

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861193

研究課題名(和文) 椎間板変性予防医療を目指した初期椎間板変性の病態解明

研究課題名(英文) The study of prevention of intervertebral disc degeneration

研究代表者

角谷 賢一郎 (KAKUTANI, Kenichiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10533739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性の機序解明に向けて、動的負荷が椎間板組織に与える影響、及び椎間板変性とAdiponectinとの関係について調査した。動的負荷を与えると椎間板変性は進行することが確認された。さらに、この動的刺激はメカノレセプターのIntegrin 5 1を介して椎間板細胞に伝達されることが確認された。本研究では、adiponectin receptorが椎間板組織に発現していることを初めて明らかにできた。このadiponectin receptorは、椎間板変性動物モデルにおいて、変性とともに発現が減少していた。椎間板組織の恒常性の維持に関与しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to reveal the pathomechanism of intervertebral disc (IVD) degeneration. The effect of mechano-stress on homeostasis of IVD tissue and the involvement of adiponectin with IVD degeneration was investigated. The results of this study was revealed Mechano-stress induced the IVD degeneration via Integrin 5 1, mechanoreceptor. In addition, the expression of adiponectin receptor in the IVD tissues was firstly investigated. The alteration of adiponectin receptor according to the severity of IVD degeneration was also revealed using rat IVD degeneration model. This adiponectin has the potential to inhibit the expression of TNF- α after IL-1 stimulation.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板変性 メカノレセプター アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

現在、日本の人口の約 80% が生涯で 1 度は腰痛を経験すると言われており、その治療費を含めた経済損失は莫大である。その腰痛の主たる原因が椎間板変性にあると考えられており、日本に限らず椎間板変性に対する治療は、高齢化社会を迎える先進諸国にとって急務である。現在椎間板再生を目指した治療は、成長因子治療、幹細胞治療が既に臨床試験されているが、ヒト椎間板変性に対する有効性を確立できていない。加えて、椎間板変性に続発する椎間関節障害や黄色靭帯の肥厚、腰椎の不安定性が腰痛の直接的な原因となることから、仮に変性椎間板の治療が可能になったとしても、腰痛が出現した後では、本当に症状が改善するかという疑問が残る。即ち、我々は椎間板変性に対する予防医療が必要であると考えている。本研究では椎間板変性の予防医療を目指し、椎間板変性を予防することを目的とした変性初期の病態解明と変性由来症状の予防を目指した症状発症の機序解明を研究の目的とする。

2. 研究の目的

(1) 初期椎間板変性の機序解明に向けた研究

我々は、これまでに椎間板変性の機序解明と治療に向けた研究を重ねてきた。ヒト椎間板に睾丸や眼球に特異的に発現する FasL の存在を初めて報告し Fas/FasL を介した免疫特権が椎間板変性に関与する事や、炎症性サイトカインである IL-1、TNF- α が椎間板細胞から産生され、微量な炎症性サイトカインが互いに絶妙なクロストークを構築し、それらが自身の基質代謝を制御していることも解明した。さらに、無血管組織である椎間板には、長寿遺伝子 SIRT1 遺伝子が発現し変性初期に基質代謝や細胞増殖能を制御することを報告した。また、椎間板変性を再現するために、

持続圧負荷椎間板変性動物モデルを改良し、一定の機械刺激(メカノストレス)が進行性の椎間板変性を惹起するトリガーになる可能性を見出した。さらに、このメカノストレスを詳細に検証するために同志社大学、米国 Rush 大学と共同で ex vivo での動的負荷培養装置を研究開発した。この動的圧負荷培養装置を用いた予備実験では、圧負荷をダイナミックに加えることで基質代謝における同化、異化の両者が活性化した。また、組織学的な検討では髄核細胞の減少と線維輪内層の内包化といった初期の椎間板変性像を再現することに成功した。更なる研究では、この初期椎間板変性では、膜表面に発現する integrin α 5 β 1, CD44 といったメカノレセプターが、feedback 経路を介して自らの発現を自在に調節し、椎間板線維輪と髄核で異なる現象を引き起こしていた。すなわち、メカノストレスを受けて、髄核では基質合成抑制効果と基質分解酵素の産生が活性化する。一方線維輪では、1 型コラーゲンが合成促進し基質分解酵素の産生が活性化した。メカノストレスに誘導される椎間板変性を integrin α 5 β 1, CD44 といったメカノレセプターが仲介する仕組みが明らかになりつつある。本研究では、メカノストレスが基質代謝に与える影響のみならず、椎間板の恒常性に深く関与していると考えられるが、未だ不明なことの多い脊索細胞の運命に対してメカノレセプターが如何に関与するかを明らかにしたい。

(2) 椎間板変性疾患の疼痛発症の機序解明に向けた研究

我々はこれまでに、椎間板ヘルニアの疼痛メカニズムについて詳細に検討してきた。椎間板ヘルニアの病態解明に向けて、ラット腰椎椎間板ヘルニアモデルを構築し、生化学解析、行動解析によって、TNF- α や IL-8 が早期の炎症惹起、症状発現に深く関与することを明らかにした。

一方、近年成人病の病態解明の研究から脂肪組織が分泌するサイトカインの一種であるアディポネクチンが注目されている。アディポネクチンは多様な生理活性を有しているが、中でも抗炎症作用が重要であり、肥満や喫煙によるアディポネクチン分泌不全が全身性の炎症を惹起し糖尿病をはじめとする成人病発症に深く関与すると考えられている。脊椎外科医としての経験から腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症の責任病変の手術所見では、本来存在するはずの硬膜外脂肪が消失しており、アディポネクチンを有する脂肪組織の減少が、椎間板変性関連疾患の症状発現の一因になっている仮説する。我々の予備実験では、硬膜外脂肪でもアディポネクチンが発現しており、責任高位では、この硬膜外脂肪層の重量が有意に少ないことを確認している。

本研究では、末梢神経を初めとする神経組織周辺に存在する脂肪組織がアディポネクチンを介して神経組織の恒常性、疼痛発症に関与する機序について解明したい。

3. 研究の方法

(1) 動的負荷培養装置を用いて椎間板変性を誘発しメカノレセプターの脊索細胞への影響に関する研究。

本実験は、同志社大学生命医科学部、森田有亮教授、米国 Rush 大学、舩田教授と共同開発した動的負荷培養装置を用いる。本動的負荷培養装置は、左図に示すようにラット尾椎椎間板をセットした培養チャンバー、サンプルに変位を負荷するためのリニアモーターおよび試験中にサンプルに作用している荷重を測定するための荷重センサーから構成されている。培養装置は小型であり、装置をインキュベーターに入れサンプルの培養環境を一定に保つことが出来る。サンプルに与える変位量、負荷荷重の値および周期は、

作成したプログラムにより制御することが可能である。本培養装置を用いて 1.3Mpa の圧負荷を数週間与えることで、椎間板変性を誘発する。

サンプルを回収後、real-time PCR にて遺伝子発現を解析する。同化、異化のマーカに加え、メカノレセプターとして細胞間接着因子である integrin α,β の各サブタイプ、CD44 について、評価検討を行う。さらに、椎間板変性に深く関与すると考えられている脊索細胞について、Galectin-3、Cytokeratin-8 の免疫染色にて同定し、脊索細胞のアポトーシス、活動性について、生死染色と増殖静止マーカーの p16INK4A の多重蛍光免疫染色にて評価する。

(2) 椎間板ヘルニアの疼痛発症に対するアディポネクチンの関与に関する研究。

我々の先行研究で、ヒト、ラットの腰椎硬膜外腔に存在する硬膜外脂肪にも、皮下脂肪と同様にアディポネクチンが発現していることを確認している。さらに、ヒト硬膜外脂肪は、腰部脊柱管狭窄症や椎間板ヘルニアにおける神経学的責任高位では、有意に脂肪重量が少ないことが明らかになっていることから、椎間板変性関連疾患の疼痛発症に、抗炎症作用を有するアディポネクチン分泌不全が関与していると仮説する。本研究では、ヒト、ラットの培養椎間板細胞に IL-1 や LPS といった炎症惹起因子を負荷することで椎間板に炎症性変化を誘導する。そこへ脂肪組織との共培養やリコンビナントアディポネクチンを負荷し、椎間板由来の炎症性サイトカインの発現、Fas/FasL 系について、mRNA レベル、蛋白レベルで経時的に評価検討する。

4. 研究成果

(1) メカノレセプターに関する研究

本研究では 6 群を作成した。すなわち、動的

負荷を与えていない静置培養したものをC群、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤を負荷し静置培養したものをT群、動的負荷培養装置を用いて、1.3MPa, 1Hzで6日間培養したL群、動的負荷を与えIntegrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤を添加したものをTL群、動的負荷を与えIntegrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤に対するnegative controlを添加したものをNL群とした。

動的負荷を与えることで、椎間板変性が誘導されることが明らかとなった。一方、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 阻害剤を添加することで、動的負荷を加えても椎間板変性の進行が抑制されることが明らかとなった。同期的負荷を与えることにより、椎間板変性が惹起されたが、この変化は主に髄核細胞の変性が主体であり、線維輪の変化は軽度であった。

