

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592150

研究課題名(和文) 生体力学的環境変化により生じる椎間板細胞・組織の変性制御に関する統合的研究

研究課題名(英文) Caspase 3 Silencing Inhibits Biomechanical Overload-induced Intervertebral Disc Degeneration

研究代表者

須藤 英毅 (SUDO, HIDEKI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：30374367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性には椎間板への過度の生体力学的応力集中が関与しているとの報告がある。一方、椎間板細胞のアポトーシスが椎間板組織の変性に關与しているとの報告もあり、今回これら生体力学的、分子生物学的側面から両者を統合したアプローチにより椎間板組織に対する変性抑制効果を検討した。その結果、椎間板細胞のアポトーシスを制御することにより、生体力学的荷重負荷を起因とした椎間板の組織変性を抑制することができた。生体力学的環境変化における椎間板変性に対しても今後有用な治療手段となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intervertebral disc (IVD) degeneration causes debilitating low back pain in large sections of the worldwide population. No efficient treatment currently exists because the unclear pathogenesis. One characteristic event early in the degeneration is the apoptosis of nucleus pulposus (NP) cells embedded in IVD. Excessive biomechanical loading may be also a major etiology of IVD degeneration. The present study used in vitro and in vivo models of compressive loading to elucidate the underlying mechanism of IVD degeneration. In addition, we investigated whether the inhibition of apoptosis is a potential clinical therapeutic strategy for the treatment of IVD degeneration induced by biomechanical stress. The present study suggests that caspase 3 siRNA attenuates overload-induced IVD degeneration by inhibiting NP cell apoptosis and the expression of matrix-degrading enzymes.

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：アポトーシス 椎間板 変性制御

1. 研究開始当初の背景

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。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。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。

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。

このように生体力学的、分子生物学的各アプローチにより椎間板組織の変性メカニズムを解明してきたが、実際の臨床応用を目標として、両者を統合した多面的アプローチによる椎間板組織に対する変性制御・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といった特殊な組織でもあるが、同時に椎間板組織は脊柱の主要な構成要素でもあり、様々な荷重・運動に対して力学的に重要な機能を担っている。本研究では、動物実験モデルを用いて椎間板組織に生体力学的負荷を与え、本研究者がこれまでに実証した分子生物学的解析手法を用いてアポトーシス関連遺伝子の遺伝子導入、抑制実験を行うことによって、より生体内環境に近似した状態において椎間板組織の変性変化が制御可能か、明らかにしようとしている。

3. 研究の方法

思春期特異性側弯症患者から同意の元、術中採取した非変性椎間板組織より髓核細胞を単離継代し、アガロースゲルを用いて3次元培養した。自作の軸圧縮器を用いて小型圧センサーによるモニター下に細胞へ圧縮負

荷を与え、western blot と蛍光染色・TUNEL 染色による細胞生存率評価を行った。3次元培養細胞は圧縮負荷により活性型 caspase 3 の発現が増加し、生存率が有意に低下していた。さらにヒト caspase 3 遺伝子に対する caspase 3 siRNA を作成して髓核細胞に lipofectamine を用いて導入し、同様に3次元培養後に圧縮負荷を与え細胞生存率を評価すると、caspase 3 siRNA 導入細胞では siRNA 非導入群、scrambled negative control siRNA (control siRNA) 導入群に比べ、有意に細胞死が抑制されていた。また、圧縮負荷により細胞外基質分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP)-3, -13, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4, -5 発現が増加したが、caspase 3 siRNA 導入細胞ではこれらの変化が抑制されていた (in vitro 試験)。

次いで、in vivo 試験として caspase 3 siRNA 導入による生体力学的環境変化における椎間板変性抑制効果を検討した。3.5kg 雄日本白色家兎を用いて、自作の創外固定器により椎間板組織に圧迫負荷をかけ (150N)、圧迫開始 1 週間後に caspase 3 siRNA を in vivo lipofectamine とともに、X 線イメージ下に椎間板組織内へ導入した。コントロールとして非圧迫群 (sham 群)、control siRNA 導入群を設定した。siRNA 導入 8, 16 週後に椎間板組織を採取し、7T-MRI と組織学的評価を行ったところ、圧迫群では非圧迫群に比べ、経時的に椎間板の変性変化が進行した。また TUNEL, MMP-3 陽性細胞率が圧迫群で増加した。一方 caspase 3 siRNA 導入椎間板では、control siRNA 導入椎間板に比べ変性の進行が有意に抑制されており、TUNEL, MMP-3 陽性細胞率が減少していた。

4. 研究成果

本研究では、生体力学的環境変化に伴う椎間板組織変性のメカニズムを解析し、また内在性 caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することによる力学負荷に起因した椎間板変性抑制効果を検証するため、ヒト髓核細胞 3 次元培養モデルを用いた in vitro 試験と、ウサギ椎間板圧迫モデルを用いた in vivo 試験を行った。

In vitro 試験では、まずヒト髓核細胞をアガロースゲルで3次元培養を行い、静的な圧縮負荷を与えることで椎間板細胞への影響を解析した。圧縮負荷によりアポトーシス実行因子である活性型 caspase 3 の発現が増加し、髓核細胞アポトーシスが誘導された。また細胞外基質分解酵素 MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5 発現が増加し、TIMP-1, type collagen, aggrecan 発現が減少した。力学的負荷に起因する椎間板変性において、細胞外基質代謝に関わる MMP, ADAMTS, TIMP のバランスが重要であると報告されている。本研究では、圧縮負荷により細胞外マトリッ

クス分解に作用する MMP, ADAMTS 発現が増加し, MMP 阻害因子として働く TIMP 発現が低下し, さらに細胞外マトリックスの構成成分である type collagen, aggrecan の発現低下が誘導された. 力学的負荷により, 椎間板機能維持に重要な役割を持つ髄核細胞のアポトーシスが進行し, 細胞外基質分解酵素の発現が増加する異化作用が誘導された.

続いて, caspase 3 siRNA を髄核細胞へ導入し, 内在性 caspase 3 のノックダウンを行うと, 圧縮負荷による活性型 caspase 3 の発現は低下し髄核細胞アポトーシスは抑制された. また圧縮負荷による細胞外基質分解酵素の発現が抑制され, TIMP-1, type collagen, aggrecan 発現が増加した. Caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することで, 圧縮負荷に伴う髄核細胞アポトーシスの進行が抑制され, 細胞外基質同化作用が維持された. これらの所見より, 力学的負荷における椎間板変性には caspase を介した細胞外基質代謝の変化が関与しており, caspase 3 発現の制御が変性抑制に有効であることが示唆された.

In vivo 試験では, ウサギ椎間板圧迫モデルへ caspase 3 siRNA を導入することで, 生体力学的環境変化における椎間板変性抑制効果を検討した. 椎間板圧迫負荷により, 髄核細胞アポトーシスの増加を伴い, 経時的に椎間板変性が進行した. また圧迫椎間板で細胞外基質酵素 MMP-3 発現が増加した. 圧迫椎間板へ caspase 3 siRNA を局所導入することで, 髄核細胞のアポトーシスが減少し, MMP 発現の低下を伴い椎間板変性の進行が抑制された. これらの所見より, 生体力学的環境変化に起因する椎間板変性に対する caspase 3 siRNA の in vivo 変性抑制効果が示された.

以上の結果より, 髄核細胞の caspase 3 発現・アポトーシスを抑制することで, 力学的環境変化による椎間板の細胞外基質代謝変化を是正しうることが in vitro, in vivo それぞれの実験において初めて示された. これまで細胞外基質分解酵素とアポトーシスの関連性について指摘されており, MMP は tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) や Fas ligand といった death ligand とその受容体を介して, アポトーシスを誘導すると報告されている. また細胞内の MMP-3 がアポトーシスを引き起こすという報告がある. さらに, caspase 3 の活性化を介したアポトーシスにおいて, MMP 発現が増加することも報告されている. 本研究における所見は, 椎間板への過度な荷重負荷が caspase を介して細胞外基質分解酵素を発現させ, 椎間板組織の変性を引き起こしたことが示唆された.

