



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
Author(s)	山田, 勝久
Description	配架番号 : 2111
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11239号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11239
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56247
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuhisa_Yamada.pdf



学 位 論 文

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)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

山田 勝久
Katsuhisa Yamada

目 次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
緒言		3 頁
略語表		4 頁
第一章		
緒言		5 頁
実験方法		6 頁
結果		11 頁
考察		23 頁
第二章		
緒言		25 頁
実験方法		27 頁
結果		32 頁
考察		40 頁
総括および結論		43 頁
謝辞		45 頁
引用文献		46 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Hideki Sudo, Katsuhisa Yamada (equal contribution as first author), Koji Iwasaki, Hideaki Higashi, Manabu Ito, Akio Minami, Norimasa Iwasaki

Global Identification of Genes Related to Nutrient Deficiency in Intervertebral Disc Cells in an Experimental Nutrient Deprivation Model

PLoS One 8 (3): e58806 (2013)

2. Katsuhisa Yamada, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Naoki Sasaki, Hideaki Higashi, Yusuke Kameda, Manabu Ito, Masahiko Takahata, Kuniyoshi Abumi, Akio Minami, Norimasa Iwasaki

Caspase 3 Silencing Inhibits Biomechanical Overload-induced Intervertebral Disc Degeneration

American Journal of Pathology (in press)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 山田 勝久, 須藤 英毅, 岩崎 浩司, 高畑 雅彦, 鑑 邦芳, 伊東 学

生体力学的荷重負荷に起因した椎間板変性に対する caspase 3 siRNA の変性抑制効果

第 42 回日本脊椎脊髄病学会

平成 25 年 4 月 25 日 9:55~10:40 (口演)

沖縄コンベンションセンター

2. 須藤 英毅, 山田 勝久 (発表者), 岩崎 浩司, 伊東 学, 三浪 明男, 岩崎 倫政

椎間板細胞の栄養飢餓状態に関連する遺伝子の網羅的発現解析

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会

平成 25 年 10 月 17 日 18:00～18:50 (ポスター)

幕張メッセ国際会議場

3. 山田 勝久, 須藤 英毅, 岩崎 浩司, 高畑 雅彦, 鑑 邦芳, 伊東 学,
岩崎 倫政

生体力学的荷重負荷に起因した椎間板変性に対する caspase 3 siRNA の変性抑制
効果

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会

平成 25 年 10 月 18 日 8:00～9:10 (口演)

幕張メッセ国際会議場

4. Katsuhisa Yamada, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Naoki Sasaki, Yusuke Kameda, Manabu
Ito, Masahiko Takahata, Kuniyoshi Abumi, Akio Minami, Norimasa Iwasaki

Therapeutic Potential of Caspase 3 Silencing for Biomechanical Overload-induced
Intervertebral Disc Degeneration

ORS 2014 Annual Meeting in New Orleans, March 15-18, 2014.

(Poster session, Spine Therapeutics – In vivo Preclinical)

緒 言

椎間板は体幹を支える脊椎の重要な基本構成要素であり、椎間板障害によって惹起される症状として腰痛が挙げられる。腰痛は日本人の 7 割以上が生涯において経験するとされ、病院受診の原疾患として腰痛症は最多といわれる。このように腰痛は自立した健康的な生活をおこなう上での大きな障害として認知され、現代医学において克服すべき重要な課題である。

椎間板障害に対する治療には、従来より髄核摘出術や脊椎固定術などの外科的治療が広く普及し、一定の効果が確認されている。しかし、髄核摘出術ではかえって椎間板の変性変化が進行することが報告され¹、また脊椎固定術では固定椎間の椎間板機能は失われ、さらに隣接する椎間板障害の出現が広く認知されている²。また腰痛に対する鎮痛剤投与等の保存加療も、対症療法の域を出ていないのが現状である。現在の医療においては、椎間板の変性変化の進行を抑制し、その経過を変えうる有効な治療法は確立されておらず、椎間板障害に対する代替医療の可能性に注目が集まっている。

椎間板障害に対する効果的な治療に繋げるため、椎間板組織の変性メカニズムの解析が必要となる。椎間板組織変性の要因として、加齢、遺伝、椎間板への栄養供給、生体力学的負荷、外傷等の種々の要因が関与していると報告されている³。椎間板組織の中核を成す髄核細胞は、細胞分裂能が低く、また無血管野であり周囲からの拡散により栄養状態を維持している特殊な組織である。脊椎の変性変化により椎体終板の骨硬化が起こると、椎間板への栄養供給が低下し、さらに椎間板の変性が進行すると報告されている⁴。従って、栄養飢餓に関する椎間板細胞のメカニズムを解析することは、椎間板組織変性の病態を解明する上で重要であると考えられた。そこで我々は、椎間板細胞の栄養飢餓に関連する遺伝子群を網羅的に解析したのでここに報告する。

一方、椎間板組織は様々な荷重や運動負荷に対し、生体力学的に重要な機能を担っている。生体力学的見地より、椎間板変性には過度の応力集中や椎間板内圧の変化が関与していることが報告されている⁵。さらに近年、椎間板の変性変化には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おり^{6,7}、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。

そこで我々は、椎間板細胞および組織に生体力学的負荷を与え、分子生物学的解析手法を用いてアポトーシス関連遺伝子の発現抑制実験を行うことによって、より生体内環境に近似した状態において椎間板組織の変性変化が制御可能かどうかを検証したのでここに報告する。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
GO	Gene Ontology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics
MMP	matrix metalloproteinase
PI	propidium iodide
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
siRNA	short interfering RNA
TBS-T	tris buffered saline with tween 20
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase

第一章

椎間板細胞の栄養飢餓に関連する遺伝子の網羅的発現解析

緒言

椎間板組織変性の原因として、椎間板への栄養供給が関与することが報告されている⁸。椎間板への血流供給は乏しく、線維輪および椎体終板に囲まれた髄核組織は無血管野であり、髄核は椎体終板からの拡散により栄養状態が維持されている⁸。椎体終板-椎骨間における毛細血管が椎間板への栄養供給に重要な役割を担っており、椎体終板の骨硬化により椎間板への栄養供給が減少することで、椎間板の変性変化が進行することが報告されている⁴。また、Sudoらはラットおよびウサギ椎間板細胞を血清飢餓状態にすることでアポトーシスが誘導され、type II collagen や aggrecan といった細胞外マトリックスの発現が減少することを報告している^{9,10}。

このように、椎間板への栄養供給の低下が椎間板組織の変性変化の進行を引き起こすことが指摘されているが、その詳細な分子メカニズム等は十分解明されていない。そこで、椎間板細胞の栄養飢餓に関連する遺伝子を解析し同定することは、椎間板変性病態メカニズムの解明、および新たな椎間板変性治療のターゲットとなる可能性があると考えられた。そこで我々は、椎間板細胞血清除去モデルを使用し、椎間板細胞の栄養飢餓に関する遺伝子群を網羅的に解析した。

本研究において、椎間板細胞は栄養飢餓状態において、DNA damage checkpoint およびアポトーシスに関連する遺伝子群に変動が認められたのでここに報告する。

実験方法

ラット・ヒト髄核細胞血清除去モデル

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。13 週齢雄 Sprague-Dawley ラットを安楽死させ、顕微鏡下にゲル状の髄核組織を採取した。まずラット髄核組織の免疫染色 (type I collagen, type II collagen, aggrecan) を行った (Figure 1)。採取した組織を 10% ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋。パラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、アルコール処理、水洗いした後、pH 6.0 のクエン酸緩衝液でマイクロウェーブ 5 分処理 (type I collagen, aggrecan) または proteinase K (Dako, Kyoto, Japan) で 6 分処理 (type II collagen) した。phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、1% 過酸化水素メタノール処理後、抗 type I collagen 抗体 (1:200; Abcam, Cambridge, UK), 抗 type II collagen 抗体 (1:50; Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan), 抗 aggrecan 抗体 (1:100; Abcam) を使用し、一次抗体反応を室温で 60 分行った。Envision (Dako) で処理し、DAB にて発色、ヘマトキシリンで後染色した。得られた組織の細胞外基質は type II collagen, aggrecan に濃染し、type I collagen は陰性であり、髄核組織であることを確認した (Figure 1)。

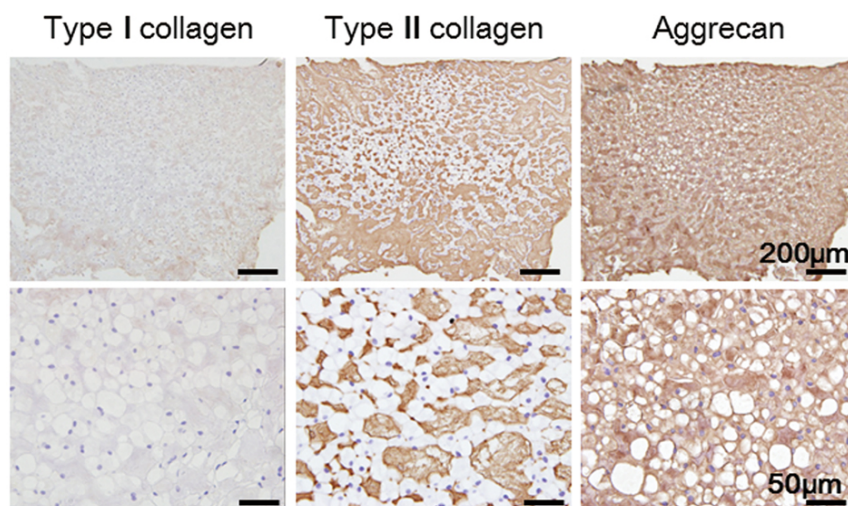


Figure 1. ラット髄核組織 type I collagen, type II collagen, aggrecan 免疫染色。

ラット髄核組織を 0.25% Collagenase (Wako, Osaka, Japan) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) で 37°C, 4 時間処理し、髄核細胞を単離した。得られた髄核細胞を 1% penicillin/streptomycin, 1.25µg/ml

fungizone (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% fetal bovine serum (FBS) を含む DMEM を培養液として 37°C, 5% CO₂ で培養し, 2 継代の細胞を実験で使用した.

本研究は北海道大学倫理委員会の承認のもと実施した. 思春期特発性側弯症患者より同意の元, 術中採取した非変性椎間板組織より髓核組織を取り出した. 本組織もラットより採取した組織と同様に type I collagen, type II collagen, aggrecan 免疫染色を施行し, 髓核組織であることを確認した (Figure 2).

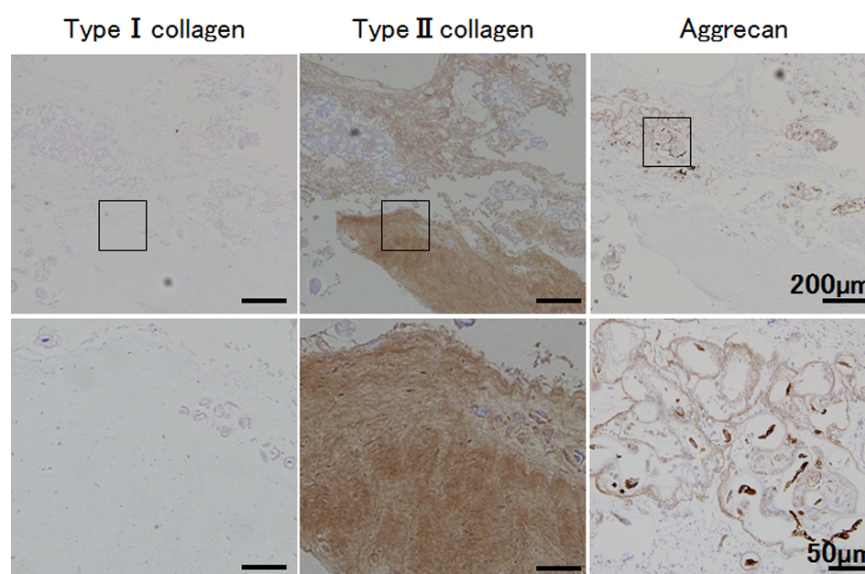


Figure 2. 非変性椎間板組織より採取したヒト髓核組織 type I collagen, type II collagen, aggrecan 免疫染色.

ラット髓核組織と同様に, 0.25% Collagenase (Wako) を含む DMEM 培地で 37°C, 4 時間処理し, 髓核細胞を単離・継代し, 2 継代の細胞を実験で使用した.

髓核細胞の栄養飢餓状態を再現するため, *in vitro* 血清除去モデルを採用した⁹. 平面培養した髓核細胞よりメディウムを除去し, PBS で 2 回洗浄後, 血清を含まない DMEM, 1% penicillin/streptomycin, 1.25µg/ml fungizone 培地を加え, 37°C, 5% CO₂, 20%O₂ の条件でインキュベートを行った (血清除去細胞). 対照群として, 10%FBS を含む DMEM, 1% penicillin/streptomycin, 1.25µg/ml fungizone 培地を用い, 同条件でインキュベートを施行した (非血清除去細胞).

マイクロアレイ解析

血清除去 48 時間後および血清含有培地で培養したラット髓核細胞より, FastPure RNA Kit (TaKaRa BIO, Otsu, Japan)を使用し RNA を抽出した. 500ng の RNA を使用し, Whole Rat Genome Oligo DNA Microarray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った. 非血清除去細胞と比較し, 血清除去細胞において 1.5 倍以上の発現変動がみられた遺伝子プローブを検出した. 得られた発現変動遺伝子から, Gene Ontology (GO) 解析 (<http://geneontology.org/>) および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) pathway 頻度解析 (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>) を行った. 次いでマイクロアレイ解析の再現性を確認するため, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) アレイ解析を行った. 1 μ g のラット髓核細胞 total RNA から逆転写にて complementary DNA (cDNA) を合成し, RT² Profiler PCR Arrays (Rat Cell Cycle, SABiosciences, Frederick, MD) を用いて qRT-PCR アレイを施行した. mRNA の発現量はハウスキーピング遺伝子 *Rplp1* と *Actb* の発現量により標準化した.

qRT-PCR analysis

ラット・ヒト髓核細胞より NucleoSpin RNA II Kit (TaKaRa BIO) を用いて RNA を採取し, 逆転写にて cDNA を合成し, SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa BIO) を用いて qRT-PCR を施行した.

使用したプライマーのシークエンスは, ラット p53; 5'-TGCAGTCAGGGACAGCCAAG-3' and 5'-GAGGTGACCCACAACCTGCACA-3', ラット caspase 3 ; 5'-GAGACAGACAGTGGAAGTACGATG-3' and 5'-GGCGCAAAGTGACTGGATGA-3', ラット glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); 5'-GACAACCTTTGGCATCGTGGA-3' and 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGC-3', ヒト caspase 3 ; 5'-ACAGAACTGGACTGTGGCATTGAG-3' and 5'-GGCACAAAGCGACTGGATGA -3', ヒト GAPDH ; 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' and 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'である. 各 mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した.

Western blot analysis

血清除去 6 時間および 48 時間後のラット・ヒト髓核細胞より, 冷却した T-PER tissue protein extraction reagent (Pierce, Rockford, IL) を加えタンパクを抽出した. 得られた各細胞抽出液を用いて western blot 解析を行った. 20 μ g のタンパクを還元処理し, SDS-PAGE (4-12% polyacrylamide gel) により分画し, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンへ転写した. 5% 脱脂粉乳/ Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) にてブロッキング後, 1 次抗体反応を 4°C で一晩行った. 1 次抗体には抗 p15^{Ink4b} 抗体 (Abcam,

UK), 抗 p16^{Ink4a} 抗体 (Abcam), 抗 p21^{Cip1} 抗体 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), 抗 p27^{Kip1} 抗体 (Santa Cruz), 抗 p53 抗体 (Abcam), 抗 caspase 3 抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA), 抗 cleaved caspase 3 抗体 (Cell Signaling) を 1:1000 に希釈し使用した. 1 次抗体反応終了後, horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:10000 dilution; Cell Signaling) を加え, 2 次抗体反応を室温で 1 時間行った. 反応終了後, メンブレンを TBS-T で洗浄し, 化学発光基質 Super Signal West Dura Extended Substrate (Thermo scientific, Waltham, MA) を用いて目的タンパク質の検出を行った. 各タンパク発現量は全て β -actin の発現量により標準化した.

髄核細胞への siRNA 導入

ラット p53 siRNA (sequence 1: 5'-CAAUUUCCCUCAAUAAGCUTT-3' and 5'-AGCUUAUUGAGGGGAAUUGTT-3'; sequence 2: 5'-CCACUAUCCACUACAAGUATT-3' and 5'-UACUUGUAGUGGAUAGUGGTT-3'), およびラット caspase 3 siRNA を作成した (sequence 1: 5'-GCACAUCCUCACUCGUGUUTT-3' and 5'-AACACGAGUGAGGAUGUGCTT-3'; sequence 2: 5'-GAAAGCCGAAACUCUUCAUTT-3' and 5'-AUGAAGAGUUUCGGCUUUCTT-3'). 対照群として scrambled negative control siRNA (control siRNA) を作成した (sequences: 5'-UCUUAUAUCGCGUAUAAGGCTT-3' and 5'-GCCUUAUACGCGAUUAAGATT-3').

また, ヒト caspase 3 siRNA (sequence 1: 5'-GCAUAUCAGUUGAGCUUCATT-3' and 5'-UGAAGCUCAACUGAUUAUGCTT-3'; sequence 2: 5'-GUAGAAGAGUUUCGUGAGUTT-3' and 5'-ACUCACGAAACUCUUCUACTT-3'), およびヒト control siRNA を作成した (sequences: 5'-UCUUAUAUCGCGUAUAAGGCTT-3' and 5'-GCCUUAUACGCGAUUAAGATT-3').

siRNA 導入は Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) を使用した. siRNA 最終濃度 50nmol に調整し, 抗生剤を除いた FBS10%を含む DMEM 培地に混和し siRNA を導入した. siRNA 導入 48 時間後に血清除去を開始した.

Caspase 3 免疫蛍光染色

ラット髄核細胞への caspase 3 siRNA 導入効果を確認するため, caspase 3 免疫蛍光染色を行った. 平面培養したラット髄核細胞を PBS で洗浄後, 1%パラホルムアルデヒドで 20 分固定し, 0.5% TritonX-100-PBS で処理し, 1% bovine serum albumin (BSA)/PBS でブロッキングし, 抗 caspase 3 抗体 (1:100 dilution; Thermo Scientific) を用いて 1 次抗体反応を 4°C で一晩行った. fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヤギ IgG

抗体 (1:100 dilution; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を加え, 2 次抗体反応を室温で 30 分行った. PBS で洗浄後, 蛍光顕微鏡で観察した.

フローサイトメトリーによる細胞周期, アポトーシス評価

フローサイトメトリーにて, 血清除去 48 時間後のラット髄核細胞の細胞周期, アポトーシスを評価した. Propidium iodide (PI) 染色法を用いて, ラット髄核細胞の細胞周期を解析した. ラット髄核細胞を遠沈しペレットを得た後, 70%エタノールにて固定し, PI 50 μ l にて DNA を染色しフローサイトメトリーにて測定した. アポトーシスは FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用し評価した. ペレットを 100 μ l の FITC, PI を含む binding buffer でインキュベートし評価した. フローサイトメトリーで早期アポトーシス細胞 (FITC+/ PI-) と後期アポトーシス (FITC+/ PI+) を測定した.

統計分析

得られたデータは Student's *t* test または ANOVA を用いて有意差検定を行い, 判定は P 値 <0.05 で有意差ありとした.

実験結果

髄核細胞は血清飢餓状態で細胞周期関連遺伝子群の発現が変動する

血清除去48時間後のラット髄核細胞を用い、マイクロアレイ解析を行った。非血清除去細胞と比較したところ、2922プローブの発現変動が確認された。得られた発現変動遺伝子プローブよりGO解析を行ったところ、血清除去により生物学的プロセスのカテゴリにおいて*regulation of physiological process*, *response to environmental stimulus*, *response to extracellular stimulus*, *response to nutrient levels*らのGO termの出現頻度が有意にup-regulateし (Table 1), *anatomical structure development*, *organ development*, *anatomical structure morphogenesis*らの出現頻度がdown-regulateしていた (Table 2)。また、血清除去髄核細胞において*regulation of programmed cell death*, *regulation of cell proliferation*に関連する遺伝子群に変動がみられていた。さらに、血清除去髄核細胞において、GO term: *response to nutrient levels*に関連し発現変動がみられた遺伝子群を同定した (Table 3)。

GO annotation	P-value	Count
response to external stimulus	6.43×10^{-13}	64
regulation of biological process	4.82×10^{-12}	191
regulation of cellular process	1.66×10^{-11}	170
developmental process	1.02×10^{-10}	155
biological regulation	2.2×10^{-10}	200
response to wounding	6.09×10^{-10}	42
anatomical structure development	8.89×10^{-10}	122
response to stress	9.36×10^{-10}	75
immune system process	1.67×10^{-09}	59
system development	5.54×10^{-09}	110
positive regulation of biological process	6.73×10^{-09}	90
multicellular organismal development	2.42×10^{-08}	118
positive regulation of cellular process	3.82×10^{-08}	81
cellular developmental process	1.66×10^{-07}	104
cell differentiation	1.66×10^{-07}	104
inflammatory response	1.76×10^{-07}	26
behavior	1.94×10^{-07}	35
response to extracellular stimulus	2.89×10^{-07}	21
organ development	4.69×10^{-07}	88
defense response	7.88×10^{-07}	35
lipid metabolic process	9.14×10^{-07}	47
response to nutrient levels	9.56×10^{-07}	20
regulation of cell proliferation	1.20×10^{-06}	43
immune response	1.91×10^{-06}	36
regulation of multicellular organismal process	2.02×10^{-06}	39
regulation of developmental process	4.59×10^{-06}	34
locomotory behavior	4.78×10^{-06}	21
cellular lipid metabolic process	7.26×10^{-06}	41
cell development	7.41×10^{-06}	79
regulation of metabolic process	8.11×10^{-06}	102
tissue development	1.27×10^{-05}	31
cellular component organization and biogenesis	1.42×10^{-05}	118
regulation of cellular metabolic process	2.28×10^{-05}	94
membrane organization and biogenesis	2.46×10^{-05}	24
carboxylic acid metabolic process	3.15×10^{-05}	40
organic acid metabolic process	3.15×10^{-05}	40
positive regulation of apoptosis	4.63×10^{-05}	25
positive regulation of programmed cell death	5.13×10^{-05}	25
anatomical structure morphogenesis	5.77×10^{-05}	68
cell proliferation	8.17×10^{-05}	46
negative regulation of cellular process	8.55×10^{-05}	65
regulation of programmed cell death	8.97×10^{-05}	41
regulation of cell differentiation	0.000112264	24
response to other organism	0.000117083	20
response to biotic stimulus	0.00012937	23
response to drug	0.00014258	24
nervous system development	0.000146085	49
response to organic substance	0.000171546	26
negative regulation of biological process	0.000174563	68
regulation of apoptosis	0.00028338	39

Table 1. 血清除去ラット髄核細胞で up-regulate した GO term (*P*-value 低値の top 50). count はその GO term に分類された遺伝子数を表す.

GO annotation	P-value	Count
anatomical structure development	2.17×10^{-19}	147
developmental process	3.35×10^{-19}	178
system development	1.44×10^{-18}	135
multicellular organismal development	3.78×10^{-18}	145
organ development	1.64×10^{-15}	111
anatomical structure morphogenesis	1.11×10^{-11}	88
cell development	3.77×10^{-11}	95
response to external stimulus	4.06×10^{-11}	60
response to wounding	4.9×10^{-10}	42
cellular developmental process	8.63×10^{-10}	111
cell differentiation	8.63×10^{-10}	111
multicellular organismal process	9.86×10^{-10}	196
regulation of cell proliferation	2.06×10^{-08}	47
nervous system development	2.39×10^{-08}	60
organ morphogenesis	2.91×10^{-08}	48
cell proliferation	4.72×10^{-08}	55
tissue development	1.74×10^{-07}	35
negative regulation of biological process	2.35×10^{-07}	78
positive regulation of biological process	3.73×10^{-07}	84
growth	6.44×10^{-07}	34
regulation of multicellular organismal process	6.53×10^{-07}	40
anatomical structure formation	8.84×10^{-07}	24
response to stress	1.03×10^{-06}	66
positive regulation of cell proliferation	1.15×10^{-06}	31
wound healing	1.30×10^{-06}	21
neurogenesis	1.38×10^{-06}	40
blood vessel development	1.38×10^{-06}	24
blood vessel morphogenesis	1.47×10^{-06}	22
regulation of biological process	1.48×10^{-06}	169
cell death	1.63×10^{-06}	54
vasculature development	1.84×10^{-06}	24
heart development	1.84×10^{-06}	20
death	1.94×10^{-06}	54
apoptosis	2.15×10^{-06}	52
biological regulation	2.8×10^{-06}	182
regulation of biological quality	3.01×10^{-06}	51
programmed cell death	3.07×10^{-06}	52
regulation of programmed cell death	3.19×10^{-06}	45
circulation	3.89×10^{-06}	20
regulation of developmental process	3.93×10^{-06}	34
second-messenger-mediated signaling	4.28×10^{-06}	21
neuron differentiation	4.33×10^{-06}	34
regulation of apoptosis	5.22×10^{-06}	44
generation of neurons	5.49×10^{-06}	36
negative regulation of cellular process	5.54×10^{-06}	69
biological adhesion	6.06×10^{-06}	37
cell adhesion	6.06×10^{-06}	37
positive regulation of cellular process	1.44×10^{-05}	72
cell migration	1.64×10^{-05}	30
cell morphogenesis	1.66×10^{-05}	40

Table 2. 血清除去ラット髄核細胞で down-regulate した GO term (P-value 低値の top 50). count はその GO term に分類された遺伝子数を表す.

Gene Name	Entrez Gene No	Fold Change
Apolipoprotein C-III	24207	2.95
B-cell leukemia/lymphoma 2	24224	1.82
Glucokinase	24385	1.85
Jun oncogene	24516	1.65
Interleukin 6 signal transducer	25205	1.63
Oxytocin	25504	2.72
Glucose-6-phosphatase, catalytic	25634	1.58
Microtubule-associated protein tau	29477	1.53
Solute carrier family 8, member 1	29715	2.48
Transforming growth factor, beta receptor II	81810	1.64
Harakiri, BCL2 interacting protein	117271	6.29
NUAK family, SNF1-like kinase, 2	289419	1.59
Mucin 4	303887	3.92
ATP-binding cassette, sub-family A, member 1	313210	3.40
Breast cancer 2	360254	1.69

Table 3. 血清除去ラット髄核細胞で *response to nutrient levels* に関連し発現増加した遺伝子群.

得られた発現変動遺伝子プローブより KEGG pathway 頻度解析を行ったところ、血清除去細胞において有意な変動 ($P < 0.01$) が 17 pathway に認められた (Table 4). 最も有意でかつ出現頻度の高かった pathway である “pathways in cancer” は、細胞周期およびアポトーシスに関する pathway に密接に関係があり、細胞周期に注目し PCR アレイによる追認実験を行った. PCR アレイでは、細胞周期における DNA damage checkpoint に関連する遺伝子群に発現変動を認めた (Table 5).

Pathway (total gene count)	P-value	Count
<i>Up-regulated</i>		
Pathways in cancer (313)	0.00004	27
Fatty acid metabolism (41)	0.00012	8
Adipocytokine signaling pathway (64)	0.00061	9
Complement and coagulation cascades (67)	0.00087	9
Small cell lung cancer (92)	0.00237	10
B cell receptor signaling pathway (67)	0.00357	8
Tyrosine metabolism (29)	0.00424	5
PPAR signaling pathway (70)	0.00470	8
Toll-like receptor signaling pathway (90)	0.00675	9
T cell receptor signaling pathway (95)	0.00955	9
<i>Down-regulated</i>		
O-Glycan biosynthesis (6)	0.00034	6
Focal adhesion (185)	0.00058	18
Calcium signaling pathway (191)	0.00085	18
Glutathione metabolism (42)	0.00150	7
ECM-receptor interaction (73)	0.00297	9
Nitrogen metabolism (16)	0.00355	4
p53 signaling pathway	0.00357	9

Table 4. KEGG pathway 頻度解析で血清除去ラット髄核細胞に有意に発現変動のみられた pathway ($P < 0.01$).

Gene Symbol	Description	qRT-PCR		Array
		Fold change	P value	Fold change
Abl1	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase	1.78	0.033	1.28
Atm	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	1.86	0.015	1.43
Bca1	Breast cancer 1	1.57	0.020	1.69
Cnd1	CyidinD1	-1.51	0.024	-1.59
Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	1.68	0.016	1.31
Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1.82	0.038	1.58
Hus1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	1.74	0.042	1.46
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2	1.89	0.003	1.82
Rad21	RAD21 homolog (S. pombe)	1.62	0.003	1.49
Msh2	MutS homolog 2 (E. coli)	1.63	0.003	1.23
Notch2	Notch homolog 2 (Drosophila)	1.56	0.006	1.38
Ppm1d	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	1.74	0.039	1.39
Rad9	RAD9 homolog (S. pombe)	1.64	0.013	1.37
Stag1	Stromal antigen 1	1.52	0.044	1.52
Terf1	Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	1.56	0.007	1.24
Tfdp2	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	1.78	0.020	1.39
Tp53	Tumor suppressor protein p53	2.07	0.010	1.403

Table 5. qRT-PCR アレイで血清除去ラット髄核細胞に有意に発現変動のみられた遺伝子群.

注目すべき細胞周期・アポトーシス関連遺伝子として $p15^{\text{Ink4b}}$, $p16^{\text{Ink4a}}$, $p21^{\text{Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1}}$, $p53$ を挙げ, western blot による蛋白レベルの発現を評価した. 血清除去 6 時間, 48 時間後のラット髓核細胞を用いて評価したところ, $p15^{\text{Ink4b}}$, $p16^{\text{Ink4a}}$ の発現には変化が見られなかった (Figure 3A). $p21^{\text{Cip1}}$ は血清除去 6 時間で発現が増加し, 48 時間で低下した (Figure 3A, B). $p27^{\text{Kip1}}$, $p53$ は血清除去により発現が増加した (Figure 3A, B). また, ヒト髓核細胞においても同様の傾向がみられた (Figure 4).

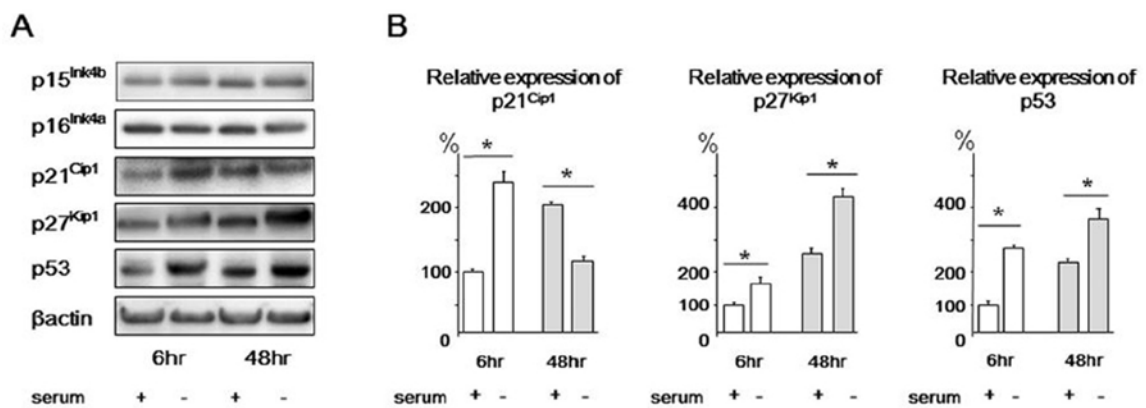


Figure 3. A) ラット髓核細胞血清除去における $p15^{\text{Ink4b}}$, $p16^{\text{Ink4a}}$, $p21^{\text{Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1}}$, $p53$ の western blot. B) $p21^{\text{Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1}}$, $p53$ 発現の densitometry による定量化. 発現量は β -actin により標準化. (n = 3 per group. Data shown are mean $\pm$ SD. * = $P < 0.05$)

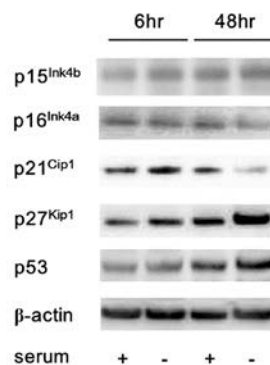


Figure 4. ヒト髓核細胞血清除去における $p15^{\text{Ink4b}}$, $p16^{\text{Ink4a}}$, $p21^{\text{Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1}}$, $p53$ の western blot.

p21^{Cip1} と p53 の相互機能解析

p21^{Cip1} は p53 の標的分子であり, p53 に依存して細胞増殖を停止させる主要な機能を有しており¹¹, p21^{Cip1} と p53 の関連性を解析した. ラット p53 siRNA を作成し髄核細胞へ導入したところ, qRT-PCR にて有意に p53 発現が抑制された (Figure 5A). 髄核細胞へ siRNA を導入後, 血清除去を 48 時間かけて western blot を施行した. 血清存在下では p53 siRNA 導入細胞で p53 発現は抑制され, p21^{Cip1} 発現は低下した. 血清除去により p53 発現は増加したが, p53 siRNA 導入細胞では抑制されていた (Figure 5B, C). p21^{Cip1} は血清除去により発現が低下したが, siRNA 非導入細胞・control siRNA 導入細胞と比べ p53 siRNA 導入細胞における p21^{Cip1} 発現に変化はみられなかった (Figure 5B, C).

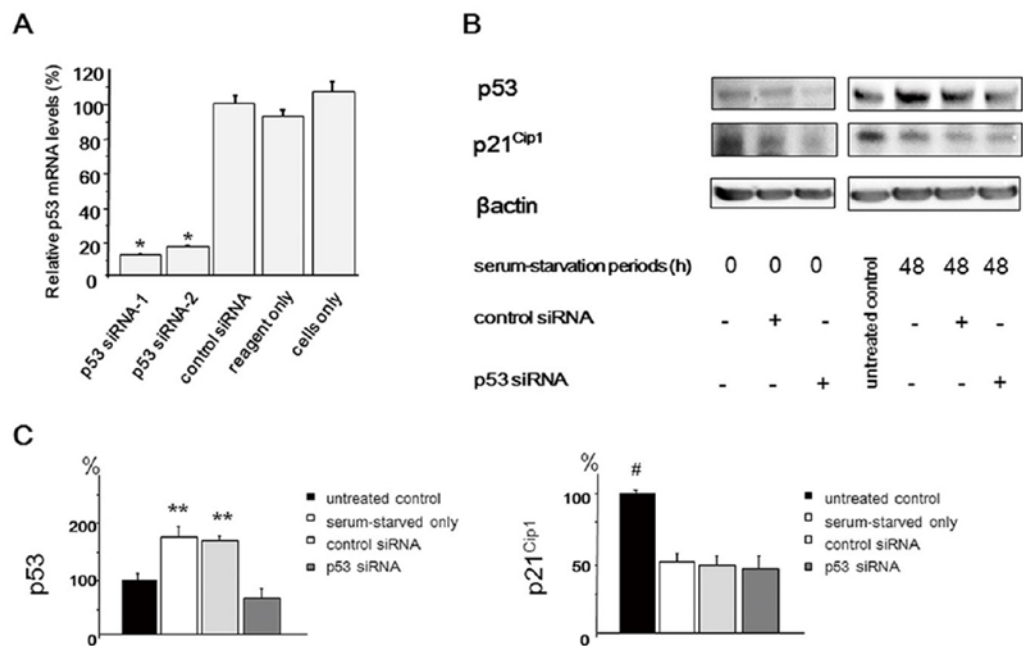


Figure 5. A) ラット髄核細胞へ p53 および control siRNA を導入し, 導入後 48 時間で RNA を回収, p53 mRNA 発現を qRT-PCR で解析. B) ラット髄核細胞 siRNA 導入後, 血清除去における p53, p21^{Cip1} の western blot. C) 血清除去 48 時間における p53, p21^{Cip1} 発現の densitometry による定量化. 発現量は β-actin により標準化. (n = 3 per group. Data shown are mean ± SD. * = $P < 0.05$ compared with control siRNA, reagent only, cells only, ** = $P < 0.05$ compared with untreated control, p53 siRNA, # = $P < 0.05$ versus all other groups)

p21^{Cip1} と caspase 3 の相互機能解析

p21^{Cip1} と caspase 3 はアポトーシスに関連して相互に関与していることが指摘されており^{12,13}, p21^{Cip1} と caspase 3 の関連性を解析した. ラット caspase 3 siRNA を作成し髄核細胞へ導入したところ, qRT-PCR にて有意に caspase 3 発現が抑制された (Figure 6A). また, caspase 3 免疫蛍光染色においても, caspase 3 siRNA 導入細胞で caspase 3 の発現は抑制されていた (Figure 6B). 髄核細胞へ siRNA を導入後, 血清除去を 48 時間かけて PCR アレイおよび western blot を施行した. PCR アレイでは p21^{Cip1} 発現が有意に増加していた (Table 6). Western blot では, 血清除去により cleaved caspase 3 発現は増加したが, caspase 3 siRNA 導入細胞では siRNA 非導入細胞・control siRNA 導入細胞に比べ発現は低下していた (Figure 6C, D). p21^{Cip1} は, 血清存在下では caspase 3 siRNA 導入細胞で発現が増加した. 血清除去 48 時間では, siRNA 非導入細胞・control siRNA 導入細胞では p21^{Cip1} 発現は低下したが, caspase 3 siRNA 導入細胞では発現が維持されていた (Figure 6C, D). また, ヒト caspase 3 siRNA を作成し, ヒト髄核細胞へ導入後血清除去をかけたところ, ラット髄核細胞と同様の傾向がみられた (Figure 7).

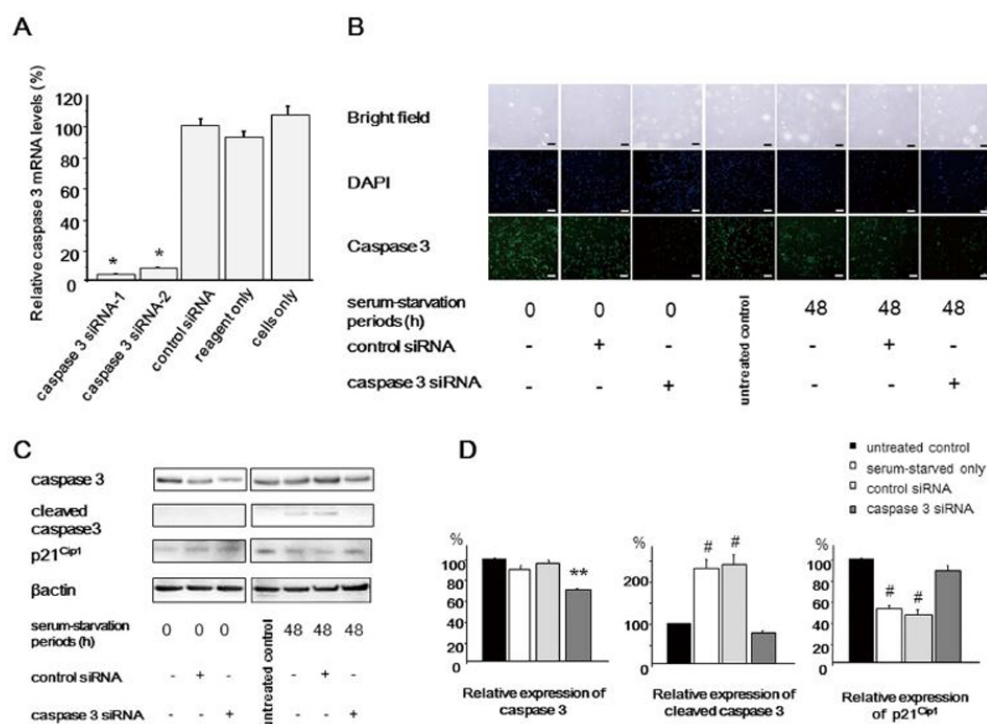


Figure 6. A) ラット髄核細胞へ caspase 3 および control siRNA を導入し, 導入後 48 時間で RNA を回収, caspase 3 mRNA 発現を qRT-PCR で解析. B) siRNA 導入後, 血清除去 0 時間, 48 時間における caspase 3 免疫蛍光染色. Bar = 200μm C) ラット髄核細胞 siRNA 導入後, 血清除去における caspase 3, cleaved caspase 3, p21^{Cip1} の western blot. D) 血清除去 48 時間における caspase 3, cleaved caspase 3, p21^{Cip1} 発現の densitometry による定量化. 発現量は β-actin により標準化. (n = 3 per group. Data shown are mean ± SD. * = P < 0.05

compared with control siRNA, reagent only, cells only, *** = $P < 0.05$ compared with all other groups, # = $P < 0.05$ versus untreated control, caspase 3 siRNA)

Gene symbol	Description	Fold change	P value
Casp3	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	-22.51	0.000038
Cna2	Cyclin A2	-1.92	0.033772
Ccnb2	Cyclin B2	-2.01	0.000215
Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21 ^{Cip1})	1.61	0.000000
Cdkn1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27 ^{Kip1})	1.20	0.022136
Chek1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	-1.26	0.009386
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	-1.18	0.079602
Dnajc2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	-1.05	0.002712
LOC289740	Similar to PES1 protein	-1.22	0.007056
E2f3	E2F transcription factor 3	-1.43	0.000482
Hus1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	-1.17	0.000981
Mad2l1	MAD2 (mitotic arrest deficient, homolog)-like 1 (yeast)	-1.67	0.000388
Mcm4	Minichromosome maintenance complex component 4	-1.32	0.021914
Npm2	Nucleophosmin/nucleoplasmin 2	-1.45	0.000564
Pkd1	Polycystic kidney disease 1 homolog (human)	1.34	0.012155
Pmp22	Peripheral myelin protein 22	-1.37	0.000479
Ran	RAN, member RAS oncogene family	-1.65	0.000005
Sfn	Stratifin	-1.29	0.046112
Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	1.43	0.000465

Table 5. qRT-PCR アレイで, caspase 3 siRNA 導入後の血清除去ラット髄核細胞に有意に発現変動のみられた遺伝子群.

