

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791030  
 研究課題名（和文）プロアテーゼ活性化受容体を標的とした椎間板変性に対する治療法の開発

研究課題名（英文） Therapeutic development of intervertebral disc degeneration targeting proteinase-activated receptor

研究代表者  
 明田 浩司 (AKEDA KOJI)  
 三重大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：20422826

研究成果の概要（和文）：

Proteinase-activated receptor-2 (以下 PAR-2) がラットおよびヒト椎間板細胞において発現していることが示され、PAR-2 活性化シグナルは椎間板細胞の炎症性サイトカインやその刺激下に蛋白分解酵素の発現を増強させることが判明した。またヒト椎間板組織における PAR-2 発現細胞数は、変性初期群と比較し変性進行期群において有意に増加していた。PAR-2 シグナルはサイトカインネットワークと連携しながら、椎間板変性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The results of this study show that intervertebral disc (IVD) cells express PAR-2. The expression of PAR-2 is regulated by IL-18 stimulation. PAR-2 activation accelerates the expression of matrix degrading enzymes. PAR-2 may play an important role in the cytokine-mediated catabolic cascade and consequently may be involved in IVD degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：椎間板バイオロジー、再生医療、生体材料

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：椎間板、サイトカイン、蛋白分解酵素、細胞外基質、椎間板変性

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛の生涯罹患率は日本国民の 7 割以上と報告され、若中年層の QOL を低下させる原因の第一位に挙げられている。また、腰痛は日常生活動作 (ADL) を障害する大きな問題であるとともに、若年者での罹患率が高いことから、社会的かつ経済的にも大

きな影響力を及ぼす。

腰痛の発生原因についてはいまだ不明な点が多いが、近年、椎間板変性はその病態に大きく関与していることが明らかになってきた。脊椎前方支持組織である椎間板が変性に陥ると、隣接椎体間の不安定性を引き起こし、腰痛、さらには下肢痛をき

たす脊椎変性疾患の原因となる。従って、現在、椎間板変性に対する治療法の開発が注目視されており、世界的な規模で研究が行われている。椎間板は、力学的、生化学的に異なる特徴を有する外層の線維輪とその内部の髄核の二つの組織からなり、各組織の生化学的特性が組織生体力学的特徴に深く関与している。線維輪組織は主にI型コラーゲンに富み、捻り（引っ張り）張力に寄与しており、髄核組織は巨大プロテオグリカンに富む組織からなり、水分を保持することにより組織の弾力性に寄与している。椎間板変性は、年齢、機械的ストレス、遺伝性、栄養などのいろいろな原因によって生じると考えられているが、生化学的变化からみると、椎間板組織における細胞外基質（主に巨大プロテオグリカンおよびII型コラーゲン）の産生と分解（新陳代謝）のバランスが崩壊し、細胞外基質が進行的に崩壊していく病態である。したがって、分解が優位な状態にあると考えられる椎間板変性の進行に対して、これらの炎症性サイトカインの刺激を抑制することは、椎間板基質の崩壊を抑制しうる画期的な治療戦略となると考える。

## 2. 研究の目的

Proteinase-activated receptors (以下 PARs) は、G 蛋白共役 7 回膜貫通型受容体のスーパーファミリーに属しており、これまでに PAR-1 から PAR-4 の 4 つがクローニングされている。その中で、PAR-2 は炎症の発現進行過程において深く関与しており、特定のセリンプロテアーゼによって特異的に活性化される。PAR-2 は生体内に広く分布しており、その酵素的活性化は NF $\kappa$ B 経路を活性化し、さらには炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- $\alpha$ ) や蛋白分解酵素の誘導を惹起することが示されており、数々の炎症過程をはじめとした生理学的、病態生理学的役割を担っている。したがって、新しい治療ターゲット分子として注目されており、近年、PAR-2 のアゴニスト、アンタゴニストが開発され、臨床応用に向けてさらなる研究が進められている。

そこで、われわれは、PAR-2 が椎間板細胞に発現して、サイトカインネットワークの一端を担い、椎間板の基質代謝に影響を与え、椎間板変性の発症に関与していると仮説した。

この仮説に対し、われわれは、ラット椎間板細胞の培養系を確立させ、免疫組織学およびウェスタンブロット法にて、ラット椎間板細胞に PAR2 蛋白が発現していることを証明した。また、PAR-2 の発現自体が、炎症性サイトカインの一つである、IL-1 によって増強することも判明した。

本研究の目的は、椎間板における PAR-2 の機能を解明することである。さらにヒト椎間板組織を用いて、椎間板変性と PAR-2 の発現の関連性を検討することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず、ラット椎間板細胞における PAR-2 の機能解析を行う。*In vitro* における PAR-2 アゴニストの椎間板細胞の基質代謝への影響を調べる。次に、ラットを用いた *in vivo* の研究に移行する。ラット椎間板内に PAR-2 アゴニストを注入し、椎間板変性の進行を検討する。さらに、椎間板変性度（初期、進行期）の異なるヒト椎間板組織を用いて、PAR-2 の発現と椎間板変性度の関連性を検討する。

