of physiological process, Inflammatory response, Response to nutrient levels, Regulation of metabolic process, Regulation of programmed cell death などが有意に発現上昇していた。さらに発現変動遺伝子として Cdkn1c などの細胞周期関連遺伝子群が同定された。

(in vivo 試験) 上記遺伝子群に対する siRNA-Alexa 555 を作成し、実験的に作成した椎間板穿刺変性モデル中のウサギ椎間板内へ導入した。48 時間後に蛍光染色を行うと、髄核内への導入が確認され、この蛍光標識は導入 8 週間まで観察された。また RT-PCR 及び Western blotting による knock-down を確認した。

組織学的には SNC siRNA 導入椎間板に比べ有意に変性の進行が抑制されており、MRI でも変性の進行が抑制されていた。以上の結果から椎体終板に骨硬化像がなく、椎体周囲からの拡散による椎間板細胞への栄養供給が維持されているような変性初期の段階で、細胞周期関連遺伝子をターゲットとした治療は今後有用な治療手段となりうることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Sudo H, et al. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration. Arthritis & Rheumatism. 査読有, Epub ahead of print, 2011.
2. Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Sudo H, et al. Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population. Journal of Orthopaedic Research. 査読有, Epub ahead of print, 2011.
3. Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Sudo H, et

- al. Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population. Journal of Orthopaedic Research. 査読有, Epub ahead of print, 2011.
4. Sudo H, et al. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression. Journal of Orthopaedic Research. 査読有, 28,2010, 1608-13
 5. Sudo H, et al. A wide spread echinococcosis of the spine. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 査読有, 81, 2010, 892
 6. Sudo H, et al. One-stage posterior instrumentation surgery for the treatment of osteoporotic vertebral collapse with neurological deficits. European Spine Journal. 査読有, 19, 2010, 907-15
 7. Hojo Y, Ito M, Abumi K, Kotani Y, Sudo H, et al. A late neurological complication following posterior correction surgery of severe cervical kyphosis. European Spine Journal. 査読有, Epub ahead of print, 2010
 8. Ito M, Abumi K, Kotani Y, Takahata M, Sudo H, Simultaneous double-rod rotation technique in posterior instrumentation surgery for correction of adolescent idiopathic scoliosis. Journal of Neurosurgery Spine. 査読有, 12, 2010, 293-300.
 9. Sudo H, et al. Spinal cord compression by ligamentum flavum hematoma in the thoracic spine. Spine. 査読有, 34, 2009, E942-4.
 10. Ito M, Sudo H, Abumi K, Kotani Y, Takahata M, Fujita M, Minami A. Minimally invasive surgical treatment for tuberculous spondylodiscitis. Minim Invasive Neurosurg. 査読有, 52, 2009, 250-3.
 11. 須藤英毅 他. 血液透析に伴う高度脊柱変形に対する外科的治療. 脊椎脊髄ジャーナル, 査読無, 22, 2009, 1042-48
 12. 須藤英毅 他. 強直性脊椎炎による脊椎後弯症の手術治療. 脊椎脊髄ジャーナル, 査読無, 22, 2009, 570-73
 13. 須藤英毅 他. 環軸椎回旋位固定. 脊椎脊髄ジャーナル, 査読無, 21, 2008, 1219-1222
 14. 須藤英毅 他. リウマチ性環軸椎亜脱臼に対する環椎外側塊スクリューの治療成績. 北海道整形災害外科学会誌. 査読有,

50, 2008, 88-91

[学会発表] (計 17 件)

1. 須藤英毅 他. 化膿性脊椎椎間板炎の鏡視下搔爬洗浄. 第 22 回腰痛シンポジウム. 2011 年 3 月 5 日, 東京国際フォーラム, 東京都
2. Sudo H et al. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration. 2011 annual meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, Feb 15-19-2011, San Diego Convention Center/ San Diego, CA, USA
3. Sudo H et al. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration. 2011 annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Jan 13-16-2011, Long Beach Convention Center/ Long Beach, CA, USA
4. Sudo H et al. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression. 2011 annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Jan 13-16-2011, Long Beach Convention Center/ Long Beach, CA, USA
5. 須藤英毅 他. 骨粗鬆症性椎体圧潰に対する手術療法—前方脊柱再建術と後方単独再建術の比較検討—. 第 19 回日本脊椎インストルメンテーション学会. 2010 年 10 月 29 日, 札幌プリンスホテル国際館パミール, 札幌市
6. 須藤英毅 他. Osteoporotic Spine の再建手術 Vertebroplasty と後方再建手術の併用. 第 14 回北大脊柱再建セミナー. 2010 年 7 月 23 日, 北大病院臨床大講堂, 札幌市
7. 須藤英毅 他. 環軸椎固定: 環椎外側塊スクリュー. 第 14 回北大脊柱再建セミナー. 2010 年 7 月 23 日, 北大病院臨床大講堂, 札幌市
8. 須藤英毅 他. 脊柱変形矯正の実際 胸椎・胸腰椎移行部の除圧と後弯矯正. 第 14 回北大脊柱再建セミナー. 2010 年 7 月 23 日, 北大病院臨床大講堂, 札幌市
9. 須藤英毅 他. Caspase 3 をターゲットとした椎間板組織に対する変性抑制効果. 第 119 回北海道整形災害外科学会. 2010 年 6 月 26 日, 北大学術交流会館, 札幌市
10. 須藤英毅 他. 骨粗鬆症性椎体骨折の最前線: 骨粗鬆症性椎体圧潰に対す

- る手術療法－前方脊柱再建術と後方単独再建術の比較検討－第119回北海道整形災害外科学会. 2010年6月26日, 北大学術交流会館, 札幌市
11. 須藤英毅 他. 骨粗鬆症性椎体圧潰に対する手術療法－前方脊柱再建術と後方単独再建術の比較検討－. 第83回日本整形外科学会学術総会. 2010年5月29日, 東京国際フォーラム, 東京都
 12. 須藤英毅 他. 骨粗鬆症性椎体圧潰に対する超高分子量ポリエチレンケーブルを併用した後方単独再建術の中期術後成績. 第82回日本整形外科学会学術総会. 2009年5月14-17日, 福岡サンパレルホテル, 福岡市
 13. 須藤英毅 他. 神経障害を伴う骨粗鬆症性椎体圧潰に対する後方単独脊柱再建術の術後成績. 第39回日本脊椎脊髄病学会. 2010年4月23日, 新阪急ホテル, 高知市
 14. 須藤英毅 他. 神経障害を伴う骨粗鬆症性椎体圧潰に対する後方単独脊柱再建術. 第117回北海道整形災害外科学会. 2009年6月27-28日, グランドパーク小樽, 小樽市
 15. 須藤英毅 他. アポトーシス関連遺伝子を用いた椎間板細胞の変性制御機構. 第117回北海道整形災害外科学会. 2009年6月27-28日, グランドパーク小樽, 小樽市
 16. 須藤英毅 他. アポトーシス関連遺伝子を用いた椎間板細胞の変性制御機構. 第38回日本脊椎脊髄病学会. 2009年4月23-25日, 神戸ポートピアホテル, 神戸市
 17. 須藤英毅 他. 環椎外側塊スクリューによる上位頸椎再建術の中・長期成績. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008年5月22-25日, 札幌プリンスホテル国際館パミール, 札幌市

[その他]

ホームページ等

http://www.hokudai.ac.jp/bureau/topics/press_release/110131_pr_med.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 英毅 (SUDO HIDEKI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：30374367

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし