

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791562

研究課題名(和文)閉経後の椎間板変性機序解明に関する研究

研究課題名(英文)Mechanisms of intervertebral disc degeneration in postmenopausal women

研究代表者

細金 直文(Hosogane, Naobumi)

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・その他部局等・助教)

研究者番号：10365306

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)：閉経後の椎間板を卵巣摘出ラットで検討した結果、椎間板変性が促進されたものの、さらなる解析を行うには表現型はさほど強いものではなかった。そこで椎間板穿刺による変性モデルラットを用いて検討した結果、椎間板変性に酸化ストレスが関与していることが明らかになった。また変性椎間板ではTNF- $\alpha$ 、MMP-3、COX-2などの遺伝子発現が増加し、in vitroでもH2O2による酸化ストレス刺激によりこれら遺伝子発現の上昇がみられた。これら活性酸素による作用は抗酸化剤であるNAC(N-acetyl cysteine)でin vivo、in vitroともにrescueされることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Intervertebral disc (IVD) degeneration was accelerated in ovariectomy rats, although the phenotype was not obvious enough to perform further analysis. Therefore, IVD degeneration was induced by disc puncture with needle and revealed that oxidative stress was involved in the degeneration. mRNA expression of catabolic factors such as TNF- $\alpha$ , MMP-3, COX-2 were increased in degenerated IVD of punctured rats. In vitro study, oxidative stress induced with H2O2 upregulated the expressions of these catabolic factors. Finally, degeneration of IVD induced with oxidative stress was rescued with administration of antioxidant NAC (N-acetyl cysteine) both in vivo and in vitro analysis.

研究分野：脊椎

キーワード：椎間板 退行変性 活性酸素

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を最も早く迎えた日本では、その社会構造の特殊性から医療における疾患構造も特殊である。わが国の国民生活基礎調査の結果では(平成19年統計)男性の有訴者率第1位は腰痛であり、女性でも第2位と多くの国民が腰痛を訴えている。また脊椎の退行性変化を基盤とした疾患で腰痛の主要因となりうる変形性腰椎症は3800万人にもものぼると推定されている。

腰痛の原因となる退行変性疾患の一部である変性すべり症、変性側弯症など椎間板変性を基盤として生じる疾患は、他の軟骨変性に伴い生じる四肢変形性関節症と同様に高齢者女性に多いとされている。高齢女性に多く発症する原因のひとつとして閉経によるエストロゲン欠乏が関与すると考えられている。In vitroにおいてエストロゲンは軟骨細胞によるグリコサミノグリカンの産生を増加させる作用を有し、TNF- $\alpha$ やオンコスタチンMによるII型コラーゲン分解を抑制し、また活性酸素による誘導されるcyclooxygenase-2の発現を抑制することで軟骨を保護する作用があることなどが報告されている。これまでにわれわれはエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )欠損マウスにおいては椎体軟骨終板の軟骨細胞数や軟骨細胞層が減少し、またII型コラーゲンの発現もER $\alpha$ 欠損マウスでは減少していたことを明らかにした。In vitroでもluciferaseを用いたレポーターアッセイではER $\alpha$ がglucocorticoid receptor-interacting protein-1(GRIP1)と共同してエストロゲン応答配列(ERE)を介したII型コラーゲン遺伝子の発現を増強し、更にはTGF- $\beta$ /MKK6/p38MAPKのシグナル系とcrosstalkすることも明らかにしてきた。このように加齢やそれに伴うホルモンバランスの変化は椎間板変性に関与していると考えられ、その機序の一部を解明することは、今後更に増加していくであろうこれらの疾患の治療や予防の一助になる可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

人体の中で最も早期に始まるとされる椎間板の退行変性は、腰痛などを引き起こすことで多くの国民の生活の質を低下させ、健康寿命の維持や社会的生産性の維持を困難なものにしている。さらに変性すべり症や変性側弯症など椎間板変性を基盤とした高齢女性に多い疾患が進行すると侵襲の大きな外科治療を行わなくてはならなくなる。

そこでこれら加齢に伴う椎間板変性のメカニズムとして閉経によるエストロゲン欠乏の関与、またエストロゲンは軟骨細胞において活性酸素による変性を抑制すると知られていることから、これら活性酸素の椎間板変性への関与などを明らかにすることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)閉経によるエストロゲン欠乏が椎間板に与える影響を検討するため、8週齢Wistar系雌性ラットに卵巣摘出術を施行し8週後に椎間板サンプルを採取しMRI、遺伝子発現等を偽手術群と比較した。また卵巣摘出により骨密度が低下していることは大腿骨をDEXA法で調べることで確認した。

