HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12543
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65892
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Ohnishi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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)

2017 年 3 月

北海道大学

大西　貴士
Takashi Ohnishi

学位論文

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)

2017 年 3 月

北海道大学

大西　貴士
Takashi Ohnishi

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

　実験結果　・・・・・・・・・・・・10 頁

　考察　・・・・・・・・・・・・・18 頁

第二章

　緒言　・・・・・・・・・・・・・20 頁

　実験方法　・・・・・・・・・・・・21 頁

　実験結果　・・・・・・・・・・・・23 頁

　考察　・・・・・・・・・・・・・29 頁

第三章

　緒言　・・・・・・・・・・・・・31 頁

　実験方法　・・・・・・・・・・・・32 頁

　実験結果　・・・・・・・・・・・・37 頁

　考察　・・・・・・・・・・・・・42 頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・45 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・46 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・47 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. Takashi Ohnishi, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Takeru Tsujimoto, Yoichi M. Ito, Norimasa Iwasaki

   In vivo mouse intervertebral disc degeneration model based on a new histological classification

   PLoS One 11 (8): e0160486 (2016)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 大西貴士，須藤英毅，岩崎浩司，辻本武尊，岩崎倫政

   再現性の高いマウス椎間板穿刺変性モデルの作製

   第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会
   平成 27 年 10 月 22 日 18:15～18:55 (ポスター)
   富山市民プラザ

2. Takashi Ohnishi, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Takeru Tsujimoto, Norimasa Iwasaki

   Highly reproducible *in vivo* mouse intervertebral disc degeneration model based on newly developed histological classification

   Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting in Orlando, Florida, March 5-8, 2016. (Poster session)

3. 大西貴士，須藤英毅，岩崎浩司，辻本武尊，岩崎倫政

   新病理分類に基づいた再現性の高い *in vivo* マウス腰椎椎間板変性モデルの確立

第 45 回日本脊椎脊髄病学会
平成 28 年 4 月 14 日 15:00〜15:30 (ポスター)
幕張メッセ国際展示場

4. 大西貴士，須藤英毅，岩崎浩司，辻本武尊，岩崎倫政

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

第 45 回日本脊椎脊髄病学会
平成 28 年 4 月 15 日 9:00〜9:48 (口演)
幕張メッセ国際会議場

5. 大西貴士，須藤英毅，岩崎浩司，辻本武尊，岩崎倫政

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

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 28 年 10 月 14 日 13:50〜15:00 (口演)
福岡国際会議場

緒言

高齢化の進行する先進国において，健康長寿社会の実現に向けて運動器の役割に注目が集まっている．特に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．腰痛は生涯に 7 割以上の人が自覚し病院受診の原疾患として最多であり，椎間板ヘルニアは，椎間板の退行変性により線維輪が破綻し内部の髄核組織が脱出することにより近傍の神経を圧迫し疼痛や運動麻痺などの神経症状を呈する疾患である．脊柱管狭窄症は，変性した椎間板組織が脊柱管に膨隆し神経を圧迫して障害を生じ，脊柱変形においては，これらの複合的な症状を呈する．こうした疾患は，患者の生活の質を悪化させ，自立した健康的な生活を行う上で大きな障害であり，社会的に克服すべき重要なテーマである．

現在の治療には，鎮痛薬や椎間板切除術や脊椎固定術などの外科的治療が普及しているが，病因に対する直接的なアプローチではなく椎間板の退行変性を遅らせる治療はない．こうした中、近年の分子生物学の革新を背景として，より低侵襲で経済的負担も少ない方法で椎間板の退行変性を遅らせることが可能となれば，日常生活動作や生活の質を大きく改善させるものと期待される．

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が [1]，我々のグループでは栄養供給，生体力学的負荷，外傷の要因に関して研究を進めてきた [2,3]．その結果，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明らかになった．

今回我々は，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．また，*in vivo* 外傷性椎間板変性モデル，加齢性椎間板変性モデルとそれらの評価に最適な組織分類スコアを作製した．これらのモデル及び *in vitro* 試験を通して検証した結果をここに報告する．

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
AF	annulus fibrosus
bp	base pair
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CFU-S	colony forming unit spherical
CT	computed tomography
DAPI	4’, 6-diamidino-2-phenylindole
DHI	disc height index
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
G	gauge
HSD	honestly significant difference
KO	knock out
Ku	kurtosis
MMP	matrix metalloproteinase
MPR	multiplanar reconstruction
MRI	magnetic resonance imaging
N/C	nucleus-cytoplasm
NP	nucleus pulposus
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
SASP	senescence-associated secretory phenotype
Sk	skewness
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling
WT	wild type

第一章

新病理分類に基づいた *in vivo* マウス椎間板変性モデルの作製

緒言

椎間板変性の研究は，様々な動物モデルを用いて肉眼や組織学的評価により行われてきた．動物モデルとしては，イヌ[4]・ラット[5]に対してメス刃による線維輪全層切開，ヒツジ[6]に対してメス刃による線維輪表層切開，マウス[7]・ラット[8]に対して針による椎間板穿刺，マウス[9]・ラット[10]・ウサギ[11-13]に対して針による片側線維輪穿刺が挙げられる．同じ手技であっても，動物の大きさと種の違いにより椎間板変性の重症度は多様となる．マウスにおいて針穿刺による椎間板変性モデルの詳細な報告はなく，その評価に用いる適切な組織分類スコアもない．

そこで，我々は遺伝子組み換えマウスにも適用可能な，針穿刺による腰椎椎間板変性モデルとその評価のための新組織分類スコアを作成した．

本研究において作成したプロトールは再現性の高い椎間板変性が得られ，新組織分類スコアは段階的な変性の進行を良好に検出したのでここに報告する．

実験方法

マウス腰椎椎間板穿刺変性モデル作製

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．11 週齢雌雄 C57BL/6 マウス 106 匹（雄 54 匹，雌 52 匹）に対してケタミン 1.9mg とキシラジン 0.2mg の腹腔注射による全身麻酔下に手術を行った．腰椎は後側方アプローチにより展開し，L4/5 椎間板を側面より 35-gauge (G)もしくは 33G 注射針で穿刺貫通させた．針を留置して micro computed tomography (μCT) (3D micro X-ray CT R_mCT 2, Rigaku)を撮影し，複数スライスの multiplanar reconstruction (MPR) 画像により椎間板内の針貫通領域を 3 次元的に確認した (Figure 1a)．貫通領域の規定として，まず椎間板中央軸位における椎間板短径を 3 分割した．分割点を通るように同心楕円を描き，椎間板中心領域を規定した．次に，残った外側領域を腹側と背側に 2 分割し，椎間板腹側領域と背側領域を規定した (Figure 1b)．また，この領域は頭尾側椎体終板間の空間で規定され，その空間から膨隆した線維輪外層は対象外とした．針がこの領域から外れて穿刺された場合，この領域を貫通するまで手技を繰り返した．貫通領域の判定としては，針が中心領域に通っていれば「中心領域」とし，中心領域を通らず腹側領域を通れば「腹側領域」，背側領域を通れば「背側領域」とした．領域判定後，針を除去し閉創した．術後 1，2，4，8，12 週後にペントバルビタールナトリウム 5mg を腹腔注射して安楽死させ評価した．

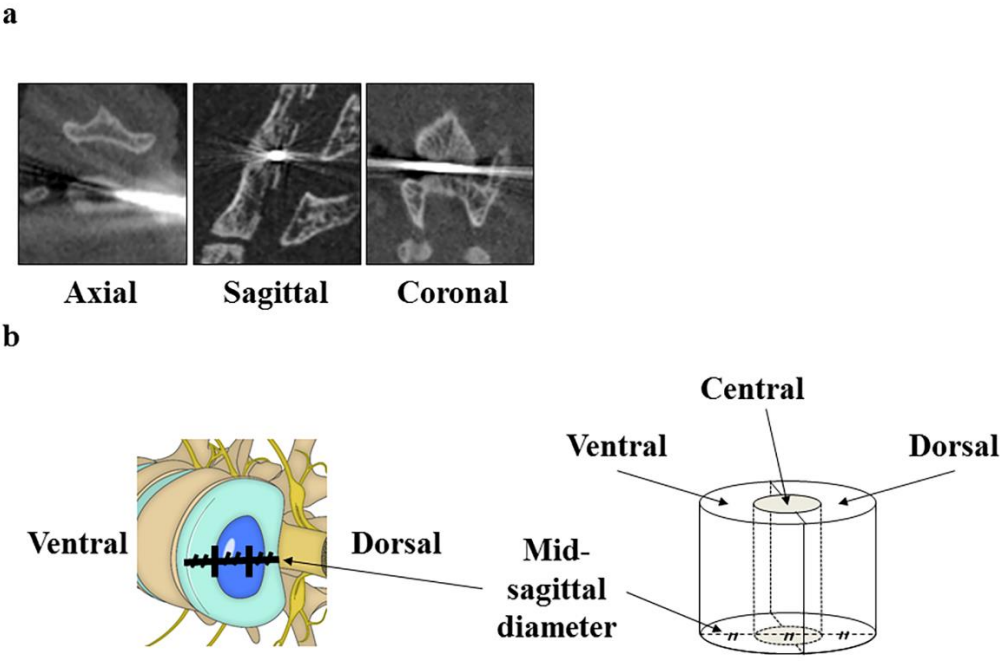

Figure 1. a) 椎間板内における針の貫通領域は μCT MPR 画像にて確認した．**b)**

貫通領域は腹側，中心もしくは，背側領域と判定した.

針のサイズ, 術後期間と性別におけるマウスの数を示す. 35G 針穿刺群では, 1 週 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹），2 週 14 匹（雄 4 匹，雌 10 匹），4 週 11 匹（雄 4 匹，雌 7 匹），8 週 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹），12 週 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹）であった．33G 針穿刺群では，1 週 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹），2 週 10 匹（雄 9 匹，雌 1 匹），4 週 11 匹（雄 5 匹，雌 6 匹），8 週 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹），12 週 10 匹（雄 7 匹，雌 3 匹）であった (Figure 2).

また前述の 106 匹に加え，11 週齢雌雄 C57BL/6 マウス 16 匹（雄 8 匹，雌 8 匹）に対して同様の麻酔下に Sham 手術を行った．Sham 手術の定義は，腰椎を後側方アプローチにより展開し，椎間板の針穿刺をせず閉創する手術とした．術後 2，4，8，12 週後に同様の手法で安楽死させ評価した．術後期間と性別におけるマウスの数は，各時点において 4 匹（雄 2 匹，雌 2 匹）であった (Figure 2).

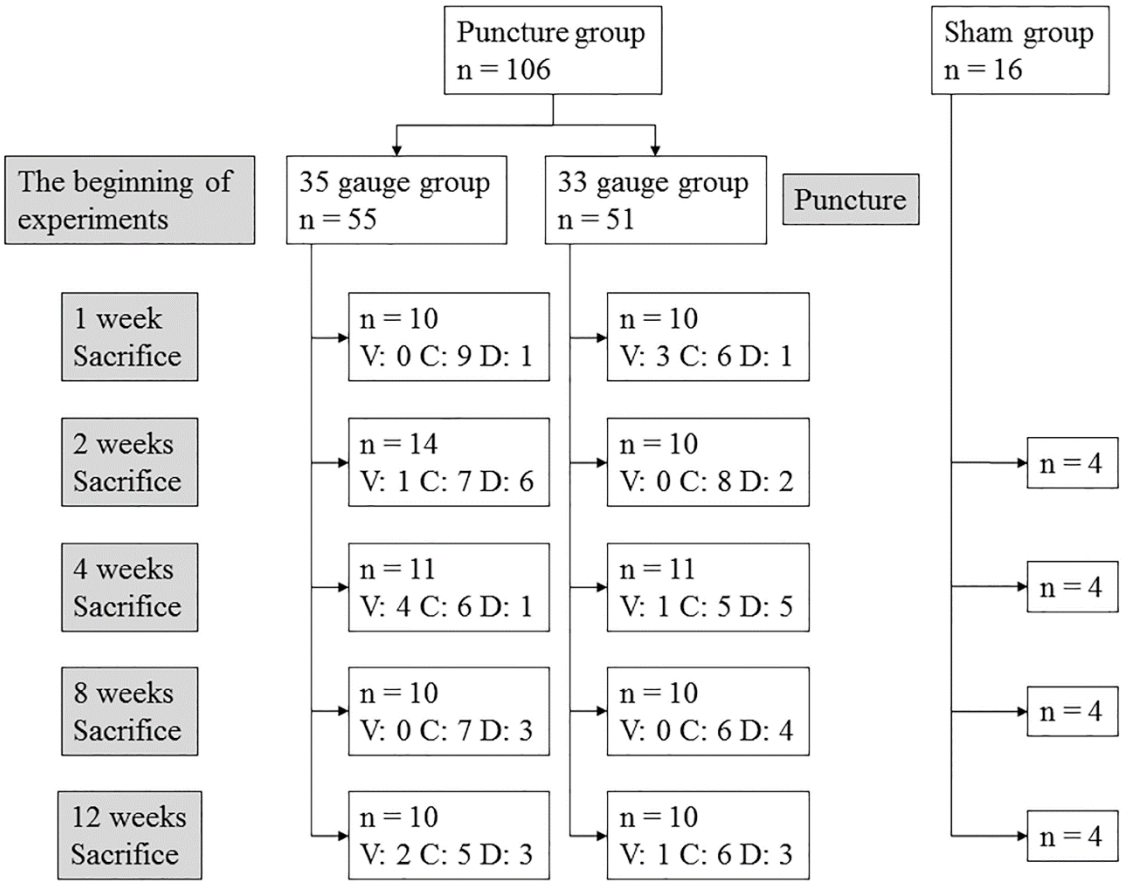

Figure 2. 実験のタイムコースと症例数を示すフローチャート．V は腹側領域, C は中心領域，D は背側領域を示す.

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

椎間板変性を評価するため，7.0-Tesla MR scanner (Unity Inova, Varian)を用いた．安楽死したマウスから腰椎を切除し，T2 強調正中矢状断を撮像した．椎間板変性の重症度を評価するため，Pfirrmann 分類 [14] を用いてスコア化した．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．コントロールとして，非穿刺 L3/4 椎間板のスコアを用いた．

また, Analyze 10.0 software (AnalyzeDirect) を用いて, 正中矢状断における MRI index (髄核の平均信号強度と髄核面積の積)[2,3,15] を測定し定量的に評価した．コントロールとして，非穿刺 L3/4 と L5/6 椎間板の MRI index 平均値を用いた．穿刺 L4/5 椎間板における MRI index を，コントロールの 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 撮影後，10%ホルムアルデヒドでサンプルを 48 時間固定，10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH7.5)で 2-4 週間脱灰処理し，パラフィンに包埋, 矢状断 5-μm 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，サフラニン-O 染色を施した．椎間板変性の重症度は 4 種類の組織分類 Masuda[11]，Nishimura[16]，Yang[9]，そして我々の分類 (Figure 3) を用いてスコア化した. Masuda[11] の分類は 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．Nishimura[16] の分類は 2 種類のカテゴリ（線維輪の配列，軟骨終板の細胞数・配列）からなるが，実用的には線維輪の配列のみで 1 点 (normal) ～ 5 点 (highly degenerative)のスコアで用いられている．Yang[9] の分類は 2 種類のカテゴリ（線維輪の配列，髄核の性状）からなり，0 点 (normal) ～ 8 点 (highly degenerative)のスコアとなる．我々の分類は, 2 種類のカテゴリ（線維輪の配列, 髄核の性状）からなり, 0 点 (normal) ～ 10 点 (highly degenerative)のスコアとなる (Figure 3).