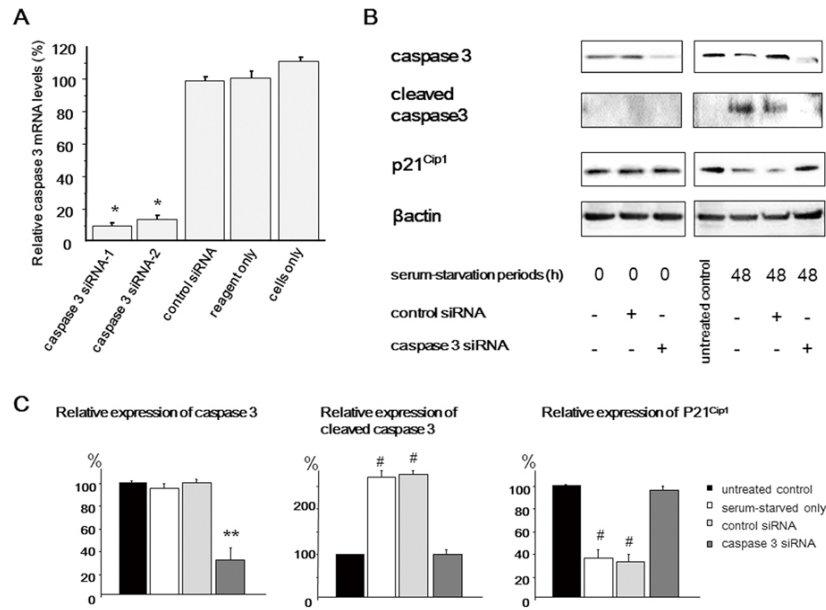


Figure 7. A) ヒト髓核細胞へcaspase 3およびcontrol siRNAを導入し、導入後48時間でRNAを回収, caspase 3 mRNA 発現を qRT-PCR で解析. **B)** ヒト髓核細胞 siRNA 導入後、血清除去における caspase 3, cleaved caspase 3, p21^{Cip1} の western blot. **D)** 血清除去 48 時間における caspase 3, cleaved caspase 3, p21^{Cip1} 発現の densitometry による定量化. 発現量は β-actin により標準化. (n = 3 per group. Data shown are mean ± SD. * = $P < 0.05$ compared with control siRNA, reagent only, cells only, ** = $P < 0.05$ compared with all other groups, # = $P < 0.05$ versus untreated control, caspase 3 siRNA)

続いてフローサイトメトリーにてラット髓核細胞への caspase 3 siRNA 導入による細胞周期、アポトーシスへの影響を調べた。血清除去 48 時間後では、siRNA 非導入細胞、control siRNA 導入細胞では G1 arrest がみられたが、caspase 3 siRNA 導入細胞ではこの変化が抑制されていた (Figure 8A, B)。アポトーシス評価では、血清除去 48 時間で siRNA 非導入細胞、control siRNA 導入細胞でアポトーシスが増加したが、caspase 3 siRNA 導入細胞では血清除去によるアポトーシスが抑制されていた (Figure 8C, D)。

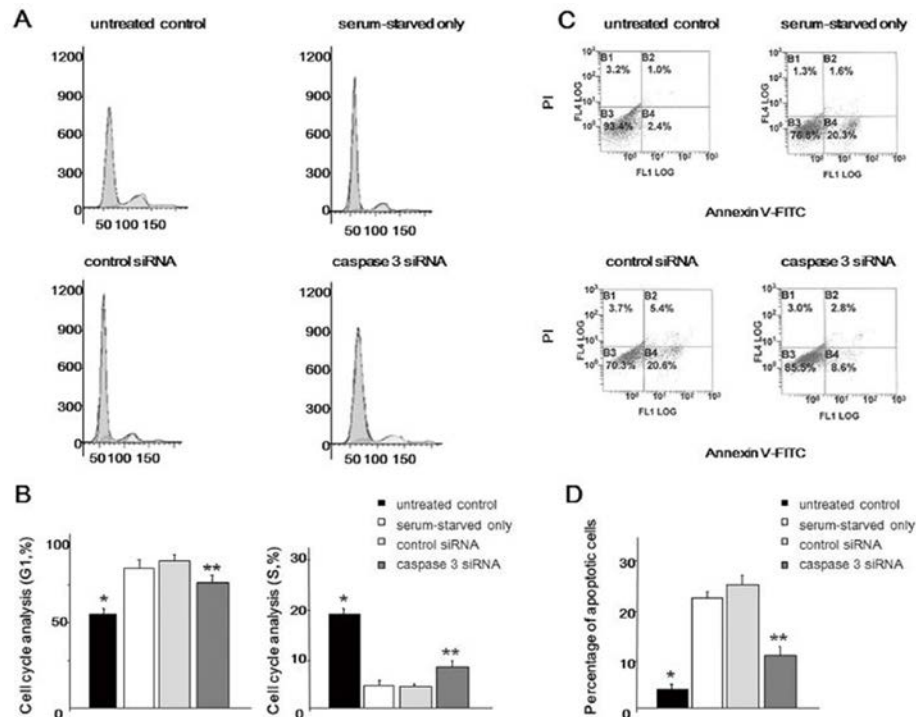


Figure 8. **A)** ラット髄核細胞へ caspase 3 および control siRNA を導入し、血清除去 48 時間におけるフローサイトメトリーによる PI 染色を用いた細胞周期評価. **B)** 各群における G1 期, S 期の比較. **C)** siRNA 導入後, 血清除去 48 時間における Annexin V-FITC を用いたアポトーシス評価. 早期アポトーシス (FITC+/PI-), 後期アポトーシス (FITC+/PI+). **D)** 各群におけるアポトーシス (早期+後期) 割合. (n = 3 per group. Data shown are mean $\pm$ SD. * = $P < 0.05$ versus all other groups, ** = $P < 0.05$ versus serum-starved only, control siRNA)

また、髄核細胞は低酸素状態で培養すると、血清除去により誘導されるアポトーシスに抵抗性を有すると報告されている¹⁴。そこで、2% O₂ の低酸素条件下でラット髄核細胞に血清除去を負荷し、タンパク発現を評価した (Figure 9)。低酸素条件下においても、通常酸素濃度と同様のタンパク発現傾向を示した。しかし、低酸素下血清除去細胞における各種タンパク発現の変化は、通常酸素濃度時に比べ発現変化が少なかった。

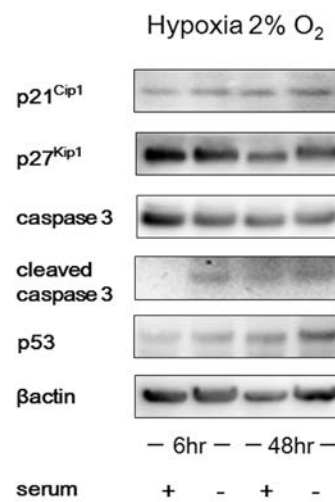


Figure 9. 低酸素条件下 (2% O₂) ラット髄核細胞血清除去における p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, caspase 3, p53 の western blot.

考察

本研究ではラット髄核細胞の血清除去モデルを用いて、椎間板細胞の栄養飢餓状態における遺伝子発現を網羅的に解析した。マイクロアレイ解析では、血清除去ラット髄核細胞において、細胞周期 DNA damage check point に関する遺伝子群 (*Atm*, *Brca1*, *Cdc25*, *Gadd45*, *Hus1*, *Ppm1D*, *Rad9*, *Tp53*, *Ccnd1*) に有意な変動がみられた。これらのうち、*Tp 53* (tumor suppressor protein p53) は癌抑制遺伝子として知られており、DNA 修復や細胞周期・細胞増殖の停止、アポトーシスの誘導などにかかわる機能を有している。*Ccnd1* (Cyclin D1) は、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase: CDK) 4/6 と結合し活性化されることで、細胞周期 G1 期から S 期へ移行に関与している。そこで G1 から S 期の移行において、サイクリン-CDK 複合体の調節に関わり、また p53 とも重要な関係を有する p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} に着目し、ラットおよびヒト髄核細胞を用いて実験を行った。

髄核細胞の血清除去モデルを用いて、western blot によるタンパクレベルの発現を評価したところ、p21^{Cip1}, p27^{Kip1} および p53 で有意な発現変化を認めた。p21^{Cip1}, p27^{Kip1} はサイクリン-CDK 複合体の活性を抑制し、細胞周期の進行に抑制的に働く CDK インヒビターである。また p21^{Cip1} は p53 の標的分子であり、DNA 損傷時における p53 に依存した細胞増殖停止の主要な機能を有している¹¹。血清除去におけるこれらのタンパク発現の増加は、細胞周期停止を引き起こし DNA 修復の時間をとる方向へ働いたものと考えられる。本研究では血清除去後早期 (6 時間) で p21^{Cip1} タンパク発現は増加したが、48 時間では反対に発現は低下していた。これは血清飢餓早期では p21^{Cip1} 発現が増加し、細胞周期を止めることで細胞保護的に働き、その後はアポトーシスを誘導する方向へ働いたものと考えられる。p21^{Cip1} は p53 により制御されており、髄核細胞へ siRNA を導入し内在性の p53 をノックダウンしたところ、血清存在下では p21^{Cip1} 発現は低下した。しかし血清除去 48 時間後では、p53 siRNA 導入細胞においても p21^{Cip1} 発現に変化はみられなかった。これらの所見より、血清存在下において p53 は p21^{Cip1} 発現に影響するものの、血清飢餓状態では p21^{Cip1} は p53 非依存的に制御されることが示唆された。

p21^{Cip1} は CDK インヒビターとして細胞周期を停止させ、アポトーシス関連遺伝子 caspase 3 を介してアポトーシス制御に関与している¹²。一方 caspase 3 は p21^{Cip1} を不活化し、その機能を抑制するとも報告されている¹³。本研究では血清除去により p21^{Cip1} 発現は低下したが、caspase 3 siRNA 導入細胞では p21^{Cip1} 発現は維持された。また、caspase 3 siRNA 導入細胞は血清飢餓における G1 arrest およびアポトーシスが抑制されていた。これらの所見より、caspase 3 のノックダウンが血清飢餓状態における髄核細胞の生理的な機能維持に働き、p21^{Cip1} は caspase 3 siRNA 導入により髄核細胞抗アポト

ーシス作用をもつことが示された。

本研究の限界として、椎間板の栄養飢餓状態を再現するために用いた血清除去モデルが挙げられる。生体内において、椎間板変性によりどの程度髄核への栄養供給が阻害されるのかは不明であり、血清を全く含まない血清除去モデルが生体内の低栄養状態を完全には反映していない可能性がある。しかし、血清除去モデルは広く行われている手法で、極度の栄養飢餓状態を再現出来る有用なモデルであり、本研究で採用した。また、本研究では細胞周期とアポトーシス、特に G1-S 期における分子メカニズムに着目し実験を進めたが、その他の有意に変動のみられた遺伝子群も椎間板細胞の栄養飢餓状態に重要な役割を有していることが考えられる。今後これらのメカニズムも合わせて明らかにしていく必要がある。

本研究において、椎間板細胞の血清飢餓状態において細胞周期 DNA damage check point に関する遺伝子群およびアポトーシス関連遺伝子群に有意な変動が認められた。これらの遺伝子群は、今後さらなる椎間板変性病態解析および治療のターゲットとなりうることが示唆された。そこで我々は、アポトーシス関連遺伝子に着目し caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することによる椎間板変性抑制効果について検討した。

第二章

生体力学的負荷に起因する椎間板細胞・組織の変性制御に関する研究

緒 言

椎間板組織の変性変化に髄核細胞のアポトーシスが関与することが、分子生物学的研究において報告されている^{6,7}。髄核はプロテオグリカンおよびタイプIIコラーゲンを含む豊富な細胞外基質を有しており、髄核細胞がこれらの細胞外マトリックスを産生することで椎間板機能の維持に重要な役割を担っている。椎間板変性では、髄核細胞がアポトーシスを起こし、それに伴い細胞外基質産生が減少し、組織の変性変化が進行する¹⁵。

Sudo らは椎間板細胞のアポトーシス機構の解析を行い、髄核細胞のアポトーシス関連遺伝子を遺伝子レベルで制御することで、アポトーシスの抑制および椎間板組織の変性抑制が可能であることを実証した⁹。アポトーシス実行因子である caspase 3 の発現を siRNA を用いてノックダウンすることにより、ウサギ椎間板穿刺変性モデルにおける *in vivo* 変性抑制効果を明らかにしている¹⁰。また、先行研究では髄核細胞の栄養飢餓状態において、細胞周期およびアポトーシス関連遺伝子群に変動がみられており、髄核細胞のアポトーシスは椎間板組織変性に対する治療ターゲットとなりうるということが考えられた。

一方で、脊椎の重要な構成要素である椎間板は生体内において常に荷重を受けている組織であり、椎間板への過度な力学的負荷は椎間板変性の重要な因子として報告されている^{16,17}。臨床において脊椎固定術後に隣接する椎間板の変性変化が進行することが指摘されているが、脊椎固定術モデルを用いた生体力学的研究より、固定隣接椎間への過度の応力集中が椎間板変性を進行させる要因であると報告されている⁵。また、力学的負荷に起因する椎間板変性に関しても、髄核細胞のアポトーシスが関連していると報告されている^{6,16}。

そこで我々は、生体力学的環境変化における椎間板変性に対して、髄核細胞のアポトーシスを抑制することで椎間板の変性変化を制御できるのではないかという仮説を立てた。これを検証するため、ヒト髄核細胞3次元培養モデルを用いた *in vitro* 試験と、ウサギ椎間板圧迫変性モデルを用いた *in vivo* 試験を行った。これらの実験において、力学的負荷による椎間板変性の病態を解析し、また caspase 3 siRNA を用いた髄核細胞 caspase 3 ノックダウンによる椎間板細胞死・組織変性抑制効果について検証した。

本研究において、椎間板細胞のアポトーシスを遺伝子レベルで阻害することで、生

体内環境に近似した状態において椎間板組織の変性変化が制御可能であったのでここに報告する.

実験方法

ヒト髄核細胞 3次元培養モデル

本研究は北海道大学倫理委員会の承認のもと実施した。思春期特発性側弯症患者より同意の元、術中採取した非変性椎間板組織より髄核組織を取り出した。0.25% Collagenase (Wako) を含む DMEM 培地で 37°C, 4 時間処理し、髄核細胞を単離した。得られた髄核細胞を 1% penicillin/streptomycin, 1.25µg/ml fungizone (Invitrogen), 10% FBS を含む DMEM を培養液として 37°C, 5% CO₂ で培養し、2 継代の細胞を実験で利用した。

ヒト髄核細胞を 0.25%トリプシン/EDTA (Invitrogen) にて剥がし、遠心分離で回収した。20% FBS を含む DMEM 培養液 1.0ml で懸濁し 2.0×10^6 cells/ml とし、PBS で溶解した低温融解アガロースゲル (Sigma-Aldrich) 1.0ml を加え、髄核細胞 2.0×10^6 cells/ml 含有 2%アガロース溶液を作成した¹⁸。4°C, 5 分間凝固後、直径 8mm, 厚さ 2mm の円柱状に採型した (Figure 10). 髄核細胞-アガロース複合体を 10% FBS を含む DMEM 培養液で一晩培養し、圧縮負荷試験を施行した。

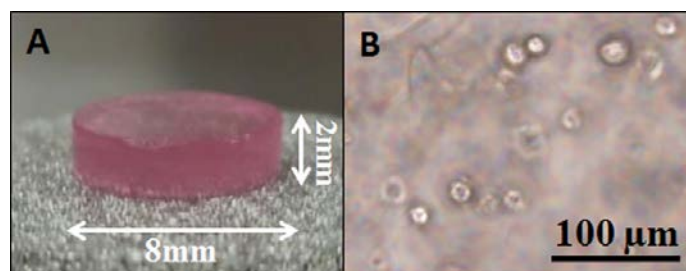


Figure 10. A) 髄核細胞-アガロースゲル複合体. **B)** アガロースゲルを用いて3次元培養した髄核細胞の顕微鏡写真.

ヒト髄核細胞への siRNA 導入

ヒト caspase 3 siRNA を作成した (sequences: 5'-GCAUAUCAGUUGAGCUUCATT-3' and 5'-UGAAGCUCAACUGAUAUGCTT-3'). 対照群として scrambled negative control siRNA (control siRNA) を作成した (sequences: 5'-UCUUAUACGCGUAUAAGGCTT-3' and 5'-GCCUUAUACGCGAUAUAAGATT-3').

siRNA 導入は Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) を使用した。siRNA 最終濃度 50nmol に調整し、抗生剤を除いた FBS10%を含む DMEM 培地に混和し siRNA を導入した。siRNA 導入 48 時間後に細胞を回収し、ヒト髄核細胞-アガロース複合体を作成した。

力学的圧縮負荷試験

自作の圧縮試験器を用いて、ヒト髄核細胞－アガロース複合体に圧縮負荷を与えた (Figure 11). 液体透過性を有する多孔質金属プレート上に髄核細胞－アガロース複合体を設置し、圧力モニター (50N Load cell; Kyowa Electronic Instruments, Tokyo, Japan) 下に金属製圧子を用いて静的圧縮負荷を与えた. 初期試料の高さに対し、25%の圧縮負荷を与え評価をおこなった. すべての試験は 37°C, 5% CO₂ の条件下にインキュベーターで施行した.

4 群の髄核細胞－アガロース複合体を設定した.

- (a) Unloaded control: siRNA 非導入髄核細胞－アガロース複合体, 非圧縮群.
- (b) Compression only group: siRNA 非導入髄核細胞－アガロース複合体, 圧縮群.
- (c) Control siRNA group: control siRNA 導入髄核細胞－アガロース複合体, 圧縮群.
- (d) Caspase 3 siRNA group: caspase 3 siRNA 導入髄核細胞－アガロース複合体, 圧縮群.

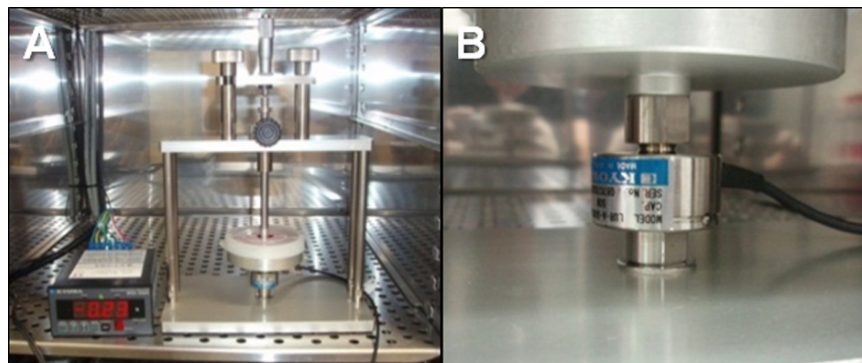


Figure 11. A) インキュベーター内に設置した静的圧縮試験器. **B)** 圧力モニターにて髄核－アガロースゲル複合体にかかる圧力を計測.

細胞生存率・アポトーシス評価

圧縮負荷後のヒト髄核細胞－アガロース複合体における細胞生存率を、蛍光染色にて評価した. 生細胞・死細胞の染色にそれぞれ Calcein-AM, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Dojindo, Kumamoto, Japan)を使用した. 圧縮負荷後の髄核細胞－アガロース複合体を PBS で 5 分, 3 回洗浄し, Calcein-AM (1 μ g/ml), DAPI (1 μ g/ml)を含む PBS で 37°C, 1 時間処理した¹⁹. PBS で 5 分, 3 回洗浄後, ゲルを 0.5mm の厚さにスライスし蛍光顕微鏡で観察した. 緑 (Calcein-AM), 青 (DAPI) に染まった細胞数をそれぞれ

無作為に抽出した5視野で計測し、細胞生存率はCalcein-AM 陽性細胞数のCalcein-AM, DAPI 陽性細胞数の和に対する割合で算出した。

髄核細胞のアポトーシスは In Situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa BIO) を用いて terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色を施行し、評価した。TUNEL 陽性細胞数をそれぞれ無作為に抽出した5視野で計測し、TUNEL 陽性細胞率は総細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の割合で算出した。

Western blot analysis

圧縮負荷後の髄核細胞-アガロース複合体を PBS で2回洗浄し、100U/ml agarase (Sigma-Aldrich) で37°C, 1時間処理した。PBS で2回洗浄後、回収した細胞に冷却した T-PER tissue protein extraction reagent (Pierce) 100 μ l を加えタンパクを抽出した。得られた各細胞抽出液を用いて western blot 解析を行った。20 μ g のタンパクを還元処理し、SDS-PAGE (4-12% polyacrylamide gel) により分画し、PVDF メンブレンへ転写した。5% 脱脂粉乳/TBS-T にてブロッッキング後、1次抗体反応を4°C で一晩行った。1次抗体には抗 caspase 3 抗体 (Cell Signaling), 抗 cleaved caspase 3 抗体 (Cell Signaling), 抗 matrix metalloproteinase (MMP)-3 抗体 (Santa Cruz), 抗 MMP-13 (R&D systems, Boston, MA), 抗 α disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif (ADAMTS)-4 抗体 (Abnova, Taipei, Taiwan), 抗 ADAMTS-5 抗体 (Santa Cruz), 抗 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 抗体 (Abcam), 抗 type II collagen 抗体 (Abcam), 抗 aggrecan 抗体 (Abcam), 抗 integrin α 5 β 1 (Chemicon, Temecula, CA) を1:1000 に希釈し使用した。1次抗体反応終了後、それぞれ HRP 標識抗ウサギ・マウス IgG 抗体(1:10000 dilution; Cell Signaling), 抗ヤギ IgG 抗体 (1:10000 dilution; Santa Cruz) を加え、2次抗体反応を室温で1時間行った。反応終了後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、化学発光基質 Super Signal West Dura Extended Substrate (Thermo scientific) を用いて目的タンパク質の検出を行った。各タンパク発現量は全て β -actin の発現量により標準化した。

ウサギ椎間板圧迫変性モデルの作製, caspase 3 siRNA 導入

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。4-5 ヶ月齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5kg) を使用し、椎間板圧迫変性モデルを作成した。腰椎椎間板に創外固定器を装着し、バネを用いて圧迫負荷をかけるモデルを採用した²⁰。自作の創外固定器を作成し、校正器でバネ長と圧迫力との関係を計測した (Figure 12A)。圧迫力 150N までバネ長と圧縮力との関係は比例関係にあり、圧迫力の調整が可能であった (Figure 12B)。

ペントバルビタール (30mg/kg) による静脈麻酔と 1%キシロカインの局所麻酔を併し手術を施行した。電動ドリルを用いて第 4・5 腰椎椎体にそれぞれ平行に刺入した 1.5mm 径の K-wire 2 本に、経皮的に刺入した 4 本のステンレス製ピンを連結させ、創外固定器を装着した (Figure 12C)。校正器で調整したバネを用いて、第 4・5 腰椎間に圧迫を負荷した。創外固定器を装着し、圧迫をかけないものを Sham 群とした。

ウサギ caspase 3 siRNA は先行研究に従い作成した (sequences: 5'-CGUCCCCGGUCUGGUACAGAUGUAAA-3' and 5'-UUUACAUCUGUACCAGACCGGGACG-3')¹⁰。対照群として control siRNA を作成した (sequences: 5'-CGUUGGCGGUCACAUGUAGUCCAAA-3' and 5'-UUUGGACUACAUGUGACCGCCAACG-3')。各 siRNA は Invivofectamine Reagent (Invitrogen) を用い、最終濃度 1 μ g/ μ m に調整した。圧迫開始 1 週間後、X 線透視下に 27G の注射針とマイクロシリンジを用い、第 4/5 腰椎椎間板へ siRNA-Invivofectamine Reagent 混合液 10 μ l を注入した (Figure 12D)。siRNA 注入後 8 週、16 週で評価を行った。

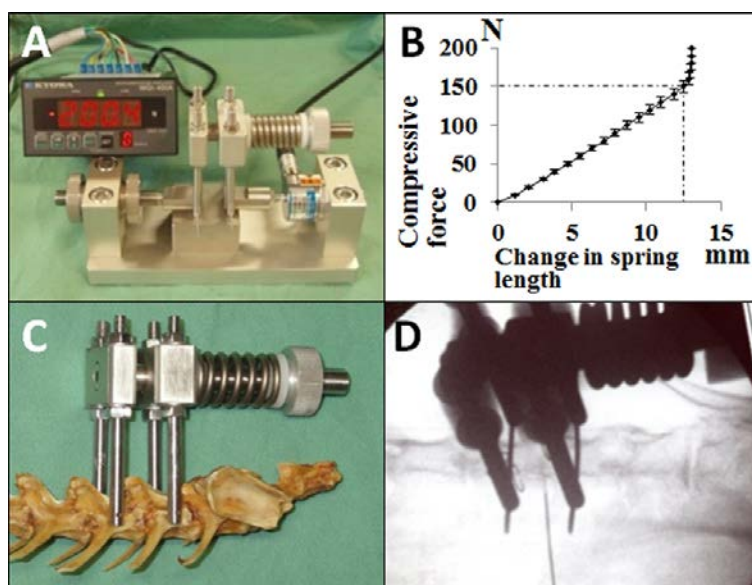


Figure 12. A) 椎間板圧迫創外固定器と校正器。 B) バネ長と圧迫力の関係を校正器で計測。 C) ウサギ第 4-5 腰椎へ創外固定器を設置。 D) 透視下に第 4/5 腰椎椎間板に siRNA を注入。

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

椎間板変性を評価するため、7.0-Tesla MR scanner (Unity Inova, Varian) を用い評価した。siRNA 導入後 8 週、16 週にペントバルビタールを過量投与し安楽死させ腰椎を切

除し, 63mm 径表面コイルを使用し, T2 強調矢状断, 冠状断 (1mm-thick, 10×10 cm field of view, 512×256 matrix size) を撮像した (repetition time 2500 msec, time to echo 80 msec). 椎間板変性の重症度を評価するため, Pfirrmann 分類を用いてスコア化した²¹. 本分類は MRI における椎間板変性を 5 段階 (1: normal~5: highly degenerative) に評価している.

また, Analyze 10.0 software (AnalyzeDirect) を用いて, 矢状断における MRI index (髄核の平均信号強度と髄核面積の積) を測定し定量的に評価した²². siRNA 導入椎間板における MRI index を, sham 群の MRI index に対する割合で評価した.

組織切片の作製・椎間板変性の組織学的評価

MRI 撮像後, 10%ホルムアルデヒドでサンプルを固定, 10% EDTA (pH 7.5)で脱灰処理し, パラフィンに包埋. 矢状断 5- μ m 厚のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし, アルコール処理, 水洗いした後, Hematoxylin & Eosin (HE) 染色, サフラニン-O 染色を施した. 椎間板変性の重症度は Masuda の分類を用いてスコア化した²³. 本分類は 4 種類のカテゴリ (線維輪の配列, 線維輪と髄核の境界, 髄核細胞数, 髄核細胞外マトリックス) からなり, 4 点 (normal) ~12 点 (highly degenerative) のスコアとなる. また HE 染色において, 無作為に選択した 5 視野において単位面積あたりの髄核細胞数を計測した. TUNEL 染色は, In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa BIO) を用いて施行し, DAB (Dako) で発色した. Cleaved caspase 3, MMP-3, integrin $\alpha 5\beta 1$ 免疫染色を行った. 一次抗体には抗 cleaved caspase 3 抗体 (1:100; Cell Signaling), 抗 MMP-3 抗体 (1:50; Santa Cruz), 抗 integrin $\alpha 5\beta 1$ 抗体 (1:200, Chemicon) を使用した. 前処理として cleaved caspase 3 はオートクレーブ処理, integrin $\alpha 5\beta 1$ は Proteinase K (Dako)で 20 分処理を行った. PBS 洗浄後 1% 過酸化水素メタノール処理し, 一次抗体反応を行い Envision (Dako) (cleaved caspase 3, integrin $\alpha 5\beta 1$) または biotinylated anti-goat IgG (1:100; Vector, Burlingame, CA), AVC reagent (Vector) (MMP-3) で処理し, DAB にて発色, hematoxylin で後染色した. 無作為に選択した 5 視野において, TUNEL, cleaved caspase 3, MMP-3, integrin $\alpha 5\beta 1$ 陽性細胞数を計測した.

統計分析

得られたデータは Student's *t* test または ANOVA を用いて有意差検定を行い, 判定は *P* 値<0.05 で有意差ありとした.

実験結果

ヒト髄核細胞は静的圧縮負荷により細胞外基質分解酵素の発現上昇を伴い細胞死が進行する

ヒト髄核細胞－アガロース複合体へ静的軸圧縮を負荷し，髄核細胞へ与える影響を評価した．初期試料の厚さに対して 30%以上の圧縮負荷を与えたところ，髄核細胞－アガロース複合体は破壊されてしまい，耐える最大負荷の 25%圧縮負荷を採用した．圧縮負荷による髄核細胞－アガロース複合体への圧力を圧モニターにて計測すると，応力緩和曲線に示すように髄核細胞－アガロース複合体は粘弾性の動態を示した (Figure 13)．圧縮により一時的に 19.6 ± 2.1 kPa まで圧力は増加し，2 分後には速やかに 1.8 ± 0.4 kPa まで低下した．圧縮負荷後 1 時間で 1.0 ± 0.16 kPa まで圧力は緩徐に低下し，その後 24 時間まで持続的に圧力がかかっていた (Figure 13)．

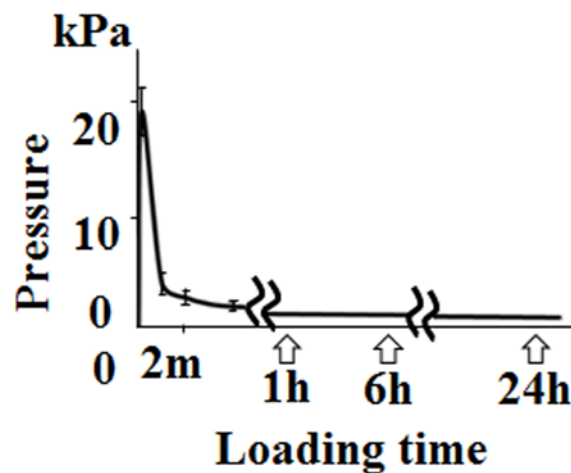


Figure 13. ヒト髄核細胞－アガロースゲル複合体へ 25%静的圧縮負荷をかけ，ゲルへの圧力を計測（応力緩和曲線）．

まず，圧縮負荷をヒト髄核細胞－アガロース複合体へ 0~24 時間与え評価を行った．Calcein-AM 蛍光染色による細胞生存率評価では，圧縮群で非圧縮群に比べ髄核細胞生存率は有意に低下した (Figure 14A)．TUNEL 染色による髄核細胞アポトーシス評価では，圧縮群で TUNEL 陽性細胞率が有意に増加した (Figure 14A)．Western blot では，圧縮負荷により cleaved caspase 3 発現が有意に増加した (Figure 14B)．また，MMP-3, MMP-13, ADMATS-4, ADAMTS-5 の発現は圧迫群で非圧迫群に比べ増加した．一方，TIMP-1, type II collagen, aggrecan 発現は圧迫に伴い減少した (Figure 14B)．機械的ストレスにより，ヒト髄核細胞の細胞外基質分解酵素の発現が増加した．椎間板におけるメカノレセプターとして確認されている integrin $\alpha 5 \beta 1$ は，圧迫群で発現が増加した

(Figure 14B). また、圧縮負荷 48 時間後においても、24 時間後と比べて同様の傾向がみられた (Figure 15).

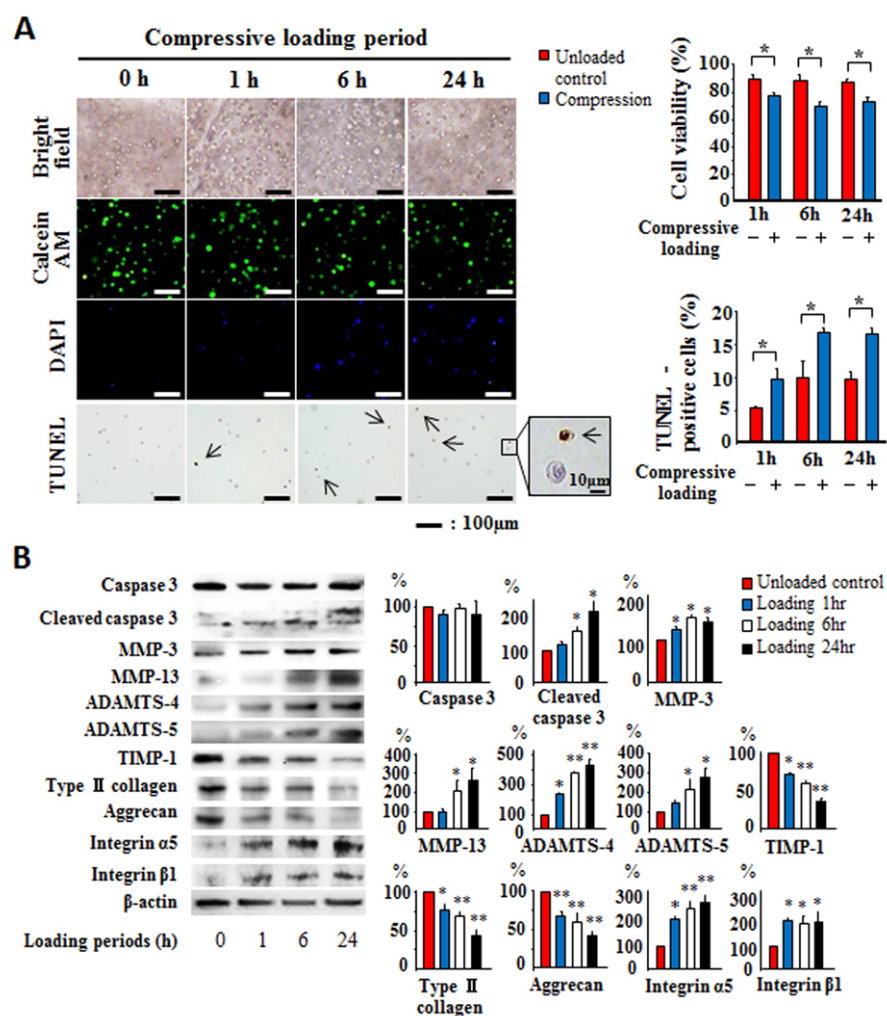


Figure 14. A) ヒト髄核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 1, 6, 24 時間における Calcein AM 蛍光染色, TUNEL 染色による細胞生存率・アポトーシス評価. Arrows: TUNEL 陽性細胞. **B)** ヒト髄核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 0~24 時間における western blot, および densitometry による定量化. (n = 3 per group. Data shown are mean ± SD. * = $P < 0.05$ versus unloaded control, ** = $P < 0.05$ versus unloaded control)

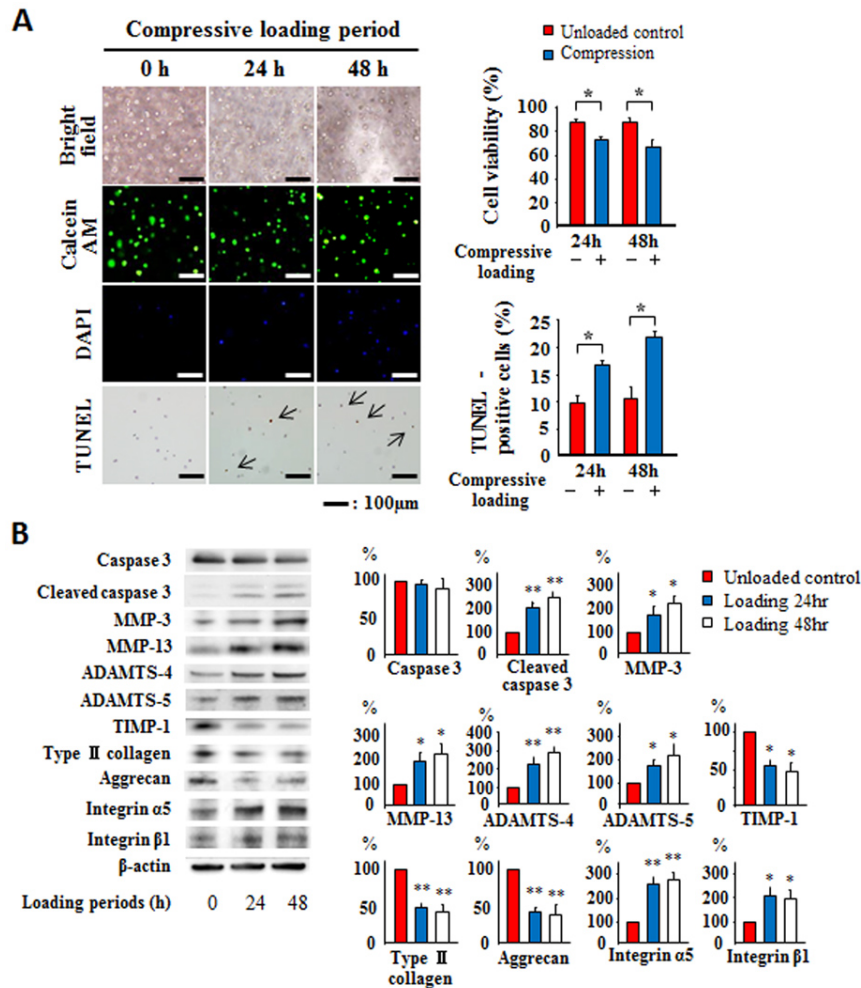


Figure 15. A) ヒト髄核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 24, 48 時間における Calcein AM 蛍光染色, TUNEL 染色による細胞生存率・アポトーシス評価. Arrows: TUNEL 陽性細胞. **B)** ヒト髄核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 24, 48 時間における western blot, および densitometry による定量化. (n = 3 per group. Data shown are mean ± SD. * = $P < 0.05$ versus unloaded control, ** = $P < 0.05$ versus unloaded control)

Caspase 3 阻害は圧縮負荷によるヒト髄核細胞の細胞死を抑制し細胞外基質分解酵素の発現を減少させる

次に、ヒト髄核細胞圧縮負荷モデルにおいてアポトーシス実行因子 caspase 3 阻害が与える影響を評価した。Caspase 3 siRNA をヒト髄核細胞へ導入し、髄核細胞-アガロースゲル複合体を作成し (caspase 3 siRNA 群) 同様に圧縮負荷を与えた。Unloaded control 群 (siRNA 非導入, 非圧縮), compression only 群 (siRNA 非導入, 圧縮), control siRNA 群 (control siRNA 導入, 圧縮)と比較し、評価を行った。

蛍光染色による細胞生存率評価では、圧縮負荷 1~48 時間において、圧縮群で非圧

縮群に比べ髓核細胞生存率は低下した (Figure 16A). 一方 caspase 3 siRNA 導入群では, compression only 群, control siRNA 群に比べ細胞生存率の低下が抑制されていた (Figure 16A). TUNEL 染色では, 圧縮負荷により TUNEL 陽性細胞率は増加したが, caspase 3 siRNA 導入群で compression only 群, control siRNA 群と比べ TUNEL 陽性細胞率は低値であった (Figure 16B).

Western blot では, 圧縮負荷 24~48 時間における caspase 3 siRNA の抗アポトーシス作用が細胞外基質代謝へ与える影響を評価した. Caspase 3 siRNA 導入群で圧縮負荷による cleaved caspase 3 発現が抑制された (Figure 16C). また, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現は caspase 3 siRNA 導入群で compression only 群, control siRNA 導入群に比べ低下した. また, TIMP-1, type II collagen, aggrecan 発現は caspase 3 siRNA 導入群で増加した (Figure 16C). Caspase 3 を標的としたアポトーシス制御が, 細胞外基質分解酵素の発現低下に関与していた. 一方, integrin $\alpha 5 \beta 1$ 発現は caspase 3 siRNA 導入群において変化はなかった (Figure 16C).

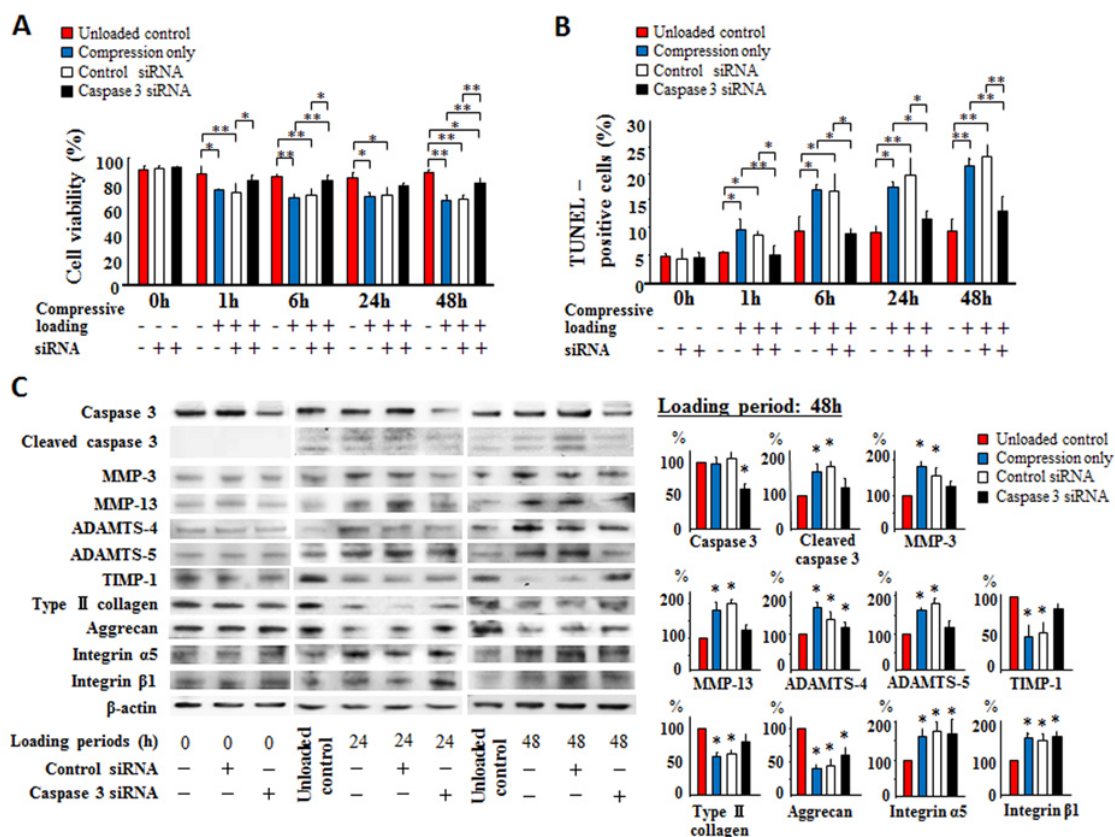


Figure 16. A) ヒト髓核細胞へ caspase 3 siRNA 導入後, 髓核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 0~48 時間における Calcein AM 蛍光染色による細胞生存率評価. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) **B)** TUNEL 染色による

アポトーシス評価. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) C) siRNA 導入ヒト髓核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 0~48 時間における western blot, および圧縮負荷 48 時間における densitometry による定量化. (n = 3 per group. Data shown are mean $\pm$ SD. * = $P < 0.05$ versus unloaded control)

続いて, 7 日間の圧縮負荷を髓核細胞-アガロース複合体へ与え, 長期における caspase 3 siRNA の影響を解析した. 細胞生存率は圧縮負荷 48 時間に比べさらに低下したが, caspase 3 siRNA 導入群では compression only 群, control siRNA 群に比べ高値であった (Figure 17A). Caspase 3 siRNA による caspase 3 発現抑制効果は低下していたが, cleaved caspase 3 発現は圧縮負荷 7 日後においても抑制されていた (Figure 17B). また, aggrecan 発現は caspase 3 siRNA 導入群で維持されていた (Figure 17B).

