

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670651

研究課題名(和文)細胞周期関連遺伝子による椎間板恒常性維持制御機構の解明

研究課題名(英文)Maintenance of homeostasis for intervertebral disc by cell cycle-related genes

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)・准教授

研究者番号：30374367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板組織の中核を成す椎間板細胞の細胞増殖・維持機構は不明である。本研究では細胞周期関連遺伝子群の椎間板変性における機能解析を行った。すなわち、caspase 3とp27遺伝子に着目し、これらのKOマウスを作製した。また、その前段階として、野生型マウスを用いて再現性の高い椎間板変性モデルの作製を行った。この独自に作製したマウス椎間板変性モデルを用いて野生型マウスとcaspase 3KOマウスとの比較では、初期にcaspase 3KOマウスで変性の抑制がみられ、p27KOマウスにおいても同様の結果が得られた。この結果から、これら細胞周期関連遺伝子群を対象として椎間板変性制御の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Although human intervertebral disc (IVD) degeneration can cause several spinal diseases, its pathogenesis remains unclear. This study aimed to create a highly reproducible in vivo mouse IVD degeneration model. One hundred six mice were operated and L4/5 IVD was stabbed with a 35 or 33-gauge needle. Micro-computed tomography scanning was performed, and the stabbed region was confirmed. Evaluation was by magnetic resonance imaging (MRI) and histology using our classification scoring system. In IVDs stabbed with either needle, significant degeneration occurred relative to the control. Our histological classification scores correlated well with MRI findings and could detect degenerative progression, irrespective of the stabbed region. In this study, a highly reproducible in vivo mouse IVD degeneration model was created with precise information about surgical techniques.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板変性 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

国際社会の先駆けとなる健康長寿社会の実現に向け運動器の役割に注目が集まる中、体幹を支える脊椎は重要な構成要素であり、その関連疾病として椎間板障害が挙げられる。

惹起される症状・疾患には腰痛や椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症、脊柱変形などがあり、特に腰痛は一生に7割以上のひとが自覚するとされ、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大きな障害として認知され、社会的にも克服すべき重要なテーマである。

治療には脊椎固定術などの外科治療が普及しているが、病因に対する直接的なアプローチとはいえない。そこで、申請者はこれまでに生体力学的 (Sudo et al. J Neurosurg 2003, J Neurosurg Spine 2005)、分子生物学的 (Sudo et al. J Orthop Res 2010, Arthritis Rheum 2011, PLoS ONE 2013, Yamada, Sudo et al. Am J Pathol, 2014) 解析手法を用いて椎間板組織の変性変化の病態解析と変性制御について多方面から検討してきた。

2. 研究の目的

椎間板組織の中核を成す椎間板細胞は、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増殖能は低い。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り、その細胞増殖・維持機構は不明である。

申請者らはまず、栄養飢餓により惹起される椎間板細胞の変性変化に関与する遺伝子群をマイクロアレイにより網羅的に探索した。その結果、細胞周期関連遺伝子の DNA damage checkpoint に属する遺伝子群に有意な変動がみられ、今後のさらなる病態解析の標的となり得ることが示唆された (Sudo et al. PLoS ONE 2013)。

本研究ではさらに、これら細胞周期関連遺伝子群の椎間板変性における機能解析を進めることを目的とした。脊柱の構成要素である椎間板は、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、主として加齢とともに失われていくこれら力学的支持機構を、細胞への栄養供給と細胞周期維持機構という分子生物学的側面から明らかにする。

3. 研究の方法

(1)

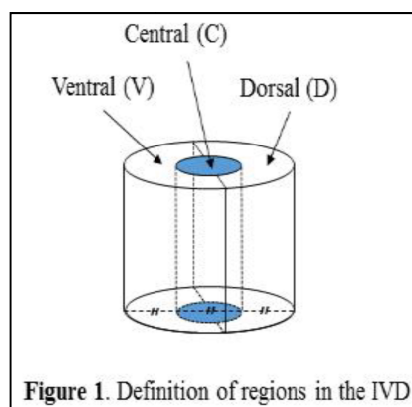
ヒト椎間板細胞を単離・継代、3次元培養したのち血清飢餓を開始し、これまでの研究結果から明らかとなったターゲット遺伝子である caspase 3 と p27Kip1 遺伝子の発現を経時的 (0, 6, 48, 72 時間) にウエスタンブロッティングによるタンパク質レベルでの

発現解析を行った。

(2)

次いでマウスを用いた in vivo 実験を行うことにした。しかし、これまでにマウスを対象とした適切な椎間板変性モデルとその病理学的評価法がなかったため、まずは野生型 (WT) マウスを用いて変性モデルの作製を試みた。

11 週齢 WT C57BL/6 マウス 106 匹を対象とし、33 あるいは 35 ゲージ (G) 針を使用して L4/5 椎間板を側面から穿刺貫通させ、 μ CT MPR 画像により貫通部位を 3 次元的に確認した。貫通部位は、椎間板中央軸位における椎間板短径を 3 分割し、中心領域と外側領域を同心楕円状に分けた。さらに外側領域は腹側・背側領域に 2 分割した (下図)。



術後 1, 2, 4, 8, 12 週 (n = 10) に安楽死させ MRI 正中矢状断 T2 強調画像を撮影後、病理組織標本作成した。MRI は Pfirrmann grade, MRI index (signal intensity x area) を測定し、病理組織学的評価には Nishimura らの分類, Masuda らの分類と我々の新病理分類を用いた (下表)。

Table 1. Our new histological grading score

Intervertebral disc	Score	Findings
Annulus fibrosus (AF)	0	Normal
	1	Mildly serpentine
	2	Moderately serpentine
	3	Severely serpentine
	4	Severely serpentine and ruptured
5	Indistinct	
Nucleus pulposus (NP)	0	Normal
	1	Condensed
	2	Infiltration of chondrocyte-like cells, residual NP matrix
	3	Global infiltration of chondrocyte-like cells
	4	Mildly replaced by fibrous cartilaginous tissue
5	Moderately or severely replaced by fibrous cartilaginous tissue	

Degeneration score = AF score + NP score.