また，椎間板高と椎体終板間の領域で測った椎間板前後径を計測した．コントロールとして，非穿刺 L3/4 椎間板のスコアを用いた．

Intervertebral disc	Score	Findings
Annulus fibrosus (AF)	0	Normal
	1	Mildly serpentine (not bulge beyond endplate edge)
	2	Moderately serpentine (slightly bulge beyond endplate edge)
	3	Severely serpentine (obviously bulge beyond endplate edge)
	4	Severely serpentine and ruptured
	5	Indistinct
Nucleus pulposus (NP)	0	Normal
	1	Condensed
	2	Existence of chondrocyte-like cells, residual NP matrix
	3	Global existence of chondrocyte-like cells
	4	Mildly replaced by fibrous cartilaginous tissue
	5	Moderately or severely replaced by fibrous cartilaginous tissue

Degeneration score = AF score + NP score.

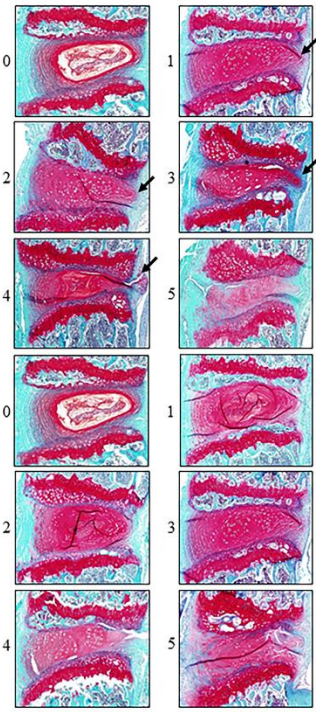

Figure 3. 我々が提唱する組織分類．矢印は線維輪の波状化所見を示す．

統計分析

MRI index と各組織分類スコアの相関分析を行った．術後期間と針の貫通領域が椎間板変性に対して有意な因子か重回帰分析で検証した．各貫通領域の椎間板の変性と非穿刺コントロール椎間板の変性の比較に Kruskal-Wallis test を用いた．穿刺椎間板における我々の分類の annulus fibrosus (AF) score と nucleus pulposus (NP) score に対して術後期間が有意な因子か単回帰分析で検証した．さらに，各時点の NP score を比較するため，Tukey honestly significant difference (HSD) test を用いた．椎間板高と椎間板前後径に対して，術後期間が有意な因子か単回帰分析で検証した．35G と 33G 針穿刺椎間板の Pfirrmann 分類スコア [14], MRI index そして我々の組織分類スコアの比較に Kruskal-Wallis test を用いた．P 値 < 0.05 を有意とした．

実験結果

組織分類スコアの比較

初めに，4 つの組織分類による 35G 針穿刺群のスコア分布を比較した (Figure 4). Masuda の分類スコア [11] は歪度(skewness: Sk) -1.27 で正規分布を示さず，天井効果も生じた．よって，Masuda の分類 [11] はこのマウス椎間板変性モデルの評価に適切ではないことが示された．対照的に，Nishimura の分類 [16]，Yang の分類 [9] と我々の分類は Sk と尖度(kurtosis: Ku)が共に-1 から 1 の間にあり正規分布を示した (Nishimura の分類 [16]：Sk = 0.97，Ku = 0.66；Yang の分類 [9]：Sk = -0.69, Ku = -0.96；我々の分類：Sk = -0.09, Ku = -0.72)．しかし，Nishimura の分類スコア [16] には外れ値があり，Sk は我々の分類の値よりも高かった．さらに，Nishimura の分類スコア [16] は床効果を，Yang の分類スコア [9] は天井効果を示したが，我々の分類スコアは床効果，天井効果を共に示さなかった．これらの結果より，我々の分類はこのマウス椎間板変性モデルの段階的な変性変化を最も正確に検出できると解釈できた．

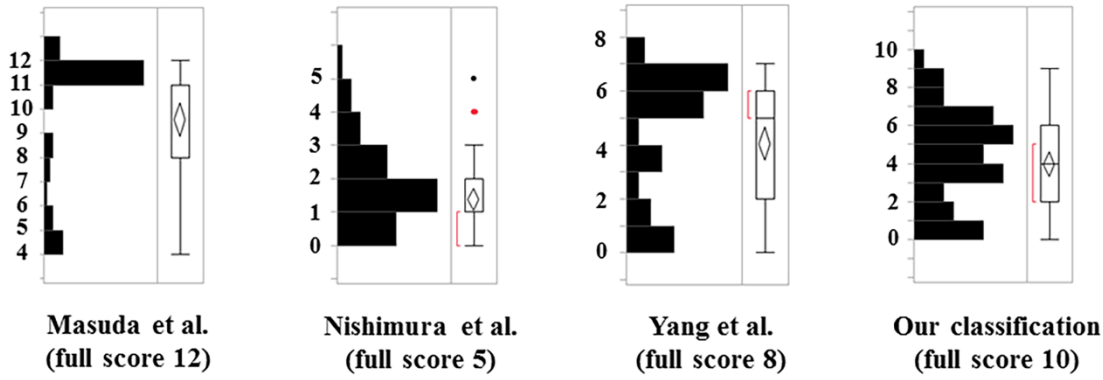

Figure 4. 病理分類スコア分布の比較．赤括弧は 50%のデータを含む最少範囲を示す．Nishimura の分類 [16] の赤と黒点は外れ値を示す．

我々の組織分類スコアと MRI index の相関分析

我々の組織分類スコアと MRI index の相関係数と単回帰分析の結果, $\rho = -0.66$, $R^2 = 0.44$ であり，良い相関と直線への当てはまりを示した (Figure 5)．散布図と確率楕円分析では，各貫通領域の 50%確率楕円は細長く，良好に分離しており，直線への良い当てはまりを示していた．さらに，中心領域と背側領域貫通症例において，それぞれ $p = 0.01$, $p = 0.002$ と有意な相関を示していた (Figure 5).

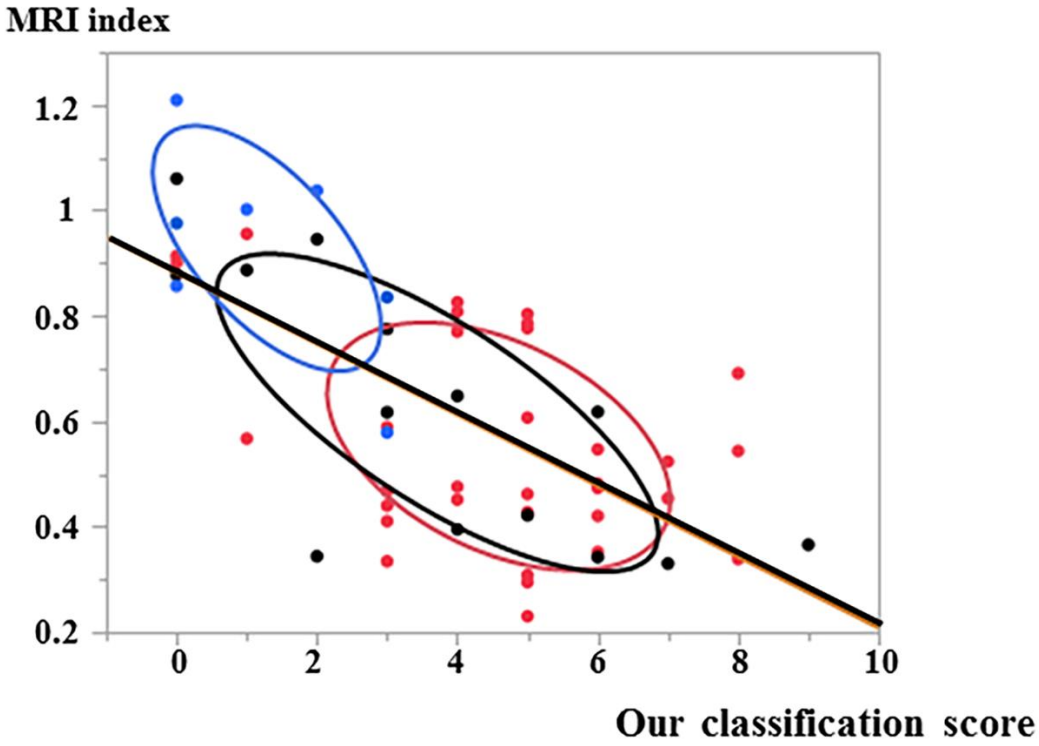

Figure 5. 我々の組織分類スコアと MRI index の相関．青，黒，赤色の点はそれぞれ腹側，背側，中心領域の症例を示す．楕円は各領域の二変量正規分布による 50%確率楕円を示す.

椎間板変性を誘発する有意な因子の分析

次に椎間板変性に最も寄与する因子を同定するため，重回帰分析にて貫通領域（腹側・中心・背側領域）と術後期間が有意因子か検定した．その結果，術後期間は有意でなく，貫通領域が有意な因子であった (Table 1).

	Punctured region	Time point
35G		
Pfirrmann grade	< 0.01*	0.99
MRI index	< 0.01*	0.03**
Classification by us	0.04*	0.20
33G		
Pfirrmann grade	< 0.01*	0.34
MRI index	< 0.01*	0.13
Classification by us	< 0.01*	0.27

Table 1. 椎間板変性に有意な因子を同定するための重回帰分析結果．値は，p 値を示す．* 統計学的有意，** Tukey HSD 検定の結果，非有意.

重回帰分析の結果を踏まえて，貫通領域別に穿刺椎間板と非穿刺椎間板（コントロール群）を比較した．非穿刺椎間板と比較して，中心または背側領域貫通症例の Pfirrmann 分類スコア [14] は有意に高く，MRI index は有意に低く，我々の組織分類スコアは有意に高かった．腹側領域貫通椎間板では，非穿刺椎間板と比較して我々の組織分類スコアは有意に高かった．しかし，Pfirrmann 分類スコア [14] や MRI index は、腹側領域貫通椎間板と非穿刺椎間板の間で有意差はなかった (Table 2) (Figure 6).

	Central region	Dorsal region	Ventral region
35G			
Pfirrmann grade	> Control*	> Control *	= Control
MRI index	< Control *	< Control *	< Control
Histological score	> Control *	> Control *	> Control *
33G			
Pfirrmann grade	> Control *	> Control *	> Control
MRI index	< Control *	< Control *	< Control
Histological score	> Control *	> Control *	> Control *

Table 2. コントロール群と比較した貫通領域別の椎間板変性分析. * $p < 0.05$.

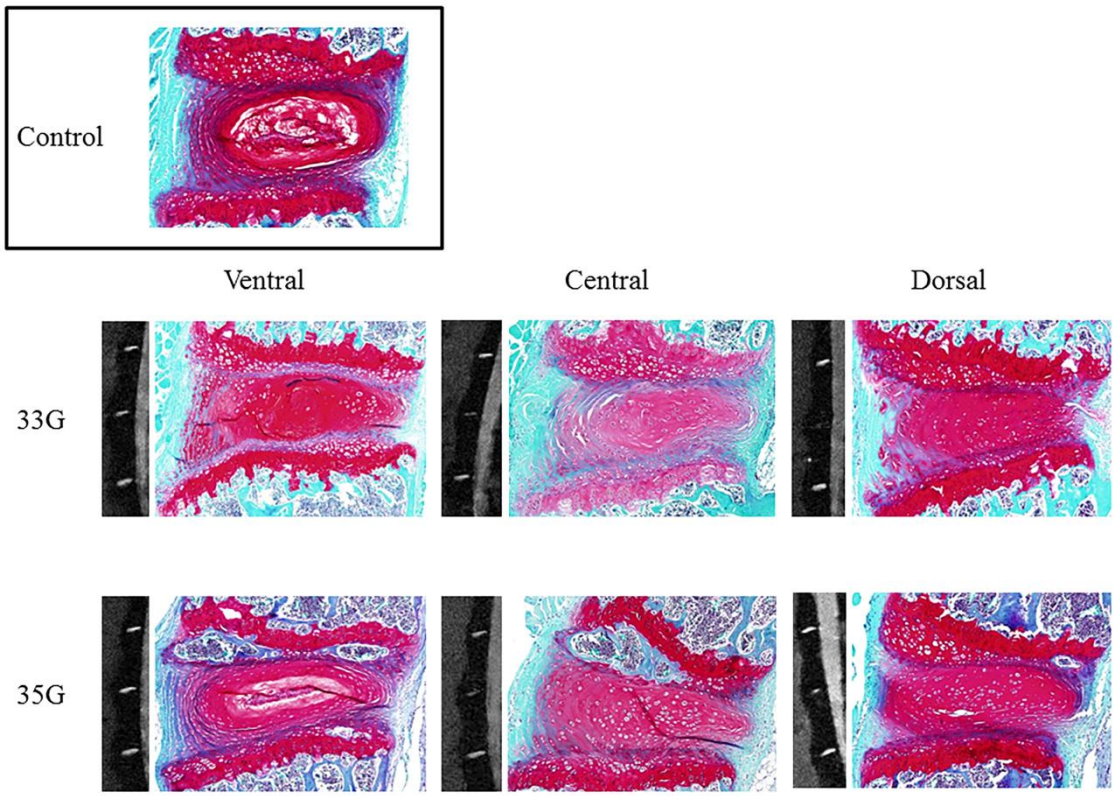

Figure 6. 貫通領域と椎間板変性．35G 針と 33G 針による穿刺後 4 週の症例の代表的 MRI 画像と組織画像.

我々の組織分類合計スコアに加えて, AF score と NP score を別々に分析した．すなわち単回帰分析を用いて，術後期間が中心，背側領域貫通椎間板の AF score と NP score に有意な因子かを検討した．各術後期間における NP score の比較に Tukey HSD 検定を用いた．33G 針穿刺群の術後 1 週における NP score と比較して，術後 8 週と 12 週における NP score は有意に高値であったが，それ以外の NP score や AF score には有意な変化を認めなかった.

また，椎間板高と前後径に対して，術後期間が中心，背側領域貫通椎間板の椎間板高と前後径に有意な因子か単回帰分析にて検討した．35G あるいは 33G 針により穿刺された L4/5 椎間板は L3/4 非穿刺椎間板（コントロール）と比較して，穿刺後 1 週間で約 10%の高さ低下と約 20% (35G)から約 30% (33G)の前後径増加を生じた．しかしながら，椎間板高と前後径は術後 1 週以降，有意な変化を示さなかった.