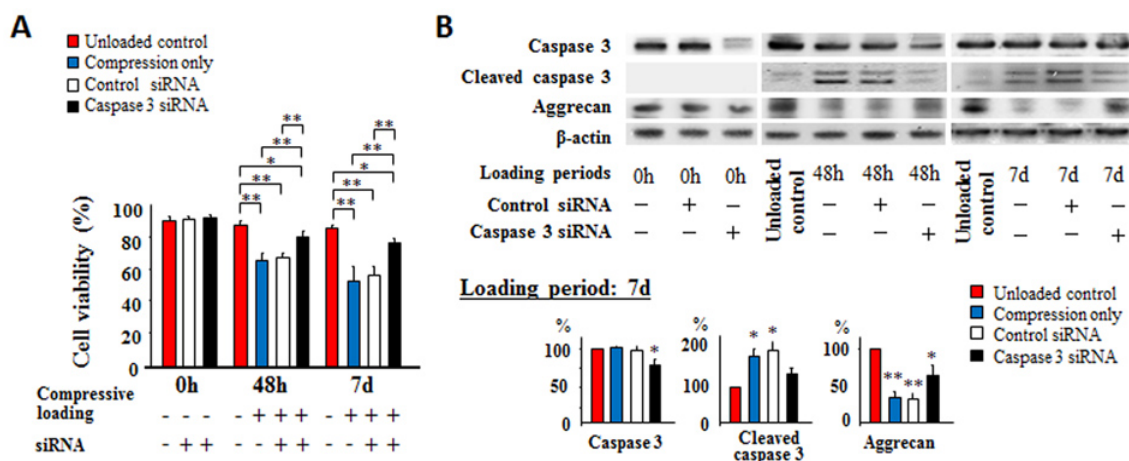


Figure 17. A) ヒト髓核細胞へcaspase 3 siRNA 導入後, 髓核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 48 時間, 7 日間における Calcein AM 蛍光染色による細胞生存率評価. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) **B)** siRNA 導入ヒト髓核細胞-アガロース複合体への圧縮負荷 48 時間, 7 日間における western blot, および圧縮負荷 7 日間における densitometry による定量化. (n = 3 per group. Data shown are mean $\pm$ SD. * = $P < 0.05$ versus unloaded control)

Caspase 3 siRNA の椎間板局所導入はウサギ椎間板圧迫変性モデルにおいて *in vivo* 変性抑制効果がある

日本白色家兎を使用し自作の創外固定器を第 4-5 腰椎間に設置し, 椎間板圧迫変性モデルを作成した. 校正器で創外固定器の圧迫力を計測したところ, 圧迫力 150N までバネ長と圧縮力との関係は比例関係にあり, 圧迫力の調整が可能であった (Figure 12B). そこで, 50N, 100N, 150N の椎間板圧迫モデルを作成し椎間板の変性変化を検

証したところ、50N、100N では椎間板変性の進行は非常に緩徐であった。そこで、本実験では圧迫力を 150N、1.67MPa 相当に設定した²⁴。1.6MPa の椎間板への圧力は、ヒトにおいて 20kg の重りを膝屈曲位で持ち上げる際に、腰椎椎間板へかかる圧力に相当する²⁵。圧縮負荷開始 1 週間後に、caspase 3 siRNA および control siRNA を導入し、導入後 8 週、16 週に評価をおこなった。先行実験ではウサギ椎間板への caspase 3 siRNA 局所導入により、導入後 48 時間の mRNA レベルは 25%以下、タンパクレベルは 40%以下に caspase 3 発現を抑制した¹⁰。

MRI T2 強調画像では control siRNA 導入群で、圧迫をかけない sham 群に比べ経時的に髄核の信号強度が低下した。caspase 3 siRNA 導入椎間板では、圧迫による髄核の信号変化が抑制されていた (Figure 18A)。椎間板変性の重症度をスコア化した Pfirrmann 分類では、caspase 3 siRNA 導入群では sham 群より有意にスコアは高値であったが、control siRNA 群に比べ有意にスコアは低かった (Figure 18B)。また、髄核の信号強度を定量化した MRI index では、caspase 3 siRNA 導入群は control siRNA 導入群に比べ高値であった (Figure 18C)。

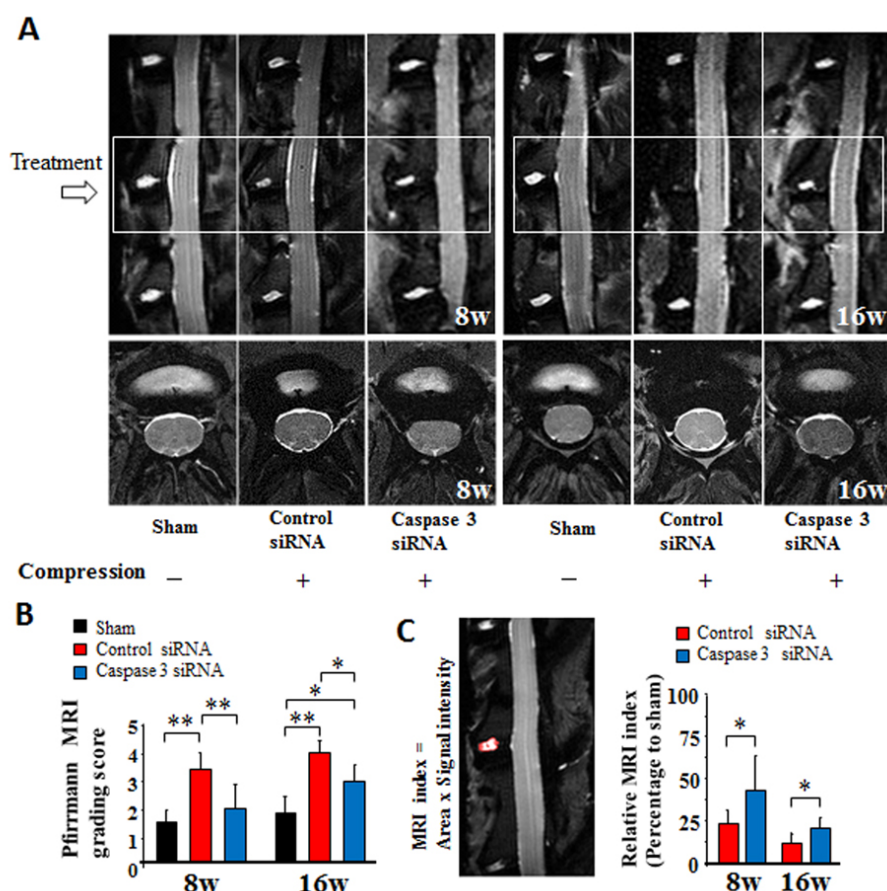


Figure 18. A) ウサギ椎間板圧迫モデルに siRNA を導入後 8 週, 16 週における 7.0T-MRI 評価 (T2 強調画像, 矢状断(上), 冠状断画像(下)). Sham 群: 非圧迫椎間板, Control siRNA 群: 圧迫負荷+control siRNA 導入, Caspase 3 siRNA 群: 圧迫負荷+caspase 3 siRNA 導入. **B)** Pfirrmann grading score による椎間板変性評価. (n = 8 per group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) **C)** 矢状断画像より MRI index (髄核高信号域の面積×平均信号強度) を計測し評価. 8 週, 16 週それぞれにおける Control siRNA 群, Caspase 3 siRNA 群の Sham 群に対する MRI index の割合を比較. (n = 8 per group. Data shown are mean $\pm$ SD. * = $P < 0.05$ versus unloaded control)

サフラニン-O 染色では, control siRNA 導入椎間板で経時的に髄核基質の減少と髄核一線維輪境界の破綻が進み, 組織の変性変化が進行していた (Figure 19A). Caspase 3 siRNA 導入椎間板は, 圧迫により髄核基質の減少がみられたが, control siRNA 導入椎間板に比べ髄核一線維輪構造は保たれていた. Histological grade は, caspase 3 siRNA 導入椎間板は sham 群に比べ高値であったが, control siRNA 導入群より有意に grade は低値であった. HE 染色では control siRNA 導入椎間板で有意に髄核細胞数は減少し, hypocellular fibrocartilaginous matrix の増生がみられた (Figure 19B). Caspase 3 siRNA 導入椎間板では, 導入後 16 週においても髄核に vacuolated cell, chondrocyte-like cell があ

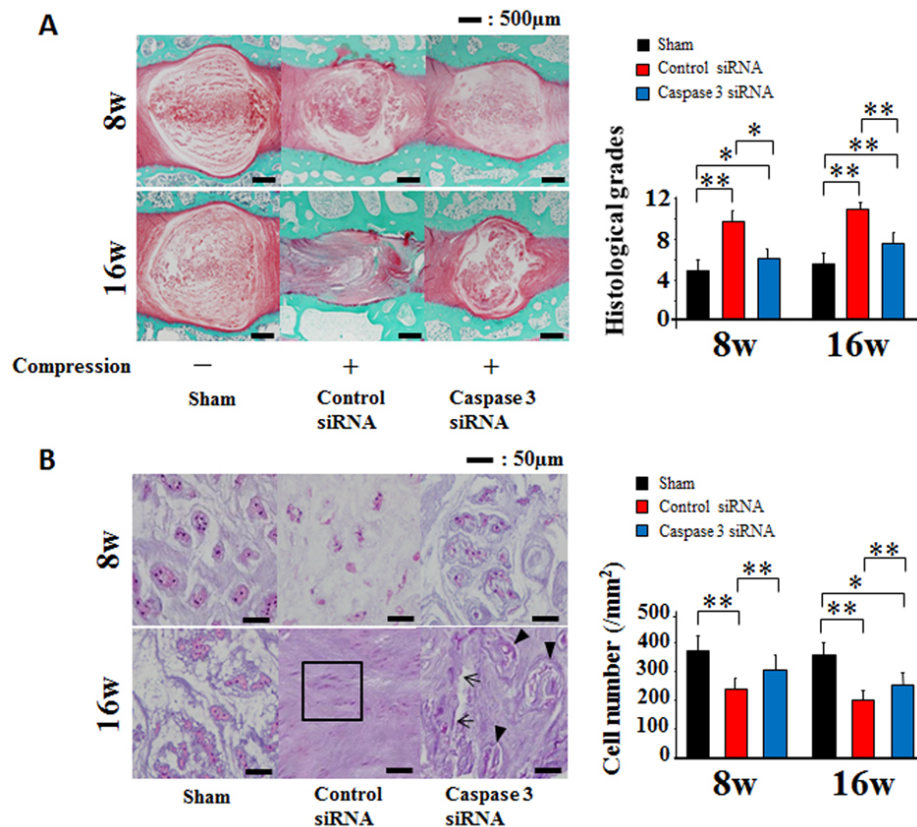


Figure 19. A) ウサギ椎間板圧迫モデルに siRNA を導入後 8 週, 16 週におけるサフラニン-O 染色, Histological grade による評価. (n = 8 per group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) **B)** 髄核 HE 染色および髄核細胞数評価. Hypocellular fibrocartilaginous matrix (boxed area), large vacuolated cell (矢頭), chondrocyte-like cell (矢印). (n = 8 per group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

免疫染色では, cleaved caspase 3 陽性細胞は圧迫により経時的に増加したが, cleaved caspase 3 陽性細胞率は caspase 3 siRNA 導入椎間板で control siRNA 導入椎間板に比べ低値であった (Figure 20A, B). TUNEL 染色では, 同様に圧迫群で陽性細胞が増加したが, TUNEL 陽性細胞率は caspase 3 siRNA 導入椎間板で control siRNA 導入椎間板に比べ低値であった (Figure 20C, D). MMP-3 免疫染色においても, 同様の傾向を示し圧迫群で陽性細胞率は増加したが, caspase 3 siRNA 導入椎間板で低値であった (Figure 20E, F). 一方, メカノレセプターである integrin $\alpha 5\beta 1$ 陽性細胞率は圧迫群で増加したが, caspase 3 siRNA 導入による変化はなかった (Figure 20G, H).

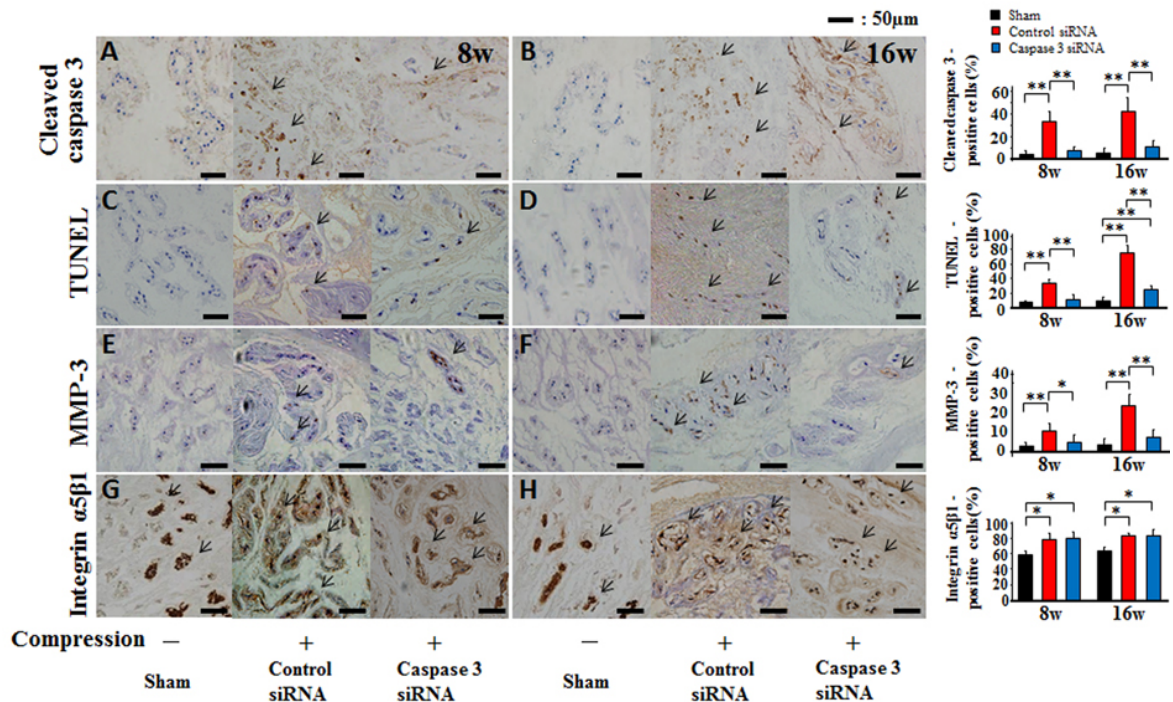


Figure 20. A, B) ウサギ椎間板圧迫モデルにおける髄核 cleaved caspase 3 免疫染色, **C, D)** TUNEL 染色. **E, F)** MMP-3 免疫染色. **G, H)** integrin $\alpha 5\beta 1$ 免疫染色, および陽性細胞率評価 (n = 8 per group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). 矢印: 染色陽性髄核細胞.

