

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591741

研究課題名（和文） 椎間板変性解明への分子生物学的アプローチと新しい治療法の確立

研究課題名（英文） Molecular biologic approach to elucidate intervertebral disc degeneration and establishment of new treatment

研究代表者

波呂 浩孝 (HARO HIROTAKA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10313264

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は椎間板変性の原因を解明し、これを利用した新たなサイトカイン治療の可能性を検討することである。

椎間板ヘルニアの炎症では(1)TNF- α ファミリーであるTWEAKがMMP-3とMCP-1を誘導し、そのシグナルがそれぞれC-JunおよびNF- κ Bを介すること、(2)TSLPがNF- κ Bを介してMCP-1を誘導し、M ϕ の浸潤に作用すること、(3)TNF- α がTNF- α 受容体Iを介してVEGFを誘導し、血管増生に作用することが、加齢により血管誘導が低下すること、(4)TNF- α とTWEAKによるMMP-3とMCP-1誘導は加齢性に誘導能が減少すること、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Life time occurrence of low back pain goes up to 60-80%, and the most common complaint at outpatient clinic in Japan is LBP. The major cause of LBP is disc degeneration, that is acted by various kinds of cytokines and enzymes. The purpose of the current study is to explain the cause of the disc degenerations, moreover to examine the possibility of new cytokine treatment. The following below are our new findings conducted by the current study in the inflammation of herniated disc. (1) TWEAK, that is the TNF- α family, must induce MMP-3 and MCP-1 through C-Jun or NF- κ B signal pathway respectively. (2) TSLP must induce MCP-1 through NF- κ B signal pathway, resulting in M ϕ infiltration. (3) TNF- α must induce VEGF with TNF- α receptor I, resulting in neovascularization. However this phenomenon is decreased by aging. (4) The induction of MMP-3 and MCP-1 induced by TNF- α and TWEAK. However this induction is decreased by aging. I would like to continue investigation of this precise mechanism, moreover to achieve the establishment of new cytokine treatment in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：TWEAK, MMP-3, MCP-1

1. 研究開始当初の背景

我々は腰椎椎間板ヘルニア保存治療例を対象にMRI検査を施行して、経時的に脊柱管へ脱出したヘルニア塊が減少する自然退縮機序が認められることを報告した。また、椎間板の分解にはサイトカインであるTNF- α やTWEAKが炎症を惹起し、分解酵素であるMMPを誘導してヘルニア塊が退縮することが明らかになった。

2. 研究の目的

椎間板ヘルニアの原因となる椎間板変性のメカニズムを解明し、これに作用している炎症性サイトカイン、血管新生因子、分解酵素を同定し、腰痛に対する新たなサイトカイン治療の可能性を体系化することである。

3. 研究の方法

(1) マウス

野生型 (C57BL6), TNF- α レセプターI型欠損、TNF- α レセプターII型欠損マウスを用いる。加齢性変化を検討するために、マウス週令は4, 8, 12, 16週を用いる。

(2) 椎間板器官培養

マウス尾椎から軟部組織を取り除いた後に顕微鏡下で椎間板組織を採取する。その後、椎間板と赤色蛍光色素でラベルしたマクロファージと共培養する。この共培養中にrm TNF- α また、TWEAK また、各種NF-kappaB, MAPK 阻害剤を加えて培養する。

(3) ELISA 法

培養2日から6日目の培養液を回収して、培養液中の総タンパク量を計測する。その後それぞれのサンプルから同量のタンパクを用いてR&D社のマウスVEGF ELISAキットを用いてVEGFの発現を検討する。

(4) Angiogenesis assay

各種培養液を使用し、Fibrin Gel in Vitro Angiogenesis assay kit (Chemicon社)により、血管新生を検討する。

4. 研究成果

(1) TNF- α ファミリーであるTWEAKは椎間板細胞に作用しc-Jun N-terminal kinaseを介してMMP-3を誘導し、椎間板変性を誘引していた。また、TWEAKはNF-kappaB経路を介してマクロファージ走化性サイトカインであるMCP-1を誘導した。

(2) これまで気管支喘息などの好酸球の粘膜内浸潤に関与すると報告されていたThymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)が椎間板細胞に発現し、炎症性サイトカインTNF- α などの刺激で発現が促進し、TSLPはautocrineでマクロファージ遊走サイトカインであるMCP-1をNF-kappaB経路を介して誘導することを明らかにした。TSLPとその受容体は11の椎間板ヘルニア手術検体での発現も確認された。よって、TSLPが椎間板ヘルニアの自然退縮機序に関与していることが強く示唆された。