椎間板中心と髄核中心の位置関係の検討

解剖学的見地から組織の中央矢状断切片を用いて，健常なマウス 77 腰椎椎間板において，椎間板中心に対する髄核中心の偏位を計測した．CT 画像による針の貫通領域と組織学的評価を適合させるため，線維輪は椎体終板の間にある部分のみ評価対象とし，外側に膨隆した部分は除外した．椎間板中心と髄核中心を肉眼的に決定した後，中心間距離は Image J software (National Institutes of Health)を用いて計測した．腹側線維輪の幅，椎間板中心に対する髄核中心の背側偏位，そして背側線維輪の幅は，椎間板長径に対する割合として計算した．腹側線維輪幅は背側線維輪幅よりも大きく，髄核の背側偏位平均値(7%)は，腹側線維輪幅平均値(28%)と背側線維輪幅平均値(15%)の差に一致した (Figure 7).

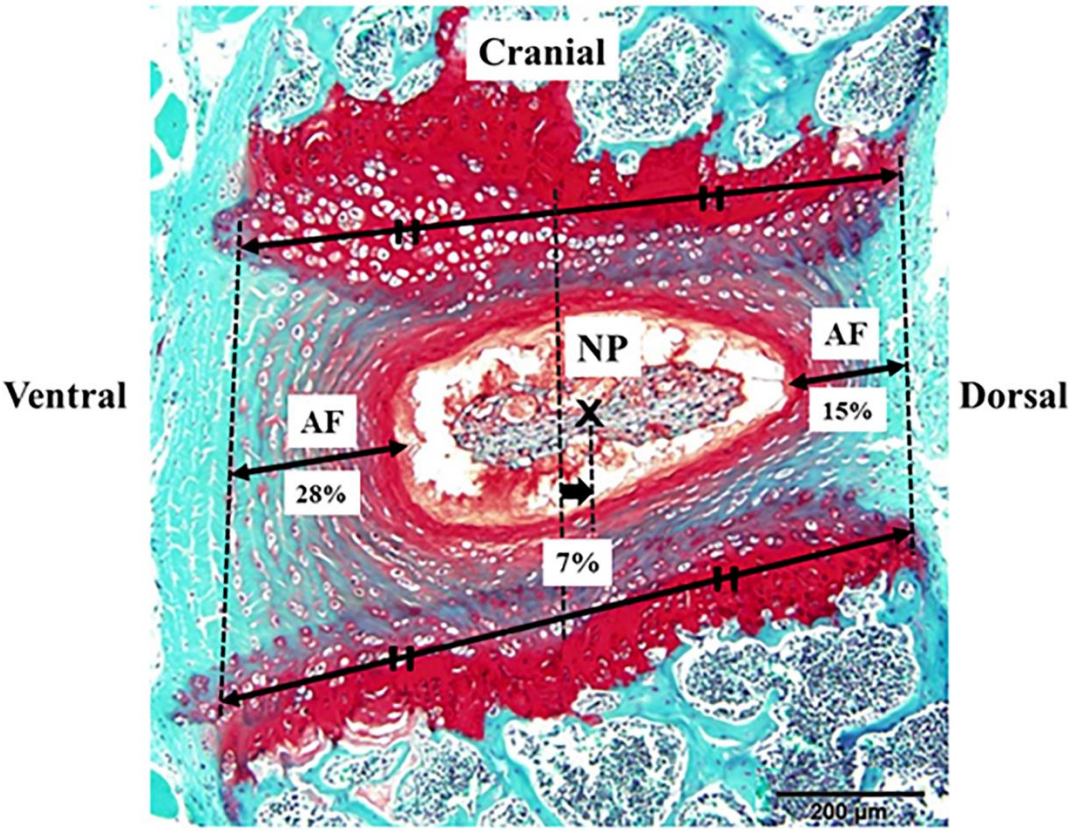

Figure 7. マウス腰椎椎間板の組織矢状断像．椎間板中心に対して髄核中心が背側に偏位している．健常な腰椎椎間板において，椎間板長軸に対する腹側線維輪幅，椎間板中心から髄核中心までの背側偏位距離，背側線維輪幅の割合を算出した（n=77）．腹側線維輪幅は背側線維輪幅よりも大きく，腹側線維輪幅の平均値(28%)と背側線維輪幅の平均値(15%)の差が，髄核中心の背側偏位平均値(7%)と一致した．

椎間板変性と穿刺針サイズ

MRI における評価(Table 3)と我々の組織分類スコアによる評価(Table 4)の結果, 33G 針で穿刺された椎間板は 35G 針で穿刺された椎間板より高度な変性を生じた．終板における血管新生や石灰化所見はなかった．Sham 手術群では，MRI と組織所見は正常だった.

	35G	33G	P
Pfirrmann grade			
1-week	2.50 ± 0.71	3.71 ± 1.11	0.03*
2-week	2.54 ± 0.88	4.30 ± 0.82	< 0.01*
4-week	2.43 ± 1.13	4.50 ± 0.53	< 0.01*
8-week	2.50 ± 0.85	4.60 ± 0.70	< 0.01*
12-week	2.50 ± 0.93	4.22 ± 0.83	< 0.01*
MRI index			
1-week	0.71 ± 0.14	0.47 ± 0.11	< 0.01*
2-week	0.54 ± 0.23	0.34 ± 0.09	0.01*
4-week	0.62 ± 0.29	0.34 ± 0.09	0.04*
8-week	0.51 ± 0.17	0.34 ± 0.15	0.02*
12-week	0.49 ± 0.20	0.34 ± 0.10	0.08

Table 3. 穿刺針サイズと MRI における椎間板変性所見．腹側領域貫通症例は除外して評価した．* 統計学的有意.

	35G	33G	P
Our classification score			
1-week	5.10 ± 1.91	4.86 ± 1.57	0.73
2-week	4.15 ± 1.82	6.30 ± 2.83	0.08
4-week	4.00 ± 3.00	6.70 ± 2.54	0.11
8-week	5.20 ± 2.66	7.30 ± 1.25	0.05*
12-week	2.88 ± 1.73	7.11 ± 1.69	< 0.01*

Table 4. 穿刺針サイズと我々の組織分類スコアにおける椎間板変性所見. 腹側領域貫通症例は除外して評価した. * 統計学的有意.

考察

加齢による自然発症の椎間板変性モデルを用いて椎間板変性機序を調査することは有用であるが，遺伝子組み換えマウスの中には短命のものもあり適用が困難である[17,18]．その点において，本穿刺モデルは短命な遺伝子組み換えマウスに対しても適用可能であり有用である．二足歩行のヒト椎間板研究のために，四足歩行動物を用いることに対する批判はあるかもしれない．しかしElliottら[19]は，幾何学的標準化を行った場合，マウス椎間板の機械的特性がヒト腰椎椎間板のそれに近いことを報告しており，マウスモデルを使うことに対する根拠となっている．更にマウス腰椎椎間板においては，いくつかの幾何学的，力学的特性が動物の体重と相関しているのに対し，尾椎椎間板では相関していないことから，二足歩行のヒトを模したモデルとしては腰椎の方が優れていることを示している[19,20]．これは，四足歩行動物の体重が腰椎に伝わっていることが考えられる．

過去に，針穿刺によるマウス腰椎椎間板変性モデルの研究報告がある[21]．しかし，フォローアップ期間が短い，症例数が少ない，主観的な組織学的評価といった欠点の他，一匹のマウスで連続した3つの椎間板(L4/5, 5/6, L6/S1)を穿刺しており，針の穿刺状態も肉眼による確認のみであることが研究限界として挙げられる. 我々の研究では, 各評価時期に10匹以上のマウスを評価し，術後12週までフォローアップしている．組織学的評価として4つの組織分類スコアを比較して，最適なスコアを採用し，1匹のマウスに対して椎間板穿刺は1つのみとした．更に，椎間板の針による穿刺状態をCTにより詳細に評価した．

Masudaら[11]は，ウサギにおいて初めて，針で椎間板線維輪を穿刺することで椎間板変性を惹起し，組織による椎間板変性の重症度を独自の点数化システムを用いて評価するモデルを確立した．Nishimuraら[16]はラット椎間板において，独自の重症度点数化システムを用いて評価した．さらにYangら[9]は，独自の重症度点数化システムを用いてマウス椎間板変性を評価した. 本研究では, Masudaの組織分類スコア[11]を用いると軽度の変性変化でも高い変性度スコアを示した. Masudaの組織分類スコア[11]では，30%の線維輪が波状化することでAF gradeが最高点となり，髄核が中等度凝縮を示しただけでNP gradeが最高点となった. マウスにおいてこれらの所見は，早期の変性所見や軽度変性所見として現れた. 「線維輪と髄核の境界」や「髄核の細胞充実度」の項目でも同様の結果を生じた. Nishimuraの組織分類スコア[16]を用いると, 0点から2点に集中した. Nishimuraの組織分類スコア[16]では，髄核が評価項目に入っていないが、マウスにおいては，早期に髄核の劇的な変性変化が生じるため，椎間板変性の評価から髄核を除外することは，変性の過小評価につながる．さらに、Yangの組織分類[9]を用

いると，5 点から 6 点に集中し，重症な変性を最高点に分類できていないことを示していた．結果として，3 つの組織分類スコアは椎間板変性の段階的な進行を検出できないことが示された．一方，我々の組織分類スコアはマウスの線維輪と髄核，そして椎間板全体の段階的な変性変化を正確に分類することが可能であった．

我々の組織分類スコアを用いることで，穿刺椎間板は，針の貫通領域に関わらず有意な変性を示した．しかし MRI による分析では，非穿刺椎間板コントロールと比較して，腹側領域貫通椎間板に有意な変性変化はなかった．今回の研究において、腹側線維輪が背側線維輪よりも厚いことが明らかとなっており、そのため，腹側線維輪に対する針穿刺が椎間板変性を生じる生体力学的効果は，背側線維輪穿刺に比べて低いと考えられる．さらに，髄核は生物学的反応の中心的な役割を果たしているが，髄核中心は椎間板内で背側に偏位しており，この解剖学的特徴と生体力学的，生物学的要因により，腹側領域貫通椎間板の変性変化は，中心，背側領域貫通椎間板よりも有意に低くなったと考えられる．椎間板変性を，病理学的評価のみならず， MRI 評価まで行う場合，中心領域と背側領域への穿刺を推奨する．

過去の研究報告を根拠に，我々は針のサイズを 35G と 33G に決定した．Elliot ら [22] によると，有意な変性を惹起するためには，針径は穿刺する椎間板高の 40%以上必要だとしている．穿刺による組織破壊を極力小さくし，なおかつ変性を生じさせるためには，35G (割合 50%)と 33G (割合 87%)は妥当と考えられ、椎間板変性の程度を考慮すると，35G モデルを椎間板変性制御研究に，33G モデルを椎間板再生研究に用いることを推奨する．

「術後期間」は椎間板変性を生じるための有意な因子ではなかったので，術後 1，2，4，8，12 週の Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，我々の組織分類スコア間に有意差はなく、この結果より，針穿刺により惹起されたマウス椎間板変性は，術後 1 週以内に劇的に進行しその後プラトーに達したと結論付けた．穿刺された椎間板変性の最終的な変性を評価するのには，1，2 週間の経過観察で十分であることが示唆された．

本研究ではマウスにおいて，μCT により針の腰椎椎間板貫通領域を確認し，椎間板変性重症度との関係を調査した．腹側領域の針穿刺は，変性を惹起しない可能性がある．腰椎椎間板に有意な変性を惹起するためには，中心または背側領域の穿刺が必要といえる．しかし，我々の組織分類スコアでは貫通領域に関わらず，段階的な変性変化の進行を検出できた．本結果を踏まえ，中心または背側領域の穿刺のため，μCT の代わりに高解像度 X 線透視機械を用いて，椎間板穿刺を行うことも可能であることが示唆された．

第二章

加齢性自然発症のマウス腰椎椎間板変性モデル

緒言

動物モデルによる研究は，ヒト脊椎の外傷，病態，修復に関する生物学的、生体力学的特性を理解する上で適切な基準となってきた[23]. マウス腰椎椎間板穿刺変性モデルは，外傷性椎間板変性を模したモデルとして第一章で報告した．しかしながら，椎間板変性には非外傷性の病態もある．多くの患者が外傷の既往がなく，経時的に椎間板変性を呈する．このことはヒト椎間板変性研究に，外傷モデルだけでなく，加齢性自然発症椎間板変性モデルを用いることの重要性を示している．

マウスにおける加齢性自然発症椎間板変性モデルはいくつか報告がある[24-32]．MRI や組織分類による評価など，様々な調査が経時的になされた．MRI 評価ではマウスの半生以上の期間を観察したが，信号変化を伴う変性所見は得られなかった[31] とする報告や、Boos の組織分類スコア[33]（ヒト椎間板変性研究で開発された分類）を用いて, 3 ヵ月齢から軽度の椎間板変性所見を確認し, 徐々に進行したとする報告がある[27]．また、Millecamps の組織分類スコア[32] を用いて， 24 週齢（5.6 ヵ月齢）から軽度の椎間板変性所見を認め，緩徐な進行を示したとする報告もある[32]．このように組織学的評価は，様々な分類スコアを用いてなされてきたが、その結果は多岐に渡り、マウスの椎間板変性がいつ始まり，どのように進行するのか判断するための一定の見解は得られていない．

そこで，我々はマウス腰椎椎間板の変性所見を寿命年齢に到達するまで調査した．本研究では，マウス腰椎椎間板における加齢性自然発症の変性が，いつ始まりどのように進行するのか，MRI 評価と組織学的評価を元に明らかにしたので，ここに報告する．

実験方法

実験動物

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．6 ヵ月齢から 2 歳齢以上の C57BL/6 マウス 49 匹を，ペントバルビタールナトリウム 5mg 腹腔注射にて安楽死させた．各年齢におけるマウス数と性差は，6 ヵ月齢 10 匹（雄 6 匹，雌 4 匹），1 歳 2 ヵ月齢 11 匹（雄 9 匹，雌 2 匹），1 歳 6 ヵ月齢 11 匹（雄 7 匹，雌 4 匹），1 歳 10 ヵ月齢 12 匹（雄 12 匹），2 歳齢以上 5 匹（雄 3 匹，雌 2 匹）であった．6 ヵ月齢は，第一章の穿刺後 12 週群 6 匹（穿刺された L4/5 椎間板を除外），sham 手術後 12 週群 4 匹のデータを用いた．

MRI

椎間板変性を評価するため，7.0-Tesla MR scanner を用いた．安楽死したマウスから腰椎を切除し，全腰椎椎間板(L1/2, L2/3, L3/4, L4/5, L5/6, L6/S)の T2 強調正中矢状断を撮像した．L1/2 や L6/S 椎間板が欠損していた場合，評価は残存椎間板で行った．

椎間板変性の重症度を評価するため, Pfirrmann 分類 [14] を用いてスコア化した．また，Analyze 10.0 software（AnalyzeDirect）を用いて，正中矢状断における MRI index を測定し定量的に評価した．各腰椎椎間板における MRI index を，L6 椎体骨または仙骨の 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 撮影後，10%ホルムアルデヒドでサンプルを 48 時間固定したのち，10% EDTA (pH7.5)で 2-4 週間脱灰処理し，パラフィンに包埋，矢状断 5-μm 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，サフラニン-O 染色を施した．

組織学的評価では，第一章で考案した組織分類スコアを用いた．また，それを一部修正して組織分類スコアを作成した (Figure 8)．髄核凝縮を程度に応じて 3 段階に分類するため，次のような基準を設けた．軽度凝縮を NP score 1，明らかな線維化を伴う中等度凝縮を NP score 2，髄核基質の破壊と脊索細胞の散乱を伴い，線維軟骨組織には置換されていない高度凝縮を NP score 3 とした．両方の組織分類スコアで 10 点を最高点とし，最重症所見とした．

また，経時的な disc height index (DHI)[34] を計測した．DHI[34] は，Image J (National Institutes of Health)を用いて計測した腹側，中間，背側椎間板高の平均値を椎間板前後径で割った値である．

Intervertebral disc	Score	Findings
Annulus fibrosus (AF)	0	Normal
	1	Serpentine
	2	Mildly reversed contour (internally convex)
	3	Thickened and ingrowth centrally or ruptured
	4	Vague borderline with NP
	5	Indistinct
Nucleus pulposus (NP)	0	Normal
	1	Slightly condensed
	2	Moderately condensed (fibrous)
	3	Severely condensed (scattering cells)
	4	Mildly replaced by fibrous cartilaginous tissue
	5	Moderately or severely replaced by fibrous cartilaginous tissue

Degeneration score = AF score + NP score.

