



Title	生体力学的環境変化により生じる椎間板組織の変性制御に関する統合的研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山田, 勝久
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11239号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/56246
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2111
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Katsuhisa_Yamada_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医 学)	氏 名	山 田 勝 久
審査担当者	主査	教授	山 本 有 平
	副査	教授	畠 山 鎮 次
	副査	教授	近 藤 亨
	副査	教授	岩 崎 倫 政

学 位 論 文 題 名

生体力学的環境変化により生じる椎間板組織の変性制御に関する統合的研究
(Caspase 3 Silencing Inhibits Biomechanical Overload-induced Intervertebral Disc Degeneration)

椎間板障害により惹起される腰痛症や椎間板ヘルニアなどは、日常診療においてよく経験する関連疾患である。しかし、現在椎間板の変性変化を抑制しうる有効な治療法は確立されていない。椎間板の変性変化には過度の応力集中が原因となることが知られており、また髄核細胞のアポトーシスが大きく関与していることが報告されている。そこで生体力学的、分子生物学的側面から多面的に椎間板組織に対する変性制御を試みることは、椎間板変性に対する新たな治療戦略として期待される。本研究では、椎間板細胞・組織に生体力学的負荷を与え、アポトーシス関連遺伝子の発現抑制実験を行うことで、椎間板組織の変性変化が制御可能かどうかを検証した。

まず、*in vitro* 髄核細胞血清除去モデルを用いて、椎間板変性に関連する遺伝子群を解析した。マイクロアレイ解析により、血清除去ラット髄核細胞において DNA damage checkpoint およびアポトーシス関連遺伝子群に変動がみられた。ラット髄核細胞へ caspase 3 siRNA を導入すると、血清除去における活性型 caspase 3 の発現増加は抑制され、p21^{Cip1} 発現が維持された。また、血清除去による G1 arrest およびアポトーシスが抑制された。ヒト髄核細胞においても同様の結果がみられた。以上の結果から、細胞周期 DNA damage checkpoint およびアポトーシス関連遺伝子群は、椎間板変性における病態に重要な機能を有することが示唆された。

次に、生体力学的環境変化に起因する椎間板変性の病態を解析し、caspase 3 siRNA 導入による椎間板変性抑制効果を検証した。*In vitro* 試験において、ヒト髄核細胞へ圧縮負荷を与えたところ、活性型 caspase 3、細胞外基質分解酵素の発現増加を伴い髄核細胞アポトーシスが増加した。caspase 3 siRNA を導入し圧縮負荷を与えたところ、これらの変

化が抑制された。 *In vivo* 試験において、ウサギ椎間板に圧迫を負荷することで、髄核細胞アポトーシスの増加及びMMP発現の増加を伴い、経時的に椎間板の変性変化が進行した。 Caspase 3 siRNA を椎間板へ局所導入したところ、これらの変性変化が抑制された。 以上の結果から、生体力学的荷重負荷による椎間板変性には caspase を介した細胞外基質代謝変化が関与しており、caspase 3 siRNA の導入により椎間板組織の変性変化を抑制可能であることが示唆された。

審査に当たり副査近藤教授から、caspase 3 siRNA で椎間板変性抑制結果が得られたが、caspase 3 inhibitor も有効ではないかとの質問があった。 申請者は、caspase 3 inhibitor の使用により椎間板細胞死を抑制した報告があることより、siRNA と同様に有効な可能性が考えられるが、阻害剤で引き起こされうる他の類似した分子への影響を避けるために siRNA を使用したと回答した。 次いで副査畠山教授より、生体力学的圧迫変性モデルで使用した圧力は、ヒトに置き換えるとどの程度の負荷なのかと質問があった。 申請者は、*in vivo* 試験において、ウサギ椎間板へ 1.6MPa 相当の圧力をかけたが、これはヒトでは 20kg のものを膝屈曲位で持ち上げる際に腰椎椎間板にかかる圧力であると回答した。 また、椎間板変性における髄核細胞アポトーシスの経路について質問があった。 申請者は、本研究では詳細なアポトーシス経路の評価は行っていないが、Bcl-2 を過剰発現させることにより髄核細胞アポトーシスが抑制されることを当科にて報告しており、ミトコンドリア経路が主体となりアポトーシスが起これると回答した。 副査岩崎教授からは、細胞・組織への力学的ストレスに関して、負荷の種類とその影響に関する質問があった。 申請者は、生体にとって保護的に働く生理的な動的ストレスがあり、反対に障害的に働く静的ストレスおよび生理的な範囲を超える激しい動的ストレスがあると回答した。 補足として岩崎教授より、圧縮、引張、剪断ストレス等の応力方向の違いによる分類があり、椎間板・軟骨細胞にとって引張・剪断ストレスは障害的な作用を持つとのコメントがあった。 主査山本教授からは、椎間板圧迫モデルの臨床的な意義について質問があった。 申請者は、*in vivo* 実験では 16 週と長期間の圧迫により変性を引き起こしており、外傷による急性の椎間板変性ではなく慢性的な荷重負荷による椎間板変性モデルであると回答した。 また、椎間板細胞死へのネクロシスの関与について質問があった。 申請者は、椎間板変性においては主にアポトーシスが関与していると考えられるが、ネクロシスとの鑑別も今後の検討課題に挙げられると回答した。

この論文は、力学的負荷による椎間板変性の進行に髄核細胞のアポトーシスが深く関与していることを示し、また caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することにより、椎間板圧迫変性モデルにおける変性抑制効果を示した。 これらのメカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、本手法は生体力学的環境変化における椎間板変性に対し、今後有用な治療手段となりうると期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。