次に脊索細胞に関して検討を加えたところ、脊索細胞は、動的負荷を与えることで染色性は失われる一方、髄核内に集簇する傾向が見られた。また、興味深いことに生死染色を行ったところ、脊索細胞はapoptosisするのではなく、形質転換している可能性が考えられた。今後、さらに研究を続けることで、脊索細胞の運命を明らかにしたい。

(2) アディポネクチンに関する研究

免疫組織学的染色によりヒト硬膜外脂肪層にアディポネクチンが発現していることが確認された。一方、椎間板組織内には、アディポネクチンは発現していなかった。また、アディポネクチンレセプターであるAdipoR1、AdipoR2は、ヒト、ラット椎間板細胞において広く発現していた。このレセプターの発現率は、AdipoR1、R2ともに同様に、髄核で80%、線維輪で70%であった。

このadipoR1、R2の発現性に関して、ラット尾椎椎間板変性モデルを用いて変性度との関連を検討したところ、中等度、高度変性と変性度が上昇するにつれて、各レセプターの

発現性は減少する傾向が見られた。また、アディポネクチンは抗炎症作用を有することが知られており、この抗炎症作用について検討を追加した。

椎間板細胞に対してIL-1 β 刺激を行いアディポネクチンを追加投与することで、TNF- α 、IL-6の発現性が変化するかを観察した。アディポネクチンを投与することで、髄核、線維輪ともに、IL-1 β 刺激によるTNF- α の発現上昇が濃度依存的に抑制されることが確認された。一方、IL-6に関しては、アディポネクチンによる発現抑制効果は見られなかった。以上からアディポネクチンは椎間板組織に恒常的に発現しており、抗炎症作用をはじめとして組織の恒常性の維持に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

角谷賢一朗、西田康太郎、前野耕一郎、高田徹、由留部崇、蔵川拓外、宮崎真吾、寺嶋良樹、伊藤雅明、Masuda Koichi、森田有亮、黒坂昌弘 整形外科基礎の最前線 2015 椎間板変性の機序と再生の可能性、関節外科、査読無 Vol34. P27-37, 2015

Terashima, Y. Kakutani, K. Yurube, T. Takada, T. Maeno, K. Hirata, H. Miyazaki, S. Ito, M. Kakiuchi, Y. Takeoka, Y. Kuroda, R. Nishida, K. Expression of adiponectin receptors in human and rat intervertebral disc cells and changes in receptor expression during disc degeneration using a rat tail temporary static compression model. J Orthop Surg Res. 査読有 2016.11,147

〔学会発表〕(計 4 件)

Yoshiki Terashima, Kenichiro Kakutani,

Toru Takada, Takashi Yurube, Hiroaki Hirata, Koichiro Maeno, Shingo Miyazaki, Masaaki Ito, Yuji Kakiuchi, Masahiro Kurosaka, Kotaro Nishida. The alterations of Adiponectin receptor expression with disc degeneration in rat intervertebral disc cells、国際腰椎学会 2016年5月16日、シンガポール(シンガポール)

Yoshiki Terashima, Kenichiro Kakutani, Toru Takada, Takashi Yurube, Hiroaki Hirata, Koichiro Maeno, Shingo Miyazaki, Masaaki Ito, Yuji Kakiuchi, Masahiro Kurosaka, Kotaro Nishida. The alterations of Adiponectin Receptor Expression with disc degeneration in rat intervertebral disc cells、第62回米国整形外科学会、2016年3月5日、オランダ(米国)

寺嶋良樹、角谷賢一朗、高田徹、由留部崇、平田裕亮、前野耕一郎、宮崎真吾、伊藤雅明、垣内裕司、黒坂昌弘、西田康太郎、Adiponectin の椎間板細胞に対する抗炎症効果と椎間板変性に伴う Adiponectin 受容体の発現変化、第45回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2016年4月14日 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

寺嶋良樹、角谷賢一朗、前野耕一郎、平田裕亮、蔵川拓外、宮崎真吾、由留部崇、高田徹、黒坂昌弘、西田康太郎 椎間板細胞に対する Adiponectin の抗炎症効果、第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014年10月9日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobe-seikei.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

角谷 賢一朗 (KAKUTANI, Kenichiro)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10533739

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

西田 康太郎 (NISHIDA, Kotaro)
前野 耕一郎 (MAENO, Koichiro)
高田 徹 (TAKADA, Toru)
由留部 崇 (YURUBE, Takashi)
寺嶋 良樹 (TERASHIMA, Yoshiki)
垣内 裕司 (KAKIUCHI, Yuji)
伊藤 雅明 (ITO, Masaaki)
武岡 由樹 (TAKEOKA, Yoshiki)