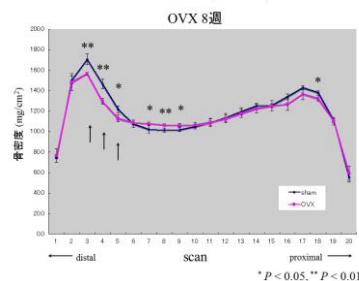
(2)椎間板変性を惹起させる方法として椎間板穿刺による変性モデルを使用した。8週齢Wistar系雌性ラットの尾椎に23G針を穿刺し1週後に椎間板組織からmRNAを採取し遺伝子発現を定量した。また変性に活性酸素が関与するか否かを酸化マーカーであるニトロチロシンの陽性細胞数で評価した。組織切片、MRI評価は穿刺後2か月で行った。

(3)8週齢雌性Wistarラットの腰椎および尾椎から線維輪細胞を分離培養し活性酸素の及ぼす影響を検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加により線維輪細胞に酸化ストレスを与え各種遺伝子発現の変化を定量した。また抗酸化剤であるNAC(N-acetyl cysteine)によりH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加による変化が中和されるか検討した。

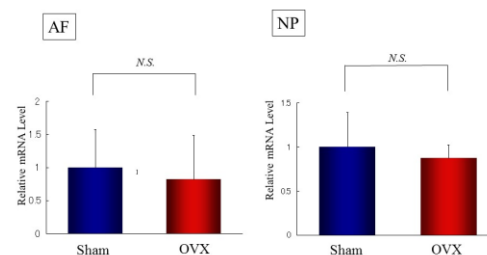
(4)椎間板穿刺による椎間板変性モデルラットに穿刺1週間前から穿刺2か月後までNACを経口投与し、酸化ストレスを介した椎間板変性がrescueされるか検討した。

### 4. 研究成果

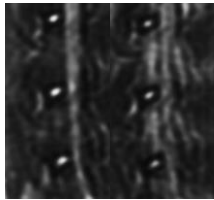
(1)卵巣摘出術8週後では偽手術群と比較してエストロゲン欠乏により大腿骨遠位部、近位部骨密度の有意な減少が見られた。



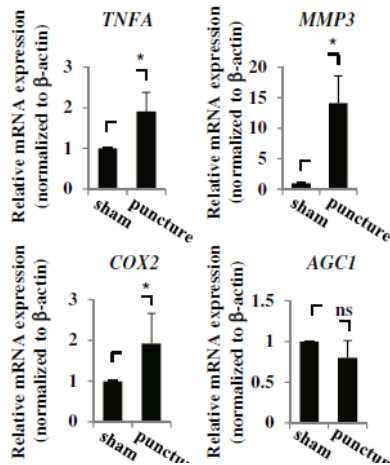
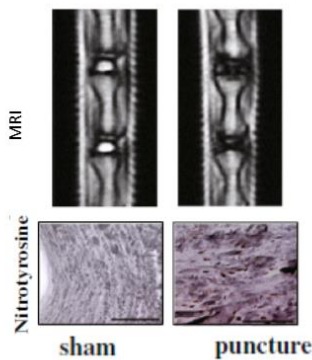
維輪細胞(AF)、髄核細胞(NP)におけるII型コラーゲンmRNA発現を定量した結果、卵巣摘出術群でわずかな低下を認めたものの有意な差には至らなかった。



卵巣摘出術後1年時のMRIではT2強調画像における髄核の輝度低下がみられる。

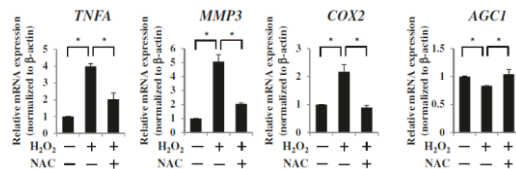


(2) エストロゲン欠乏は椎間板変性に関与する可能性が示唆されたものの、その表現型はさほど強くないと判断し、針穿刺による椎間板変性モデルを使用することとした。その結果、MRI において顕著な椎間板変性が惹起され、また穿刺群ではニトロチロシン抗体陽性細胞が増加していたことから酸化ストレスが変性に関与していることが示唆された。

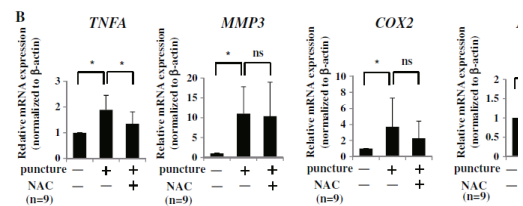
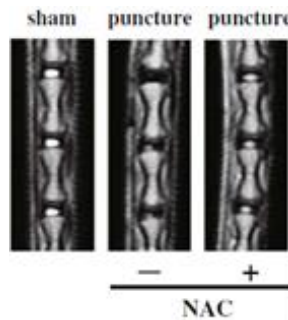
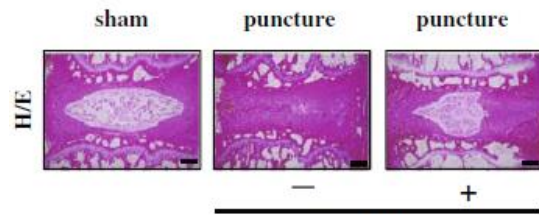


また穿刺椎間板では TNF  $\alpha$ 、MMP3、COX2 などの catabolic factor の遺伝子発現が上昇する一方でアグリカンの遺伝子発現が低下していることが明らかになった。

(3) In vitro の解析では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による酸化ストレスの catabolic factor やアグリカンの遺伝子発現に対する効果は抗酸化剤 NAC により中和されることが示された。



(4) 椎間板穿刺による変性モデルに対する NAC の効果を検証した。穿刺 1 週間からの NAC 投与により、組織像や MRI で評価した椎間板変性が rescue されており、in vitro と同様に遺伝子発現も中和されている。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tsuji T, Watanabe K, Hosogane N, Fujita N, Ishii K, Chiba K, Toyama Y, Nakamura M, Matsumoto M. Risk factors of radiological adjacent disc degeneration with lumbar interbody fusion for degenerative spondylolisthesis. J Orthop Sci. 2016 Mar;21(2):133-7. doi: 10.1016/j.jos.2015.12.007 (査読あり)
- ② Suzuki S, Fujita N, Hosogane N, Watanabe K, Ishii K, Toyama Y, Takubo K, Horiuchi K, Miyamoto T, Nakamura M, Matsumoto M. Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration. Arthritis Res Ther. 2015 Nov 5;17:316. doi: 10.1186/s13075-015-0834-8. (査読あり)
- ③ Hosogane N, Watanabe K, Yagi M, Kaneko S, Toyama Y, Matsumoto M. Scoliosis is a Risk Factor for Gastroesophageal Reflux Disease in Adult Spinal Deformity. J Spinal Disord Tech. 2015 Mar 18. (査読あり)

http://journals.lww.com/jspinaldisorders/Pages/default.aspx

④

[学会発表] (計 4 件)

- ① Suzuki S, Fujita N, Hosogane N, Watanabe R, Hikata T, Iwanami A, Watanabe K, Ishii K, Toyama Y, Takubo K, Horiuchi K, Miyamoto T, Nakamura M, Matsumoto M. Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration. 3rd Orthopaedic Research Society (ORS) 2015. 11. 11 Philadelphia
- ② Suzuki S, Fujita N, Hosogane N, Ishii K, Watanabe R, Hikata T, Takubo K, Watanabe K, Horiuchi K, Toyama Y, Miyamoto T, Matsumoto M. Reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration. 42nd International Society for the Study of the Lumbar Spine (ISSLS) 2015. 6. 8 San Francisco
- ③ S Suzuki, N Fujita, N Hosogane, K Ishii, R Watanabe, T Hikata, K Takubo, K Watanabe, K Horiuchi, Y Toyama, T Miyamoto, M Matsumoto. Reactive Oxygen Species Are Therapeutic Targets For Intervertebral Disc Degeneration. 2015 Annual Meeting of Orthopedic Research Society. 2015. 3. 28-31. Las Vegas
- ④ Hosogane N, Iwanami A, Watanabe K, Yagi M, Kaneko S, Tsuji T, Ishii K, Kono H, Nakamura M, Shiota M, Machida M, Saito M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Scoliosis is a risk factor for gastroesophageal reflux disease in adult spinal deformity. ISSLS 2013; 2013 5. 13-17; Scottsdale.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
細金 直文 (HOSOGANE, Naobumi)  
防衛医科大学校・病院・講師  
研究者番号：10365306