考 察

本研究では、生体力学的環境変化に伴う椎間板組織変性のメカニズムを解析し、また内在性 caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することによる力学負荷に起因した椎間板変性抑制効果を検証するため、ヒト髓核細胞3次元培養モデルを用いた *in vitro* 試験と、ウサギ椎間板圧迫モデルを用いた *in vivo* 試験を行った。

In vitro 試験では、まずヒト髓核細胞をアガロースゲルで3次元培養を行い、静的な圧縮負荷を与えることで椎間板細胞への影響を解析した。圧縮負荷によりアポトーシス実行因子である活性型 caspase 3 の発現が増加し、髓核細胞アポトーシスが誘導された。また細胞基質分解酵素 MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5 発現が増加し、TIMP-1, type II collagen, aggrecan 発現が減少した。力学的負荷に起因する椎間板変性において、細胞外基質代謝に関わる MMP, ADAMTS, TIMP のバランスが重要であると報告されている²⁶。本研究では、圧縮負荷により細胞外マトリックス分解に作用する MMP, ADAMTS 発現が増加し、MMP 阻害因子として働く TIMP 発現が低下し、さらに細胞外マトリックスの構成成分である type II collagen, aggrecan の発現低下が誘導された。力学的負荷により、椎間板機能維持に重要な役割を持つ髓核細胞のアポトーシスが進行し、細胞外基質分解酵素の発現が増加する異化作用が誘導された。

続いて、caspase 3 siRNA を髓核細胞へ導入し、内在性 caspase 3 のノックダウンを行うと、圧縮負荷による活性型 caspase 3 の発現は低下し髓核細胞アポトーシスは抑制された。また圧縮負荷による細胞外基質分解酵素の発現が抑制され、TIMP-1, type II collagen, aggrecan 発現が増加した。Caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することで、圧縮負荷に伴う髓核細胞アポトーシスの進行が抑制され、細胞外基質同化作用が維持された。これらの所見より、力学的負荷における椎間板変性には caspase を介した細胞外基質代謝の変化が関与しており、caspase 3 発現の制御が変性抑制に有効であることが示唆された。

In vivo 試験では、ウサギ椎間板圧迫モデルへ caspase 3 siRNA を導入することで、生体力学的環境変化における椎間板変性抑制効果を検討した。椎間板圧迫負荷により、髓核細胞アポトーシスの増加を伴い、経時的に椎間板変性が進行した。また圧迫椎間板で細胞外基質酵素 MMP-3 発現が増加した。圧迫椎間板へ caspase 3 siRNA を局所導入することで、髓核細胞のアポトーシスが減少し、MMP 発現の低下を伴い椎間板変性の進行が抑制された。これらの所見より、生体力学的環境変化に起因する椎間板変性に対する caspase 3 siRNA の *in vivo* 変性抑制効果が示された。

本研究では、髓核細胞の caspase 3 発現・アポトーシスを抑制することで、力学的環境変化による椎間板の細胞外基質代謝変化を是正しうることが *in vitro*, *in vivo* それぞれの実験において初めて示された。これまで細胞外基質分解酵素とアポトーシスの関

連性について指摘されており、MMP は tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) や Fas ligand といった death ligand とその受容体を介して、アポトーシスを誘導すると報告されている^{27,28}。また細胞内の MMP-3 がアポトーシスを引き起こすという報告がある²⁹。さらに、caspase 3 の活性化を介したアポトーシスにおいて、MMP 発現が増加することも報告されている²⁸。本研究における所見は、椎間板への過度な荷重負荷が caspase を介して細胞外基質分解酵素を発現させ、椎間板組織の変性を引き起こしたことが示唆された。

また、caspase と細胞外基質代謝の関連性についても指摘されている。細胞外マトリックスは、MMP, ADAMTS, TIMP らの細胞外基質代謝に関わる酵素発現により制御されており、TNF- α や interleukin-1 (IL-1) といった炎症性メディエーターは、椎間板細胞において細胞外基質分解酵素 (MMP-3, MMP-13, ADAMTS-5) の発現を増加させる³⁰。また、caspase 3 はグリア細胞において TNF- α や IL-1 β 等の炎症性サイトカイン発現を誘導すると報告されており³²、caspase 3 がメディエーターを介して MMP 発現に関わることが考えられる。本研究では、caspase 3 の活性化により細胞外基質代謝に影響がみられており、椎間板変性におけるこれらの関連性が示唆された。従って、髄核細胞の caspase 3 を阻害しアポトーシスを制御することは、力学的ストレスに起因する細胞外基質代謝異常を修正し椎間板組織変性の進行の抑制に有効であることが示唆された。

機械的刺激に対する生体組織の応答には、その刺激を伝達するメカノレセプターが関与することが考えられる。本研究では、圧縮負荷により integrin $\alpha 5 \beta 1$ の発現が増加した。integrin $\alpha 5 \beta 1$ は椎間板細胞において機械的刺激を受容および細胞内へ伝達するメカノレセプターとして確認されており^{33,34}、本所見は髄核細胞への機械的刺激の伝達が反映されたものと考えられた。しかし、椎間板細胞への機械的刺激が与える詳細なシグナル伝達や分子メカニズムは明らかにされておらず、今後さらなる研究が必要と考えられる。

本研究の限界として、*in vitro* 髄核細胞 3 次元培養圧迫モデルが、生体内の椎間板への荷重を完全には反映していないことが挙げられる。椎間板は生体内で様々な力学的負荷を受けており、これらを *in vitro* モデルで模倣するには限界がある。本研究では髄核細胞へ非生理的な負荷を与え、その影響を検証するために静的軸圧縮モデルを採用した。また *in vivo* 試験では創外固定器を用いて椎間板を圧迫したが、行動に制限を設けないことでより生体内環境に近似したモデルと考えられる。もう一つの問題点として、*in vivo* モデルでの caspase 3 siRNA 効果の持続期間が、本実験では明らかにされていないことが挙げられる。先行実験では、ウサギ椎間板内に Alexa555 で標識した caspase 3 siRNA を局所導入し、導入後 2 日で髄核細胞質内に取り込まれ、その後 4 週、8 週まで髄核細胞質内に存在していたことを確認している¹⁰。4 週から 8 週にかけて、

細胞質内の siRNA 量に大きな変化はなく、16 週においても残存していることが予想されるが、今後 caspase 3siRNA の効果持続期間を検討する必要がある。

本研究では、力学的負荷により細胞外基質分解酵素の発現増加を伴い、椎間板細胞のアポトーシスおよび椎間板組織変性が進行した。これらの変性変化は caspase 3 siRNA 導入により抑制することが可能であり、内在性 caspase 3 を遺伝子レベルで阻害することは、力学的環境変化による椎間板変性に対して有用な治療手段となりうることが示唆された。また本研究による所見より、生体力学的荷重負荷による椎間板組織変性には caspase を介した細胞外基質代謝変化が重要であることが示された。髄核細胞アポトーシスを抑制することで椎間板組織変性の制御を試みる本手法は、早期の椎間板変性をターゲットとしており、脊椎固定術後の隣接椎間板障害の予防等への応用が考えられる。今後、本手法が新たな椎間板変性の治療戦略となりうるものと期待される。

総括および結論

- 我々は、椎間板への栄養供給低下が椎間板組織変性に関わる病態を検証するために、*in vitro* 髄核細胞血清除去モデルを用いて椎間板細胞の栄養飢餓に関連する遺伝子群を網羅的に解析した。
- 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 を導入し内在性 caspase 3 をノックダウンすることで、血清除去における活性型 caspase 3 の発現増加は抑制され、CDK インヒビター-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 に関する遺伝子群、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。
- 我々は、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するため、ヒト髄核細胞 3 次元培養モデルを用いた *in vitro* 試験と、ウサギ椎間板圧迫モデルを用いた *in vivo* 試験を行った。
- *In vitro* 試験において、ヒト髄核細胞へ圧縮負荷を与えると、活性型 caspase 3, MMP, ADAMTS の発現増加を伴い髄核細胞アポトーシスが増加した。ヒト髄核細胞へ 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、ウサギ椎間板への圧迫により髄核細胞アポトーシスの増加と MMP-3 発現増加を伴い、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。

本研究結果は、力学的負荷による椎間板変性の進行に髄核細胞の caspase 3 およびアポトーシスが深く関与していることを示した。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 *in vivo* 変性抑制効果が示された。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。

本研究をさらに発展させるためには、caspase 3 siRNA の持続効果期間を検証し、また caspase 3 を選択的に阻害することでその他の関連分子に及ぼす影響についても検証することが重要と考えられる。さらに他の DNA damage checkpoint およびアポトーシス関連遺伝子群についても詳細な検討を行うことで、椎間板変性の病態解明そして新たな治療戦略へ繋がるものと期待される。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科分野教授 岩崎倫政先生，名誉教授 三浪明男先生に心より感謝いたします。また，本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました山本有平教授，畠山鎮次教授，近藤亨教授に深謝いたします。

本研究を行うにあたり，研究全般および論文作成に関してご指導を頂いた北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター感染・免疫部門の東秀明教授，アガロースゲルを使用した3次元細胞培養を教えて頂いた北海道大学大学院先端生命科学研究院組織構築科学研究室の佐々木直樹教授に深い感謝の意を表します。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました医学研究科脊椎・脊髄先端医学講座准教授の須藤英毅先生をはじめ，整形外科分野の諸先生方，研究に関わっていただいた皆様に心よりの感謝を申し上げます。

引用文献

- 1 Rahme, R. *et al.* What happens to Modic changes following lumbar discectomy? Analysis of a cohort of 41 patients with a 3- to 5-year follow-up period. *J. Neurosurg. Spine.* **13**, 562-567 (2010).
- 2 Hilibrand, A. S. *et al.* Radiculopathy and myelopathy at segments adjacent to the site of a previous anterior cervical arthrodesis. *J. Bone. Joint. Surg. Am.* **81**, 519-528 (1999).
- 3 Freemont, A. J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology.* **48**, 5-10 (2009).
- 4 Benneker, L. M. *et al.* 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine.* **30**, 167-173 (2005).
- 5 Sudo, H. *et al.* Biomechanical study on the effect of five different lumbar reconstruction techniques on adjacent-level intradiscal pressure and lamina strain. *J. Neurosurg. Spine.* **5**, 150-155 (2006).
- 6 Rannou, F. *et al.* Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am. J. Pathol.* **164**, 915-924 (2004).
- 7 Park, J. B. *et al.* Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. *J. Bone. Joint. Surg. Am.* **87**, 1338-1342 (2005).
- 8 Urban, J. P., Smith, S. & Fairbank, J. C. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine.* **29**, 2700-2709 (2004).
- 9 Sudo, H. & Minami, A. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression. *J. Orthop. Res.* **28**, 1608-1613 (2010).
- 10 Sudo, H. & Minami, A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis. Rheum.* **63**, 1648-1657 (2011).
- 11 Brooks, C. L. & Gu, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **15**, 164-171 (2003).
- 12 Tang, J. J., Shen, C. & Lu, Y. J. Requirement for pre-existing of p21 to prevent doxorubicin-induced apoptosis through inhibition of caspase-3 activation. *Mol. Cell. Biochem.* **291**, 139-144 (2006).
- 13 Levkau, B. *et al.* Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol. Cell.* **1**, 553-563 (1998).
- 14 Risbud, M. V. *et al.* Nucleus pulposus cells upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK

- signaling pathways under hypoxic conditions and resist apoptosis induced by serum withdrawal. *Spine*. **30**, 882-889 (2005).
- 15 Gruber, H. E. & Hanley, E. N., Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine*. **23**, 751-757 (1998).
 - 16 Lotz, J. C. & Chin, J. R. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading. *Spine*. **25**, 1477-1483 (2000).
 - 17 Walter, B. A. *et al.* Complex loading affects intervertebral disc mechanics and biology. *Osteoarthritis. Cartilage*. **19**, 1011-1018 (2011).
 - 18 Sasaki, N., Imai, T., Hashimoto, A. & Yasuda, H. Effect of pericellular matrix formation by chondrocytes cultured in agarose gel on the viscoelastic properties of agarose gel matrix. *J. Biorheol.* **23**, 95-101 (2009).
 - 19 Horner, H. A. & Urban, J. P. 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine*. **26**, 2543-2549 (2001).
 - 20 Guehring, T. *et al.* Stimulation of gene expression and loss of anular architecture caused by experimental disc degeneration--an in vivo animal study. *Spine*. **30**, 2510-2515 (2005).
 - 21 Pfirrmann, C. W. *et al.* Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine*. **26**, 1873-1878 (2001).
 - 22 Sobajima, S. *et al.* A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine*. **30**, 15-24 (2005).
 - 23 Masuda, K. *et al.* A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine*. **30**, 5-14 (2005).
 - 24 Beckstein, J. C. *et al.* Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content. *Spine*. **33**, E166-173 (2008).
 - 25 Wilke, H. J. *et al.* New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine*. **24**, 755-762 (1999).
 - 26 Yurube, T. *et al.* Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration. *Arthritis. Res. Ther.* **14**, R51 (2012).

- 27 Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827-839 (2003).
- 28 Lai, M. Y. *et al.* Up-regulation of matrix metalloproteinase family gene involvement in ursolic acid-induced human lung non-small carcinoma cell apoptosis. *Anticancer. Res.* **27**, 145-153 (2007).
- 29 Si-Tayeb, K. *et al.* Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am. J. Pathol.* **169**, 1390-1401 (2006).
- 30 Le Maitre, C. L., Freemont, A. J. & Hoyland, J. A. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis. Res. Ther.* **7**, R732-745 (2005).
- 31 Haro, H. *et al.* Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. *J. Clin. Invest.* **105**, 133-141 (2000).
- 32 Burguillos, M. A. *et al.* Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature.* **472**, 319-324 (2011).
- 33 Le Maitre, C. L. *et al.* Altered integrin mechanotransduction in human nucleus pulposus cells derived from degenerated discs. *Arthritis. Rheum.* **60**, 460-469 (2009).
- 34 Gilchrist, C. L. *et al.* Functional integrin subunits regulating cell-matrix interactions in the intervertebral disc. *J. Orthop. Res.* **25**, 829-840 (2007).