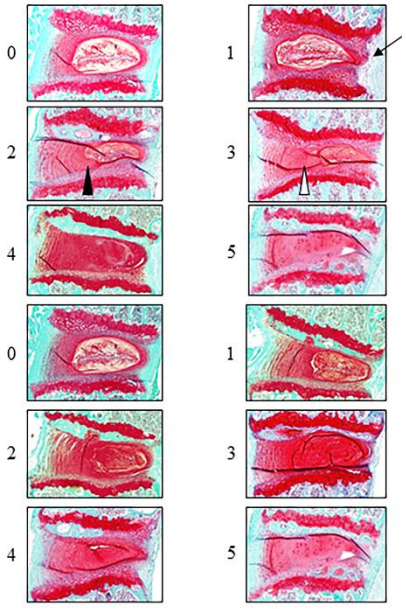

Figure 8. マウス加齢性自然発症椎間板変性モデル用に修正された組織分類スコア．矢印は線維輪の波状化所見，黒い矢頭は線維輪が内側に軽度凸状となった所見，白い矢頭は線維輪の内側への肥厚増殖所見を各々示す．

統計分析

MRI index と各組織分類スコアの相関分析を行った．椎間板高位が変性度に有意な因子か単回帰分析で検証し，有意な場合，Steel-Dwass test を用いて各椎間板高位間で変性度の有意差検定を行った．各年齢の Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，組織分類スコア，AF score，NP score，DHI[34] の比較に Steel-Dwass test を用いた．最後に，年齢とそれぞれ Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，組織分類スコアの間で相関分析を行った．P 値 < 0.05 を有意とした．

実験結果

2 種類の組織分類スコアによる評価比較

我々の第一章で作成した組織分類スコア（穿刺モデルスコア）と本モデル用に修正した組織分類スコア（加齢性モデルスコア）が，正確に変性変化を同定できるか，共に点数分布を評価した．穿刺モデルスコアは，程度に関わらず髄核凝縮を NP score 1 に分類しており，床効果を示した (Figure 9a)．さらに本モデルにおいて，線維輪の波状化は軽度であったゆえに，穿刺モデルスコアの AF score は 1 点に集中した. 一方, 加齢モデルスコアは床効果を示さなかった (Figure 9b).「線維輪が内側に軽度凸状」(AF score 2)と「線維輪の内側への肥厚増殖所見」(AF score 3)の段階を穿刺モデルスコアに加えることで，加齢モデルスコアは本モデルの段階的な変性変化をより良好に検出した．同様に，髄核凝縮を程度に応じて 3 段階に分類したことも，段階的な変性変化の検出を良好にした.

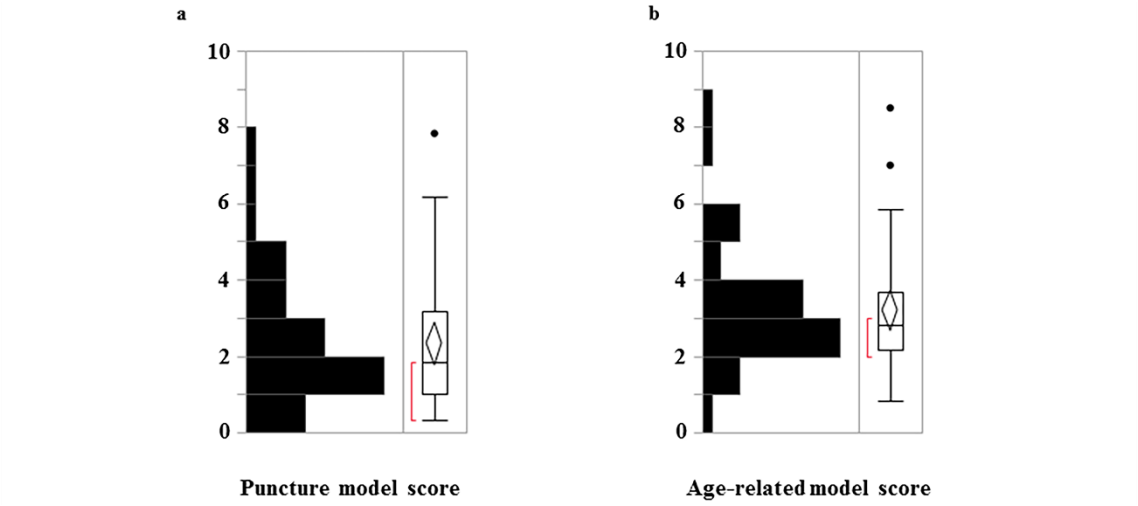

Figure 9. a) 穿刺モデルスコアと **b)**加齢モデルスコアの点数分布．赤括弧は 50%のデータを含む最少範囲を示す．点はスコアの外れ値を示す.

加齢モデルスコアと MRI index の相関分析

次に，加齢モデルスコアと MRI index の相関分析を行った．Figure 10 に全マウスの加齢モデルスコアと MRI index の散布図を示す. 加齢モデルスコアと MRI index の相関係数と単回帰分析の結果，$\rho = -0.57$，　$R^2 = 0.33$ であり，良い相関と直線への当てはまりを示した (Figure 10).

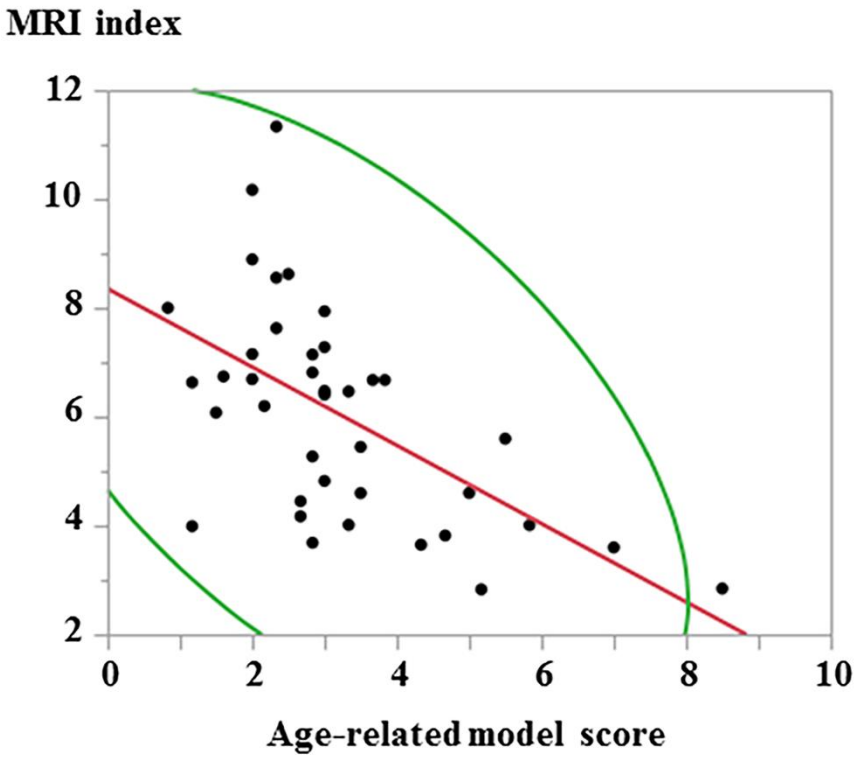

Figure 10. 加齢モデルスコアと MRI index の相関分析. 楕円は各領域の二変量正規分布による 99%確率楕円を示す.

椎間板高位と変性の関係

四つ足動物の中でも、ヒトの腰仙椎に形状が類似しているアルパカの頸椎の椎間板において、加齢変性の程度は椎間板高位と相関を示し，下位椎間板で変性が進行していたと報告されている [23]. そこで我々は本モデルにおいて，椎間板高位が変性と相関を持つかどうかを調査した.

単回帰分析を用いて，椎間板高位が Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，加齢モデルスコアに対して有意な因子かを調査した(Table 5). 1 歳 2 ヵ月齢で，椎間板高位は Pfirrmann 分類スコア [14] に対して有意な因子であった($p = 0.034$*). Steel-Dwass test による高位の多重比較の結果，L4/5 に比べて L2/3 のスコアが高く($p = 0.025$*)，L4/5 に比べて L6/S のスコアが高かった($p = 0.010$*). しかしながら椎間板高位は，MRI index や加齢モデルスコアに対して有意な因子ではなかった. 1 歳 6 ヵ月齢でも，椎間板高位は Pfirrmann 分類スコア [14] に対して有意な因子であった($p < 0.01$*). 同様に Steel-Dwass test による高位の多重比較の結果, L4/5 と L5/6 に比べて L6/S のスコアが高かったが(各 $p = 0.048$*，0.049*)，椎間板高位は，MRI index や加齢モデルスコアに対して有意な因子ではなかった. さらに 1 歳 10 カ月齢と 2 歳齢以上で, 椎間板高位は Pfirrmann 分類スコア [14], MRI index,

加齢モデルスコアに対して有意な因子ではなかった．よって，椎間板高位と本モデルの加齢性自然発症椎間板変性には，一貫した相関関係は認められなかった．

	P-value
6-month-old	
Pfirrmann grade	1
MRI index	0.252
Classification by us	< 0.01**
1-year 2-month-old	
Pfirrmann grade	0.034*
MRI index	0.307
Classification by us	0.481
1-year 6-month-old	
Pfirrmann grade	< 0.01*
MRI index	0.202
Classification by us	0.197
1-year 10-month-old	
Pfirrmann grade	0.357
MRI index	0.480
Classification by us	0.176
Over 2-year-old	
Pfirrmann grade	0.935
MRI index	0.883
Classification by us	0.980

Table 5. 椎間板高位が椎間板変性に有意な因子かを同定するための単回帰分析結果． * 統計学的有意，** Steel-Dwass test を用いた高位の多重比較の結果，非有意．

加齢と椎間板変性

椎間板高位とマウス加齢性自然発症椎間板変性に一貫した関連が認められなかったため，全腰椎椎間板の Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，加齢モデルスコア平均値を用いてマウスの総椎間板変性を評価することとした．

各年齢における MRI, 組織の代表的画像と Pfirrmann 分類スコア [14], MRI index, 加齢モデルスコアの平均値を Figure 11 と Figure 12 に示す．

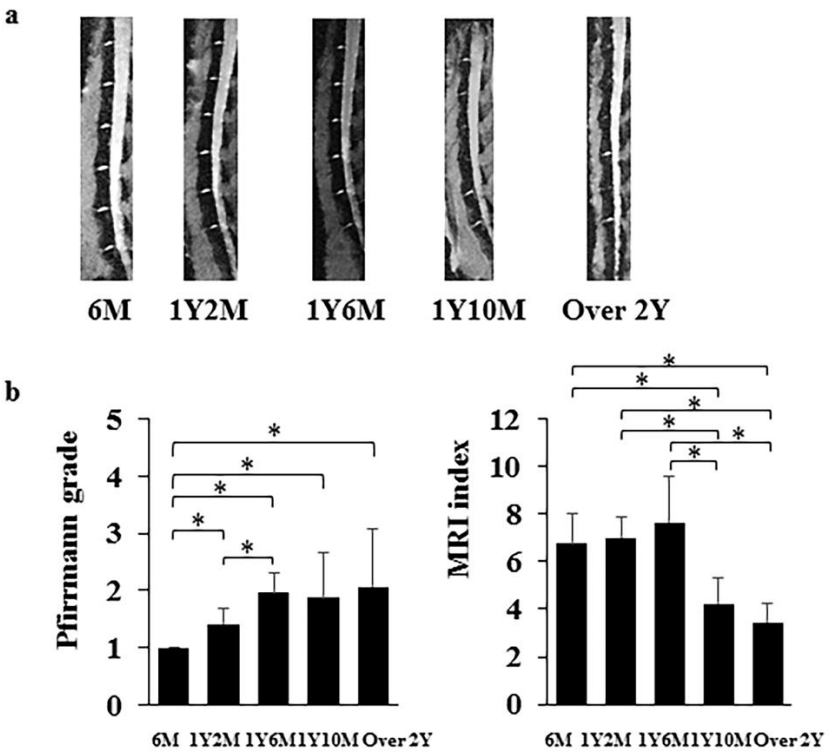

Figure 11. a) 各年齢の代表的な腰椎 MRI 画像．**b)** 各年齢の Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index 比較．Y は年齢，M は月齢を示す．平均±標準偏差．Steel-Dwass test を用いた多重比較を行った．* 統計学的有意 ($p < 0.05$).