(3)

次いで、C57BL/6 を背景として caspase 3 KO マウスと p27KO マウスを作製し、研究 1 で我々が独自に確立した in vivo マウス腰椎椎間板穿刺変性モデルを適用した。35 あるいは 33 ゲージ (G) 針を使用し L4/5 椎間板を側面から穿刺貫通させ、 μ CT MPR 画像により貫通

部位を3次元的に確認した。

術後2,4週(n=8)に安楽死させMRI正中矢状断T2強調画像を撮影後、病理組織標本を作成した。MRIはPfirrmann grade, MRI index (signal intensity x area)を測定し病理組織学的評価には我々が独自に作成した病理分類を用いた。

4. 研究成果

(1)

これまでの研究成果と同様に、血清飢餓によりcleaved caspase 3とp27遺伝子の発現が上昇していた。

(2)

穿刺椎間板は、術後1週以降有意に変性していたが、各時点間に差はなかった。また、33Gは35Gに比較して有意に変性しており、さらに中心と背側領域貫通例では有意に変性していた。

MRI indexと各病理分類スコアの相関係数は、Nishimura分類:-0.41207, Masuda分類:-0.73895, 我々の分類:-0.66114と相関を認めたと、Masuda分類では高変性度に分類される所見が多く、Nishimura分類では逆に低変性度として分類される所見が多かった。一方、我々の分類では変性度を幅広く分類していた。つまり再現性の高いin vivoマウス腰椎椎間板変性モデルを確立することに成功した。

マウス変性椎間板を対象とした病理分類に関し、Nishimuraら、Masudaらの病理分類は段階的な変性変化を検出できないのに対し、我々の病理分類は変性所見を段階的に捉えていた。また、モデルに関し有意な変性を惹起するためには中心・背側領域への貫通が適切と考えられた。

(3)

35G穿刺では、術後2週時、WTに比べてcaspase 3 KOマウスではMRI indexが有意に高く、病理変性度スコアが有意に低かったが、術後4週時には差はなかった。一方、33G穿刺ではいずれの時点においても、両群間に差はなかった。

病理所見に関し、組織の腫瘍化などの所見はなかったが、KOマウスでは軟骨終板で細胞数が多く、密に存在しており、幼弱細胞数も多かった。さらにN/C比が高く、二核細胞が少なかった。また、髓核組織に進入する軟骨様細胞も同様の所見を認め、髓核基質の残存や線維化の遷延など変性過程も遅延していた。

つまり、Caspase 3 KOマウスを用いた解析では、椎間板組織の腫瘍化の所見はなかった。さらに椎間板変性の進行を抑制するが、高度な穿刺傷害による変性を抑制するには限界があると考えられた。同様の結果はp27KOマウスでもみられた。

【結果のまとめ】

本研究は、申請者がこれまでに行ってきた解析手法を用いて、従来の外科的治療に替わり、細胞周期関連遺伝子を標的とした遺伝子治療的手法により、椎間板細胞の恒常性を維持することで椎間板細胞・組織の老化・変性を制御可能かどうか、また治療手段として有用かどうかを提案するものである。

以上の結果からこれら細胞周期関連遺伝子群を対象とした椎間板変性制御の可能性が示されており、今後研究を継続発展していくことで、より低侵襲で経済的負担の少ない、例えば注射1本で腰痛の治療や椎間板の退行変性を遅らせることが可能となれば、健康長寿社会の実現に向け極めて低侵襲に、日常生活動作や生活の質を大きく改善させることが期待され、国民の福祉向上や、労働生産性の向上にも貢献するという卓越した成果が期待できる。

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)

〔学会発表〕(計 4件)

1. Ohnishi T, Sudo H, Tsujimoto T, Iwasaki N. Highly reproducible in vivo intervertebral disc degeneration model based on newly developed histological classification. Orthopaedic Research Society. 2016 annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Mar 5-8-2016, Orland, FL, USA

2. 大西貴士, 須藤英毅, 岩崎浩司, 辻本武尊, 岩崎倫政. 遺伝子改変マウスを用いた椎間板変性におけるcaspase 3遺伝子の果たす機能解析. 日本脊椎脊髄病学会. 2016年4月14日-16日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

3. 大西貴士, 須藤英毅, 岩崎浩司, 辻本武尊, 岩崎倫政. 新病理分類に基づいた再現性の高いin vivoマウス腰椎椎間板変性モデルの確立. 日本脊椎脊髄病学会. 2016年4月14日-16日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

4. 大西貴士, 須藤英毅, 岩崎浩司, 辻本武尊, 岩崎倫政. 再現性の高いマウス椎間板穿刺変性モデルの作成. 日本整形外科学会基礎学術集会. 2015年10月22日-23日, 富山国際会議場(富山県・富山市)

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