

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861184

研究課題名(和文) RANK/RANKL/OPG系を標的とした椎間板変性に対する革新的治療法の開発

研究課題名(英文) The development of innovative therapy for intervertebral disc degeneration targeted to the RANK/RANKL/OPG system

研究代表者

竹上 徳彦 (Takegami, Norihiko)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：20727664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラットおよびヒト椎間板におけるRANK/RANKL/OPG系の発現を、mRNAおよび蛋白レベルで確認した。

炎症性サイトカイン刺激によってRANK/RANKL/OPG系の発現は上昇することが示された。IL-1 β 存在下でのRANKL刺激によって、炎症性サイトカインやタンパク分解酵素の発現は上昇した。RANK/RANKL/OPG系は炎症性サイトカインと相互作用することにより、椎間板変性の進行に関与している可能性を考えた。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that the expression of RANK/RANKL/OPG system was confirmed both by mRNA and protein levels in the rat and human intervertebral discs.

The expressions of RANK/RANKL/OPG were regulated by stimulation with IL-1 β . Those of proinflammatory cytokines and proteolytic enzymes were significantly up-regulated by stimulation with RANKL in the presence of IL-1 β stimulation.

The RANK/RANKL/OPG system has the potential to interact with proinflammatory cytokines and be involved in the progression of disc degeneration.

研究分野：椎間板変性

キーワード：椎間板変性 RANKL 炎症性サイトカイン

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、椎体間の不安定性を引き起こし、腰痛、さらには下肢神経症状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Ⅱ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[アグリカン]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。基質代謝の調節因子には、transforming growth factor-(TGF-β)、bone morphogenetic proteins(BMPs)などの成長因子が挙げられ、細胞外基質(蛋白)の合成に働く。一方、IL-1やTNF-αなどの炎症性サイトカインは蛋白分解酵素(Matrix metalloproteinases

[MMPs], ADAMTSファミリー)を誘導することにより、細胞外基質(蛋白)の分解に働き、さらには、基質産生自体をも抑制する。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。

Receptor activator of NF-κB ligand(RANKL)は破骨細胞分化因子として知られ、TNFスーパーファミリーに属する。RANKLがRANKに結合すると、T-RAF6を介してNF-κBを活性化させ、活性化NF-κBは炎症性サイトカインの発現を活性化させ、破骨細胞の骨基質成分の分解に関与していると考えられている。また、Osteoprotegerin(OPG)はRANKLのdecoy receptorとして働き、RANK/RANKL/OPG系はシグナルの均衡に寄与すると考えられている。近年、ヒト関節軟骨においてRANK/RANKL/OPG系の発現が報告されているが、椎間板組織での報告は少ない。そこで我々は、椎間板細胞においてRANK/RANKL/OPG系が存在し、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深く関与していると仮説した。

2. 研究の目的

椎間板変性とRANK/RANKL/OPG系の関連性を明らかにすることである。本研究は椎間板変性のメカニズムの解明に繋がり、新たな治療法の開発の手がかりになると確信する。

3. 研究の方法

ラット椎間板

ラット椎間板細胞(培養)にてRANK/RANKL/OPG系の機能解析を行う。まず、(1)炎症性サイトカイン刺激に対する

RANK/RANKL/OPG 系の発現の変化を調べる。次に、(2) RANKL刺激に対する椎間板細胞の基質代謝への影響を検討する。椎間板変性の微少環境を模倣する目的で、炎症性サイトカイン存在下においても同様に椎間板基質代謝への影響を検討する。

プロトコール：

ラット椎間板細胞（線維輪細胞7日間、髓核細胞10日間）培養を行う。24時間、無血清培地で培養した後に以下の条件にて細胞を培養する。

(1) recombinant human IL-1 (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10 ng/ml) 存在下に24時間培養。RANK/RANKL/OPG系のmRNA レベルでの発現を調べる。

(2) recombinant human RANKL (0, 10, 100 ng/ml) 存在下に24時間培養。また rhIL-1 (10 ng/ml) 存在下に条件1と同様の培養を行う。

基質代謝の蛋白分解系を制御しているサイトカインであるIL-1 及び蛋白分解系酵素 (MMP-3,13) のmRNA レベルでの発現を調べる。

ヒト椎間板

手術標本よりヒト椎間板組織を採取し、(1) ラット椎間板と同様にRANK/RANKL/OPG 系の発現および炎症性サイトカイン刺激による影響を検討する。また(2) 免疫組織学的手法を用い評価も行う

プロトコール：

ヒト椎間板細胞（線維輪細胞7日間、髓核細胞10日間）培養を行う。24時間、無血清培地で培養した後に以下の条件にて細胞を培養する。

(1) recombinant human IL-1 (0, 0.1, 1.0, 10 ng/ml) 存在下に24時間培養。RANK/RANKL/OPG系のmRNA レベルでの発現を調べる。

(2) 抗RANK 抗体 (ab12008, Abcam 社)、抗

RANKL抗体 (ab9957, Abcam 社)、抗OPG 抗体 (sc-8468, Santa Cruz 社) それぞれの抗体の反応部位を観察し、共焦点レーザー顕微鏡にてデジタル画像を撮影する。

4. 研究成果

ラット椎間板

(1) RANKLおよびOPGのmRNAレベルでの発現量は髓核細胞、線維輪細胞間で差を認めなかったが、髓核細胞におけるRANKのmRNA発現量は線維輪細胞に比べて有意に高値であった。