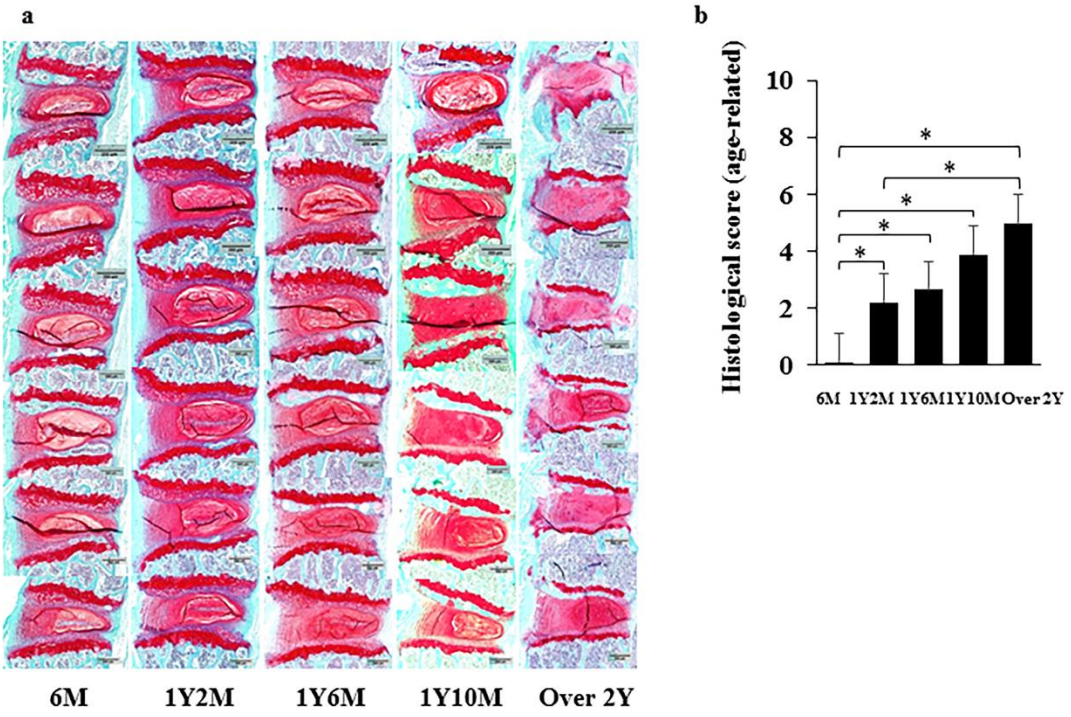

Figure 12. a) 各年齢の代表的な腰椎組織画像．**b)** 各年齢の加齢モデルスコア比

較．Y は年齢，M は月齢を示す．平均±標準偏差．Steel-Dwass test を用いた多重比較を行った． * 統計学的有意 ($p < 0.05$).

6 ヵ月齢と比較して，1 歳 2 ヵ月齢，1 歳 6 ヵ月齢，1 歳 10 カ月齢，2 歳齢以上の Pfirrmann 分類スコア [14] は有意に高かった．さらに，1 歳 2 ヵ月齢に比べて 1 歳 6 ヵ月齢の Pfirrmann 分類スコア [14] は有意に高かった (Figure 11b). 6 ヵ月齢，1 歳 2 ヵ月齢，1 歳 6 ヵ月齢と比較して，1 歳 10 カ月齢，2 歳齢以上の MRI index は有意に低かった (Figure 11b).

6 ヵ月齢と比較して，1 歳 2 ヵ月齢，1 歳 6 ヵ月齢，1 歳 10 カ月齢，2 歳齢以上の加齢モデルスコアは有意に高かった．さらに，1 歳 2 ヵ月齢に比べて 2 歳齢以上の加齢モデルスコアは有意に高かった (Figure 12b).

加齢モデルスコアに加えて，AF score と NP score も独立して分析した．Figure 13 に示すように，各スコアは加齢モデルスコアと同様の傾向を示した．

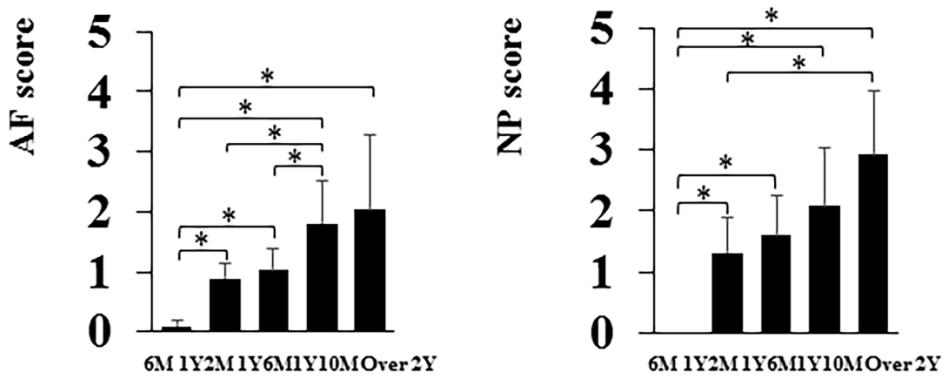

Figure 13. 各年齢の AF score 比較と NP score 比較. Y は年齢, M は月齢を示す. 平均±標準偏差．Steel-Dwass test を用いた多重比較を行った． * 統計学的有意 ($p < 0.05$).

最後に，加齢に伴う DHI[34] の変化を分析した．6 ヵ月齢と比較して，1 歳 2 ヵ月齢，1 歳 6 ヵ月齢の DHI[34] は有意に低かった (Figure 14).

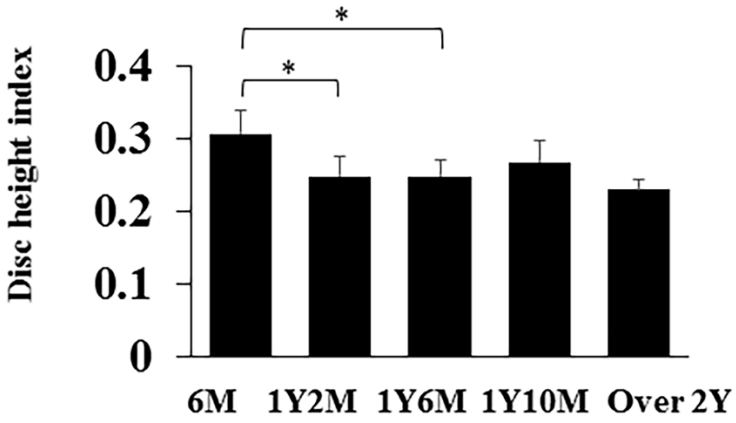

Figure 14. 各年齢の DHI[34] 比較．Y は年齢，M は月齢を示す．平均±標準偏差．Steel-Dwass test を用いた多重比較を行った． * 統計学的有意 ($p < 0.05$).

年齢と Pfirrmann 分類スコア，MRI index，加齢モデルスコアの相関分析

加齢と共に，Pfirrmann 分類スコア [14] と加齢モデルスコアは増加し，MRI index は減少した．

年齢と Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，組織分類スコアの相関係数と単回帰分析の結果，Pfirrmann 分類スコア [14] では $\rho = 0.56$， $R^2 = 0.32$，MRI index では $\rho = -0.52$， $R^2 = 0.27$，加齢モデルスコアでは $\rho = 0.80$， $R^2 = 0.64$ であり，良い相関と直線への当てはまりを示した (Figure 15)．特に，Pfirrmann 分類スコア [14] と MRI index に比べ, 加齢モデルスコアはより良い相関と直線への当てはまりを示した．

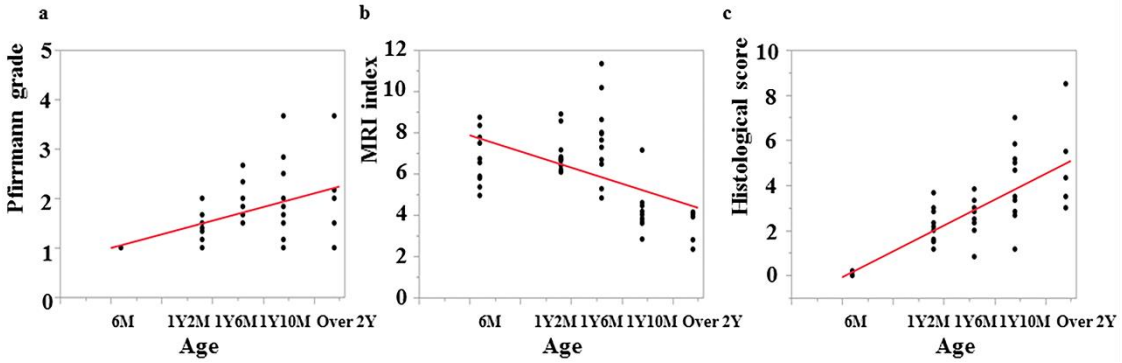

Figure 15. 年齢と **a)** Pfirrmann 分類スコア [14]， **b)** MRI index， **c)** 組織分類スコアの相関分析．各マウスの値と年齢による散布図．Y は年齢，M は月齢を示す．

考察

我々は，第一章でマウス腰椎の外傷性椎間板変性における新しい組織分類スコアを作製し，変性変化の段階的な進行を正確に検出できることを確認した．本研究においても，その組織分類スコアを用いて加齢性自然発症椎間板変性の評価を試みた．しかしながら，本研究の加齢性自然発症椎間板変性と第一章で報告した外傷性椎間板変性の違いにより，それは難しかった．外傷性椎間板変性は，線維輪の急速な波状化を伴うのに対して，加齢性自然発症椎間板変性ではそのような所見は稀で，線維輪の内側への肥厚増殖所見を認めた．さらに、外傷性椎間板変性の髄核では，凝縮所見を見ることは稀で，早期に軟骨様細胞が出現し，その後，線維軟骨組織に置き換わった．加齢性自然発症椎間板変性モデルでは，髄核凝縮は早期に始まり，徐々に進行しその後，線維軟骨組織に置き換わった．

我々は変性の違いを考慮し，外傷性椎間板変性で作成した組織分類スコアの AF score と NP score を修正して，加齢性自然発症の椎間板変性状態に適合するような組織分類スコアを作製した．修正された組織分類スコアは，加齢性自然発症椎間板変性における，線維輪，髄核，そして椎間板の段階的な変性変化を確実に分類することが可能であった．さらに，本スコアと MRI index との相関も良好であることが確認された．

アルパカの頸椎では，椎間板高位と自然発症椎間板変性の間に強い相関を認めたという研究報告がある [23]．マウスでは，症例数が少なく統計学的検定がなされていなかったが，L1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6 の腰椎椎間板変性は高位を問わず同様であったとする報告がある [32]．本研究において，MRI と組織学的評価では，椎間板高位と変性の程度の間に一貫した相関関係は見られなかったため，全腰椎椎間板の Pfirrmann 分類スコア [14]，MRI index，加齢モデルスコア平均値を用いてマウスの総椎間板変性を評価，比較することが適切と考えられた．

本研究において，MRI と組織学的評価では，6 ヵ月齢のマウス腰椎椎間板に有意な変性変化を認めなかった．1 歳 2 ヵ月齢では，程度は軽いものの Pfirrmann 分類スコア [14] と病理学的変性スコアが有意に上昇した．さらに，1 歳 10 カ月齢において，変性変化は中等度から重度に到達した．変性の程度を考えると，これらの年齢が椎間板変性制御や再生研究における経時的加齢モデルに対する適切な評価時期だと考えられた．

早老症マウスは，マウス加齢性自然発症椎間板変性モデルの代わりとなりうる．しかし，経時的な加齢性変化を考慮した場合に、加齢に伴う正常な表現型を呈するわけではないため，ヒトへのデータの当てはめは注意を要する [35]．椎間板変性モデルとしては，近年 Ercc1$^{-/\triangle}$マウスが注目を集めている [36]．このマウス

は, deoxyribonucleic acid (DNA)修復ヌクレースである ERCC1-XPF が正常の 10%しか発現せず，最長寿命が 7 ヵ月である．このマウスの椎間板は，椎間板高の低下，プロテオグリカン量の減少，基質のプロテオグリカン産生低下，アポトーシスや細胞老化の促進といった変性所見を，正常マウスよりも早く呈するが、Ercc 1 欠損と他の遺伝子組換え操作の未知の相互作用も否定はできない.

本研究では，1 歳 2 ヵ月齢で変性変化が徐々に始まり，1 歳 6 ヵ月齢でさらなる変性の進行が見られた．変性の程度を考えると，これらの年齢が椎間板変性制御研究に適切な評価時期だと考えられた．我々の組織分類スコア（加齢モデルスコア）は，マウス腰椎における加齢性自然発症椎間板変性の病理学的評価として適切であると考えられた.

第三章

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

緒言

椎間板髄核はプロテオグリカンやⅡ型コラーゲンを豊富に含有する細胞外基質で構成された組織である．この基質は髄核細胞により産生され椎間板機能の維持に重要な役割を担っている．椎間板変性において，髄核細胞アポトーシスの関与が報告されており [37,38]，髄核細胞が減少することで細胞外基質の産生が減少し，組織変性が進行するとされている [39]．

Sudo ら [2] の過去の研究では，髄核細胞のアポトーシス関連遺伝子である caspase 3 を遺伝子レベルで制御することにより，*in vitro*，*in vivo* 環境下で髄核細胞のアポトーシスを抑制し，椎間板組織の変性抑制が可能であることを実証した．

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る．また，外傷や力学的環境変化により生じる椎間板変性をターゲットに本治療が有効であることを実証してきたが [2,3]，加齢に伴う椎間板変性に対しても有効であるかを検証する必要がある．

本研究では，caspase 3 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．*In vitro* 試験と外傷性，加齢性モデルを用いた *in vivo* 試験の結果，caspase 3 KO マウスにおいて，髄核細胞のアポトーシスが抑制され，外傷性変性は進行が遅延した．一方，加齢性自然発症変性は caspase 3 KO マウスにおいて増悪していた．これらの結果より，加齢性自然発症変性は外傷性変性とは異なる病態であることが示唆された．椎間板変性メカニズムの分析と共に，本治療戦略について検証したので報告する．

実験方法

実験動物

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，北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した．

The Jackson Laboratory より C57BL/6 マウスをバックグラウンドとした caspase 3 KO マウス雄を 2 匹購入し安楽死させて精子採取を行った．C57BL/6 マウス雌に体外受精卵を挿入し，出産の後 heterogenic マウスを得た．これらのマウスを交配させて生まれた仔から，polymerase chain reaction (PCR)法による genotyping (Figure 16)を用いて caspase 3 KO マウス雌雄を抽出した．

Protocol Primers

Primer	5' Label	Sequence 5' --> 3'	3' Label	Primer Type
oIMR5338		GCG AGT GAG AAT GTG CAT AAA TTC		Wild type Forward
oIMR5339		GGG AAA CCA ACA GTA GTC AGT CCT		Wild type Reverse
oIMR5944		TGC TAA AGC GCA TGC TCC AGA CTG		Mutant Forward

Reaction/Components

Reaction Component	Volume(μl)
dd H_2O	7.0
10 x buffer	1.0
dNTP	0.5
Three primers	0.4
Extaq	0.1
DNA	1.0

Cycling

Step #	Temp °C	Time	Note
1	94	2 min	
2	94	20sec	
3	65	15sec	-0.5 C per cycle decrease
4	68	10sec	
5			repeat steps 2-4 for 10 cycles
6	94	15sec	
7	60	15sec	
8	72	10sec	
9			repeat steps 6-8 for 28 cycles
10	72	2 min	
11	10		hold

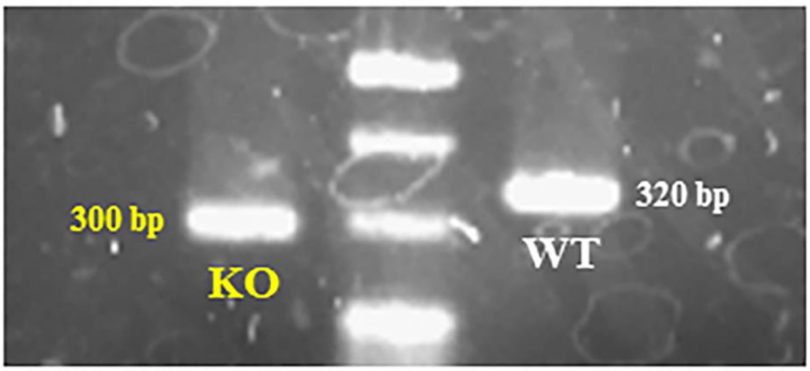

Figure 16. PCR 法による caspase 3 KO マウスの genotyping プロトコールと判定．ddH$_2$O (UltraPure Distilled Water; Invitrogen)，10 x buffer，dNTP，primers，Extaq，

Primer (DaKaRa BIO). KO は caspase 3 KO マウスを，WT は C57BL/6 wild type マウスを，bp は base pair 示す.