### *In vitro* における PAR-2 アゴニストの椎間板細胞基質代謝への影響

PRA-2 アゴニストを用いて、PAR-2 を選択的に活性化することにより、椎間板細胞の基質代謝の影響を検討する。12 週齢の SD ラットの腰椎より椎間板組織を採取し、線維輪細胞を分離し単層培養を行った。7 日間の初代培養後に PAR-2 アゴニスト:

2-Furoyl-LIGRLO-amide (Peptides

International 社:0.1, 1 $\mu$ M) を IL-1 $\beta$  (1 ng/ $\mu$ l) の存在、非存在下で 24 時間培養した。細胞増殖活性を MTS 法にて評価し、培養液中に分泌された IL-1 $\beta$  を Western blot で定量化した。椎間板細胞における蛋白分解酵素

(MMP-3,-13, ADAMTS-4) の発現を Real time PCR で検討した。

### ヒト椎間板組織における PAR-2 の発現

ヒト椎間板組織は屍体腰椎より 10 検体 (12 椎間板)、脊椎手術より 7 検体 (7 椎間板) を採取し合計 19 椎間板を本研究に用いた。平均年齢は 64.2 歳、椎間板変性度 (MRI Thompon grade) は平均 3.1 であった。ヒト椎間板における PAR-2 蛋白の発現を免疫組織学および Western blot にて検討した。MRI 画像より変性初期群と変性進行期群の 2 群に分け、PAR-2 陽性細胞の分布を免疫組織学的に比較検討した。また PAR-2 陽性細胞を強陽性群、陽性群の 2 群に分け PAR-2 陽性細胞数の比率を算出した。

### 椎間板内 PAR-2 アゴニスト注入による椎間板変性度の検討

X 線透視撮影装置を用いて、ラット椎間板に後側方背部より経皮的に造影剤 (オムニパーク 240) を注入すること試み、経皮的椎間板内穿刺手技を確立した。PAR-2 アゴニスト (2-Furoyl-LIGRLO-NH<sub>2</sub>; 1 or 100  $\mu$ g)

をラット椎間板内に注入し、椎間板変性の進行を X 線像および組織学的に評価した。コントロール群にはペプチドコントロールおよび PBS を注入した。8 週間にわたり X 線像にて椎間高の推移を観察した。

#### 4. 研究成果

##### In vitroにおける PAR-2 アゴニストの椎間板細胞基質代謝への影響

PAR-2 アゴニスト投与 (0.1, 1 μM) により、細胞増殖活性に有意な変化を生じなかったが、培養液中の IL-1β 量は濃度依存的に増加した。PAR-2 アゴニスト単独投与により、ADAMTS-4 の mRNA 発現は上昇したが、MMP-3, 13 の発現は有意な上昇を示さなかった。ところが、これらの蛋白分解酵素の発現は、IL-1β 存在下に PAR2 アゴニスト (1 μM) を加えることにより、IL-1β 単独刺激に比べ、著しい増加が誘導された (% 増加量 [IL-1]: MMP-3; +74.8%, MMP-13; +226.9%, ADAMTS-4; +383.0%) (図 1)。これらの研究結果より、PAR-2 シグナルは炎症性サイトカインである IL-1β の産生を刺激することが示された。また、IL-1β 刺激下における PAR2 シグナルの活性化は蛋白分解酵素の発現を著しく増強させることが示された。PAR2 の活性化が椎間板変性の進行に関わるサイトカインネットワークのシグナルを促進する可能性が考えられた。

