

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 山田 勝久

学位論文題名

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

【背景と目的】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椎間板ヘルニアや脊柱管狭窄症などは日常診療においてよく経験する関連疾患である。椎間板障害に対する治療には、従来から脊椎固定術や髄核摘出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、術後の隣接椎間板障害の出現や機能障害の報告が広く認知され、その限界と代替医療の可能性に注目が集まっている。そこで、近年の分子生物学、医工学分野の技術革新を背景として、より低侵襲な治療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ことが期待される。

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。一方で椎間板組織は様々な荷重・運動負荷に対し生体力学的に重要な機能を担っており、過去の報告からも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示唆されている。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、生体力学的、分子生物学的側面から多面的に椎間板組織に対する変性制御を試みることは椎間板変性に対する新たな治療戦略として期待される。

本研究では椎間板細胞・組織に生体力学的負荷を与え、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で、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明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】まず椎間板細胞の変性変化に関与する遺伝子群を網羅的に探索するため、13週齢雄SDラット腰椎から髄核組織を顕微鏡下に採取し、髄核細胞を継代・培養し血清飢餓をかけた。血清飢餓開始48時間後の細胞を回収して、DNAマイクロアレイを用いて非血清飢餓細胞と比較し(n=3)、得られた発現変動遺伝子(>1.5倍)からKyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) pathway 頻度解析を行った。最も有意でかつ出現頻度の高かった pathway である 'cell cycle' に注目し、マイクロアレイで用いた同検体を用いてPCRアレイによる再現性の確認を行うと、DNA damage checkpoint およびアポトーシスに関連する遺伝子群に有意な変動がみられた。さらに注目すべき細胞周期・アポトーシス関連遺伝子として p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p53, caspase 3 を挙げ、western blot による蛋白レベルの発現を評価すると、p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p53, caspase 3 に有意な発現変化を認めた。そこでラット caspase 3 に対する short interfering RNA (siRNA) を作成し髄核細胞に導入すると、髄核細胞のアポトーシスが抑制された。同様の結果はヒト椎間板組織から単離・継代された髄核細胞でも得られた。

次に生体力学的荷重負荷環境時におけるヒト椎間板細胞の caspase 3 の発現変化を評価した。思春期特発性側弯症患者から同意の元、術中採取した非変性椎間板組織より髓核細胞を単離継代し、アガロースゲルを用いて 3 次元培養した。自作の軸圧縮器を用いて小型圧センサーによるモニター下に細胞へ圧縮負荷を与え、western blot と蛍光染色・TUNEL 染色による細胞生存率評価を行った。3 次元培養細胞は圧縮負荷により活性型 caspase 3 の発現が増加し、生存率が有意に低下していた。さらにヒト caspase 3 遺伝子に対する caspase 3 siRNA を作成して髓核細胞に lipofectamine を用いて導入し、同様に 3 次元培養後に圧縮負荷を与え細胞生存率を評価すると、caspase 3 siRNA 導入細胞では siRNA 非導入群、scrambled negative control siRNA (control siRNA) 導入群に比べ、有意に細胞死が抑制されていた。また、圧縮負荷により細胞外基質分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP)-3, -13, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4, -5 発現が増加したが、caspase 3 siRNA 導入細胞ではこれらの変化が抑制されていた (in vitro 試験)。

次いで、in vivo 試験として caspase 3 siRNA 導入による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。3.5kg 雄日本白色家兎を用いて、自作の創外固定器により椎間板組織に圧迫負荷をかけ (150N)、圧迫開始 1 週間後に caspase 3 siRNA を in vivo lipofectamine とともに、X 線イメージ下に椎間板組織内へ導入した。コントロールとして非圧迫群 (sham 群)、control siRNA 導入群を設定した。siRNA 導入 8, 16 週後に椎間板組織を採取し、7T-MRI と組織学的評価を行ったところ、圧迫群では非圧迫群に比べ、経時的に椎間板の変性変化が進行した。また TUNEL、MMP-3 陽性細胞率が圧迫群で増加した。一方 caspase 3 siRNA 導入椎間板では、control siRNA 導入椎間板に比べ変性の進行が有意に抑制されており、TUNEL、MMP-3 陽性細胞率が減少していた。

【考察】本研究において、椎間板の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の変動がみられ、これらが椎間板の変性変化に大きく関わっていることが考えられ、さらに椎間板圧迫変性モデルにおいて解析すると、椎間板細胞・組織への生体力学的負荷により、細胞外基質分解酵素の発現を伴い椎間板細胞死と組織の変性変化が進行していた。しかし、これらの変化は caspase 3 siRNA を導入することにより抑制することが可能であった。椎間板局所への caspase 3 siRNA 導入は、生体力学的環境変化に起因する椎間板組織の変性変化を制御できる可能性が示唆された。

【結論】生体力学的環境下において、椎間板細胞におけるアポトーシス実行因子 caspase3 を遺伝子レベルで阻害することで、椎間板組織の変性変化が抑制可能であった。本手法は椎間板細胞・組織の変性を低侵襲に制御し、椎間板変性の有用な治療手段となりうることが示唆された。