1. *In vitro* 試験 Immunocytofluorescence

C57BL/6 wild type (WT)マウスと caspase 3 KO マウスを頸椎脱臼法により安楽死させ，腰椎を摘出した．顕微鏡下に腰椎椎間板髄核を採取し，TrypLE Express Enzyme (1x)(Life Technologies)により 10 分間処理し，髄核細胞を単離した．得られた髄核細胞を 0.5% penicillin/streptomycin (Wako)，0.25μg/ml fungizone (Invitrogen)，10% fetal bovine serum (FBS; Nichirei Bioscience)を含む Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich)を培養液として Lab-Tek Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific)上で， 37℃，5% O_2，5% CO_2 で培養し，5〜7 日間で髄核細胞コロニー (colony forming unit spherical: CFU-S)[40] (Figure 17)の接着を確認した．CFU-S[40] の裏付けは，光学顕微鏡による円形状コロニーの確認と，Ⅱ型コラーゲンとアグリカンの免疫染色が同時陽性であることより行った (Figure 17). Ⅱ型コラーゲンは，48 時間 4% paraformaldehyde (PFA)浸漬後，1% PFA に室温で 20 分浸漬し，phosphate buffered saline (PBS)で 5 分間洗浄を 3 セット施行した. 0.1% Triton X PBS 混合液に室温で 30 分間浸漬後，1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) PBS 混合液に室温で 60 分間浸漬した. Ⅱ型コラーゲン抗体(1:400; Abcam)で 4℃ overnight 反応させ，PBS で 5 分間洗浄を 3 セット施行した．Alexa Fluor 488 (1:200; Life Technologies)で 60 分間反応させ，PBS・蒸留水洗浄後，4’, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)(Life Technologies)封入した．アグリカンは，48 時間 4% PFA 浸漬後，1% PFA に室温で 20 分浸漬し，PBS で 5 分間洗浄を 3 セット施行した. 0.1% Triton X PBS 混合液に室温で 30 分間浸漬後, 1% bovine serum albumin PBS 混合液に室温で 60 分間浸漬した. アグリカン抗体(1:100; Abcam) で 4℃ overnight 反応させ, PBS で 5 分間洗浄を 3 セット施行した. PE (1:200; Immuno Research) で 60 分間反応させ，PBS・蒸留水洗浄後，DAPI 封入した.

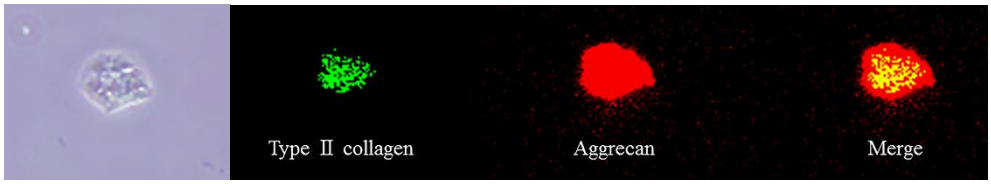

Figure 17. 髄核細胞コロニー(CFU-S)[40] の光学，蛍光免疫染色顕微鏡像.

6 ヵ月未満のマウスから採取した CFU-S[40] を若年群，1 歳 2 ヵ月齢のマウスから採取した CFU-S[40] を高齢群とした．また C57BL/6 WT マウス CFU-S[40] を WT 群，caspase 3 KO マウス CFU-S[40] を KO 群とした.

若年群では，髄核細胞のアポトーシスを惹起するため，血清除去モデル [2] を採

用した．CFU-S[40] より培養液を除去し，PBS で 2 回洗浄後，血清を含まない Minimum Essential Medium Eagle，0.5% penicillin/streptomycin，0.25μg/ml fungizone 培地を加え，37℃，5% O_2，5% CO_2 の条件で 48 時間インキュベートを行った（血清除去群）. 対照群として, 10% FBS を含む Minimum Essential Medium Eagle, 0.5% penicillin/streptomycin，0.25μg/ml fungizone 培地を用い，同条件でインキュベートを施行した（非血清除去群）．WT，KO 両群ともに同一の 8 chamber slide 上で操作した．48 時間 4% paraformaldehyde (PFA)浸漬後，PBS 洗浄後，0.3%過酸化水素メタノールにて 30 分間処理し，保冷剤上で 5 分間 parmeabillisation buffer (In Situ Apoptosis Detection Kit; TaKaRa BIO)に浸漬した．Fluorescein isothiocyanate (FITC)蛍光色素で標識した terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL)染色液(In Situ Apoptosis Detection Kit; TaKaRa BIO)に 37℃で 60 分間浸漬し DAPI 封入した．共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV300)を用いて撮像した. 血清除去群と非血清除去群で WT と KO 群の比較を行った.

更に高齢群の WT と KO マウスから採取した CFU-S[40] を，同一の chamber slide 上で matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)抗体(1:50; Santa Cruz)にて免疫染色した．48 時間 4% paraformaldehyde (PFA)浸漬後，PBS 洗浄した．MMP-3 抗体反応を 60 分間行い，Anti-Goat Alexa Fluor 568 (1:200; Thermo Fisher Scientific)で 30 分反応させ，DAPI 封入した．共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV300)を用いて撮像，両群を比較した.

評価には，半定量比較法（染色強度＋陽性率）スコア [41](Table 6)を用いた．スライド上の CFU-S[40] ごとにスコアを算出し，平均値を用いて群間比較を行った.

	Score	Finds
staining intensity		
	0	none
	1	weak
	2	moderate
	3	strong
proportion of positive cells		
	0	no staining
	1	1–50 % cells positive
	2	>50 % cells positive

Table 6. 免疫染色の半定量比較法 [41]. Total score = score of staining intensity + score of proportion of positive cells. 0 点もしくは，2 - 5 点.

2. *In vivo* 試験

外傷性椎間板変性モデル

11 週齢 C57BL/6 WT マウスと caspase 3 KO マウスに対して第一章で確立した腰椎椎間板穿刺変性モデルプロトコールを適用した．マウス数は 35G 群 WT 術後 2 週(2W) 13 匹（雄 4 匹，雌 9 匹），4W 9 匹（雄 5 匹，雌 4 匹），KO 2W 8 匹（雄 5 匹，雌 3 匹），4W 8 匹（雄 5 匹，雌 3 匹），33G 群 WT 2W 10 匹（雄 10 匹），4W 10 匹（雄 4 匹，雌 6 匹），KO 2W 10 匹（雄 2 匹，雌 8 匹），4W 10 匹（雄 8 匹，雌 2 匹）であった．35G または 33G 針を L4/5 椎間板に穿刺貫通させ有意な変性を生じる中心または背側領域貫通症例だけ抽出した．腰椎を術後 2, 4 週で摘出し，画像的評価と組織学的評価を行った．画像的評価は，MRI T2 強調中央矢状断像を用いて MRI index を測定した．コントロールとして，非穿刺 L3/4 と L5/6 椎間板の MRI index 平均値を用いた. 穿刺 L4/5 椎間板における MRI index を，コントロールの MRI index に対する割合で評価した．MRI 撮影後，10% ホルムアルデヒドでサンプルを 48 時間固定し，10% EDTA (pH7.5)で 2-4 週間脱灰処理し，パラフィンに包埋，矢状断 5-μm 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，サフラニン-O 染色を施した．組織学的評価は，穿刺モデルスコアを用いて行った．また，腫瘍化，悪性化の有無も組織学的に評価した.

加齢性自然発症椎間板変性モデル

第二章の結果をもとに, 1 歳 2 ヵ月齢と 1 歳 6 ヵ月齢の C57BL/6 WT マウスと caspase 3 KO マウスの腰椎を摘出し，全椎間板(L1/2, L2/3, L3/4, L4/5, L5/6, L6/S)に対して，画像的評価と病理組織学的評価を行った。L1/2 や L6/S 椎間板が欠損していた場合，評価は残存椎間板で行った．画像的評価は，MRI T2 強調中央矢状断像を用いて MRI index を測定した．各腰椎椎間板における MRI index を，L6 椎体骨または仙骨の MRI index に対する割合で評価した．全腰椎椎間板の MRI index 平均値を用いてマウス個体の MRI index とした．MRI 撮影後，10%ホルムアルデヒドでサンプルを 48 時間固定, 10% EDTA (pH7.5)で 2-4 週間脱灰処理し，パラフィンに包埋, 矢状断 5-μm 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，サフラニン-O 染色を施した．組織学的評価は，加齢モデルスコアを用いて行った．全腰椎椎間板の加齢モデルスコア平均値を用いてマウス個体の加齢モデルスコアとした.

統計分析

In vitro 試験の半定量比較法スコア [41] の比較，*In vivo* 試験の MRI index，組織分類スコアの比較には，Kruskal-Wallis test を用いた．P 値 < 0.05 を有意とした．

実験結果

1. *In vitro* 試験　Immunocytofluorescence

若年 WT，caspase 3 KO マウス髄核細胞の血清除去によるアポトーシス評価

別個体から採取した CFU-S[40] の接着したスライド 3 枚で，TUNEL 染色評価を各々行い，スコア平均値を算出した．非血清除去群では，WT，KO 群ともに TUNEL 染色陽性細胞を認めず，TUNEL 染色のスコアにおいても有意差はなかった．血清除去群では，WT 群で TUNEL 染色陽性細胞が増加したが，KO 群では TUNEL 染色の細胞数，スコアともに，WT 群に比べ有意に低値であった (Figure 18).

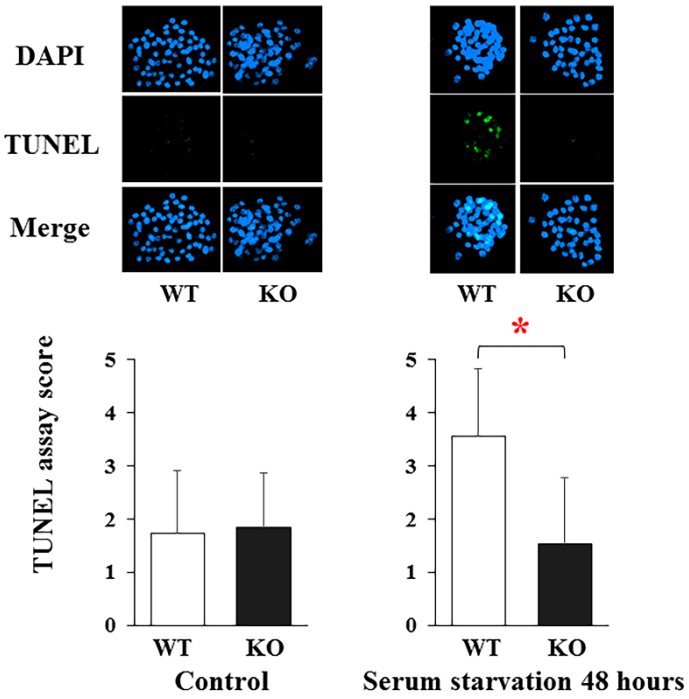

Figure 18. 若年マウス髄核細胞コロニーの血清除去モデルにおける TUNEL 染色評価．KO は caspase 3 KO マウスを，WT は C57BL/6 wild type マウスを示す．平均±標準偏差．＊ 統計学的有意 ($p < 0.05$).

高齢 WT，caspase 3 KO マウス髄核細胞における細胞外基質分解酵素の発現

CFU-S[40] の接着したスライド 1 枚で，MMP-3 免疫染色評価を行い，スコア平均値を算出した．1 歳 2 ヵ月齢の WT 群と比較して，KO 群では MMP-3 免疫染色のスコアが有意に高かった (Figure 19).

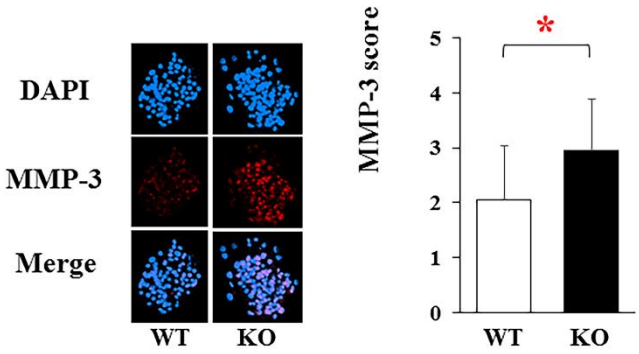

Figure 19. 高齢マウス髄核細胞コロニーにおける MMP-3 免疫染色評価．KO は caspase 3 KO マウスを, WT は C57BL/6 wild type マウスを示す. 平均±標準偏差. * 統計学的有意 ($p < 0.05$).

3. *In vivo* 試験

WT，caspase 3 KO マウスの外傷性椎間板変性比較

35G 針穿刺 2W では，WT に比較し caspase 3 KO マウスの穿刺椎間板は有意に MRI index が高く，有意に組織分類スコアが低かった．しかし 4W では，WT と caspase 3 KO マウス間で，MRI index と組織分類スコアの有意差はなかった (Figure 20).

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 2W，4W において，MRI index が高く，組織分類スコアが低かったが，有意差はなかった (Figure 21).

