



Title	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〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	大西, 貴士
Description	配架番号 : 2284
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12543号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65891
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Ohnishi_review.pdf, 審査の要旨



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 大西 貴士

	主査	教授	山	本	有	平
審査担当者	副査	教授	畠	山	鎮	次
	副査	教授	生	駒	一	憲
	副査	教授	有	賀		正

学 位 論 文 題 名

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
(Functional analysis of caspase 3 gene regarding intervertebral disc degeneration using genetically modified mouse)

体幹を支える脊椎は運動器の主要な構成要素であり、その関連疾病である椎間板障害は腰痛や椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症、脊柱変形の大きな原因となる。先行研究では、栄養供給、生体力学的負荷、外傷による椎間板変性において、椎間板細胞に内在するアポトーシス関連遺伝子 caspase 3 の発現を制御することで、椎間板組織の変性制御が可能であることが示唆された。しかし、本治療戦略に想定される課題として、caspase 3 はアポトーシスの最終実行因子であり、遺伝子レベルで抑制することで椎間板組織の恒常性維持に変化が生じる懸念や、アポトーシスの人為的な抑制により細胞の腫瘍化、悪性化が生じる懸念があった。また、加齢に伴う椎間板変性に対しても、本治療戦略が有効であるかを検証する必要性が考えられた。本研究で申請者は、まずマウスにおいて確立されていなかった *in vivo* 腰椎椎間板変性モデルを、外傷性椎間板変性と加齢性自然発症椎間板変性に分けて、確立した。本モデルを基に、caspase 3 knock out (KO)マウスを用いて、椎間板組織における表現型を確認し、椎間板変性における caspase 3 遺伝子の果たす機能解析を行った。

外傷性椎間板変性モデルでは、35-gauge (G)または 33G 注射針を椎間板に穿刺貫通させて早期の変性変化を惹起した。加齢性自然発症椎間板変性モデルでは、1 歳 2 ヶ月齢から 1 歳 6 ヶ月齢を調査することで、軽度ながら有意な変性変化を認めた。また、それぞれのモデルの評価に適切な組織分類スコアを考案した。Caspase 3 KO マウスを用いた *in vitro* 試験において、若年髄核細胞コロニーでは、Wild type (WT)群に比較して KO 群の血清除去に対するアポトーシス率が有意に低かった。一方、高齢髄核細胞コロニーでは、WT 群と比較して、KO 群で MMP-3 発現が有意に高かった。*In vivo* 外傷性椎間板変性モデルにおいて、35G 針穿刺 2 週後、WT に比較し caspase 3 KO マウスの穿刺椎間板は変性所見が有意に軽度であった。しかし 4 週では、有意差はなかった。33G 針穿刺では、WT に比較して caspase 3 KO マウスの穿刺椎間板は 2 週、4 週において、変性所見の

有意差はなかった。 *In vivo* 加齢性自然発症椎間板変性モデルにおいて、1歳2ヵ月齢で、WT マウスと比較し、caspase 3 KO マウスの椎間板変性所見は有意に高度であった。一方、1歳6ヵ月齢では、WT と比較して caspase 3 KO マウスの腰椎椎間板は、MRI の変性所見は有意に高度であったが、組織学的には有意差はなかった。また、若年 caspase 3 KO マウス椎間板の腫瘍化、悪性化所見はなかった。

審査に当たり副査有賀教授より、*in vitro* 試験の高齢髄核細胞コロニーで、WT 群と比較して、KO 群で MMP-3 発現が有意に高かったことは、どのような解釈となるか質問があった。申請者は、若年髄核細胞コロニーでは、KO 群のアポトーシス抵抗性が示された一方で、高齢髄核細胞コロニーでは、WT 群に比較して KO 群の MMP-3 発現が高度であり、細胞外基質分解の増長につながる可能性がある」と回答した。主査山本教授より、一つ目として大動物やヒトにおいて髄核細胞アポトーシスが椎間板変性の病態であるとする研究は、どのような物があるか質問があった。申請者は、ウサギのモデルや 40 から 50 歳代のヒト椎間板ヘルニア検体を用いてタンパク発現解析を行った研究があると回答した。二つ目として、針穿刺では間違いなく椎間板に外傷が加わっているのか、また注射針穿刺によるモデルは、どのような外傷に相当するのか質問があった。申請者は、 μ CT により、注射針が椎間板腔に貫通していることを 3 次元的に確認しており、外傷は確実に生じていること、また穿刺モデルの外傷は椎体骨折の椎間板への穿破や脊椎脱臼骨折に相当すると回答した。三つ目として、11 週齢において針穿刺によるモデルを適用しているが、ヒトで外傷を生じる年齢から考慮すると、若すぎるのではないかと質問があった。申請者は、マウスの寿命から単純計算すると、11 週齢はヒトの 8 歳相当だが、マウスは 8 週齢で骨格的に成体に到達するとされており、成人が椎間板外傷を受けたモデルと判断できると回答した。四つ目として、全身性 caspase 3 KO マウスを用いているが、椎間板内で本当に caspase 3 遺伝子は KO されているのか質問があった。申請者は、入手した caspase 3 KO マウスは caspase 3 タンパクが発現しないことを確認されており、椎間板内で KO されているかどうかを改めて調査はしていないが、再確認を検討すると回答した。副査生駒教授より、マウスとヒトの椎間板の類似性はあるのか質問があった。申請者は、生物学的にはマウスは髄核細胞が終生、脊索細胞という種類であるのに対し、ヒトは出生後から脊索細胞が減少し軟骨様細胞に置き換わっていく違いはあるものの、力学的には椎間板の弾性や粘弾性がマウスとヒトで類似していると回答した。副査畠山教授からは、caspase 3 KO マウスは作製方法によって dominant negative 作用を示すなど、表現型が異なる可能性があり、注意を要することを指摘された。また椎間板変性抑制治療として、caspase 3 抑制薬剤の効果を調査した研究はないのか質問があった。申請者は、caspase 3 抑制薬剤の効果を調査した研究はなく、申請者らのグループで siRNA を用いてその効果を調査した研究があるのみであると回答した。

この論文は、外傷性椎間板変性と加齢性自然発症椎間板変性の病態における違いを明らかにし、外傷性椎間板変性に対して一過性に caspase 3 抑制治療を行うことで、進行の遅延効果が期待できることを示した。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院課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。