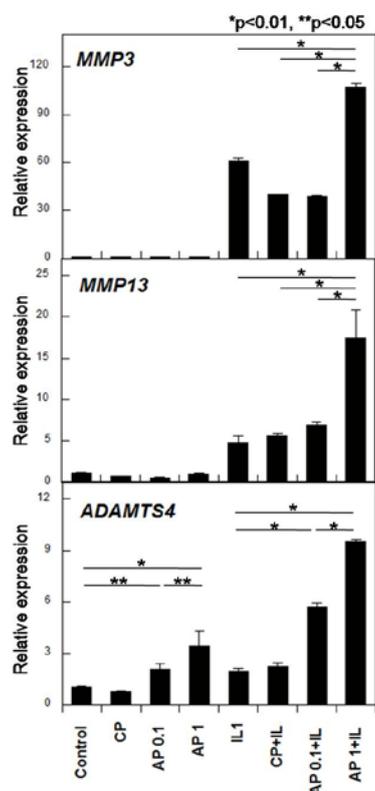


図 1. 蛋白分解酵素の mRNA 発現

ヒト椎間板組織における PAR-2 の発現  
免疫染色の結果、ヒト椎間板細胞の細胞膜および細胞質に顆粒状の PAR-2 の発現を認めた。Western blot にて PAR-2 蛋白の存在を確認した。PAR-2 陽性細胞は髄核および線維輪に認め、その割合は線維輪では変性初期群 8.8% に対して変性進行期群で 32.5% と有意に上昇していた。髄核では変性初期群 19.5% に対して変性進行期群 30.6% と上昇していたが統計学的な有意差を認めなかった。PAR-2 強陽性細胞の割合は線維輪において有意に上昇していたが髄核では有意差を認めなかった。これらの研究結果より PAR-2 蛋白がヒト椎間板細胞および組織に発現していることを確認した。ヒト椎間板組織における PAR-2 陽性細胞数の割合は、線維輪において変性初期群と比較し変性進行期群において有意に増加していた。したがって PAR-2 の発現が椎間板変性に関与している可能性が示唆された。

##### 椎間板内 PAR-2 アゴニスト注入による椎間板変性度の検討

PBS およびペプチドコントロール投与群では、実験期間中、椎間板高に変化を認めず、著しい狭小化を認めなかった。また PAR-2 アゴニスト単独投与による明かな椎間板高の狭小化は認めず、コントロール群との間に明かな差を認めなかった。組織学的評価でも同様の結果を得た。

PAR-2 分子は椎間板細胞に存在し、ヒト変性椎間板においてその発現が増強していることが判明したが、PAR-2 分子の活性化のみでは、椎間板の構造上の変化を引き起こさない可能性が考えられた。PAR-2 シグナルはサイトカインネットワークと連携

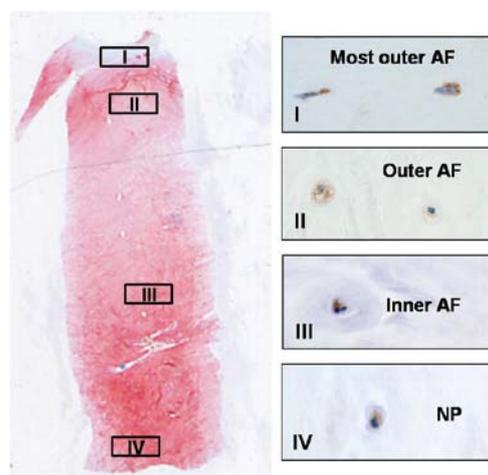


図 2. ヒト椎間板組織における PAR2 の発現

しながら、椎間板内に蛋白分解酵素の発現を増強させることにより椎間板変性の進行に関与していることが考えられた。

#### 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 1 件)

- ① Iida, R., Akeda, K., Kasai, Y., Masuda, K., Morimoto, R., Sakakibara, T., Sato, M., Uchida, A., 2009. Expression of proteinase-activated receptor-2 in the intervertebral disc. Spine (Phila Pa 1976) 34, 4 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 55nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (February 22-25, 2009, Las Vegas), FUNCTIONAL ANALYSES OF PROTEINASE-ACTIVATED RECEPTOR 2 BY RAT INTERVERTEBRAL DISC CELLS; Iida R, Akeda K, Kasai Y, Masuda K, Morimoto R, Iino T, Uchida A
- ② 第 23 回日本整形外科基礎学術集会 平成 20 年 10 月 23-24 日 浜松市 ラット椎間板細胞における proteinase-activated receptor-2 の機能解析: 飯田竜、明田浩司、笠井裕一、舩田浩一、内田淳正
- ③ 第 27 回日本運動器移植・再生医学研究会 平成 20 年 9 月 27 日 岐阜市 椎間板における Proteinase-activated receptor 2 の発現と機能: 飯田竜 明田浩司、笠井裕一、舩田浩一、森本亮、内田淳正
- ④ 第 37 回日本脊椎脊髄病学会 平成 20 年 4 月 24-26 日 東京 ヒト椎間板における Protease-Activated Receptor 2 の発現－椎間板変性との関連性－ 明田 浩司、飯田 竜、笠井 裕一、舩田 浩一、塩川 靖夫、近藤 哲士、榊原 紀彦、佐藤 昌良、内田 淳正
- ⑤ 54nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (March 2-5, 2008, San Francisco) Expression of Proteinase-Activated Receptor 2 on the Human Intervertebral Disc; Ryu Iida, Koji Akeda, Yuichi Kasai, Koichi Masuda, Yasuo Shiokawa, Toshihiko Sakakibara, Masayoshi Sato, Takahiro Iino, Atsumasa Uchida

- ⑥ The inaugural meeting of the World Forum for Spine Research January 23-25, 2008, Kyoto, EXPRESSION OF PROTEINASE-ACTIVATED RECEPTOR 2 ON THE HUMAN INTERVERTEBRAL DISC; Ryu Iida; Koji Akeda ; Yuichi Kasai; Koichi Masuda; Yasuo Shiokawa; Toshihiko Sakakibara; Masayoshi Sato; Takahiro Iino; Atsumasa Uchida

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

明田 浩司 (AKEDA KOJI)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20422826

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：