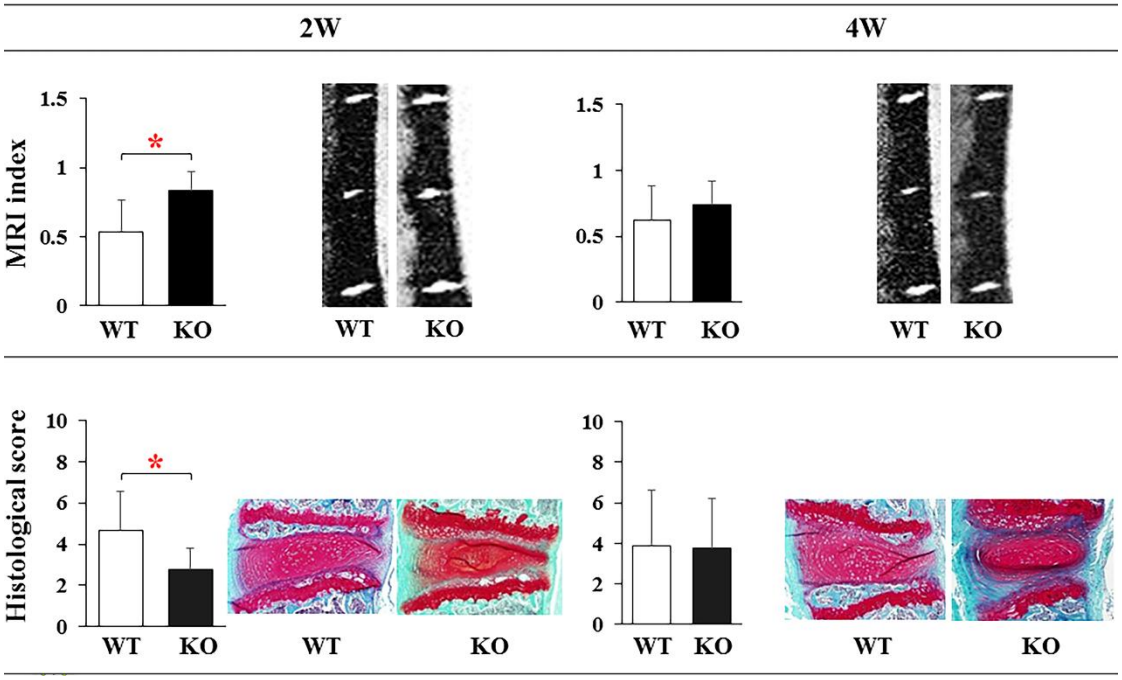

Figure 20. MRI と組織学的評価による 35G 針穿刺後の WT と caspase 3 KO マウス椎間板の変性評価．KO は caspase 3 KO マウスを，WT は C57BL/6 wild type マウスを示す．平均±標準偏差．＊ 統計学的有意 ($p < 0.05$).

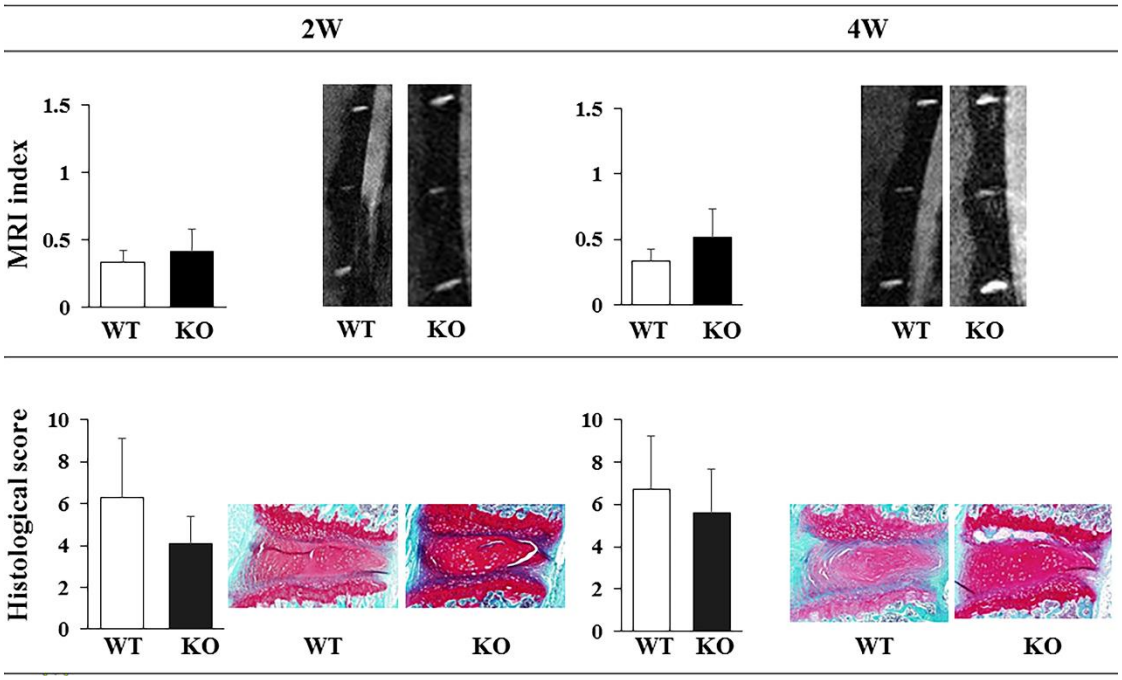

Figure 21. MRI と組織学的評価による 33G 針穿刺後の WT と caspase 3 KO マウス椎間板の変性評価．KO は caspase 3 KO マウスを，WT は C57BL/6 wild type マウスを示す．平均±標準偏差.

WT，caspase 3 KO マウスにおける加齢性自然発症椎間板変性変化の比較

1 歳 2 ヵ月齢と 1 歳 6 ヵ月齢で，WT マウスと比較して，caspase 3 KO マウスの MRI index は有意に低かった．同様に 1 歳 2 カ月齢において，WT マウスと比較して，caspase 3 KO マウスの組織変性スコアは有意に高かった．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，組織分類スコアが高かったが有意差はなかった (Figure 22).

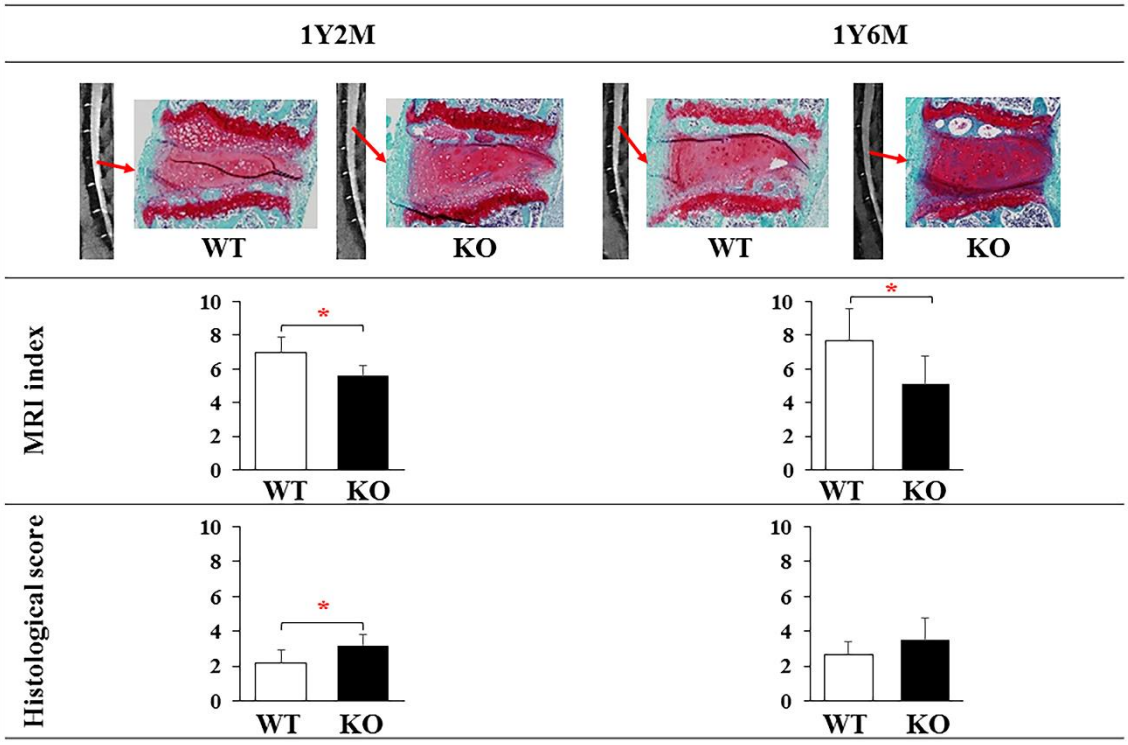

Figure 22. MRI と組織学的評価による 1 歳 2 ヵ月齢と 1 歳 6 ヵ月齢の WT と caspase 3 KO マウス椎間板の変性評価. Y は年齢, M は月齢を示す. KO は caspase 3 KO マウスを，WT は C57BL/6 wild type マウスを示す．平均±標準偏差．* 統計学的有意 ($p < 0.05$).

腫瘍化，悪性化所見有無の組織学的評価

非穿刺椎間板では，caspase 3 KO マウスの軟骨終板における細胞数が多く，密な配置であった．また nucleus-cytoplasm (N/C)比が高く二核細胞が少ないことから，増殖前段階に留まっている，又は，異型細胞が存在する所見であった．しかしながら，組織の腫瘍化所見はなかった．さらに，穿刺椎間板髄核内の軟骨様細胞でも同様な所見であった (Figure 23).

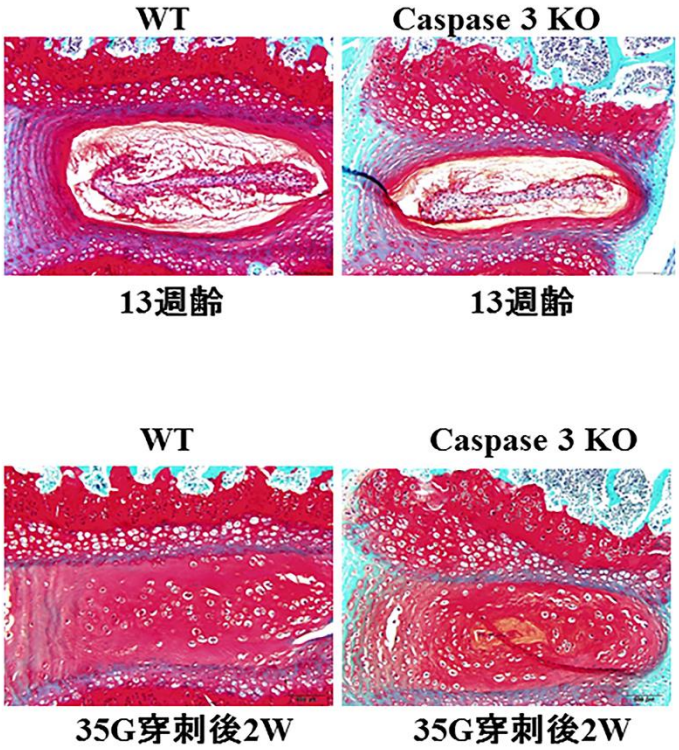

Figure 23. 腫瘍化, 悪性化所見有無の組織学的評価. サフラニン O 染色, 20 倍, 10 倍拡大像.

考察

本研究では，外傷と加齢に伴う椎間板組織変性に対する caspase 3 遺伝子 KO の効果を検証するため，WT，caspase 3 KO マウス髄核細胞を用いた *in vitro* 試験と，WT，caspase 3 KO マウス腰椎椎間板穿刺変性モデル，加齢性自然発症変性モデルを用いた *in vivo* 試験を行った．

In vitro 試験では，まず若年 WT，caspase 3 KO マウス髄核細胞を用いて，血清除去に対するアポトーシス反応性を解析した. WT マウスの髄核細胞ではアポトーシスが誘導されたのに対し, caspase 3 KO マウスの髄核細胞ではアポトーシスの誘導が抑制されていた．*In vivo* 試験では，11 週齢の WT，caspase 3 KO マウスに腰椎椎間板穿刺変性モデルを適用し比較することで，外傷性椎間板変性に対する caspase 3 遺伝子 KO の効果を検討した．35G 針穿刺による椎間板変性の進行は，WT マウスに比べて caspase 3 KO マウスで遅延していた．しかし，33G 針穿刺による椎間板変性の進行は, WT マウスと caspase 3 KO マウス間で有意差がなかった．これらの所見から，caspase 3 遺伝子 KO により髄核細胞アポトーシスが抑制され，椎間板変性の進行が遅延したと考えられた．過去の報告では，Fas 刺激で肝細胞アポトーシスを生じるモデルにおいて，caspase 3 KO マウスの生存期間が WT マウスと比較して延長したとしている [17]．この結果は，本研究結果と矛盾しないと考える. 一方, 33G 針穿刺による椎間板変性は, WT と caspase 3 KO マウス間で有意差がなかった．これは，caspase 3 遺伝子 KO による椎間板変性抑制効果が，椎間板障害の程度によって限界があることを示している．原因としては，椎間板変性が細胞のアポトーシスによって全て規定されている訳ではないことや，アポトーシスの代償機構が存在していることが考えられる．過去の報告では，caspase 3 KO 肝細胞にアポトーシスを誘導すると，WT では見られないような caspase 6，7 の活性化が見られたとしている [17]．椎間板の髄核細胞においても，同様の機構が存在している可能性はある．よって，若年 WT，caspase 3 KO マウス髄核細胞コロニーを用いた *in vitro* 試験において，血清除去による活性型 caspase 6，caspase 7，活性型 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，MMP，a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)の発現比較も今後必要であることが示唆された.

Caspase は，アポトーシスに対する作用を持つ以外に，細胞周期に影響を与えるが [42,43], 細胞周期回転を促進するか抑制するかは組織によって多様であるとしている [42]．本研究において，*in vitro* で採取できる細胞数に制限があったため，細胞周期回転を評価するデータは得られていないが，組織学的評価で軟骨終板における細胞の N/C 比が高く二核細胞が少なかったことより，増殖前段階に留まっていることが示唆された．つまり，椎間板においては caspase 3 遺伝子の KO

により細胞周期は抑制されている可能性がある．

In vivo 試験では，1 歳 2 ヵ月齢と 1 歳 6 ヵ月齢の WT，caspase 3 KO マウス腰椎椎間板を比較することで，加齢性自然発症椎間板変性に対する caspase 3 遺伝子 KO の効果を検討した．1 歳 2 ヵ月齢の腰椎椎間板変性は，WT マウスに比べて caspase 3 KO マウスで有意に高度であった．一方 1 歳 6 ヵ月齢で，MRI の腰椎椎間板変性所見は, WT マウスに比べて caspase 3 KO マウスで有意に高度であったが，組織学的評価で有意差はなかった．

この所見より，加齢性自然発症椎間板変性は外傷性椎間板変性とは異なる病態であることが示唆された．近年，椎間板変性の細胞アポトーシスとは別の病態として，細胞老化が指摘されている [44]．細胞老化を生じた髄核細胞が MMP, ADAMTS を分泌する senescence-associated secretory phenotype (SASP)[45] を呈することで，細胞外基質分解を促進し変性が進行するとされている [44]．本研究の *in vitro* 試験では，高齢 WT マウスに比べて，高齢 caspase 3 KO マウスの髄核細胞コロニーにおいて，MMP-3 の発現が有意に高度であったが，今後，本モデルにおいて caspase 3 KO により, SASP が増悪するかを確認する必要性が示唆された．

本研究結果より，椎間板変性の病態と caspase 3 遺伝子抑制による椎間板変性制御戦略を検討した．外傷性椎間板変性では，caspase 3 を介した髄核細胞アポトーシスが，変性の進行に関与している病態であり，一過性の caspase 3 遺伝子抑制は，椎間板組織の腫瘍化や悪性化の懸念が少ないと考えられるため，椎間板内で caspase 3 遺伝子を抑制することで変性の遅延効果を期待できる．一方，加齢性自然発症椎間板変性モデルにおいては，caspase 3 遺伝子を KO することで, 変性が増悪したため, 加齢性自然発症を背景とした椎間板変性に対しては, caspase 3 遺伝子の恒常的抑制はその適応に疑問あるいは限界があると考えられる．

本研究の限界として, caspase 3 KO マウスが全身性 caspase 3 KO マウスであり, 椎間板以外の臓器との相互作用が否定できない点が挙げられる．しかしながら, 椎間板は血流が乏しく，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ることから宿主の免疫機構より隔離された免疫学的特権が報告されている [46]．この点より，他臓器との相互作用の可能性は大きくないと考える．また, WT マウスと caspase 3 KO マウスの骨格，成長に違いが存在し，椎間板変性に影響を生じる可能性も挙げられる．経時的な体重測定による成長曲線解析や出産直後のマウスにおける全身骨格染色を今後確認していく必要がある．さらに, WT と caspase 3 KO におけるマウス椎体終板の違いがある．Caspase 3 KO マウスの椎体終板では，WT マウスに比較して細胞数が多く，密な配置であった．また細胞形態にも違いが見られた．髄核は椎体終板からの拡散により栄養供給がなされているため，椎体終板の違いは髄核における栄養状態の違いを生じる可能

性がある. この点を補うために, 栄養状態を統一した *in vitro* 試験を行うことで, 髄核細胞のアポトーシスや MMP 発現の比較検討を行った.

本研究では，caspase 3 遺伝子 KO の外傷性椎間板変性と加齢性自然発症椎間板変性に対する効果を検討した．Caspase 3 遺伝子 KO は外傷性椎間板変性の進行を遅延させたが，加齢性自然発症椎間板変性を増悪させた．Caspase 3 遺伝子抑制は，外傷性椎間板変性に対して一過性に行うことで，進行を遅延させる有用な治療手段となりうることが示唆された．また，caspase 3 遺伝子 KO に伴う組織腫瘍化や悪性化は見られず，安全性についても支持する結果であった.

総括および結論

- 外傷と加齢に伴う椎間板組織変性に対する caspase 3 遺伝子 KO の効果を検証するため, WT, caspase 3 KO マウス髄核細胞を用いた *in vitro* 試験と，WT，caspase 3 KO マウス腰椎椎間板穿刺変性モデル，加齢性自然発症変性モデルを用いた *in vivo* 試験を行った.

- *In vitro* 試験では，血清除去に対して若年 WT マウスの髄核細胞ではアポトーシスが誘導されたのに対し, 若年 caspase 3 KO マウスの髄核細胞ではアポトーシスの誘導が抑制されていた.

- 若年 caspase 3 KO マウスの変性, 非変性椎間板組織内で腫瘍化所見はなかった.

- 若年 WT，caspase 3 KO マウスを用いた *in vivo* 試験では，WT マウスに比べて caspase 3 KO マウスで外傷性椎間板変性の進行が遅延した．しかし，椎間板障害の程度によって限界があった.

- 高齢 WT，caspase 3 KO マウスを用いた *in vivo* 試験では，WT マウスに比べて caspase 3 KO マウスで加齢性自然発症椎間板変性が増悪した.

- 以上より, 加齢性自然発症椎間板変性は外傷性椎間板変性とは異なる病態であることが示唆された.

- Caspase 3 遺伝子抑制は, 外傷性椎間板変性に対して一過性に行うことで, 進行を遅延させる有用な治療手段となりうることが示唆された.

- 今後の課題の一つ目は，caspase 3 KO マウス椎間板内で，アポトーシス代償機構が存在しているか確認のため，若年 WT，caspase 3 KO マウス髄核細胞コロニーを用いた *in vitro* 試験において，血清除去による活性型 caspase 6，caspase 7，活性型 PARP の発現比較を行うことである．二つ目は，caspase 3 遺伝子 KO により，SASP が増悪するかを *in vitro* 試験で確認することである．三つ目は，WT マウスと caspase 3 KO マウスの経時的な体重測定による成長曲線解析, 出産直後のマウスにおける全身骨格染色の比較検討をすることである.

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学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を頂きました整形外科学分野教授岩崎倫政先生に深謝いたします．
また本研究を行うにあたり，研究全般に関してご助言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，統計学的手法のご指導および論文作成に関してご指導を頂いた北海道大学大学院医学研究科医学統計学分野伊藤陽一准教授，組織学的評価に関してご助言を頂いた北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野木村太一特任助教に深い感謝の意を表します．
最後に，これまでの研究課程において直接のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科脊椎・脊髄先端医学講座須藤英毅特任准教授をはじめ，整形外科学分野の諸先生方，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 Freemont, A. J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford)* 48, 5-10, (2009).

2 Sudo, H. & Minami, A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum.* 63, 1648-1657, (2011).

3 Yamada, K., Sudo, H., Iwasaki, K., Sasaki, N., Higashi, H., Kameda, Y., Ito, M., Takahata, M., Abumi, K., Minami, A. & Iwasaki, N. Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. *Am. J. Pathol.* 184, 753-764, (2014).

4 Key, J. A. & Ford, L. T. Experimental intervertebral-disc lesions. *J. Bone Joint Surg. Am.* 30A, 621-630, (1948).

5 Rousseau, M. A., Ulrich, J. A., Bass, E. C., Rodriguez, A. G., Liu, J. J. & Lotz, J. C. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)* 32, 17-24, (2007).

6 Osti, O. L., Vernon-Roberts, B. & Fraser, R. D. 1990 Volvo Award in experimental studies. Anulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine (Phila Pa 1976)* 15, 762-767, (1990).

7 Martin, J. T., Gorth, D. J., Beattie, E. E., Harfe, B. D., Smith, L. J. & Elliott, D. M. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J. Orthop. Res.* 31, 1276-1282, (2013).

8 Issy, A. C., Castania, V., Castania, M., Salmon, C. E., Nogueira-Barbosa, M. H., Bel, E. D. & Defino, H. L. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 235-244, (2013).

9 Yang, F., Leung, V. Y., Luk, K. D., Chan, D. & Cheung, K. M. Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocytic differentiation and stimulation of endogenous cells. *Mol. Ther.* 17, 1959-1966, (2009).

10 Hsieh, A. H., Hwang, D., Ryan, D. A., Freeman, A. K. & Kim, H. Degenerative anular changes induced by puncture are associated with insufficiency of disc biomechanical function. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 998-1005, (2009).

11 Masuda, K., Aota, Y., Muehleman, C., Imai, Y., Okuma, M., Thonar, E. J.,

Andersson, G. B. & An, H. S. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 5-14, (2005).

12 Sobajima, S., Kompel, J. F., Kim, J. S., Wallach, C. J., Robertson, D. D., Vogt, M. T., Kang, J. D. & Gilbertson, L. G. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 15-24, (2005).

13 Masuda, K., Imai, Y., Okuma, M., Muehleman, C., Nakagawa, K., Akeda, K., Thonar, E., Andersson, G. & An, H. S. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model. *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 742-754, (2006).

14 Pfirrmann, C. W., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J. & Boos, N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 1873-1878, (2001).

15 Iwasaki, K., Sudo, H., Yamada, K., Higashi, H., Ohnishi, T., Tsujimoto, T. & Iwasaki, N. Effects of single injection of local anesthetic agents on intervertebral disc degeneration: ex vivo and long-term *in vivo* experimental study. *PLoS One* 9, e109851, (2014).

16 Nishimura, K. & Mochida, J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)* 23, 1531-1538; discussion 1539, (1998).

17 Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D. W., Lazebnik, Y. & Flavell, R. A. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat. Med.* 6, 1241-1247, (2000).

18 Chien, W. M., Garrison, K., Caufield, E., Orthel, J., Dill, J. & Fero, M. L. Differential gene expression of p27Kip1 and Rb knockout pituitary tumors associated with altered growth and angiogenesis. *Cell Cycle* 6, 750-757, (2007).

19 Elliott, D. M. & Sarver, J. J. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 29, 713-722, (2004).

20 Smit, T. H. The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations. *Eur. Spine J.* 11, 137-144, (2002).

21 Liang, H., Ma, S. Y., Feng, G., Shen, F. H. & Joshua Li, X. Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture. *Spine J.* 10, 32-41,

(2010).

22 Elliott, D. M., Yerramalli, C. S., Beckstein, J. C., Boxberger, J. I., Johannessen, W. & Vresilovic, E. J. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 33, 588-596, (2008).

23 Stolworthy, D. K., Bowden, A. E., Roeder, B. L., Robinson, T. F., Holland, J. G., Christensen, S. L., Beatty, A. M., Bridgewater, L. C., Eggett, D. L., Wendel, J. D., Stieger-Vanegas, S. M. & Taylor, M. D. MRI evaluation of spontaneous intervertebral disc degeneration in the alpaca cervical spine. *J. Orthop. Res.* 33, 1776-1783, (2015).

24 Sahlman, J., Inkinen, R., Hirvonen, T., Lammi, M. J., Lammi, P. E., Nieminen, J., Lapvetelainen, T., Prockop, D. J., Arita, M., Li, S. W., Hyttinen, M. M., Helminen, H. J. & Puustjarvi, K. Premature vertebral endplate ossification and mild disc degeneration in mice after inactivation of one allele belonging to the Col2a1 gene for Type II collagen. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 2558-2565, (2001).

25 Ariga, K., Miyamoto, S., Nakase, T., Okuda, S., Meng, W., Yonenobu, K. & Yoshikawa, H. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 2414-2420, (2001).

26 Gruber, H. E., Sage, E. H., Norton, H. J., Funk, S., Ingram, J. & Hanley, E. N., Jr. Targeted deletion of the SPARC gene accelerates disc degeneration in the aging mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1131-1138, (2005).

27 Boyd, L. M., Richardson, W. J., Allen, K. D., Flahiff, C., Jing, L., Li, Y., Chen, J. & Setton, L. A. Early-onset degeneration of the intervertebral disc and vertebral end plate in mice deficient in type IX collagen. *Arthritis Rheum.* 58, 164-171, (2008).

28 Tajerian, M., Alvarado, S., Millecamps, M., Dashwood, T., Anderson, K. M., Haglund, L., Ouellet, J., Szyf, M. & Stone, L. S. DNA methylation of SPARC and chronic low back pain. *Mol. Pain* 7, 65, (2011).

29 Fujita, K., Ando, T., Ohba, T., Wako, M., Sato, N., Nakamura, Y., Ohnuma, Y., Hara, Y., Kato, R., Nakao, A. & Haro, H. Age-related expression of MCP-1 and MMP-3 in mouse intervertebral disc in relation to TWEAK and TNF-alpha stimulation. *J. Orthop. Res.* 30, 599-605, (2012).

30 Millecamps, M., Tajerian, M., Naso, L., Sage, E. H. & Stone, L. S. Lumbar intervertebral disc degeneration associated with axial and radiating low back pain in ageing SPARC-null mice. *Pain* 153, 1167-1179, (2012).

31 Marfia, G., Campanella, R., Navone, S. E., Zucca, I., Scotti, A., Figini, M., Di Vito, C., Alessandri, G., Riboni, L. & Parati, E. Potential use of human adipose mesenchymal stromal cells for intervertebral disc regeneration: a preliminary study on biglycan-deficient murine model of chronic disc degeneration. *Arthritis. Res. Ther.* 16, 457, (2014).

32 Millecamps, M., Czerminski, J. T., Mathieu, A. P. & Stone, L. S. Behavioral signs of axial low back pain and motor impairment correlate with the severity of intervertebral disc degeneration in a mouse model. *Spine J.* 15, 2524-2537, (2015).

33 Boos, N., Weissbach, S., Rohrbach, H., Weiler, C., Spratt, K. F. & Nerlich, A. G. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine (Phila Pa 1976)* 27, 2631-2644, (2002).

34 Reitmaier, S., Kreja, L., Gruchenberg, K., Kanter, B., Silva-Correia, J., Oliveira, J. M., Reis, R. L., Perugini, V., Santin, M., Ignatius, A. & Wilke, H. J. In vivo biofunctional evaluation of hydrogels for disc regeneration. *Eur. Spine J.* 23, 19-26, (2014).

35 Harkema, L., Youssef, S. A. & de Bruin, A. Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging. *Vet. Pathol.* 53, 366-389, (2016).

36 Vo, N., Seo, H. Y., Robinson, A., Sowa, G., Bentley, D., Taylor, L., Studer, R., Usas, A., Huard, J., Alber, S., Watkins, S. C., Lee, J., Coehlo, P., Wang, D., Loppini, M., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J. & Kang, J. Accelerated aging of intervertebral discs in a mouse model of progeria. *J. Orthop. Res.* 28, 1600-1607, (2010).

37 Rannou, F., Lee, T. S., Zhou, R. H., Chin, J., Lotz, J. C., Mayoux-Benhamou, M. A., Barbet, J. P., Chevrot, A. & Shyy, J. Y. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am. J. Pathol.* 164, 915-924, (2004).

38 Park, J. B., Lee, J. K., Park, S. J., Kim, K. W. & Riew, K. D. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87, 1338-1342, (2005).

39 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 (Phila Pa 1976)* 23, 751-757, (1998).

40 Sakai, D., Nakamura, Y., Nakai, T., Mishima, T., Kato, S., Grad, S., Alini, M., Risbud, M. V., Chan, D., Cheah, K. S., Yamamura, K., Masuda, K., Okano, H., Ando, K. & Mochida, J. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with

ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat. Commun.* 3, 1264, (2012).

41 Falasca, L., Torino, F., Marconi, M., Costantini, M., Pompeo, V., Sentinelli, S., De Salvo, L., Patrizio, M., Padula, C., Gallucci, M., Piacentini, M. & Malorni, W. AMBRA1 and SQSTM1 expression pattern in prostate cancer. *Apoptosis* 20, 1577-1586, (2015).

42 Woo, M., Hakem, R., Furlonger, C., Hakem, A., Duncan, G. S., Sasaki, T., Bouchard, D., Lu, L., Wu, G. E., Paige, C. J. & Mak, T. W. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat. Immunol.* 4, 1016-1022, (2003).

43 Sabbagh, L., Kaech, S. M., Bourbonniere, M., Woo, M., Cohen, L. Y., Haddad, E. K., Labrecque, N., Ahmed, R. & Sekaly, R. P. The selective increase in caspase-3 expression in effector but not memory T cells allows susceptibility to apoptosis. *J. Immunol.* 173, 5425-5433, (2004).

44 Wang, F., Cai, F., Shi, R., Wang, X. H. & Wu, X. T. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 398-408, (2016).

45 Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6, 2853-2868, (2008).

46 Kaneyama, S., Nishida, K., Takada, T., Suzuki, T., Shimomura, T., Maeno, K., Kurosaka, M. & Doita, M. Fas ligand expression on human nucleus pulposus cells decreases with disc degeneration processes. *J. Orthop. Sci.* 13, 130-135, (2008).