(2) IL-1 刺激により髓核細胞、線維輪細胞ともにRANKLのmRNA 発現量は有意に増加していた。またNP細胞においては、RANKおよびOPGのmRNA発現量も有意に増加していた。培養細胞にRANKLのみの単独投与を行ったところ、炎症性サイトカイン (IL-1) タンパク分解酵素であるMMP-3, 13の発現量に有意な変化は認めなかった。一方で、炎症性サイトカイン存在下でのRANKL刺激では、IL-1 , MMP-3, MMP-13の発現量は有意に上昇した。

ヒト椎間板

(1) RANK、RANKL、OPGともに髓核細胞におけるmRNAレベルでの発現量は線維輪細胞に比べて有意に高値であった。IL-1 刺激によりRANKやOPGではmRNAレベルでの発現量は有意な変化を認めなかったがRANKLの発現量は、線維輪、髓核細胞ともにIL-1 刺激によって有意に上昇した。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて培養細胞を観察したところ、ヒト椎間板培養細胞は線維輪、髓核ともに、RANKは主に細胞膜、RANKLとOPGでは主に細胞質に発現を認めた。

以上より、ラットおよびヒト椎間板におけるRANK/RANKL/OPG系の発現を、mRNAおよび蛋白レベルで確認した。

炎症性サイトカイン刺激によって RANK/RANKL/OPG 系の発現は上昇した。IL-1 存在下での RANKL 刺激によって、炎症性サイトカインやタンパク分解酵素の発現は上昇した。RANK/RANKL/OPG 系は炎症性サイトカインと相互作用することにより、椎間板変性の進行に参与している可能性を考えた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 11 件)

H27 年度

(1) 15th The International Society for Advancement of Spine Surgery

平成 27 年 4 月 15-17 日

San Diego (USA)

RANK/RANKL/OPG System in the Rat Intervertebral Disc

Norihiko Takegami, Koji Akeda, Koichiro Murata, Junichi Yamada, Akihiro Sudo

(2) 第 44 回 日本脊椎脊髄病学会学術総会
平成 27 年 4 月 16-18 日

福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

ラット椎間板における RANK/RANKL シグナルと炎症性サイトカインの関連性

竹上徳彦、明田浩司、村田耕一郎、山田淳一、湊藤 啓広

(3) 第 88 回 日本整形外科学会学術総会
椎間板組織における RANK/RANKL/OPG 系の発現とその意義

平成 27 年 5 月 21-24 日

神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

竹上徳彦、明田浩司、村田耕一郎、山田淳一、湊藤 啓広

(4) 42th The International Society for the Study of the Lumbar Spine

平成 27 年 6 月 8-12 日

San Francisco (USA)

Association between RANK/RANKL Signaling and Proinflammatory Cytokines in Rat Intervertebral Disc Cells

Norihiko Takegami, Koji Akeda, Koichiro Murata, Junichi Yamada, Akihiro Sudo

(5) 第 30 回 日本整形外科学会基礎学術集会

平成 27 年 10 月 22-23 日

富山国際会議場(富山県・富山市)

ラット椎間板における RANK/RANKL/OPG 系の発現と機能解析

竹上徳彦、明田浩司、村田耕一郎、山田淳一、湊藤啓広

(6) 第 30 回 日本整形外科学会基礎学術集会

平成 27 年 10 月 22-23 日

富山国際会議場(富山県・富山市)

ヒト椎間板に RANK/RANKL/OPG 系が存在する

竹上徳彦、明田浩司、山田淳一、湊藤啓広

H26 年度

(7) 41th The International Society for the Study of the Lumbar Spine

平成 26 年 6 月 3-7 日

ソウル(韓国)

Expression of the RANK/RANKL/OPG system in the rat intervertebral disc

Norihiko Takegami, Koji Akeda, Koichiro Murata, Akihiro Sudo

(8) 第 29 回 日本整形外科学会基礎学術集会

平成 26 年 10 月 9-10 日

城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

ラット椎間板における RANK/RANKL/OPG 系の発現とその意義

竹上徳彦、明田浩司、村田耕一郎、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広

研究者番号：

(9) 第 29 回 日本整形外科学会基礎学術集会

(3) 連携研究者

()

平成 26 年 10 月 9-10 日

城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)

ヒト椎間板組織における RANK/RANKL/OPG 系の発現

研究者番号：

竹上徳彦、明田浩司、村田耕一郎、藤原達彦、倉田竜也、近藤哲士、榊原紀彦、笠井裕一、須藤 啓広

(10) 第 22 回 日本腰痛学会

ラット椎間板における RANK/RANKL/OPG 系の発現と椎間板変性への関与

平成 26 年 11 月 15-16 日

幕張メッセ (千葉県・千葉市)

竹上徳彦、明田浩司、村田耕一郎 山田淳一、須藤啓広

(11) 61th Orthopaedic Research Society Annual Meeting

平成 27 年 3 月 28-31 日

Las Vegas (USA)

RANK/RANKL/OPG System in the Rat Intervertebral Disc

Norihiko Takegami, Koji Akeda, Koichiro Murata, Junichi Yamada, Akihiro Sudo

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹上徳彦 (Takegami, Norihiko)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：20727664

(2) 研究分担者

()