(3) 椎間板ヘルニアの自然退縮には新生血管の増生とマクロファージの浸潤がみられる。これまでの現象に血管新生因子であるVEGFが作用していることを明らかにした。今回この経路について詳細に調査を行うと、TNF- α はTNFレセプターIを介し、NF-kappaB経路でVEGFを椎間板細胞から誘導していた。また、血管増生能は経年的に減少するため、退縮は加齢によって阻害される可能性が示唆された。

(4) TNF- α はTNFレセプターIを介し、NF-kappaB経路でVEGFを椎間板細胞から発現誘導していた。さらにVEGFの産生量は刺激するTNF- α の濃度・時間に依存していた。

(5) TNF- α 刺激によって誘導されるVEGFの産生量及びIn vitroのAssayで測定した血管増生能は実験マウスの経年的に減少した。

(6) TNF- α とTWEAK刺激下での培養上清中のMCP-1、MMP-3の産生量は、高齢マウス由来椎間板使用例ほど低下していた

(7) 椎間板組織内における MCP-1、MMP-3 の mRNA、タンパク発現量は高齢椎間板使用例ほど低下、免疫染色による発現細胞数でも同様の結果であった。

(8) MMP-3 欠損マウスを使用すると、高週齢マウスでもアグリカン、プロテオグリカンが維持され、変性の進行が抑制されていた。よって、椎間板ヘルニアの炎症過程において、VEGF、MCP-1、MMP-3 は加齢により誘導能が低下していくため、退縮過程も遅延することが予想された。

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 3 件)

①

Ohba T, Haro H, Ando T, Wako M, Suenaga F, Aso Y, Koyama K, Hamada Y, Nakao A. TNF- α induced NF- κ B signaling reversed age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues. J Orthop Res 27:229-235, 2009. 査読有

②

Wako M, Ohba T, Ando T, Arai Y, Koyama K, Hamada Y, Nakao A, Haro H. Mechanism of signal transduction in TWEAK-induced matrix degradation by MMP-3 upregulation in disc tissues. Spine 33:2489-2494, 2008. 査読有

③

Ohba T, Haro H, Ando T, Koyama K, Hatsushika K, Suenaga F, Ohnuma Y, Katoh R, Ogawa H, Hamada Y, Nakao A. A potential role of TSLP in the recruitment of macrophages to mouse intervertebral disc cells via MCP-1 induction. Arthritis Res 58:3510-3519, 2008. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

①藤田康稚、安藤隆、大場哲郎、波呂浩孝 Age-related sequences of MCP-1 and MMP-3 expression in degeneration of mouse intervertebral disc. Annual meeting of Orthopaedic Research Society (Long Beach, CA, USA) 2011年1月13-16日

②藤田康稚、安藤隆、大場哲郎、波呂浩孝 炎症による椎間板性腰痛における加齢の影響 第18回日本腰痛学会(札幌)2010年10月30日

③藤田康稚、大場哲郎、安藤隆、若生政憲、中尾篤人、波呂浩孝 ヘルニア塊の退縮に対する加齢の影響について 第25回日本整形外科学会基礎学術集会(京都)2010年10月15日

④藤田康稚、安藤隆、大場哲郎、若生政憲、加藤良平、中尾篤人、波呂浩孝 椎間板細胞における炎症性反応の加齢による変化 第29回日本運動器移植・再生医学研究会(京都)2010年9月25日

⑤大場哲郎、若生政憲、小山賢介、藤田康稚、波呂浩孝 TSLPは、腰椎椎間板ヘルニアの自然退縮機序において、ヘルニア塊へのマクロファージの浸潤に作用している 第24回日本整形外科学会基礎学術集会(横浜)2009年11月6日

⑥大場哲郎、波呂浩孝、安藤隆、若生政憲、中尾篤人、浜田良機 椎間板由来のサイトカイン産生における TNF- α のシグナル伝達経路の解析 第22回日本整形外科学会基礎学術集会(浜松)2007年10月26日

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波呂 浩孝 (HARO HIROTAKA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10313264

(2) 研究分担者

中尾 篤人 (NAKAO ATSUSHITO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80317445

(H22:連携研究者)

濱田 良機 (HAMADA YOSHIKI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：80096544

(3) 連携研究者

竹田 秀 (TEKADA SHU)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・COE
拠点形成特別研究員 (特任准教授)
研究者番号：30376727

原 康 (HARA YASUSHI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教授
研究者番号：00228628