

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 大西 貴士

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)

【背景と目的】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。

我々は、栄養供給、生体力学的負荷、外傷による椎間板変性に関して研究を進めてきた。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る。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がある。

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ので報告する。

【対象と方法】*In vitro* 試験として、C57BL/6 wild type (WT)マウスと caspase 3 KO マウスの腰椎椎間板髄核を採取し、髄核細胞を単離した。得られた髄核細胞を培養し、5~7 日間で髄核細胞コロニー (colony forming unit spherical: CFU-S) の接着を確認した。6 ヶ月未満のマウスから採取した CFU-S を若年群、1 歳 2 ヶ月齢のマウスから採取した CFU-S を高齢群とした。

若年群では、髄核細胞のアポトーシスを惹起するため、血清除去モデルを採用した。CFU-S より培養液を除去し、血清を含まない培地を加え、48 時間インキュベートを行った。TUNEL 染色(In Situ Apoptosis Detection Kit; TaKaRa BIO)を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV300)を用いて撮像した。更に高齢群の WT と KO マウスから採取した CFU-S を、matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)抗体(1:50; Santa Cruz)にて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV300)を用いて撮像した。

In vivo 試験は、11 週齢 C57BL/6 WT マウスと caspase 3 KO マウスに対して我々の確立した外傷性椎間板変性モデルを適用した。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例だけを抽出した。腰椎を術後 2, 4 週で摘出し、MRI による画像的評価と組織学的評価を行った。腫瘍化、悪性化の有無も組織学的に評価した。

In vivo 試験はさらに、加齢性自然発症椎間板変性モデルを適用した。1 歳 2 ヶ月齢と 1 歳 6 ヶ月齢の 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、MRI による画像的評価と病理組織学的評価を行った。

【結果】*In vitro* 試験における若年 CFU-S の非血清除去群では、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。高齢 CFU-S においては、1 歳 2 ヶ月齢の 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。

In vivo 試験の外傷性椎間板変性モデルにおいて、35G 針穿刺後 2 週では、WT に比較し caspase 3 KO マウスの穿刺椎間板は MRI と組織学的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 試験の加齢性自然発症椎間板変性モデルにおいて、1 歳 2 ヶ月齢で、WT マウスと比較して、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 ヶ月齢では、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。

【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 マウス髓核細胞を用いた *in vitro* 試験と、WT、caspase 3 KO マウスにおける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、WT マウスの髓核細胞ではアポトーシスが誘導されたのに対し、caspase 3 KO マウスの髓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、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 により髓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。しかし、caspase 3 遺伝子 KO による椎間板変性抑制効果は、椎間板障害の程度によって限界があると考えられた。

1 歳 2 ヶ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。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。*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 CFU-S において、MMP-3 の発現が有意に高度であった。Caspase 3 KO により、高齢マウスの髓核細胞において、細胞外基質分解酵素発現が促進し、椎間板変性を増悪するかは、今後さらなる確認の必要性が示唆された。

【結論】Caspase 3 KO により髓核細胞ではアポトーシスの誘導が抑制され、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、その効果には限界があった。Caspase 3 KO により加齢性自然発症椎間板変性が増悪した。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を示唆された。