また, caspase と細胞外基質代謝の関連性についても指摘されている. 細胞外マトリックスは, MMP, ADAMTS, TIMP らの細胞外基質代謝に関わる酵素発現により制御されており, TNF- α や interleukin-1 (IL-1) といった炎症性メディエーターは, 椎間板細胞にお

いて細胞外基質分解酵素 (MMP-3, MMP-13, ADAMTS-5) の発現を増加させる. また, caspase 3 はグリア細胞において TNF- α や IL-1 等の炎症性サイトカイン発現を誘導すると報告されており, caspase 3 がメディエーターを介して MMP 発現に関わることが考えられる. 本研究では, caspase 3 の活性化により細胞外基質代謝に影響がみられており, 椎間板変性におけるこれらの関連性が示唆された. 従って, 髄核細胞の caspase 3 を阻害しアポトーシスを制御することは, 力学的ストレスに起因する細胞外基質代謝異常を修正し椎間板組織変性の進行の抑制に有効であることが示唆された.

機械的刺激に対する生体組織の応答には, その刺激を伝達するメカノレセプターが関与することが考えられる. 本研究では, 圧縮負荷により integrin $\alpha 5 \beta 1$ の発現が増加した. integrin $\alpha 5 \beta 1$ は椎間板細胞において機械的刺激を受容および細胞内へ伝達するメカノレセプターとして確認されており, 本所見は髄核細胞への機械的刺激の伝達が反映されたものと考えられた. しかし, 椎間板細胞への機械的刺激が与える詳細なシグナル伝達や分子メカニズムは明らかにされておらず, 今後さらなる研究が必要と考えられる.

本研究の限界として, in vitro 髄核細胞 3 次元培養圧迫モデルが, 生体内の椎間板への荷重を完全には反映していないことが挙げられる. 椎間板は生体内で様々な力学的負荷を受けており, これらを in vitro モデルで模倣するには限界がある. 本研究では髄核細胞へ非生理的な負荷を与え, その影響を検証するために静的軸圧縮モデルを採用した. また in vivo 試験では創外固定器を用いて椎間板を圧迫したが, 行動に制限を設けないことでより生体内環境に近似したモデルと考えられる. もう一つの問題点として, in vivo モデルでの caspase 3 siRNA 効果の持続期間が, 本実験では明らかにされていないことが挙げられる. 先行実験では, ウサギ椎間板内に Alexa555 で標識した caspase 3 siRNA を局所導入し, 導入後 2 日で髄核細胞質内に取り込まれ, その後 4 週, 8 週まで髄核細胞質内に存在していたことを確認している. 10.4 週から 8 週にかけて, 細胞質内の siRNA 量に大きな変化はなく, 16 週においても残存していることが予想されるが, 今後 caspase 3 siRNA の効果持続期間を検討する必要がある.

本研究では, 力学的負荷により細胞外基質分解酵素の発現増加を伴い, 椎間板細胞のアポトーシスおよび椎間板組織変性が進行した. これらの変性変化は caspase 3 siRNA 導入により抑制することが可能であり, 内在性 caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することは, 力学的環境変化による椎間板変性に対して有用な治療手段となりうることが示唆された. また本研究による所見より, 生体力学的荷重負荷による椎間板組織変性には caspase

を介した細胞外基質代謝変化が重要であることが示された。髄核細胞アポトーシスを抑制することで椎間板組織変性の制御を試みる本手法は、早期の椎間板変性をターゲットとしており、脊椎固定術後の隣接椎間板障害の予防等への応用が考えられる。今後、本手法が新たな椎間板変性の治療戦略となりうるものと期待される。

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)

Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, Sasaki N, Higashi H, Kameda Y, Ito M, Takahata M, Abumi K, Minami A, Iwasaki N. Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disc degeneration. American Journal of Pathology. 査読有, 184,753-64, 2014

[学会発表](計 2件)

1. Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, Sasaki N, Higashi H, Kameda Y, Ito M, Takahata M, Abumi K, Minami A, Iwasaki N. Therapeutic potential of caspase 3 silencing for biomechanical overload-induced intervertebral disc degeneration. Orthopaedic Research Society. 2014 annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Mar 15-15-2014, Hyatt Regency New Orleans /New Orleans, LO, USA

2. 山田 勝久, 須藤 英毅, 岩崎 浩司, 伊東 学, 高畑 雅彦, 鏝 邦芳, 岩崎 倫政. 生体力学的荷重負荷に起因した椎間板変性に対する caspase 3 siRNA の変性抑制効果. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013 年 10 月 17 日, 幕張メッセ, 千葉市

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・特任准教授
研究者番号：30374367

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし