

# 軟骨異栄養性犬種の椎間板髄核変性に関する研究

(Studies on intervertebral disc degeneration in the chondrodystrophoid dog breed)

岩田 宗峻

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教員：原 康 教授)

平成 26 年 3 月

## 目次

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 第1章：序章 .....                          | 1  |
| 第2章：MRI 信号強度の実測値を用いた髄核変性の定量的評価法 ..... | 7  |
| • 2-1：緒言 .....                        | 7  |
| • 2-2：材料と方法 .....                     | 8  |
| 2-2-1：供試動物 .....                      | 8  |
| 2-2-2：MRI 信号値の測定および解析 .....           | 9  |
| 2-2-3：変性グレードごとの組織学的評価 .....           | 9  |
| 2-2-4：変性グレードごとの各種変性マーカー発現量の評価 .....   | 11 |
| 2-2-5：統計学的検討 .....                    | 11 |
| • 2-3：結果 .....                        | 12 |
| 2-3-1：MRI 信号値を用いた変性髄核のグレード分類 .....    | 12 |
| 2-3-2：変性グレードごとの組織学的評価 .....           | 12 |
| 2-3-3：変性グレードごとの各種変性マーカー発現量の評価 .....   | 13 |
| • 2-4：考察 .....                        | 14 |
| • 2-5：小括 .....                        | 17 |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| ・ 図および表 .....                                         | 19 |
| 第 3 章：長期 3 次元培養における軟骨異栄性犬種由来、椎間板髄核細胞の発現形質の推移<br>..... | 25 |
| ・ 3-1：緒言 .....                                        | 25 |
| ・ 3-2：材料と方法 .....                                     | 26 |
| 3-2-1：供試動物.....                                       | 26 |
| 3-2-2：髄核組織からの細胞の単離.....                               | 27 |
| 3-2-3：3D マテリアルの選択と、細胞の包埋 .....                        | 27 |
| 3-2-4：組織学的評価.....                                     | 29 |
| 3-2-5：長期 3D 培養時の細胞増殖の評価 .....                         | 30 |
| 3-2-6：培養期間における sGAG 産生量の推移.....                       | 31 |
| 3-2-7：培養期間における Marker gene 発現の推移.....                 | 31 |
| 3-2-8：Lipopolysaccharide による感作.....                   | 32 |
| 3-2-9：統計学的検討.....                                     | 32 |
| ・ 3-3：結果.....                                         | 33 |
| 3-3-1：三次元培養下における細胞外基質産生能に関する組織学的評価 .....              | 33 |
| 3-3-2：培養環境による細胞増殖能の違い.....                            | 33 |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 3-3-3 : 培養環境による sGAG 産生能の違い .....            | 34 |
| 3-3-4 : 三次元培養群における Marker gene の発現量の増加 ..... | 34 |
| 3-3-5 : LPS 感作による三次元培養下髄核細胞の発現形質 .....       | 35 |
| • 3-4 : 考察 .....                             | 36 |
| • 3-5 : 小括 .....                             | 40 |
| • 図および表 .....                                | 41 |

#### 第 4 章 : 椎間板髄核変性および石灰化において発現する Runx2 に対する Wnt/ $\beta$ -catenin signal

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| pathway の関与に関する検討 .....                     | 50 |
| • 4-1 : 緒言 .....                            | 50 |
| • 4-2 : 材料と方法 .....                         | 53 |
| 4-2-1 : 供試動物 .....                          | 53 |
| 4-2-2 : 正常および変性髄核の組織学的解析 .....              | 53 |
| 4-2-3 : 髄核組織からの細胞の単離と培養方法 .....             | 55 |
| 4-2-4 : 塩化リチウム (LiCl) および FH535 による感作 ..... | 57 |
| 4-2-5 : 遺伝子発現解析 .....                       | 57 |
| 4-2-6 : 細胞増殖の評価 .....                       | 58 |
| 4-2-7 : 培養細胞の組織学的解析 .....                   | 59 |

|                                                                              |        |
|------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4-2-8 : ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析 .....                                          | 59     |
| 4-2-9 : 統計学的解析 .....                                                         | 61     |
| • 4-1 : 結果 .....                                                             | 62     |
| 4-3-1 : 組織学的解析 .....                                                         | 62     |
| 4-3-2 : MRI Signal intensity と変性に関わる mRNA の発現量の相関性 .....                     | 62     |
| 4-3-3 : HNP における各種遺伝子の発現量 .....                                              | 63     |
| 4-3-4 : LiCl が細胞に与える影響 .....                                                 | 63     |
| 4-3-5 : LiCl による培養細胞における $\beta$ -catenin および Runx2 の mRNA 発現量への<br>影響 ..... | 63     |
| 4-3-6 : LiCl による培養細胞における $\beta$ -catenin および Runx2 のタンパク発現量の<br>変化 .....    | 63     |
| • 4-4 : 考察 .....                                                             | 65     |
| • 4-5 : 小括 .....                                                             | 70     |
| • 図および表 .....                                                                | 71     |
| <br>第 5 章 : 総括および総合考察 .....                                                  | <br>81 |
| 謝辞 .....                                                                     | 95     |
| 参考文献 .....                                                                   | 96     |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Summary of Doctoral Thesis ..... | 110 |
|----------------------------------|-----|

## 第1章：序章

椎間板変性に起因する背部痛および横断性脊髄障害は、運動障害および感覚障害を伴い QOL の低下を招くため、その原因解明は医学および獣医学領域において重要視されている。

イヌの椎間板ヘルニアは、椎間板の変性様式に基づいて Hansen I 型と II 型に分類される。

Hansen I 型病変は、一般に 3 から 7 歳齢の軟骨異栄養性犬種 (Chondrodystrophoid Breeds : CDBs) で多く認められ、変性および石灰化した椎間板髄核の脊柱管への逸脱を特徴とする。

Hansen II 型病変は 6 から 8 歳齢の非軟骨異栄養性犬種で多く認められ、線維輪の背側への膨隆に起因する慢性的な脊髄の圧迫性障害を特徴とする。

椎間板変性は髄核組織におけるプロテオグリカンおよび Type 2 collagen (Col2A1) の減少を特徴とし、水分含有量の減少を伴う (Antoniou, J.ら,1996; Oegema, TR.ら, 1993)。そもそも髄核組織は脊索細胞と軟骨細胞様細胞の 2 種類の細胞で構成され、これらの 2 種類の細胞は円形であり、軟骨細胞と類似した形態を呈し、硝子軟骨と組成が似た細胞外基質の中でクラスターを形成している (Horner, HA.ら, 2002)。脊索細胞は加齢に伴い減少するが、減少の程度は動物種によって異なり、さらには脊索細胞の減少が変性の進行と相関を示すとされている (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952)。例えば、ブタやウサギ、ラットお

よび非軟骨異栄養性犬種の髓核では脊索細胞は生涯存在する (Aguiar, DJ.ら.1999; Gage, ED.ら,1975)。しかし、ヒト、羊および CDBs では早期に消失し、線維軟骨細胞様に形質が転換してしまう (Braund, KG.ら. 1975; Oegema, TR, Jr.ら. 2002)。

CDBs の椎間板髓核は早期に変性が開始するが、生後 1 年を待たずして変性が進行していることもある (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952 ; Gage, ED.ら.1975)。一般的には 3 から 7 歳齢時において異常な軟骨内骨化に起因した髓核変性が起こり、椎間板ヘルニアの罹患率が増加する (Priester WA. 1976 ; Gage, ED.ら.1975)。このような理由から CDBs の椎間板髓核は形質がヒトの椎間板髓核と類似しており、疾患の原因解明の為のモデル動物としても適していると考えられるが (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)、椎間板変性における分子生物学的なメカニズムは未だ不明な点が多い。

CDBs の髓核変性における分子生物学的機序を解明する場合、培養細胞を用いた検討は非常に重要な手法のひとつとなる。しかし髓核細胞は培養条件によって全く異なる形質を発現し、さらには動物種によっても適切な培養条件は異なる (Chou, AI.ら. 2006; Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001 )。

培養条件とは、agarose hydrogels や alginate hydrogels 等を用いた三次元培養法や、もしくは一般的な平面培養法を指すが、各種 hydrogels を用いた三次元培養法は、その scaffold 内で構築される構造が生体組織とより類似した環境であると報告されている(Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001 )。例えば、牛の髓核細胞を alginate hydrogels

もしくは collagen gel を用いて三次元培養した場合、単層培養と比較して、プロテオグリカンの産生量が増加するという報告が存在する (Horner, HA.ら. 2002)。さらには髄核細胞を単層で培養した場合、無秩序な細胞増殖を招き、線維芽細胞様の形質に転換してまうと報告されている (Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001)。しかし一方で豚の髄核細胞は alginate hydrogels を用いて三次元培養を施したとしても、単層培養した細胞と表現型は変わらないと報告されている (Wang, JY.ら.2001)。このように各種培養条件下において、さまざまな動物種の髄核細胞の表現型についての検討がなされているが、CDBs 由来の髄核細胞における培養時の表現型に関しては未だ報告が無い。CDBs の髄核細胞は、脊索細胞が早期に消失する点から、他の動物種と比較してヒトの髄核細胞と形質が類似しておりモデル動物として最適であると考えられている為、最適な培養方法の検討が望まれる (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)。以上により我々は、第3章において agarose hydrogels を用いた三次元培養および単層培養下における CDBs 由来髄核細胞の表現型の推移を経時的に評価し、最適な培養条件の設定を行った。

上述の通り CDBs では早期に椎間板髄核の変性が起こり、椎間板ヘルニア発症の原因となる (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952; Gage, ED.ら.1975)。近年、CDB における椎間板ヘルニアに対する様々な治療法が考案されているが、椎間板髄核変性における病態生理や病因論には未だ不明な点が多い。

椎間板髄核では変性の過程において、分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs)の発現が亢進し、Type 2 collagen (Col2A1) や aggrecan (ACAN)等の細胞外基質の分解が起こることが報告されている (Le Maitre, CL.ら. 2007; Le Maitre, CL.ら. 2006; Le Maitre, CL.ら. 2004; Haro, H. ら. 2000)。これらのうち MMP13 は Col2A1 を特異的に分解する酵素であり、椎間板変性に重要な役割を果たすとされている (Itoh, H.ら. 2012)。この MMP13 の発現を誘導する因子の一つとして Runt-related transcription factor 2 (Runx2)が挙げられる。Runx2 は骨芽細胞の分化と軟骨細胞の肥大化を促進し骨形成を誘導する転写因子のひとつであり (Enomoto, H.ら. 2000 : Komori, T.ら. 2005 : Zheng, Q.ら. 2003)、急性骨髄性白血病患者の染色体転座より見つかった Runx1 をはじめとする Runx のファミリー遺伝子である (Ducy, P.ら.1997; Otto, F.ら. 1997; Trancey, WD.ら.2000)。この Runx2 は椎間板変性においても MMP13 の発現を誘導し、さらには髄核細胞の肥大化や髄核基質の石灰化を促進する等、重要な役割を持つことが分かっている (Itoh, H.ら. 2012)。さらにこの Runx2 は骨形成の過程において Wnt/ $\beta$ -catenin signal によって誘導されていることが報告されている (Gaur, T.ら.2006; Dong, YF.ら. 2006)。

Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway におけるリガンドである Wnt は、分子量約 4 万の分泌性糖タンパク質で、線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて保存され、初期発生や形態形成、器官形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動などを制御する (Logan, C.Y.ら.2004)。Wnt のリガンドにより、活性化される細胞内シグナル伝達機構を Wnt signal

pathway と呼ぶが、それには  $\beta$ -catenin を介して遺伝子発現を制御する  $\beta$ -catenin 経路 (Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway)、細胞平面極性 (planar cell polarity, PCP) を制御する PCP 経路 (Wnt/PCP pathway)、 $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内動員を促進する  $\text{Ca}^{2+}$ 経路 (Wnt/  $\text{Ca}^{2+}$  Pathway) の3種類が存在することがわかっている (Kikuchi, A.ら.2007)。そのうち最もよく知られているのが Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway である。

$\beta$ -catenin はカドヘリン結合タンパク質として同定され、細胞接着に重要な働きをするが、Wnt signal pathway のメディエーターとして遺伝子発現を誘導し、その結果、Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway は細胞の増殖や分化を制御する (Kikuchi, A.ら.2007)。

これまでにリガンドとしての Wnt はヒトとマウスで 19 種類同定されており (Logan, C.Y.ら.2004)、Wnt 受容体としては 7 回膜貫通型の Fz (Fz1~10 の 10 種類) に加えて、1 回膜貫通型の low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)、LRP6、receptor tyrosine kinase-like orphan receptor2 (Ror2)、related tyrosine kinase orphan receptor (Ryk) が存在する (Kikuchi, A.ら.2007; He, X.ら.2004; Wang, HY.ら. 2006; Green, JL.ら. 2008)。

Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway の重要な構成因子の一つとして、APC/Axin/GSK-3 $\beta$  複合体が挙げられる。APC/Axin/GSK-3 $\beta$  複合体は細胞質内において  $\beta$ -catenin のリン酸化およびポリユビキチン化を担う重要なタンパク複合体であるが、その複合体を構成するタンパク質の遺伝子は gate keeper gene と呼ばれ、種々のヒトにおけるがんでタンパク質の異常が報告されている (Polakis, P.ら. 2000)。特に大腸がんでは Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway の活性化が多

段階発がんの初期に起こることが示されている。これらのがん細胞の共通の表現型は  $\beta$ -catenin の細胞質や核への異常蓄積であり、cyclin D1 や c-Myc などのがん関連遺伝子の過剰発現を介して異常細胞増殖を誘導すると考えられる。Axin の異常により、APC や  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  との複合体が形成できないために、 $\beta$ -catenin のリン酸化やユビキチン化が抑制され、その結果  $\beta$ -catenin が蓄積すると考えられている (Polakis, P.ら. 2000)。

上述のように、がん関連遺伝子として注目され、さらに骨形成においても重要な役割を担う Wnt/ $\beta$ -catenin signal であるが、変形性膝関節症 (Osteoarthritis : OA) の発症においても関与すると報告されており、OA の軟骨細胞では  $\beta$ -catenin の蓄積が進行し Col2A1 や ACAN の産生量が低下することがわかっている (Yuasa, T. ら.2008)。

この Wnt/ $\beta$ -catenin signal は椎間板髄核においても発現しており、髄核の変性に重要な役割を示すと報告されている (Smolders, LA.ら. 2012; Hiyama, A.ら. 2010)。つまり髄核変性の過程において、変性および石灰化を誘導する Runx2 の発現は、Wnt/ $\beta$ -catenin signal によって誘導されている可能性が推測される。

以上の背景から、第 4 章では組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、Runx2 の発現を介した Wnt/ $\beta$ -catenin signal による椎間板髄核の変性および石灰化について検討した。

## 第2章 MR 信号強度を用いた髄核変性の定量的評価法

### 2-1：緒言

軟骨異栄養性犬種(CDBs)では Hansen-1 型椎間板ヘルニアが好発する (Priester WA. 1976 ; Gage, ED.ら.1975)。その背景に椎間板髄核の早期変性が関与していることが知られているが、その機序は明らかにされていない。軟骨異栄養性犬種 (CDBs) の髄核では生後 1 年を待たずして脊索細胞が消失し始め、線維芽細胞様細胞に置き換わることから、その病態は人の髄核変性に類似していると考えられている (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)。それゆえ、CDBs は人の髄核変性の病態解明のためのモデル動物として適していると考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。

上述の通り CDBs は 1 歳齢を迎えずして髄核の変性が開始していることから、事前の MRI による変性の評価が不可欠となる。髄核組織は変性の進行と、MRI における T2 強調画像の信号強度の低下が相関性を有すると報告されており、MRI における T2 強調画像を用いた髄核変性の評価方法としては Pfirrmann Grading System が一般的に用いられている (Pfirrmann, CW.ら.2001)。しかしこの方法は主観的であり、定量的評価法ではないゆえに測定者間による誤差が生じやすいと考えられる。*In vitro* における検討に髄核組織を供する際、変性の進化したサンプルの選択は、誤った結果を導きかねない。故に明確な選択基準の設定が必要不可欠であるが、髄核変性の定量的評価法に関する報告は未だなされていない。

以上の背景から我々は、Pfirrmann Grading System をベースとして、MRI から得られる髄核

の信号強度の実測値を用いた新たな定量的評価方法について検討した。

## 2-2：材料と方法

### 2-2-1：供試動物

本検討には約 12 カ月齢のオスのビーグル犬 6 頭を供した。ペントバルビタールナトリウムを用いて(Somnopentyl (50 mg/kg); Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) 麻酔後、Signa EXCITE 3.0 T (GEHealthcare Japan, Tokyo, Japan)を用いて、頸椎および胸腰椎における MRI、T2 強調画像の撮影を行った。得られた画像は Image J soft ware (NIH, Bethesda, Maryland, USA) を使用し、信号強度の解析を行った。MRI の撮影が終わった後、C2-3 から L6-7 までの全椎間板髄核を採取した。

また、変性した椎間板髄核として、椎間板ヘルニアに罹患したミニチュア・ダックスフント (MD) より手術時に摘出された椎間板物質 (Herniated nucleus pulposus ; HNP) を本検討に使用した。椎間板ヘルニアに罹患した MD は全 15 頭 19 椎間で平均年齢は 7.0±2.5 歳であった。全ての症例は不全麻痺もしくは完全麻痺を呈し、相川動物医療センターで診断および治療が行われたものである。症例の詳細を表 2-1 にまとめた。

採取された髄核組織および HNP は直ちに Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) および 4%パラホルムアルデヒド (PFA : Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に保存し、適切に処理した後、検討に用いるまでそれぞれを -80℃および 4℃で保存した。

## 2-2-2 : MRI 信号値の測定および解析

撮影によって得られた C2-3 から L6-7 までの全椎間板髄核の DICOM 画像は、ApolloView Lite Software（下野 修 氏作）上で表示し、Snipping Tool（Microsoft, Redmond, WA ,USA）を用いてキャプチャし、拡張子を JPEG として保存した。

得られた JPEG 画像における髄核組織の信号値の測定は、Image J software（NIH）を使用し行った。脊髄中心管が描出される正中におけるサジタル画像を用い、1つの髄核組織あたり 3 点のポイントの信号値を測定後、その平均値を算出した。信号強度の解析によって得られた結果を、従来から一般的に用いられる Pfirrmann Grading System（Pfirrmann, CW.ら.2001）におけるグレード分類と照らし合わせ、信号強度によるグレード分類法の確立を試みた。また画像解析結果と組織変性の相関性の確認のために、それぞれのグレードに分類された髄核組織を、組織学的解析および Real-time PCR 法を用いた遺伝子発現解析により評価した。

## 2-2-3 : 変性 Grade ごとの組織学的評価

各グレードごとの髄核組織は採取後、4%PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に浸漬し、3日から4日間ほどに渡り固定処理を行った。次いでアルコール系列およびキシレン系列を用いた脱水および透徹を行い、パラプラスト（Leica Biosystems, GmbH, Germany）に包埋しパラフィンブロックを作成した。作成したパラフィンブロックはマイクロトームを用い

て約5 $\mu$ mの厚さに薄切し連続切片を作成後、スライドグラス(Matsunami Glass Industries, Ltd., Osaka, Japan) に載せ、Slide warmer 上で一晚伸展させた後、4 $^{\circ}$ Cで保存した。作成したパラフィン切片は以下の各染色法により染色した。Hematoxylin-Eosin 染色は形態観察を目的とし、Safranin-O/fast green 染色は産生された硫酸化グリコサミノグリカンやヒアルロン酸等の細胞外基質の評価を目的とし行った。加えて石灰化基質の検出を目的とした Von kossa 染色を行い、コラーゲン線維の評価には抗 Type I collagen (Col1A1) 抗体(1:1000, LSL Co., Ltd, Tokyo, Japan) および抗 Type II collagen (Col2A1) 抗体(1:50, Millipore-Chemicon, Billerica, MA, USA)を用いた免疫染色を行った。さらに炎症性サイトカインおよび MMPs の評価を目的として、抗 tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) 抗体 (1:50, Bioworld Technology, Inc, MN, USA)、抗 matrix metalloproteinase (MMP13) 抗体 (1:50, R&D Systems, Inc, MN, USA) および抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体(1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) を用いた免疫染色も行った。二次抗体としては biotinylated universal secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, Inc, CA, USA) を用いた。1次抗体の反応時間は基本的に4 $^{\circ}$ C下で24時間とし、二次抗体に関しては室温で20分間とした。増感およびペルオキシダーゼの発色は VECTASTAIN ABC Standard Kit (Vector Laboratories) および DAB Substrate Kit (Vector Laboratories) を用いた。また細胞核および髄核基質のバックグラウンドの染色を目的としてメチルグリーン (Muto Pure Chemicals Co., Ltd. Tokyo, Japan) による染色を行った。

#### 2-2-4 : 変性グレードごとの各種変性マーカー発現量の評価

採取した髄核組織は TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に浸漬後、ポリトロンホモジナイザーを用いて破碎し、クロロホルムを添加して分離後、上清を回収した。回収した上清から RNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)を用いて RNA を抽出し、260/280 nm の波長で測定した。抽出した RNA から逆転写反応により (Super Script VILO cDNA Synthesis Kit; Life Technologies) cDNA を合成し、*Col1A1*, *Col2A1*, *aggrecan (ACAN)*, *cartilage oligomeric matrix protein (COMP)*, *TNF- $\alpha$* , *MMP13* および *VEGF* の発現量を測定した。イヌ特異的なプライマーは Primer Express software, version 3.0 (Applied Biosystems)で設計し Sigma-Aldrich に合成を依頼した (表 2-2)。

また上述の遺伝子の発現量に関しては、いずれも Kapa Sybr Fast qPCR Kits (Kapa Biosystems, Inc., Boston, USA) および Stratagene Mx3000p System (Agilent Technologies Japan, Ltd.)を使用した real-time-PCR 法を用い、 *$\beta$ -actin* をコントロールとした $\Delta\Delta C_t$ により解析した。

#### 2-2-5 : 統計学的検討。

各グレードごとの髄核組織における mRNA 発現量(*Col1A1*, *Col2A1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *MMP3*, *MMP13*, *VEGF*, および *PEGS*) の比較に関しては、Tukey-Kramer method を用いた。統計学的解析は StatView 5.0 software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA)を用いて行い、 $p < 0.05$  を持つて有意差ありと判定した。

## 2-3：結果

### 2-3-1：MRI 信号値を用いた変性髄核のグレード分類

変性髄核の定量的評価を目的として、Image J software (NIH) による信号強度の解析を用いたグレード分類を行った。Pfirrmann Grading System は Grade1 から Grade5 までの 5 段階評価によるグレード分類であるが、本検討で用いた髄核で該当するものは Grade1 から Grade3 までであった。Pfirrmann Grading System において Grade1 に分類されるものは信号値が 86 以上を示し、Grade2 は 45 以上 85 未満、Grade3 は 45 未満を示す結果となった (図 2-1 A)。画像上の特徴としては、Grade1 に分類された髄核は均一に白色を呈しており、Grade2 の髄核は部分的に低信号を示す領域が認められた。Grade3 に分類された髄核は多くの場合、全体が低信号を示しており、線維輪との境界が明瞭であった。

また各グレードにおける信号値の平均値は Grade1 では 112.25、Grade2 では 68.28、Grade3 では 34.18 となった。また検討に用いた全髄核組織のうち、Grade1 が占める割合が 61%、Grade2 が 18%、Grade3 が 21%となった (図 2-1 B)。

### 2-3-2：変性グレードごとの組織学的評価

グレード 1-3 に分類された組織、および HNP は組織学的評価の結果、グレードの進行に伴う変性変化が確認された。肉眼においても髄核組織の変性の進行は確認でき、Grade1

の髄核組織のうち、信号強度が著しく高いものは無色透明でゼリー状であるのに対し、その他の Grade1、および Grade2 以上の髄核組織は白色で線維軟骨様に変化していた。Safranin-O 染色では変性の進行に伴う染色性の低下が確認され、Von Kossa 染色では石灰化領域の拡大が確認された。線維軟骨組織に特異的に発現する Col1A1 は免疫染色の結果、Grade3 および HNP で陽性を示し、逆に硝子軟骨に特異的に発現する Col2A1 の陽性領域は変性の進行と共に減少した。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および分解酵素である MMP13、加えて VEGF などの陽性細胞数の増加が変性の進行とともに確認された(図 2-2)。

### 2-3-3 : 変性グレードごとの各種変性マーカー発現量の評価

変性と併に増加すると報告されている線維軟骨のマーカーである *Col1A1* の mRNA の発現量は Grade1 の髄核組織においては、極めて低値を示していた。Grade1 と比較し、Grade3 の髄核組織で発現量の増加が確認され、HNP では高値を示した。硝子軟骨のマーカーである *Col2A1* および *ACAN* の mRNA の発現量は Grade1-3 の間では有意差は認められなかったものの、HNP では有意に低値を示した(図 2-3)。

また炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および *IL-6* の mRNA の発現量の増加が Grade3 で確認され、HNP では高値を示した。分解酵素である *MMP3* および *MMP13* も同様に Grade3 の髄核において増加しており、その他の炎症性メディエーターである *VEGF* および *PEGS* に関しても Grade3 の髄核における増加が確認された(図 2-4)。

## 2-4：考察

本章では MRI 信号強度の実測値を用いた髄核変性の定量的評価法について検討した。

軟骨異栄養性犬種（CDBs）の髄核では生後 1 年を待たずして脊索細胞が消失し始め、線維芽細胞様細胞に置き換わることから、その病態は人の髄核変性に類似していると考えられている（Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009）。それゆえ、CDBs は人の髄核変性の病態解明のためのモデル動物として適していると考えられているが、上述の通り CDBs は 1 歳齢を迎えずして髄核の変性が開始していることから、事前の MRI による変性の評価が不可欠となる。

今回の我々の検討における Image J software（NIH）による信号強度の解析を用いたグレード分類の結果、12 カ月齢のビーグル犬であるにもかかわらず、Grade3 に分類される髄核組織が全体の 21% も存在した。組織の変性は肉眼においても一部確認でき、Grade1 の中でも信号強度が著しく高いものは無色透明のゲル状であり、その他の Grade1 および Grade2、Grade3 は白色で線維軟骨様であった。髄核は変性の過程で *Col1A1* の産生が亢進し、線維軟骨様の形質に転換するため（Sive, JI.ら. 2002）、Grade1 と Grade3 の髄核では表現型が大きく異なる。本検討で得られた結果においても、Grade3 の髄核組織では *Col1A1* の mRNA の発現量が有意に増加していた。一方、硝子軟骨の基質の重要な指標である *Col2A1* および *ACAN* の mRNA の発現量に関しては、グレード間における有意差は認められなかった。変性の進行と共に *Col2A1* や *ACAN* のタンパク分解が進行するため（Kang, JD.ら.1995）、本検討にお

いても Col2A1 および ACAN のタンパク量の低下は認められたが、mRNA の発現量に差が認められなかったのは、おそらく変性に伴い進行する基質の分解に対する代償的な反応として、mRNA の発現が維持されていたからではないかと考えられる。

上述の様に、変性に伴い形質が線維軟骨様に転換した髓核組織を実験に供することは、得られる結果に大きな影響を与え、正しい結果が得られなくなると考えられる。その為、CDBs の髓核を検討に用いる際には変性していないものを選択する必要があるが、12 ヶ月齢という若い個体であっても Grade3 まで変性が進行しているものが 21% も存在することが分かった。Grade2 についても全体の 18% を占めており、Grade1 の全く変性していない髓核組織は全体の 61% でしかなかった。変性の進行していない髓核の選択にあたって、無色透明のゲル状を呈した、肉眼においても選別できる髓核組織に関しては問題はない。しかしながら、Pfirrmann's grading system で Grade1 に分類される髓核においても白色を呈しているものが存在するため、全てを肉眼で分類することは不可能である。その為、今回我々が検討した、MRI 信号強度の実測値を用いた髓核変性の定量的評価法は、確実に Grade1 を選択することが可能なため、有益な方法であると考えられた。

変性の進行によって生じる表現型の変化は、Coll1A1 や Col2A1 および ACAN 等の細胞外基質タンパクに関してだけではない。変性したヒトの髓核組織は各種炎症性サイトカインを産生すると報告されている (Doita, M. ら. 1996; Jimbo, K. ら. 2005; Kang, JD. ら. 1995; Le, Maitre, CL. ら. 2005; Specchia, N. ら. 2002; Weiler, C. ら. 2005; Aota, Y. ら. 2006)。我々の検

討においても、変性した CDBs の髄核による炎症性サイトカインの発現が確認されており、それは Grade3 の髄核および HNP において認められた。TNF- $\alpha$  や IL-6 をはじめとした炎症性サイトカインや分解酵素である MMPs の発現が、逸脱を起こしていない Grade3 の髄核においても亢進していることから、検討に用いる前の、事前の選別が重要であることが示唆された。

## 2-5：小括

本章では MRI 信号強度の実測値を用いた髄核変性の定量的評価法について検討した。

髄核組織は変性の進行と、MRI における T2 強調画像の信号強度の低下が相関することが報告されており、MRI における T2 強調画像を用いた髄核変性の評価方法としては Pfirrmann Grading System が一般的に用いられている (Pfirrmann, CW.ら.2001)。しかしこの方法は主観的であり、定量的評価法ではないゆえに測定者間による誤差が生じやすいと考えられる。In vitro における検討に髄核組織を供する際、変性の進行したサンプルの選択は、誤った結果を導きかねない。故に明確な選択基準の設定が必要不可欠であった。

Image J software (NIH) による信号強度の解析を行った結果、Pfirrmann Grading System において Grade1 に分類されるものは信号値が 86 以上を示し、Grade2 は 45 以上 85 未満、Grade3 は 45 未満を示す結果となった。本検討により 12 ヶ月齢という若い個体であっても Grade3 まで変性が進行しているものが 21% も存在することが分かった。Grade2 に関しても全体の 18% を占めており、Grade1 の全く変性していない髄核組織は全体の 61% でしかなかった。ヒトと髄核の性質が類似しており、モデル動物として適していると考えられる CDBs は多くの報告において広く用いられているが、12 ヶ月齢という若い個体においても髄核の変性が進行しているため、事前の MRI による評価が強く推奨された。

変性が進行している髄核では、Col1A1 の増加や Col2A1、ACAN の減少のみならず、TNF- $\alpha$

や IL-6 をはじめとした炎症性サイトカイン、および基質分解酵素である MMPs の発現量が増加しているため、本来の形質とは大きく異なる。よって *In vitro* における研究に CDBs 由来の椎間板髄核を供する際は、定量的で明確なグレード分類が必要である。その点において我々が今回検討した定量的評価方法は、測定者間誤差も少なく比較的簡便で有益な方法であると考えられた。

Table. 2-1 Summary of intervertebral disc disease data.

|        | <b>Breed</b> | <b>Age</b> | <b>Location of lesion</b> |
|--------|--------------|------------|---------------------------|
| Case1  | MD           | 6          | T13-L1                    |
| Case2  | MD           | 9          | T13-L1                    |
| Case3  | MD           | 6          | L4-5                      |
| Case4  | MD           | 9          | T13-L1                    |
| Case5  | MD           | 5          | T11-12                    |
| Case6  | MD           | 5          | L1-2, L2-3                |
| Case7  | MD           | 5          | T12-13                    |
| Case8  | MD           | 7          | L2-3                      |
| Case9  | MD           | 7          | T13-L1, L1-2              |
| Case10 | MD           | 9          | T11-12, T12-13            |
| Case11 | MD           | 5          | T11-12, T12-13            |
| Case12 | MD           | 6          | L2-3                      |
| Case13 | MD           | 3          | T13-L1                    |
| Case14 | MD           | 12         | T13-L1                    |
| Case15 | MD           | 12         | L1-2                      |

MD: Miniature Dachshund

Table. 2-2 Primer sequences for realtime PCR.

| Gene Name                                   | Gene Symbol   | Ref. Sequence  | Primer                                                                          |
|---------------------------------------------|---------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Type I collagen, alpha1</i>              | <i>Col1A1</i> | NM_001003090   | Forward: ACA GCC GCT TCA CCT ACA GT<br>Reverse: ATA TCC ATG CCG AAT TCC TG      |
| <i>Type II collagen, alpha1</i>             | <i>Col2A1</i> | NM_001006951   | Forward: GAAACTCTGCCACCCCTGAAT<br>Reverse: GCTGCTCCACCAAGTTCTTCT                |
| <i>Aggrecan</i>                             | <i>ACAN</i>   | NM_001113455   | Forward: CTATGAGGACGGCTTTCACC<br>Reverse: AGACCTCACCTCCATCTCC                   |
| <i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>  | <i>COMP</i>   | XM_533869      | Forward: GCC GAG ACA CGG ATT TGG<br>Reverse: CAC GTC CTC TTG CCC TGA GT         |
| <i>α-2-Macroglobulin</i>                    | <i>A2M</i>    | XM_534893      | Forward: ACT TGG CTC ACT GCC TTT GTA CT<br>Reverse: GTT GAG CAG AGA CCC GGA ACT |
| <i>Cytokeratin 18</i>                       | <i>CK18</i>   | XM_849849      | Forward: AAG AAC CAC GAGGAG GAA GTA AAG<br>Reverse: CCC GGA TAT CTG CCA TGA TC  |
| <i>SRY (sex determining region Y)-box 5</i> | <i>Sox5</i>   | XM_003433564   | Forward: ACC TCT GAT GGC AAA TCA CC<br>Reverse: ATT CAC AAC AGC CAC CTT CC      |
| <i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i> | <i>Sox9</i>   | NM_001002978   | Forward: TCA TGA AGA TGA CCG ACG AG<br>Reverse: GTC CAG TCG TAG CCC TTG AG      |
| <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>          | <i>TNF-α</i>  | NM_001003244.4 | Forward: ACC ACA CTC TTC TGC CTG CT<br>Reverse: ACC CAT CTG ACG GCA CTA TC      |
| <i>Interleukin 1</i>                        | <i>IL-1β</i>  | NM_001003301.1 | Forward: TGC AGG TGT CCT CTC AGC TA<br>Reverse: GAG CCT GGT CTC ATC TCC AG      |
| <i>Interleukin 6</i>                        | <i>IL-6</i>   | NM_001003301.1 | Forward: GGC TAC TGC TTT CCC TAG CC<br>Reverse: GAA GAC GAG GAA GTG CAT CTG     |
| <i>Matrix metalloproteinase 3</i>           | <i>MMP3</i>   | NM_001002967.1 | Forward: ATG GAG ATG CCC ACT TTG AC<br>Reverse: GGA GGA ATC AGA GGG AGG TC      |
| <i>Matrix metalloproteinase 13</i>          | <i>MMP13</i>  | XM_536598.2    | Forward: TTC TGG CTC ATG CTT TTC CT<br>Reverse: GGT CCT TGG AGT GGT CAA GA      |
| <i>Vascular endothelial growth factor A</i> | <i>VEGF</i>   | NM_001003175.2 | Forward: TTC CTG CAG CAT AGC AAA TG<br>Reverse: AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA      |
| <i>Prostaglandin E synthase</i>             | <i>PGES</i>   | NM_001122854.1 | Forward: AGT ATT GCC GGA GTG ACC AG<br>Reverse: GCA GGT CTC CTG ATT GAA CC      |
| <i>Actin, beta</i>                          | <i>ACTB</i>   | NM_001195845.1 | Forward: AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG<br>Reverse: TGC GTG ACA TCA AGG AGA AG      |

Dog-specific primers were designed using Primer Express software, version 3.0

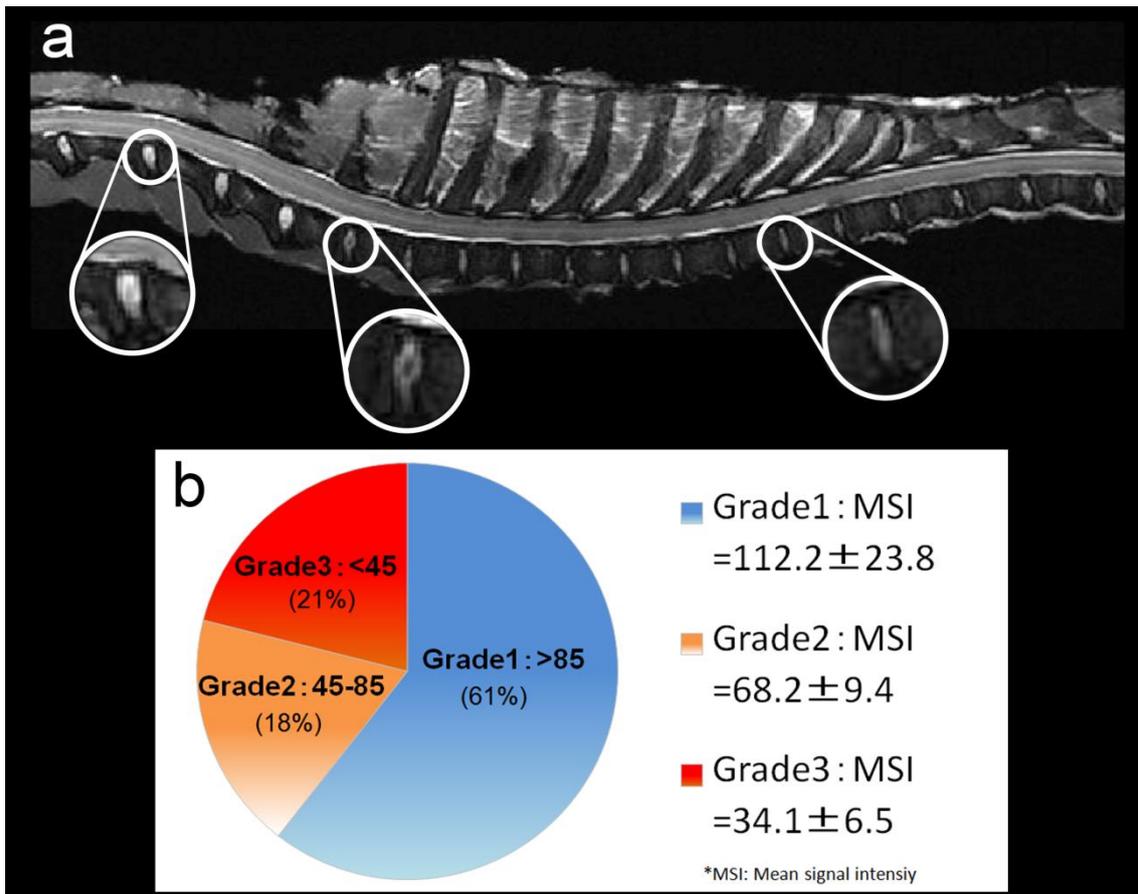


Figure. 2-1 Evaluation of degeneration of nucleus pulposus (NP) tissue based on the magnetic resonance imaging signal intensity.

(A) NP tissue exhibiting signal intensity >86 is classified as grade 1, 45–85 as grade 2, and <45 as grade 3. (B) Mean signal intensity (MSI) of grade 1 NP tissue is 112.25, grade 2 is 68.28, and grade 3 is 34.18. The percentage of tissue occupied by grade 1 is 61%, grade 2 is 18%, and grade 3 is 21%.

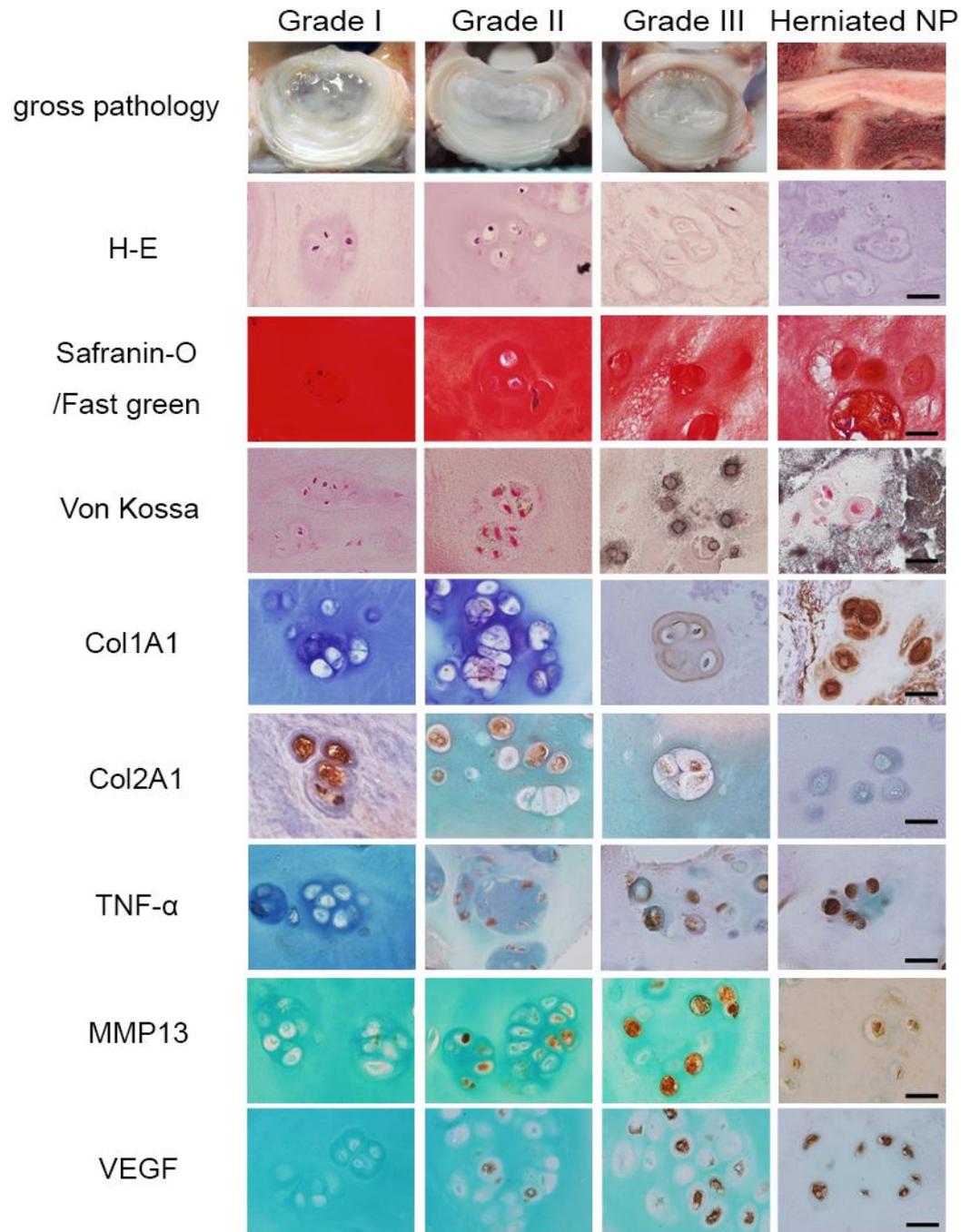


Figure. 2-2 Herniated canine nucleus pulposus (NP) cells shows typical degenerative histological changes. Lack of Safranin-O staining, calcified area, and MMP13 positive cells increased with the progression of degeneration. Scale bars indicate 100  $\mu$ m.

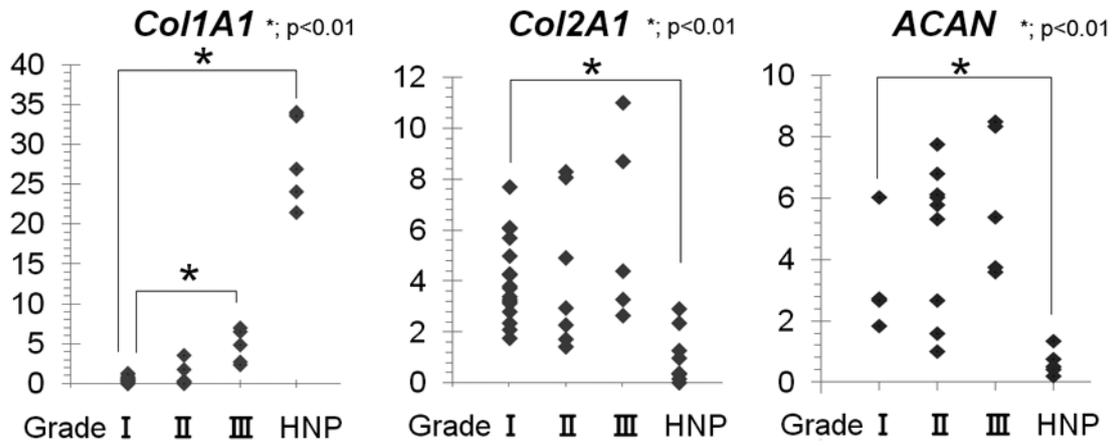


Figure. 2-3 Expression of *Col1A1*, *Col2A1*, and *ACAN* in NP tissues according to Pfirrmann's grades 1–3 and HNP were analyzed using RT-PCR.

Grade 3 NP and HNP tissues exhibited significantly higher expression of *Col1A1* than did grade 1 NP tissues. For *Col2A1* and *ACAN*, there was a significant difference only in HNP, \*p < 0.01

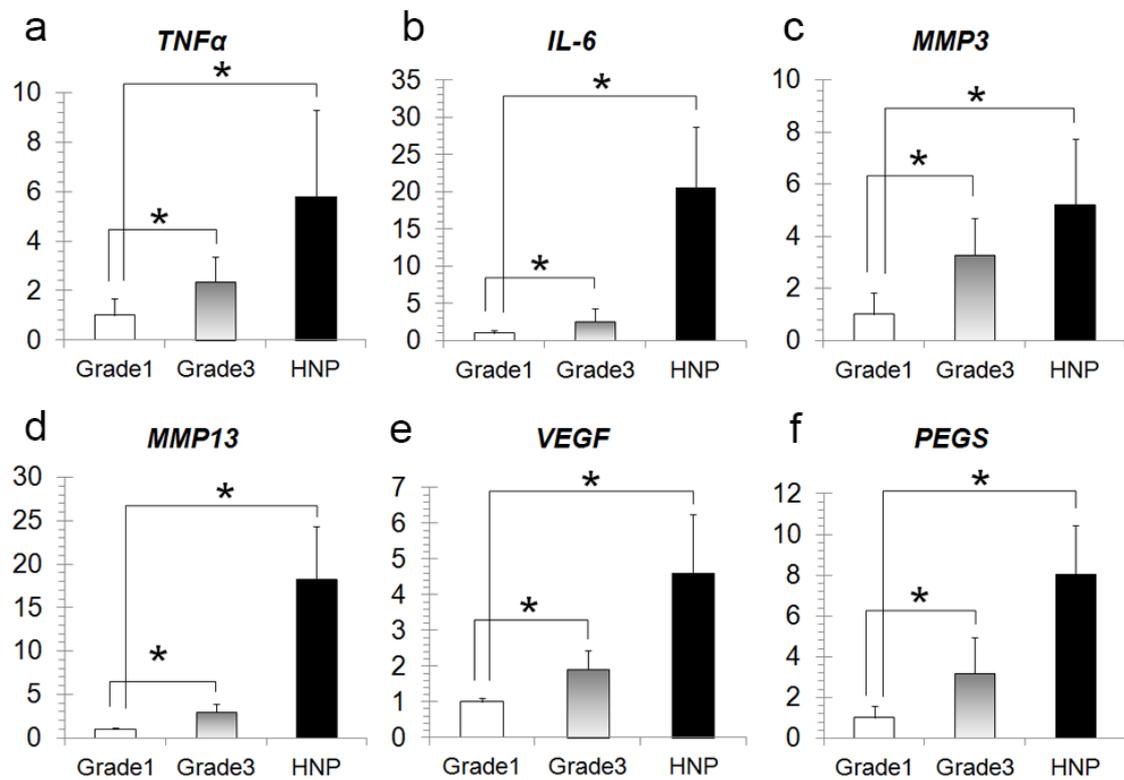


Figure. 2-4 Canine HNP cells showed upregulation of inflammatory and catabolic cytokines.

RT-PCR analysis showed high mRNA expression levels of *Col1A1* (Fig. 1b), *TNF- $\alpha$*  (a), *IL-6* (b),

*MMP3* (c), *MMP13* (d), *VEGF* (e), and *PEGS* (f) in canine HNP cells.

第3章：長期3次元培養における軟骨異栄養性犬種由来椎間板髄核細胞の表現型の推移。

### 3-1 緒言

軟骨異栄養性犬種(CDBs)では Hansen-1 型椎間板ヘルニアが好発する (Priester WA. 1976 ; Gage, ED.ら.1975)。その背景に椎間板髄核の早期変性が関与していることが知られているが、その機序は明らかにされていない。ヒトの髄核において脊索細胞は 10 歳齢までに消失し、同時期に椎間板変性の形態学的変化も生じるとされている。脊索細胞は髄核の恒常性維持において重要な役割を担うとされているが、CDBs の髄核においても生後 1 年を待たずして脊索細胞が消失し始め、線維芽細胞様細胞に置き換わり、変性の進行が認められることから、その病態は人の髄核変性に類似していると考えられている (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)。それゆえ、CDBs は人の髄核変性の病態解明のためのモデル動物として適していると考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。髄核細胞の特性を研究する場合に細胞培養が非常に重要な手法のひとつとなるが、髄核細胞は単層培養下ではその形質が線維芽細胞様に脱分化するため、三次元培養を推奨する報告も少なくない (Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001 )。また培養環境のみならず、動物種によっても発現する形質が異なるため、動物種ごとの培養条件の設定が必要である。CDBs の髄核細胞は、ヒトの髄核細胞と形質が類似しておりモデル動物として最適であると考えられているが (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)、CDBs 由来の髄核細胞の最適な培養方法に関する検討は未だなされていない。

以上により我々は、agarose hydrogels を用いた三次元培養および単層培養下における CDBs

由来髄核細胞の表現型の推移を経時的に評価し、最適な培養条件の設定を行った。

なお使用する scaffold としては alginate hydrogels および agarose hydrogels が代表的なもの

となるが、本検討では細胞の包埋時に化学薬品を使用しない agarose hydrogels を採用すること

とした。

## 3-2 : 材料と方法

### 3-2-1 : 供試動物

対照群とする椎間板髄核組織 (Non-degenerated nucleus pulposus ; NNP) は臨床的に健常な約 12 カ月齢のビーグル犬 6 頭より採取した。

また、変性した椎間板髄核として、椎間板ヘルニアに罹患したミニチュア・ダックスフン

ト (MD) より手術時に摘出された椎間板物質 (Herniated nucleus pulposus ; HNP) を本検

討に使用した。椎間板ヘルニアに罹患した MD は全 15 頭 19 椎間であり平均年齢は  $7.0 \pm 2.5$

歳であった。全ての症例は不全麻痺もしくは完全麻痺を呈し、相川動物医療センターで診

断および治療が行われたものである。症例の詳細を表 3-1 にまとめた。

採取されたサンプルで、組織学的解析に用いるものは 4%パラホルムアルデヒド (PFA :

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液に浸漬し、4°Cで保存した。また Real-time RT PCR

解析に用いるものは TRIZOL (Life Technologies) に浸漬し、-80°Cで保存した。

### 3-2-2 : 髄核組織からの細胞の単離

滅菌下にて採取した髄核組織は 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (all antibiotics from Life Technologies)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に保存した。その後、直ちに 10cm dish (Falcon, Franklin Lakes, NJ) 内でメスを用いて約 2mm 角程に切り、0.4% (w/v) pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む DMEM/F-12 中に浸漬し、37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>環境下で2時間にわたり酵素処理を行った。

pronase による酵素処理が終わった組織片は 50ml (Falcon) チューブに回収し、PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で洗浄後、1500rpm で5分間遠心し上清を捨て、0.1% (w/v) collagenase type II (Sigma-Aldrich)および上述の抗生剤を含む DMEM/F-12 中に浸漬し、37°C および 5%CO<sub>2</sub>環境下で1時間にわたり酵素処理を行った。なお pronase および collagenase 処理中においては、各種酵素の活性の阻害となるため、FBS 等の血清は使用しなかった。

酵素処理により単離した細胞は cell strainer (Falcon)を通過させて余分な細胞外基質を除去後、50ml (Falcon, Franklin Lakes, NJ) チューブに回収し、PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で洗浄した後、1500rpm で5分間遠心して細胞を回収した。回収した細胞は trypan blue により生細胞の確認をした。

### 3-2-3 : 3D マテリアルの選択と、細胞の包埋

使用する scaffold としては alginate hydrogels および agarose hydrogels が代表的なものとな

るが、本検討では細胞の包埋時に化学薬品を使用しない agarose hydrogels を採用することとした。また、細胞を包埋する必要がある為、37°C以下でも硬化しない low melting agarose hydrogels を使用することとした。

まず low melting agarose hydrogels の粉末を 2%の濃度になるように 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (Life Technologies)を含む DMEM/F-12 に懸濁し、沸騰直前まで加熱して agarose の粒子を完全に溶解させた。その後温度が下がるのを待ち、コンタミネーションを防止するためにシリンジフィルター (Millipore, Billerica, MA, USA) を通過させ微生物等の除去を行った。ろ過滅菌した agarose hydrogels は 50ml チューブ(Falcon)に保管した。

前項の手順により単離した細胞は  $5 \times 10^6$  cells/mL の濃度で agarose hydrogels と懸濁し、均一に混ざるようにピペットを用いて攪拌した。

細胞を播種するにあたり、事前に 12well culture plate (Falcon)に細胞を含まない agarose hydrogels を 0.2ml 入れ、約 4°Cに調整した保冷剤を用いて硬化させた。これは cell-agarose constructs から抜け出した細胞が単層で増えることを防止するためである。その上に、0.5ml の cell-agarose constructs を播種し、同じく約 4°Cに調整した保冷剤を用いて硬化させた。

硬化させた cell-agarose constructs は 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies) および 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (Life Technologies) を含む DMEM/F-12 を培養液として 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 0 日、5 日、10 日、25 日と培養した。培養液は 2 日に 1 回の頻度で交換した。

対照群である単層培養としては、12 well culture plate (Falcon)に単離した細胞を直接、 $4 \times 10^4$  cells/mL の濃度で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で0日、5日、10日、25日と培養した。培養液は2日に1回の頻度で交換した。

### 3-2-4 : 組織学的評価

各培養期間を経た cell-agarose constructs は4%CMC (Leica Microsystems, GmbH, Germany) に浸漬し、液体窒素中で迅速に凍結させ、ブロックを作成した。作成したブロックはクライオトームを用いて約 10 $\mu$ m の厚さに薄切し、スライドガラス (Matsunami Glass Industries, Ltd., Osaka, Japan) に載せ、-80°Cで保存した。作成した凍結切片は以下の各染色法により染色した。Hematoxylin-Eosin 染色は細胞の形態観察を目的とし、iron-hematoxylin で対比染色した Safranin-O/fast green 染色および、Toluidin blue (pH 2.5 and pH 7.0) は産生された硫酸化グリコサミノグリカンやヒアルロン酸等の細胞外基質の特定を目的とし行った。さらに抗 type II collagen 抗体(1:50, Millipore-Chemicon, Billerica, MA, USA)を用いた免疫染色も行った。二次抗体としては Alexa Fluor 594-labeled secondary antibodies (1:500, Life Technologies)を使用した。

また LPS で刺激した群は Hematoxylin-Eosin および iron-hematoxylin で対比染色した Safranin-O/fast green に加え、抗 TNF- $\alpha$  抗体 (1:50, Bioworld Technology, Inc, MN, USA), 抗 MMP13 抗体 (1:50, R&D Systems, Inc, MN, USA), 抗 VEGF 抗体 (1:100, Santa Cruz

Biotechnology, Inc., CA, USA) を用いた免疫染色を行い、二次抗体は biotinylated universal secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, Inc, CA, USA)を用いた。

いずれの凍結切片においても、染色前にドライヤーの送風機能を利用し、室温にて風乾させた後、95%エタノールで15分間固定を行った。

一方、単層培養における細胞の組織学的解析としては、カバーガラス上に播種し、増殖させた細胞を各培養期間ごとに回収し、95%エタノールで15分間固定を行った後、Hematoxylin-Eosin、iron-hematoxylin で対比染色した Safranin-O/fast green ならびに Toluidin blue (pH 2.5 and pH 7.0)を行った。

### 3-2-5 : 長期 3D 培養時の細胞増殖の評価

培養した細胞の増殖能および相対的な細胞数を確認するために WST-1 cell proliferation assay (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) を行った。96 well plate (Falcon) 上で培養した細胞に、培養液と 1:10 の割合で希釈した WST-1 solution を 200 $\mu$ l 添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 1 時間インキュベートした後、440 nm の波長で Micro plate reader (Powerscan HT; Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan)を用いて吸光度の測定を行った。

### 3-2-6 : 培養期間における sGAG 産生量の推移

培養細胞が産生したグリコサミノグリカンの定量を目的として Alcian blue dye-binding assay (Wieslab sGAG Quantitative Kit, Eurodiagnostica, Sweden)を行った。

kit に同包されていた guanidine hydrochloride を用いて cell-agarose constructs および単層培養細胞からタンパクを抽出後、Alcian blue に 15 分間反応させ、600 nm の波長で吸光度を測定した(Powerscan HT; Dainippon Pharmaceutical)。総 sGAG 量は shark cartilage (Chondroitin sulfate sodium salt from shark cartilage, C4384, Sigma)を基準として相対定量を行った。

### 3-2-7 : 培養期間における Marker gene 発現の推移

0 日、5 日、10 日、25 日間の培養期間における cell-agarose constructs および単層培養細胞から、TRIzol (Life Technologies)および RNeasy Mini Kit (Qiagen,GmbH, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、260/280 nm の波長で測定した。抽出した RNA から逆転写反応により(Super Script VILO cDNA Synthesis Kit; Life Technologies) cDNA を合成し、*type I collagen (Col1A1)*, *type II collagen (Col2A1)*, *aggrecan (ACAN)*, *cartilage oligomeric matrix protein (COMP)*, *alpha 2-macroglobulin (A2M)*, *cytokeratin 18 (CK18)*, そして *SRY-related HMG-box 5 and 9 (Sox5, 9)*の発現量を測定した。

さらに LPS 処理を行った群に関しては *tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )*, *matrix metalloproteinase 3 (MMP3)*, *matrix metalloproteinase 13 (MMP13)*, *vascular endothelial growth*

*factor (VEGF)* そして *prostaglandin E synthase (PGES)* の発現量を測定した。

イヌ特異的なプライマーは Primer Express software, version 3.0 (Applied Biosystems) で設計し Sigma-Aldrich に作成を依頼した (表 3-2)。

また上述の遺伝子の発現量に関しては、いずれも Kapa Sybr Fast qPCR Kits (Kapa Biosystems, Inc., Boston, USA) および Stratagene Mx3000p System (Agilent Technologies Japan, Ltd.) を使用した real-time-PCR 法を用い、*beta-actin* をコントロールとした  $\Delta\Delta C_t$  により解析した。

### 3-2-8 : Lipopolysaccharide による感作

三次元培養により再分化を促した細胞が、変性した髄核組織の形質を *in vitro* で獲得することができるのか確認するために lipopolysaccharide (LPS) で刺激する検討を行った。

25 日間にわたる三次元培養を行った cell-agarose constructs を LPS (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で刺激し、*Col2A1*, *TNF- $\alpha$* , *MMP13*, and *VEGF* の免疫染色および遺伝子発現解析を用いて検討した。

### 3-2-9 : 統計学的検討

培養条件の違いによる Marker gene の発現量の違いに関しては Tukey-Kramer method を使用し、LPS 処理によるサイトカイン等の発現に関しては Mann-Whitney U test を用いた。

いずれの統計学的解析も StatView 5.0 software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) を用いて行った。  $p < 0.05$  を持って有意差ありと判定した。

### 3-3 : 結果

#### 3-3-1 : 三次元培養下における細胞外基質産生能に関する組織学的評価

agarose hydrogels を用いた三次元培養群において、10 日間および 25 日間の培養期間を経たものは、円形であり髓核細胞らしい形態を呈していた。さらに iron-hematoxylin で対比染色した Safranin-O/fast green 染色により 10 日間培養群の細胞周囲における sGAG の増加が確認され、25 日間培養群において最も産生量が増加していることが確認された。また、Toluidin blue (pH 2.5 および pH 7.0) 染色においても同様に時間依存性に sGAG の増加が確認され、さらには pH 2.5 および pH 7.0 の対比から、ヒアルロン酸の産生増加も確認された (図 3-1)。

Type 2 collagen の免疫染色でも同じように時間依存性に細胞周囲における陽性領域の増加が確認され、25 日間培養群において最も陽性領域の増大が確認された (図 3-1)。

一方、単層培養では Safranin-O/fast green および Toluidin blue のいずれにおいても細胞周囲における sGAG、ヒアルロン酸は陰性を示した。

#### 3-3-2 : 培養環境による細胞増殖能の違い

agarose hydrogels を用いた三次元培養群では 25 日間の培養期間を経ても細胞の有意な増加は確認されなかった。しかし単層培養群では時間依存性に顕著な細胞増加が確認され、25 日間の培養期間を経た細胞は培養開始時と比較し、約 10 倍もの細胞数が確認された。(図

3-2)。

### 3-3-3 : 培養環境による sGAG 産生能の違い

産生された sGAG の量は三次元培養群において有意に増加していた。10 日間培養群より増加が確認され、25 日間培養群ではさらなる増加が確認された。一方、単層培養群では増加は確認されなかった (図 3-3)。

### 3-3-4 : 三次元培養群における Marker gene の発現量の増加

三次元培養群では *Col1A1* の発現量は全培養期間を通して低値を示した。また *Col2A1* および *ACAN* の発現量は 10 日間培養群で増加が確認され、25 日間培養群で最も発現量が増加し、*In vivo* の髄核組織と同程度の発現量を呈した。一方、0 日間および 5 日間の培養期間においては、*Col2A1* および *ACAN* の発現量は単層培養群より低値を示した。

*COMP* の発現量は 25 日間の三次元培養群において、発現量の増加が確認されたが、0-10 間の培養群では単層培養群との有意差は認められなかった。また、*CK18* は 25 日間の三次元培養で顕著な発現増加が認められた。しかし *A2M* の発現量に関しては、全培養期間を通して有意差は確認されなかった。

また髄核細胞の分化を誘導する *Sox5* および *Sox9* の発現量も 10 日間および 25 日間の三次元培養群において、単層培養と比較して増加が確認された (図 3-4)。

*Col2A1*, *ACAN* および *COMP* の発現量に関しては、25 日間の三次元培養群において *in vivo* の髄核の発現量に近似した値を示した。

### 3-3-5 : LPS 感作による三次元培養下髄核細胞の表現型

三次元培養により再分化を促した髄核細胞を用いて、*In vitro* において変性した髄核細胞の形質を再現することが可能か確認するために、25 日間培養した cell-agarose constructs を LPS で刺激し、変性髄核で増加している各種遺伝子およびタンパクの発現量を調べた。

LPS の感作により *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *MMP3*, *MMP13*, *VEGF* および *PEGS* の mRNA 発現量の増加が確認され、免疫染色では *TNF- $\alpha$* , *MMP13* および *VEGF* の陽性細胞の増加が確認された (図 3-4、3-5)。

また、*Col2A1* および *Col1A1* の発現量は LPS 感作による影響は受けなかった。

### 3-4 : 考察

本章では長期三次元培養下における軟骨異栄養性犬種由来の椎間板髄核細胞の表現型および細胞周囲で構築される細胞外基質について検討した。

軟骨異栄養性犬種由来の椎間板髄核細胞の培養時の表現型の推移に関する報告は、本検討が初めてである。ヒトの髄核において脊索細胞は10歳齢までに消失し、同時期に椎間板変性の形態学的変化も生じるとされている。脊索細胞は髄核の恒常性維持において重要な役割を担うとされているが、CDBsの髄核においても生後1年を待たずして脊索細胞が消失し始め、線維芽細胞様細胞に置き換わり、変性の進行が認められることから、その病態は人の髄核変性に類似していると考えられている (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952; Gage, ED.ら.1975)。それゆえCDBsはヒトの髄核変性研究におけるモデル動物として適しており、CDBs由来の髄核細胞の培養環境による表現型の変化は非常に重要である。本検討では、CDBsの髄核細胞は三次元培養および単層培養で全く異なる形質を発現していた。まず第一に、単層培養では細胞の指数関数的な増殖が確認されたが、三次元培養においては細胞増殖が顕著に抑制されていた。髄核細胞は生体内では増殖しない細胞である。それゆえ、単層培養下で無秩序に細胞増殖を繰り返すことは、本来の形質を失うことに繋がりがねない。

髄核細胞は軟骨細胞とよく似た発生の過程を経る。Col2A1やACAN等の軟骨基質のMarker

gene は髄核細胞においても主要な基質である (Sive, JI.ら.2002)。さらに以前の Microarray を用いた報告において A2M および CK18 が CDBs の髄核において高発現していることが示されている (Sakai, D.ら.2009)。以上の理由を背景に、我々は髄核の Marker gene を *Col2A1*、*ACAN*、*A2M* および *CK18* とした。

5 日間の三次元培養下では上述の *Col2A1*、*ACAN*、*A2M* および *CK18* の mRNA の発現量は単層培養と比較して、低値を示した。この結果は、cell agarose constructs 内における再分化を促す細胞周囲環境は 5 日間では構築されないことを示唆している。しかし 10 日間の三次元培養群では単層培養群と比較して *Col2A1*、*ACAN* および *COMP* の mRNA の発現量が増加し、細胞外基質の産生増加も確認された。さらには *Col2A1*、*ACAN*、*COMP*、および *CK18* の mRNA の発現量は 25 日間の三次元培養群で顕著な増加を示し、*in vivo* の髄核の表現形質と似た表現型を示した。加えて、軟骨細胞の重要な Marker gene であり髄核細胞においても細胞外基質の構築や脊索細胞の維持に必要である、*Sox5* および *Sox9* (Smits, P.ら. 2003) の発現量は三次元培養 10 日目において、*in vivo* の髄核と同程度の発現量を示し、25 日培養群ではさらなる発現量の増加が確認された。特に *Sox9* は髄核細胞において *Col2A1* および *ACAN* の発現量の増加を促進し sGAG の産生を促すことが知られている為[23]、これらの結果から 25 日間の三次元培養では、*Sox5* および *Sox9* の発現増加に伴い、*Col2A1* および *ACAN* の発現量が増加し、細胞外基質の産生が増加することで細胞周囲の環境が *in vivo* の環境に類似したものとなり、髄核細胞の再分化が促進されていることが示唆された。

過去の報告において、髄核細胞は培養条件によって全く異なる形質を発現し、さらには動物種によっても適切な培養条件は異なると示されている (Chou, AI.ら. 2006; Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001)。例えば、牛の髄核細胞を alginate hydrogels もしくは collagen gel を用いて三次元培養した場合、単層培養と比較して、プロテオグリカンの産生量が増加するという報告がある (Horner, HA.ら. 2002)。さらには髄核細胞を単層で培養した場合、無秩序な細胞増殖を招き、線維芽細胞様の形質に転換してまうとされている (Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001)。しかし一方で豚の髄核細胞は alginate hydrogels を用いて三次元培養を施したとしても、単層培養した細胞と表現型は変わらないと報告されている (Wang, JY.ら.2001)。

今回、我々の検討によって CDBs の髄核細胞は agarose hydrogels を用いた 25 日間の三次元培養により *in vivo* の髄核組織に近似した表現形質を獲得することが明らかとなった。

さらに我々は、25 日間の三次元培養により再分化を促した cell agarose constructs を利用して、*in vitro* における変性髄核モデルの作成を試みた。変性したヒトの髄核組織は各種炎症性サイトカインを産生すると報告されている (Doita, M. ら. 1996; Jimbo, K. ら. 2005; Kang, JD. ら. 1995; Le, Maitre, CL. ら. 2005; Specchia, N. ら. 2002; Weiler, C. ら. 2005; Aota, Y. ら. 2006)。炎症性サイトカインは病理学的な見地から、椎間板髄核の変性の発生に重要であると近年注目されており、MMPs、prostaglandin E2 (PGE2) および TNF- $\alpha$  が逸脱した髄核で高発現していると報告されている (Weiler, C. ら. 2005)。我々の検討においても、変性し

た CDBs の髄核による炎症性サイトカインの発現が確認されており、それは逸脱を起こしていない髄核においても認められた。つまりマクロファージの影響を受けずとも髄核細胞そのものから、炎症性サイトカインが産生されているということが示唆された。

過去に、牛の髄核において LPS は細胞外基質の分解を促進し、IL-1 $\beta$ 、 -6、 および -10 を含む各種炎症性サイトカインの発現を促進すると報告されている (Aota, Y. ら. 2006)。以上を背景に我々は、*in vitro* における変性髄核モデルの作成にあたり、炎症性サイトカインの発現誘導を目的として LPS を用いた。本検討の結果、LPS の感作により CDBs の髄核細胞からは主要な炎症性サイトカインや MMPs の発現が確認され、変性髄核と同じような表現型が得られることがわかった。我々が作成した cell-agarose constructs は、正常な髄核組織と同じような形質を発現するだけでなく、LPS を用いることで変性髄核モデルとしても利用可能であることがわかった。

### 3-5 : 小括

本章では長期 3 次元培養における軟骨異栄養性犬種由来の椎間板髄核細胞の表現型の推移および細胞周囲に産生される細胞外基質によって構築される微小環境について検討を行った。我々の検討により、一般的な単層培養では形質が大きく変わってしまう CDBs の髄核細胞は、agarose hydrogels を用いた 25 日間にわたる長期三次元培養を行うことで、生体の髄核組織の表現型に近づくことが明らかとなった。単層培養において形質が大きく変化してしまう理由としては、本来増殖することのない髄核細胞が無秩序な分裂を繰り返し、指数関数的に増殖することが深く関わっていると考えられる。agarose hydrogels で作成した scaffold 内では細胞は円形を呈し、増殖もほとんど見られなかった。さらに髄核細胞自身が産生する細胞外基質が agarose hydrogels にトラップされ細胞周囲に留まり、微小環境を構築する。これにより長期間の培養を経ることで、少しずつ本来の形質へと再分化が促されるものであると考えられる。CDBs の髄核はヒトの髄核と形質が似ているゆえ、我々が樹立した *in vitro* における髄核モデルは、人医領域および獣医学領域の双方にとって有益である新たな知見を提供し、椎間板髄核変性の病態解明に貢献するものであると考えられた。

Table. 3-1 Summary of intervertebral disc disease data.

|        | <b>Breed</b> | <b>Age</b> | <b>Location of lesion</b> |
|--------|--------------|------------|---------------------------|
| Case1  | MD           | 6          | T13-L1                    |
| Case2  | MD           | 9          | T13-L1                    |
| Case3  | MD           | 6          | L4-5                      |
| Case4  | MD           | 9          | T13-L1                    |
| Case5  | MD           | 5          | T11-12                    |
| Case6  | MD           | 5          | L1-2, L2-3                |
| Case7  | MD           | 5          | T12-13                    |
| Case8  | MD           | 7          | L2-3                      |
| Case9  | MD           | 7          | T13-L1, L1-2              |
| Case10 | MD           | 9          | T11-12, T12-13            |
| Case11 | MD           | 5          | T11-12, T12-13            |
| Case12 | MD           | 6          | L2-3                      |
| Case13 | MD           | 3          | T13-L1                    |
| Case14 | MD           | 12         | T13-L1                    |
| Case15 | MD           | 12         | L1-2                      |

MD: Miniature Dachshund

Table. 3-2 Primer sequences for realtime PCR.

| Gene Name                                   | Gene Symbol   | Ref. Sequence  | Primer                                                                          |
|---------------------------------------------|---------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Type I collagen, alpha1</i>              | <i>Col1A1</i> | NM_001003090   | Forward: ACA GCC GCT TCA CCT ACA GT<br>Reverse: ATA TCC ATG CCG AAT TCC TG      |
| <i>Type II collagen, alpha1</i>             | <i>Col2A1</i> | NM_001006951   | Forward: GAAACTCTGCCACCTGAAT<br>Reverse: GCTGCTCCACCACTTCTCT                    |
| <i>Aggrecan</i>                             | <i>ACAN</i>   | NM_001113455   | Forward: CTATGAGGACGGCTTTCACC<br>Reverse: AGACCTCACCTCCATCTCC                   |
| <i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>  | <i>COMP</i>   | XM_533869      | Forward: GCC GAG ACA CGG ATT TGG<br>Reverse: CAC GTC CTC TTG CCC TGA GT         |
| <i>α-2-Macroglobulin</i>                    | <i>A2M</i>    | XM_534893      | Forward: ACT TGG CTC ACT GCC TTT GTA CT<br>Reverse: GTT GAG CAG AGA CCC GGA ACT |
| <i>Cytokeratin 18</i>                       | <i>CK18</i>   | XM_849849      | Forward: AAG AAC CAC GAGGAG GAA GTA AAG<br>Reverse: CCC GGA TAT CTG CCA TGA TC  |
| <i>SRY (sex determining region Y)-box 5</i> | <i>Sox5</i>   | XM_003433564   | Forward: ACC TCT GAT GGC AAA TCA CC<br>Reverse: ATT CAC AAC AGC CAC CTT CC      |
| <i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i> | <i>Sox9</i>   | NM_001002978   | Forward: TCA TGA AGA TGA CCG ACG AG<br>Reverse: GTC CAG TCG TAG CCC TTG AG      |
| <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>          | <i>TNF-α</i>  | NM_001003244.4 | Forward: ACC ACA CTC TTC TGC CTG CT<br>Reverse: ACC CAT CTG ACG GCA CTA TC      |
| <i>Interleukin 1</i>                        | <i>IL-1β</i>  | NM_001003301.1 | Forward: TGC AGG TGT CCT CTC AGC TA<br>Reverse: GAG CCT GGT CTC ATC TCC AG      |
| <i>Interleukin 6</i>                        | <i>IL-6</i>   | NM_001003301.1 | Forward: GGC TAC TGC TTT CCC TAG CC<br>Reverse: GAA GAC GAG GAA GTG CAT CTG     |
| <i>Matrix metalloproteinase 3</i>           | <i>MMP3</i>   | NM_001002967.1 | Forward: ATG GAG ATG CCC ACT TTG AC<br>Reverse: GGA GGA ATC AGA GGG AGG TC      |
| <i>Matrix metalloproteinase 13</i>          | <i>MMP13</i>  | XM_536598.2    | Forward: TTC TGG CTC ATG CTT TTC CT<br>Reverse: GGT CCT TGG AGT GGT CAA GA      |
| <i>Vascular endothelial growth factor A</i> | <i>VEGF</i>   | NM_001003175.2 | Forward: TTC CTG CAG CAT AGC AAA TG<br>Reverse: AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA      |
| <i>Prostaglandin E synthase</i>             | <i>PGES</i>   | NM_001122854.1 | Forward: AGT ATT GCC GGA GTG ACC AG<br>Reverse: GCA GGT CTC CTG ATT GAA CC      |
| <i>Actin, beta</i>                          | <i>ACTB</i>   | NM_001195845.1 | Forward: AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG<br>Reverse: TGC GTG ACA TCA AGG AGA AG      |

Dog-specific primers were designed using Primer Express software, version 3.0

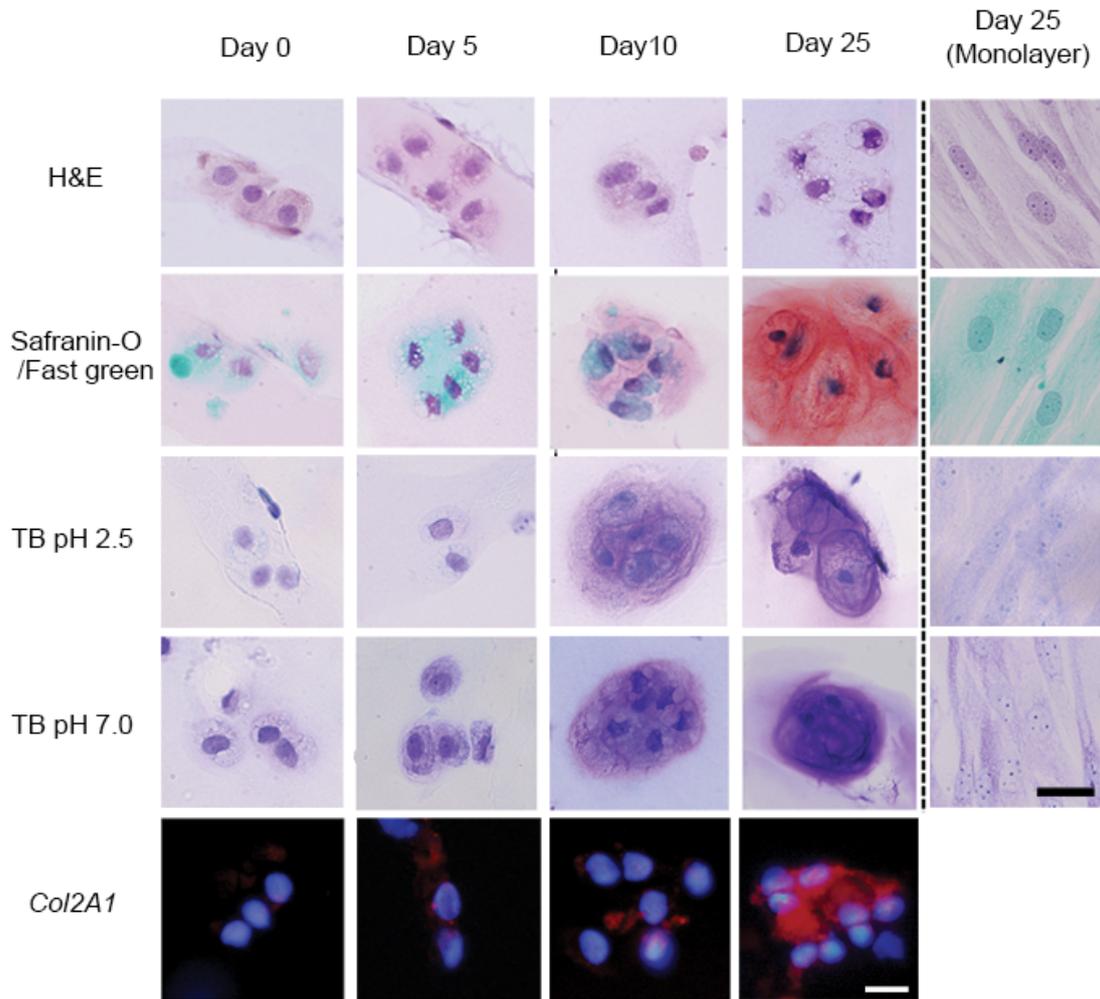


Figure. 3-1 Histological characterization of 3D-cultured cells.

Chondrodystrophic NP cells encapsulated in agarose hydrogels displayed a rounded and native NP cell morphology and expressed high levels of sGAG, hyaluronic acid, and *Col2A1* in a time-dependent manner, particularly at day 25. In contrast, monolayer cultures at day 25 were negative for sGAG and hyaluronic acid. Scale bar: 20  $\mu$ m.

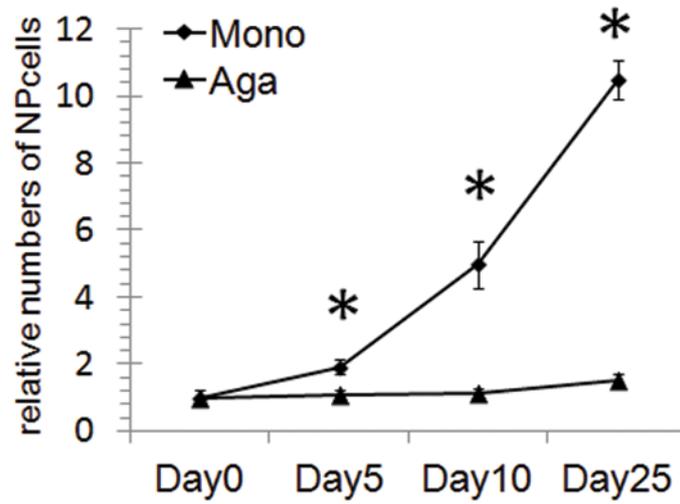


Figure. 3-2 NP cell proliferation in monolayers or agarose hydrogels.

NP cells did not proliferate when cultured in agarose hydrogel scaffolds. In contrast, in monolayer cultures, the number of cells was 10-fold higher at day 25 than at day 0,

\* $p < 0.01$ .

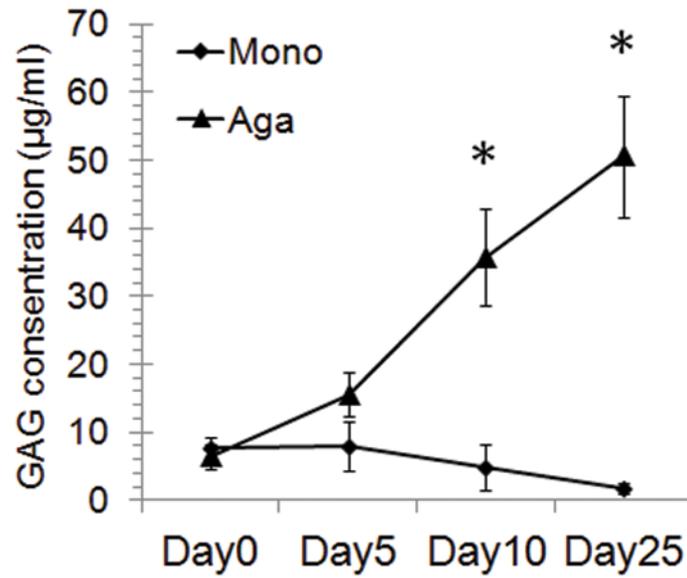


Figure. 3-3 Quantitation of secreted sGAG using an Alcian blue dye-binding assay.

Synthesis of sGAG was significantly higher and increased in a time-dependent manner in agarose 3D cultures of NP cells at day 10 and 25 compared with monolayer cultures ( $p < 0.01$ ), \* $p < 0.01$ .

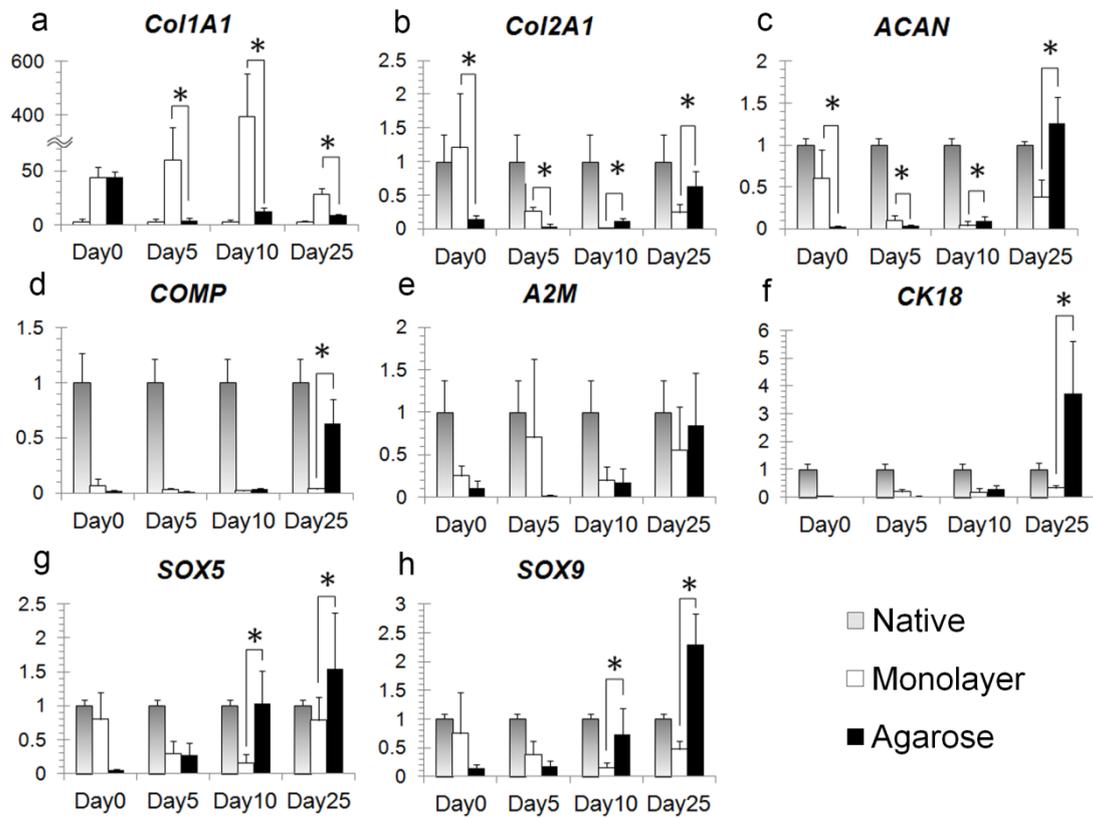


Figure. 3-4 Levels of mRNA expression in chondrodystrophic NP in 3D cultures.

**a)** In agarose hydrogels, mRNA expression of *Col1A1* was decreased for all culture periods compared with monolayer culture ( $p < 0.01$ ). **b, c)** *Col2A1* and *ACAN* expression levels were also increased at day 10 and 25 and peaked at day 25 ( $p < 0.01$ ). At early time points (day 0 and 5), agarose cultures exhibited lower expression of *Col2A1* and *ACAN* than monolayer cultures ( $p < 0.01$ ). **d, f)** Expression levels of *COMP* and *CK18* mRNA were increased at day 25 ( $p < 0.01$ ). **e)** In contrast, no statistically

significant differences in gene expression were observed in *A2M* expression at day 25. **g**,

**h)** Furthermore, in 3D agarose cultures, NP cells exhibited high expression of *SOX5* and

*SOX9* at day 10 and day 25 ( $p < 0.01$ ) compared with monolayers. \* $p < 0.01$

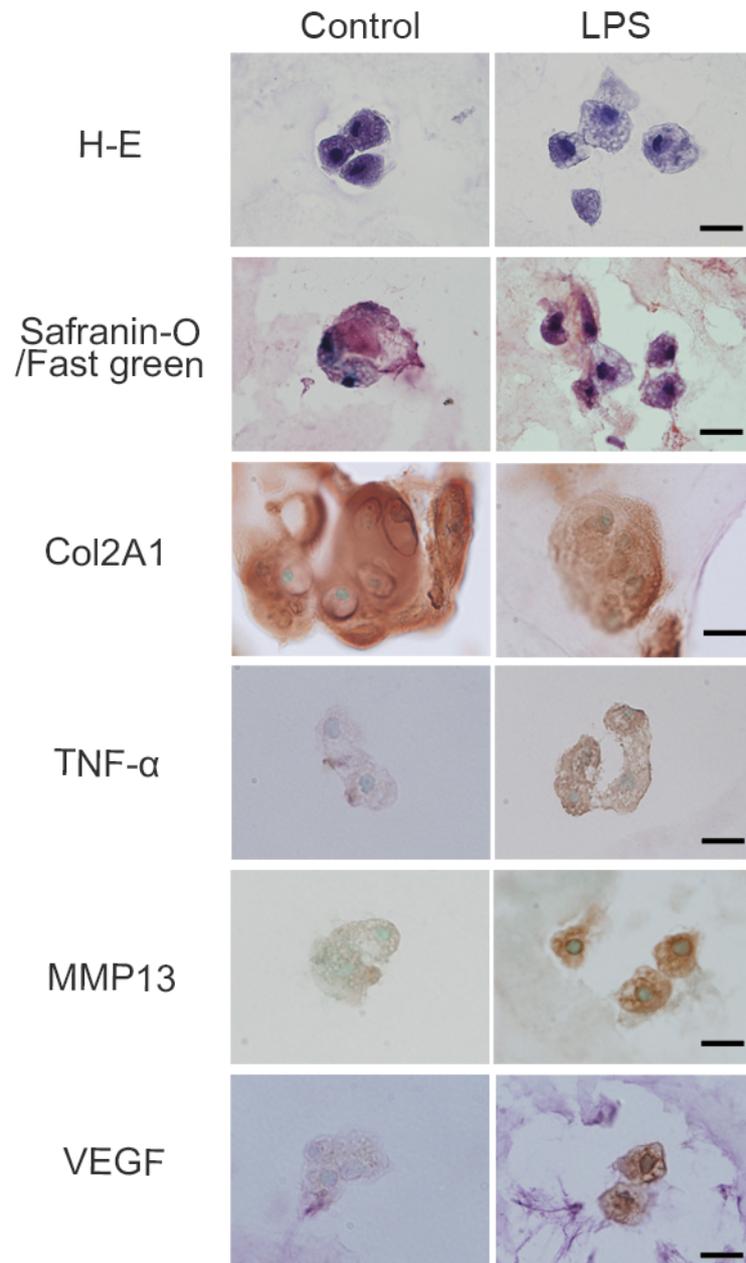


Figure. 3-4 LPS-induced expression of inflammatory and catabolic cytokines in 3D cultured NP cells.

Cells were treated with defined media supplemented with a single dose of LPS (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after 25 days of culture.

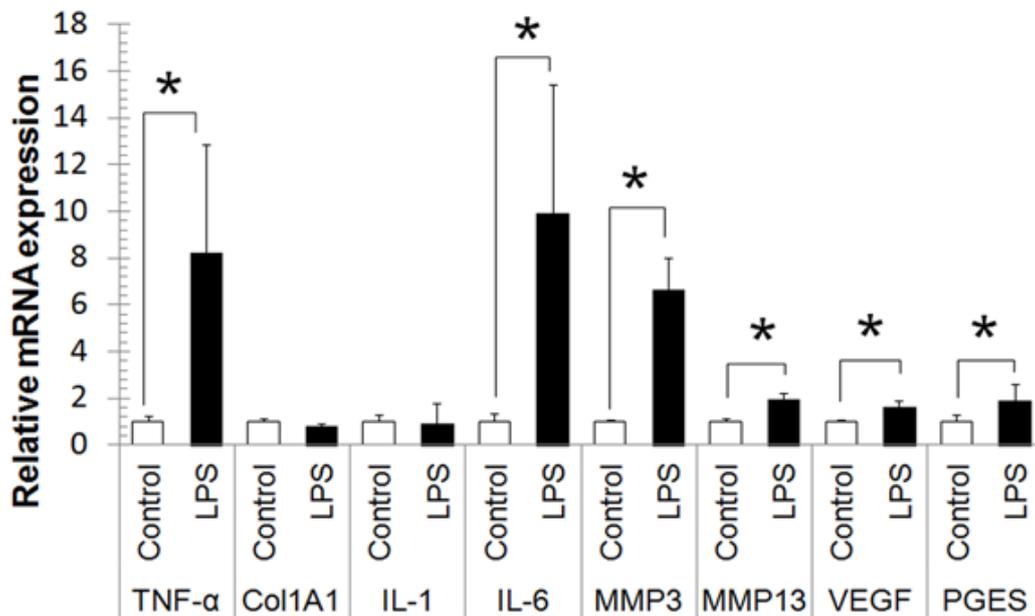


Figure. 3-5 LPS-induced expression of inflammatory and catabolic cytokines in 3D cultured NP cells.

After stimulation with LPS, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *MMP3*, *MMP13*, *VEGF*, and *PEGS* mRNA expression levels were elevated.

## 第4章 椎間板髄核変性および石灰化において発現する Runx2 に対する Wnt/ $\beta$ -catenin signal

### pathway の関与に関する検討

#### 4-1：緒言

椎間板変性は髄核組織におけるプロテオグリカンおよび Type 2 collagen (Col2A1)の減少を特徴とし、水分含有量の減少を伴う (Antoniou, J.ら,1996; Oegema, TR.ら, 1993)。そもそも髄核組織は脊索細胞と軟骨細胞様細胞の 2 種類の細胞で構成され、これらの 2 種類の細胞は円形であり、軟骨細胞と類似した形態を呈し、硝子軟骨と組成が似た細胞外基質の中でクラスターを形成している。(Horner, HA.ら, 2002) 脊索細胞は加齢に伴い減少するが、減少の程度は動物種によって異なり、さらには脊索細胞の減少が変性の進行と相関性を有するとされている (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952)。

椎間板髄核では変性の過程において、分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs)の発現が亢進し、Type 2 collagen (Col2A1) や aggrecan (ACAN) 等の細胞外基質の分解がおこることが報告されている (Le Maitre, CL.ら. 2007; Le Maitre, CL.ら. 2006; Le Maitre, CL.ら. 2004; Haro, H. ら. 2000)。これらのうち MMP13 は Col2A1 を特異的に分解する酵素であり、椎間板変性に重要な役割を示すとされている (Itoh, H.ら. 2012)。この MMP13 の発現を誘導する因子の一つとして Runt-related transcription factor 2 (Runx2)が挙げられる。Runx2 は骨芽

細胞の分化と軟骨細胞の肥大化を促進し骨形成を誘導する転写因子のひとつであるが (Enomoto, H.ら. 2000 ; Komori, T.ら. 2005 ; Zheng, Q.ら. 2003)、この Runx2 は椎間板変性においても MMP13 の発現を誘導し、さらには髄核細胞の肥大化や髄核基質の石灰化を促進する等、重要な役割を持つことが分かっている (Itoh, H.ら. 2012)。さらにこの Runx2 は骨形成の過程において Wnt/ $\beta$ -catenin signal によって誘導されていることが報告されている (Gaur, T.ら.2006 ; Dong, YF.ら. 2006)。

Wnt/ $\beta$ -catenin signal は変形性膝関節症 (OA) の進行に関与すると報告されており、OA の軟骨細胞では  $\beta$ -catenin の蓄積が進行し Col2A1 や ACAN の産生量が低下することがわかっている (Yuasa, T. ら.2008)。この Wnt/ $\beta$ -catenin signal は椎間板変性においても重要な役割を示すと考えられている (Smolders, LA.ら. 2012; Hiyama, A.ら. 2010)。

Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖タンパク質で、線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて保存され、初期発生や形態形成、器官形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動などを制御する (Logan, C.Y.ら.2004)。

Wnt が細胞に作用することにより、活性化される細胞内シグナル伝達機構を Wnt signal pathway と呼ぶが、Wnt signal pathway には noncanonical pathway および canonical pathway が存在し、canonical pathway では  $\beta$ -catenin を介した T-cell factor (TCF) および lymphoid enhancer factor (LEF) の活性化により下流の遺伝子発現を制御していると考えられている (Gordon, MD.ら. 2006; Nusse, R. ら. 2003; Peifer, M.ら. 2002; Yamanaka, H.ら. 2002; Giles, RH.ら. 2003)。

これまでにリガンドとしての Wnt はヒトとマウスで 19 種類同定されている (Logan, C.Y. 2004)。Wnt のリガンドが存在しない場合、 $\beta$ -catenin は adenomatous polyposis coli (APC)、Axis Inhibition Protein (Axin) および glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )から構成される複合体によるリン酸化を受けた後、ユビキチン化を経て分解される。一方、Wnt のリガンドが存在する場合、リガンドは 7 回膜貫通型の受容体である Frizzled (Fz) および 1 回膜貫通型の受容体である low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5 もしくは 6 と結合する。それにより Dishevelled (Dvl) がリン酸化とポリユビキチン化を受けて活性化され、APC/Axin/GSK-3 $\beta$  複合体から GSK-3 $\beta$  を遠ざける。すると  $\beta$ -catenin のリン酸化およびユビキチン化は抑制され、分解が行われない為、細胞質内に  $\beta$ -catenin が蓄積し核内へと移行する。核内に移行した  $\beta$ -catenin は転写因子である TCF および LEF と結合し、下流の遺伝子の発現を調節し、その結果 Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway は細胞の増殖や分化を制御する。

この Wnt/ $\beta$ -catenin signal が髄核変性の過程においても Runx2 の発現を誘導し、変性および石灰化に関与している可能性が考えられる。

本検討では組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、Runx2 の発現を介した Wnt/ $\beta$ -catenin signal による椎間板髄核の変性および石灰化について検討した。

## 4-2 : 材料と方法

### 4-2-1 : 供試動物

対照群とする椎間板髄核組織 (Non-degenerated nucleus pulposus ; NNP) は臨床的に健全な約 12 カ月齢のビーグル犬 6 頭より採取した。

また、変性した椎間板髄核として、椎間板ヘルニアに罹患したミニチュア・ダックスフント (MD) より手術時に摘出された椎間板物質 (Herniated nucleus pulposus ; HNP) を本検討に使用した。椎間板ヘルニアに罹患した MD は全 15 頭 19 椎間であり平均年齢は  $7.0 \pm 2.5$  歳であった。全ての症例は不全麻痺もしくは完全麻痺を呈し、相川動物医療センターで診断および治療が行われたものである。症例の詳細を表 4-1 にまとめた。

採取されたサンプルで、組織学的解析に用いるものは 4%パラホルムアルデヒド (PFA : Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液に浸漬し、4°Cで保存した。また Real-time RT PCR 解析に用いるものは TRIZOL (Life Technologies) に浸漬し、-80°Cで保存した。

### 4-2-2 : 正常および変性髄核の組織学的解析

各グレードに分類したそれぞれの髄核組織および HNP は、採取後すぐに 4%PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に浸漬し、3 日から 4 日間ほどに渡り固定処理を行った。次いでアルコール系列およびキシレン系列を使用した脱水および透徹を行い、パラプラス

ト (Leica Biosystems, GmbH, Germany) に包埋しパラフィンブロックを作成した。作成したパラフィンブロックはマイクロトームを使用して約 5 $\mu$ m の厚さに薄切し連続切片を作成後、スライドガラス(Matsunami Glass Industries, Ltd., Osaka, Japan) に載せ、Slide warmer 上で一晩伸展させた後、4 $^{\circ}$ Cで保存した。作成したパラフィン切片は以下の各染色法により染色した。Hematoxylin-Eosin 染色は形態観察を目的とし、Safranin-O/fast green 染色は産生された硫酸化グリコサミノグリカンやヒアルロン酸等の細胞外基質の評価を目的とし行った。加えて石灰化基質の検出を目的とした Von kossa 染色を行った。さらに  $\beta$ -catenin および Runx2 のタンパク質発現の評価を目的として、抗  $\beta$ -catenin 抗体 (1:50 dilution; Cell Signal Technology)および抗 Runx2 抗体 (1:200 dilution; Abcam) 使用した免疫染色を行った。

二次抗体としては Alexa Fluor 594-labeled secondary antibodies (1:500, Life Technologies)および Alexa Fluor 488-labeled secondary antibodies (1:500, Life Technologies)を使用した。1次抗体の反応時間は基本的に 4 $^{\circ}$ C下で 24 時間とし、二次抗体に関しては室温で 20 分間とした。二次抗体との反応が終了したサンプルは PBS で洗浄後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Inc, CA, USA)を使用して核染および封入し、蛍光顕微鏡を使用して陽性細胞の観察を行った。

#### 4-2-3 : 髄核組織からの細胞の単離と培養方法

滅菌下にて採取した髄核組織は 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (all antibiotics from Life Technologies)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に保存した。その後、直ちに 10cm dish (Falcon, Franklin Lakes, NJ) 内でメスを使用して約 2mm 角程に切り、0.4% (w/v) pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む DMEM/F-12 中に浸漬し、37°Cおよび 5%CO<sub>2</sub>環境下で 2 時間にわたり酵素処理を行った。pronase による酵素処理が終わった組織片は 50ml (Falcon) チューブに回収し、PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で洗浄後、1500rpm で 5 分間遠心し上清を捨て、0.1% (w/v) collagenase type II (Sigma-Aldrich)および上述の抗生剤を含む DMEM/F-12 中に浸漬し、37°C および 5%CO<sub>2</sub>環境下で 1 時間にわたり酵素処理を行った。なお pronase および collagenase 処理中においては、各種酵素の活性の阻害となるため、FBS 等の血清を含む溶液の使用を回避した。酵素処理により単離した細胞は cell strainer (Falcon)を通過させて余分な細胞外基質を除去後、50ml (Falcon, Franklin Lakes, NJ) チューブに回収し、PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で洗浄した後、1500rpm で 5 分間遠心して細胞を回収した。回収した細胞は trypan blue により生細胞を確認した。

上記の手順により単離した髄核細胞を検討に用いるにあたり、事前に三次元環境下で 25 日間にわたり培養した。その手順としては、まず low melting agarose hydrogels の粉末を 2% の濃度になるように 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (Life Technologies)を含む

DMEM/F-12 に懸濁し、沸騰直前まで加熱して agarose の粒子を完全に溶解させた。その後温度が下がるのを待ち、コンタミネーションを防止するためにシリンジフィルター (Millipore, Billerica, MA, USA) を通過させ微生物等の除去を行った。ろ過滅菌した agarose hydrogels は 50ml チューブ(Falcon)に保管した。上記の手順により単離した細胞は  $5 \times 10^6$  cells/mL の濃度で agarose hydrogels と懸濁し、均一に混ざるようにピペットを用いて攪拌した。細胞を播種するにあたり、事前に 12 well culture plate (Falcon)に細胞を含まない agarose hydrogels を 0.2ml 入れ、約 4°Cに調整した保冷剤を用いて硬化させた。これは cell-agarose constructs から抜け出した細胞が単層で増えることを防止するためである。その上に、0.5ml の cell-agarose constructs を播種し、同じく約 4°Cに調整した保冷剤を用いて硬化させた。硬化させた cell-agarose constructs は 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies) および 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (Life Technologies) を含む DMEM/F-12 を培養液として 25 日間培養した。培養液は 2 日に 1 回の頻度で交換した。

単層培養としては、12 well culture plate (Falcon)に単離した細胞を直接、 $4 \times 10^4$  cells/mL の濃度で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 80%コンフルエントに至るまで培養を行った。培養液は 2 日に 1 回の頻度で交換した。

#### 4-2-4 : 塩化リチウム (LiCl) および FH535 による感作

GSK-3 $\beta$  の活性阻害剤である LiCl (Wako Co., Ltd, Tokyo, JAPAN)は、細胞質内における GSK-3 $\beta$  による  $\beta$ -catenin のリン酸化およびポリユビキチン化を阻害し、 $\beta$ -catenin の細胞内蓄積を促す。また FH535 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)は Tcf/ $\beta$ -catenin signal の活性阻害剤であり、 $\beta$ -catenin によって促進される下流の遺伝子の転写活性を抑制する。それぞれの試薬は、培養下における髄核細胞内で実際に Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway が機能していることを確認するために本検討で使用した。LiCl は最終濃度を 20mM として、また FH535 は最終濃度を 30  $\mu$ M となるように DMEM/F-12 中に溶解し、12-72 時間にわたり培養下で感作を行った。

#### 4-2-5 : 遺伝子発現解析

採取した髄核組織および HNP は TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に浸漬後、ポリトロンホモジナイザーを使用して破碎し、クロロホルムを添加して分離後、上清を回収した。回収した上清から RNeasy Mini Kit (Qiagen,GmbH, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、260/280 nm の波長で測定した。抽出した RNA から逆転写反応により (Super Script VILO cDNA Synthesis Kit; Life Technologies) cDNA を合成し、 $\beta$ -catenin, Runx2, MMP2, MMP13, wnt inhibitory factor 1 (Wif-1), Col1A1, および transcription factor 7 like 2 (Tcf7L2)の発現量を測定した。

また三次元環境下で培養し、LiCl および FH535 による感作を行った髄核細胞から、上記と同じ手順により RNA を抽出し、その濃度を 260/280 nm の波長で測定した。抽出した RNA から逆転写反応により (Super Script VILO cDNA Synthesis Kit; Life Technologies) cDNA を合成し、*β-catenin*, *Runx2*, *MMP13*, *wnt inhibitory factor 1 (Wif-1)*, および *transcription factor 7 like 2 (Tcf7L2)* の発現量を測定した。

イヌ特異的なプライマーは Primer Express software, version 3.0 (Applied Biosystems) で設計し Sigma-Aldrich に合成を依頼した (表 4-2)。

また上述の遺伝子の発現量に関しては、いずれも Kapa Sybr Fast qPCR Kits (Kapa Biosystems, Inc., Boston, USA) および Stratagene Mx3000p System (Agilent Technologies Japan, Ltd.) を使用した real-time-PCR 法を用い、*beta-actin* をコントロールとした  $\Delta\Delta C_t$  により解析した。

#### 4-2-6 : 細胞増殖の評価

培養した細胞の増殖能および相対的な細胞数を確認するために WST-1 cell proliferation assay (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) を行った。96well plate (Falcon) 上で培養した細胞に、培養液と 1:10 の割合で希釈した WST-1 solution を 200 $\mu$ l 添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 1 時間インキュベートした後、440 nm の波長で Micro plate reader (Powerscan HT; Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) を用いて吸光度の測定を行った。

#### 4-2-7 : 培養細胞の組織学的解析

各培養期間を経た cell-agarose constructs は 4% CMC (Leica Microsystems, GmbH, Germany) に浸漬し、液体窒素中で迅速に凍結させ、ブロックを作成した。作成したブロックはクライオトームを用いて約 10 $\mu$ m の厚さに薄切し、スライドガラス (Matsunami Glass Industries, Ltd., Osaka, Japan) に載せ、-80 $^{\circ}$ C で保存した。作成した凍結切片は、細胞の形態観察を目的とし Hematoxylin-Eosin 染色を行った。

凍結切片は、染色前にドライヤーの送風機能を利用し、室温にて風乾させた後、95% エタノールで 15 分間固定を行った。

一方、単層培養における細胞の組織学的解析としては、カバーガラス上に播種し、増殖させた細胞を各培養期間ごとに回収し、95% エタノールで 15 分間固定を行った後、Hematoxylin-Eosin 染色を行い形態を評価した。

#### 4-2-8 : ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析

ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析には agarose hydrogel 由来のタンパク質の影響を除外するために、単層培養細胞を用いた。各濃度における LiCl および 30 $\mu$ M における FH535 により感作を行った細胞は、氷冷した PBS で 2 回洗浄した。その後 Protease Inhibitor Cocktail (ProteoGuard; Clontech Laboratories, Inc., CA, USA) を添加した RIPA buffer を使用し、細胞を破碎および溶解した後、4 $^{\circ}$ C 下にて 10000rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清をタン

パク質抽出液とした。タンパク質抽出液はプロテインアッセイキット II (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を使用し、595nm の波長における吸光度を測定することにより濃度測定を行った。濃度が明らかとなったタンパク質抽出液は 2×SDS sample buffer を添加し 95°C で 5 分間加熱し変性させ、その後 -80°C で保存した。

上記の方法により精製したタンパク質抽出液はポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS-PAGE (20 µg/lane) を行った。泳動終了後、ゲルを取り出し PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) にタンパク質を転写した。転写が終了した PVDF 膜は 5% スキムミルクを含有する Tween 20 を含む Tris-buffered saline (TBST; 50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) を使用して 4°C 下で 24 時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング終了後、抗  $\beta$ -catenin 抗体 (1:1,000 dilution; Cell Signal Technology)、抗 p- $\beta$ -catenin 抗体 (1:1,000 dilution; Cell Signal Technology) および抗 Runx2 抗体 (1:500 dilution; Abcam) を使用し 4°C 下で一晩反応させた。二次抗体による反応はホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:2,000 dilution; GE Healthcare Life Sciences, K.K., Tokyo, Japan.) で行い、発色反応には ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences, K.K., Tokyo, Japan) を使用した。発色させた PVDF 膜は ImageQuant LAS-4000 Chemiluminescence & Fluorescence Imaging System (GE Healthcare Life Sciences, K.K., Tokyo, Japan) により発光を検出した。

#### 4-2-9 : 統計学的解析

MRI signal intensity と変性に関わる mRNA の発現量の相関性に関しては、Pearson's correlation coefficient を使用し、Grade 1 と HNP における mRNA の発現量の違いに関しては Mann-Whitney *U* test を使用した。その他の統計学的解析には Tukey-Kramer method を使用し、 $P < 0.05$  を持って有意差ありと判定した。いずれの統計学的解析も StatView 5.0 software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) を使用して行った。

#### 4-3 : 結果

##### 4-3-1 : 組織学的解析

Pfirrmann grading system によって分類された Grade1, 3 および HNP は変性の進行に伴う典型的な病理学的変化を示した。すなわち Safranin-O の染色性の低下および石灰化領域の拡大が認められ、加えて MMP13 陽性細胞の増加も認められた (図 4-1)。さらに蛍光免疫染色により、変性の進行に伴う  $\beta$ -catenin 陽性細胞の増加が認められた。さらに  $\beta$ -catenin に陽性を示す細胞における Runx2 の陽性の比率の増加が認められた (図 4-2)。

##### 4-3-2 : MRI Signal intensity と変性に関わる mRNA の発現量の相関性

MRI の T2 強調画像における髄核組織の信号値の低下は、本検討による解析の結果、 $\beta$ -catenin, Runx2, Col1A1, および Wif-1 の mRNA 発現量の増加と相関性を有することがわかった ( $p < 0.001$ ; 図 4-3)。これらの結果から、 $\beta$ -catenin, Runx2, Col1A1, および Wif-1 は髄核変性に関与することが示唆された。

##### 4-3-3 : HNP における各種遺伝子の発現量

外科学的処置により摘出された、逸脱した椎間板物質では Grade1 の髄核組織と比較し、 $\beta$ -catenin および Runx2 の mRNA の発現量が顕著に増加していた。加えて Col1A1 および

*MMPs* (*MMP2*, *MMP9*, *MMP13*)などの発現も従来の報告通り増加していたが、*Wif-1* の発現量は低下していた (図 4-4)。

#### 4-3-4 : LiCl が細胞に与える影響

20mM の LiCl 添加による細胞数および細胞形態への影響は、48 時間の感作では明らかなものではなかった (図 4-5AB)。また三次元環境下で培養した細胞については 72 時間にわたる 20mM の LiCl による感作においても明らかな変化は認められなかった (図 4-6AB)。

#### 4-3-5 : LiCl による培養細胞における $\beta$ -catenin および *Runx2* の mRNA 発現量への影響

三次元環境下で 72 時間にわたる LiCl による刺激によって *Runx2* の発現量は増加し、48 時間の単層培養においても同様の結果が得られた(図 4-5C ; 図 4-6C)。

FH535 を使用し  $\beta$ -catenin の活性を阻害した場合、LiCl により促された活性が顕著に抑制されることがわかった。一方、*Wif-1* に関してのみは、LiCl の感作により発現量が低下し、FH535 添加により発現量が回復した (図 4-7)。

#### 4-3-6 : LiCl による培養細胞における $\beta$ -catenin および *Runx2* のタンパク発現量の変化

ウェスタンブロットによる解析の結果、10mM および 20mM の濃度における LiCl の添加時に、 $\beta$ -catenin および *Runx2* の発現量が増加していることが明らかとなった。また、リン酸

化  $\beta$ -catenin の発現量は LiCl の影響により低下することが明らかとなった。また LiCl による  $\beta$ -catenin および Runx2 の発現量の増加は、FH535 により有意に抑制された。

#### 4-4 : 考察

本章では組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、Runx2の発現を介した Wnt/ $\beta$ -catenin signal による椎間板髄核の変性および石灰化について検討した。

近年、医療技術の進展により、椎間板ヘルニアに対する様々な治療法が考案されているが、椎間板変性の原因および病態に関しては未だ不明な点が多く残されている。椎間板変性では各種の MMPs の発現増加がみられることがわかっているが (Le Maitre, CL.ら. 2007; Le Maitre, CL.ら. 2006; Le Maitre, CL.ら. 2004; Haro, H. ら. 2000)、本検討に使用した、CDBs の変性髄核においても同様の結果が得られた。CDBs の髄核変性の過程において、MMP13 の発現は Runx2 により誘導されることが示唆されている (Itoh, H.ら. 2012)。Runx2 は骨芽細胞の分化と軟骨細胞の肥大化を促進し骨形成を誘導する転写因子のひとつであるが (Enomoto, H.ら. 2000 ; Komori, T.ら. 2005 ; Zheng, Q.ら. 2003)、その発現は Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway により制御されており、さらには OA における軟骨細胞の肥大化にも関わりとされている (Gaur, T.ら.2006 ; Dong, YF.ら. 2006)。

本検討では髄核細胞内で実際に、Runx2 の発現が Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway によって誘導されていることを確認するために、LiCl を使用して Wnt/ $\beta$ -catenin signal の活性化を行った。LiCl は GSK-3 $\beta$  の阻害剤であり  $\beta$ -catenin の細胞内濃度を高め、核への移行を促進するものである (Hiyama, A.ら. 2010)。我々の検討の結果、CDBs 由来の髄核細胞においても、LiCl

の作用により  $\beta$ -catenin タンパクの細胞内蓄積量の増加が確認された。LiCl の作用により、 $\beta$ -catenin の mRNA レベルでの発現増加が生じるとする報告も存在するが (Hiyama, A.ら. 2010; Yingjuan, Y.ら. 2011 ; Roberto G.ら. 2007)、我々の検討では mRNA の発現量の有意な増加は確認されなかった。LiCl の作用は APC/Axin/GSK3 $\beta$  の複合体における GSK3 $\beta$  の阻害により  $\beta$ -catenin のタンパクの分解を抑制するとされている。つまりタンパクの活性阻害によって引き起こされる現象であるため、 $\beta$ -catenin の mRNA の発現量の増加を説明することは難しい。今後の詳細な機序に関する報告が期待される。

一方、Runx2 の発現量に関しては mRNA およびタンパクの両方の発現増加が認められた。さらに FH535 の作用により  $\beta$ -catenin および Runx2 の発現抑制も確認された。FH535 は Tcf/ $\beta$ -catenin の阻害剤であるため、この結果はつまり、実際に髄核細胞内で Runx2 が Wnt/ $\beta$ -catenin signal の下流で発現調節を受けていることを示している。

また、本検討では Wif-1 の mRNA 発現も調査しているが、Wif-1 は Wnt のリガンドに競合拮抗するタンパクであり、Wnt signal pathway の阻害因子である (Hsieh, JC.ら. 1999)。この Wif-1 はマイクロアレイを使用した検討において、CDBs の髄核で高発現していることが明らかとなった (Sakai, D.ら. 2009)。この事実から、CDBs の椎間板変性に何らかの関与があるのではないかと考え、本検討において、髄核変性と Wif-1 の mRNA の発現の推移に関して調べた。

過去の報告において使用された CDBs はビーグル犬であり、年齢は 16-18 カ月齢であったと記されている (Sakai, D.ら. 2009)。我々の以前の報告により、12 カ月齢のビーグル犬では、Grade2 以上に分類される髄核の割合が全体の約 40%程を占め、既に変性が開始していることが明らかとなっている (Iwata, M.ら. 2013)。つまり過去の Wif-1 発現に関する報告に用いられた髄核は変性しているものを含んだ結果であることが考えられる。このことから、Wif-1 が変性の過程において増加することが示唆されるが、実際に MRI の signal intensity を用いた我々の検討においても、Wif-1 の mRNA の発現量が変性ととも増加していることがわかった。しかし、椎間板ヘルニアに罹患した症例から採取された HNP においては、Wif-1 の発現量が Grade1 の髄核と比較し、有意に減少していることが明らかとなった。一方、培養細胞を用いた検討では、LiCl の刺激により Wif-1 が有意に減少した。このことは細胞内における過剰な Wnt/ $\beta$ -catenin の経路の活性化が、Wif-1 の発現を抑えていることを意味する。以上の点をまとめると、変性の初期では Wif-1 の発現が増加するが、進行もしくは逸脱すると Wif-1 の発現量が低下し始めることが示唆される。

髄核変性における Wif-1 の発現に関する報告は現時点ではないが、関節軟骨変性における発現に関しては報告が存在する。その報告では Wif-1 は発生の過程において、関節軟骨の表層で発現し Wnt signal から軟骨を保護しており、さらに Wif-1 を全身でノックアウトしたマウスでは関節炎の進行が促進されるとされている (Stock, M.ら. 2013)。また、Wnt/ $\beta$ -catenin signal は関節炎の進行にも関わり軟骨の破壊を促進する因子であるが、Wif-1 は

Wnt/ $\beta$ -catenin signal に拮抗し、軟骨変性および破壊を防ぐ作用があると示唆されている

(Stock, M.ら. 2013)。これらの事象を統合すると、髄核変性の過程においても、初期には変性に拮抗する為に Wif-1 の発現が増加するが、何らかの関与により Wif-1 が減少することで変性の進行がより促進されている可能性が考えられる。

過去の報告では、TNF- $\alpha$  の作用により軟骨細胞における  $\beta$ -catenin の発現量が増加し、Wif-1 の発現量が低下するとされている (Stock, M.ら. 2013)。また、TNF- $\alpha$  は髄核細胞においても  $\beta$ -catenin の発現量を増加させる (Hiyama, .ら.2013)。我々の今回の検討においては、in vitro における LiCl の感作により Wif-1 の発現量が減少した。つまり LiCl による  $\beta$ -catenin の増加により Wif-1 の発現量が抑制されたということが示唆される。

さらに我々は過去に、CDBs の髄核変性の過程で TNF- $\alpha$  の発現が増加すると報告している (Iwata, M.ら. 2013)。変性が進行し、TNF- $\alpha$  や  $\beta$ -catenin の発現量が一定以上増加することで Wif-1 の発現は抑制されると考えられる。

今回の検討では 12 カ月齢のビーグル犬のみの使用と制限があったため、Grade 4 以上に分類される変性した髄核組織は検討に用いることができなかったが、Grade 4 以上の髄核組織で Wif-1 の発現を検討する必要があると考えられる。また実際に Col2-Cre; Wif-1<sup>fl/fl</sup> マウスを用いて髄核変性における Wif-1 の機能に関しても精査する必要がある。Wif-1 の減少は変性の進行を促進すると考えられる非常に重要な因子であるため、どのタイミングで何をき

っかけに減少が誘導されるのかを調べることは、椎間板変性の病態解明において意義のあることだと考えられる。

本章では組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、Runx2の発現を介した Wnt/ $\beta$ -catenin signal による椎間板髄核の変性および石灰化について検討した。本検討により、CDBs の椎間板変性および石灰化に Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway が深くかかわっていることが証明され、加えて Runx2 の発現誘導に関与していることが示唆された。

#### 4-4 : 小括

本章では組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、Runx2の発現を介した Wnt/ $\beta$ -catenin signal による椎間板髄核の変性および石灰化について検討した。第 2 章に記載した手法により変性の程度を分類した髄核を使用して、 $\beta$ -catenin および Runx2 の免疫染色を行った結果、変性の進行とともに双方の発現が増加することがあきらかとなった。また MRI signal intensity の低下と  $\beta$ -catenin および Runx2 の mRNA の発現量に関しても相関性が認められた。in vitro における解析では LiCl の感作により  $\beta$ -catenin のタンパク質および Runx2 の mRNA およびタンパク質の発現が増加し、p- $\beta$ -catenin の発現は低下した。LiCl により誘導された  $\beta$ -catenin および Runx 2 の発現増加は、FH535 により抑制された。以上の結果から、CDBs の椎間板変性および石灰化に Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway が深くかかわっていることが証明され、加えて Runx2 の発現誘導に関与していることが示唆された。

Table. 4-1 Summary of intervertebral disc disease data.

|        | <b>Breed</b> | <b>Age</b> | <b>Location of lesion</b> |
|--------|--------------|------------|---------------------------|
| Case1  | MD           | 6          | T13-L1                    |
| Case2  | MD           | 9          | T13-L1                    |
| Case3  | MD           | 6          | L4-5                      |
| Case4  | MD           | 9          | T13-L1                    |
| Case5  | MD           | 5          | T11-12                    |
| Case6  | MD           | 5          | L1-2, L2-3                |
| Case7  | MD           | 5          | T12-13                    |
| Case8  | MD           | 7          | L2-3                      |
| Case9  | MD           | 7          | T13-L1, L1-2              |
| Case10 | MD           | 9          | T11-12, T12-13            |
| Case11 | MD           | 5          | T11-12, T12-13            |
| Case12 | MD           | 6          | L2-3                      |
| Case13 | MD           | 3          | T13-L1                    |
| Case14 | MD           | 12         | T13-L1                    |
| Case15 | MD           | 12         | L1-2                      |

MD: Miniature Dachshund

Table. 4-2 Primer sequences for realtime PCR.

| Gene Name                                  | Gene Symbol   | Ref. Sequence  | Primer                                                           |
|--------------------------------------------|---------------|----------------|------------------------------------------------------------------|
| <i>Beta-catenin</i>                        | <i>CTNNB1</i> | NM_001137652.1 | Forward: tactgagcctgc catctgtg<br>Reverse: tggac aaagg gcaagattc |
| <i>Runt-related transcription factor 2</i> | <i>RUNX2</i>  | XM_005627766.1 | Forward: cagaccagcagc actccata<br>Reverse: cagcgtcaac accatcattc |
| <i>Type I collagen, alpha1</i>             | <i>COL1A1</i> | NM_001003090   | Forward: acagccgcttc acctacagt<br>Reverse: atatccatgc cgaattcctg |
| <i>WNT inhibitory factor 1</i>             | <i>WIF1</i>   | XM_538269.4    | Forward: acaacacctgc gaaatggag<br>Reverse: taagtgaaggcgtgtgttc   |
| <i>Transcription factor 7-like 2</i>       | <i>TCF7L2</i> | XM_005637736.1 | Forward: cgtagacccc aaaacaggaa<br>Reverse: tctgtcgtg attgggtaca  |
| <i>Matrix metalloproteinase 2</i>          | <i>MMP2</i>   | XM_535300      | Forward: g gatgctgcctttaattgga<br>Reverse: cgcaaccctgaagaagtagc  |
| <i>Matrix metalloproteinase 9</i>          | <i>MMP9</i>   | NM_001003219   | Forward: ctggagagctggaca aaacc<br>Reverse: tacacgcgagtg aaggtgag |
| <i>Matrix metalloproteinase 13</i>         | <i>MMP13</i>  | XM_536598.3    | Forward: ttctggctcatgcttttctt<br>Reverse: ggtccttggagtggtcaaga   |
| <i>Actin, beta</i>                         | <i>ACTB</i>   | NM_001195845.1 | Forward: aggaaggaaggctggaagag<br>Reverse: tgcgt gacatc aaggagaag |

Dog-specific primers were designed using Primer Express software, version 3.0

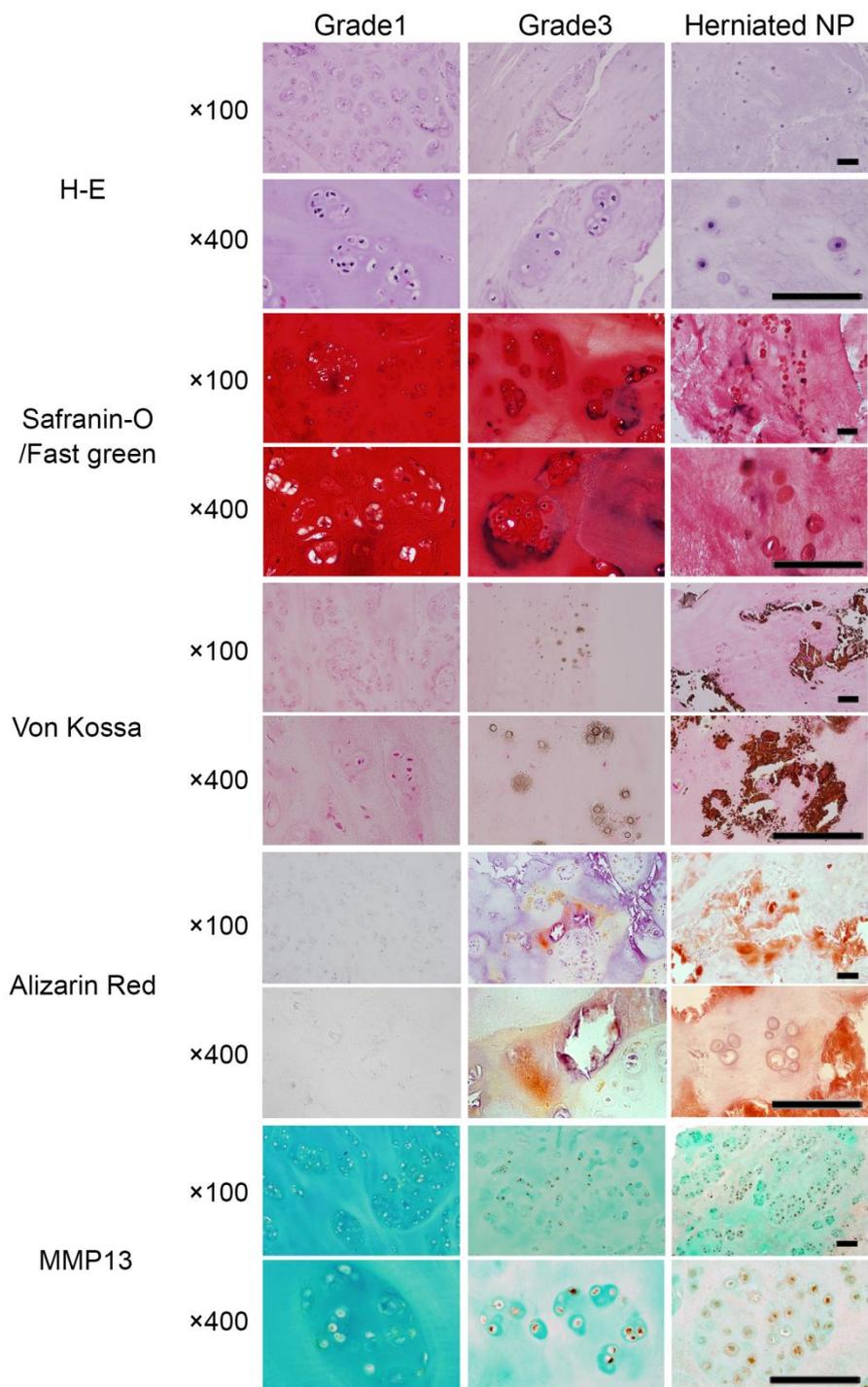


Figure. 4-1 Herniated canine nucleus pulposus (NP) cells shows typical degenerative histological changes. Lack of Safranin-O staining, calcified area, and MMP13 positive cells increased with the progression of degeneration. Scale bars indicate 100  $\mu$ m.

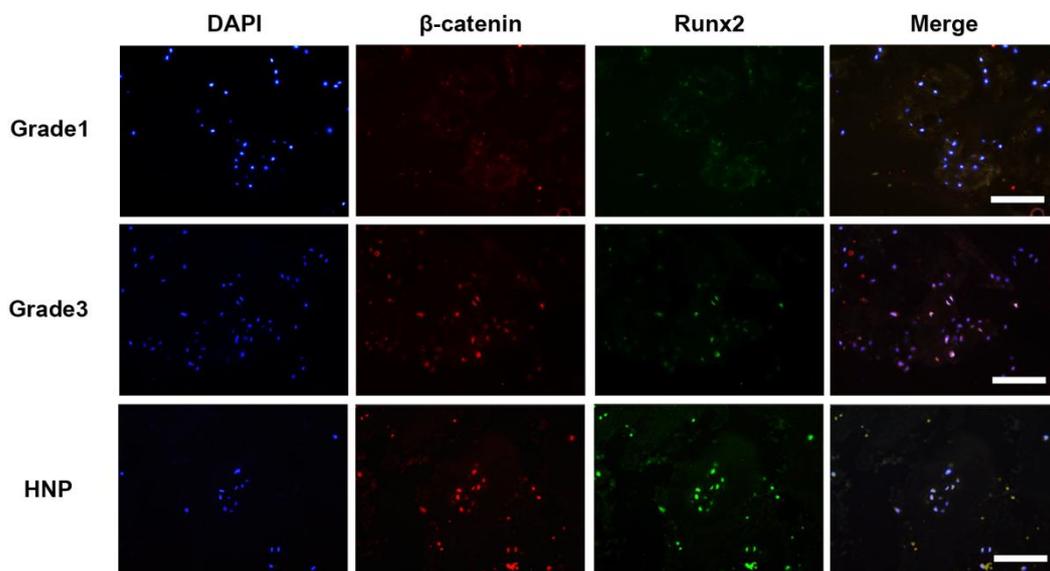


Figure. 4-2 Immunohistological evaluation revealed that  $\beta$ -catenin- (red) and Runx2-positive (green) cells increased with the progression of degeneration. Scale bars indicate 100  $\mu$ m.

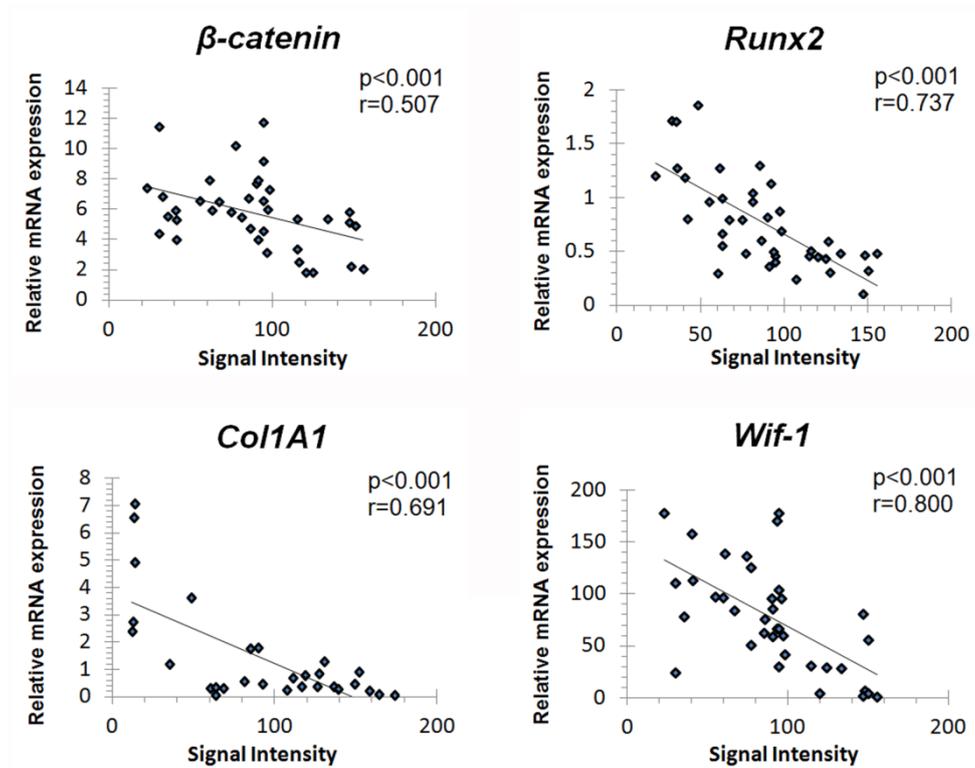


Figure. 4-3 Magnetic resonance imaging (MRI) signal intensity and mRNA expression

level in nucleus pulposus (NP) tissue are correlated.

The mRNA expression of  $\beta$ -catenin, Runx2, Col1A1, and Wif-1 increases with decreasing

MRI signal intensity ( $p < 0.010$ ).

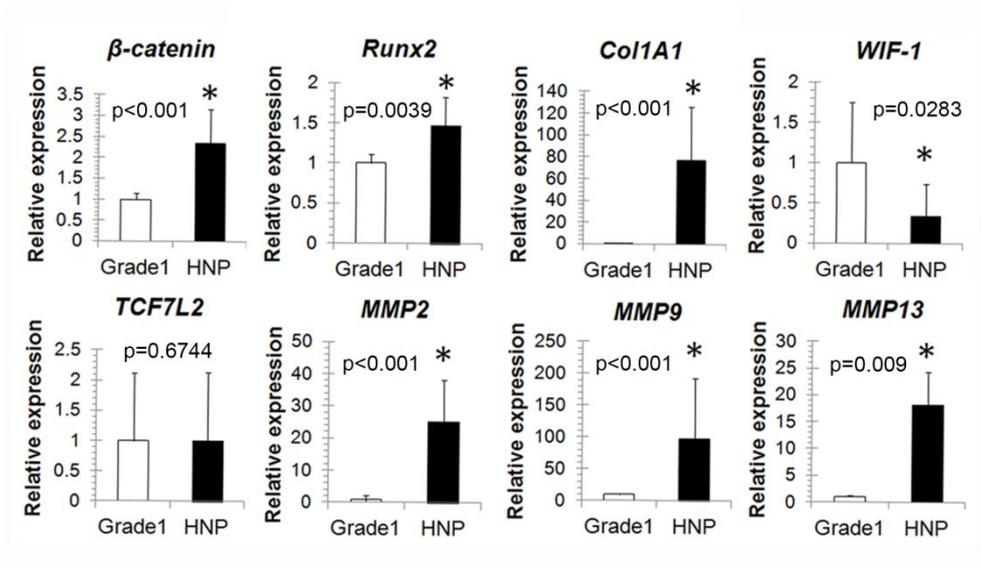


Figure. 4-4 Herniated nucleus pulposus (NP) tissue exhibits high levels of  $\beta$ -catenin, Runx2, and MMPs mRNA expression, whereas the expression of Wif-1 decreases. Significant differences between the controls and herniated NP tissues are indicated by \* ( $p < 0.050$ ).

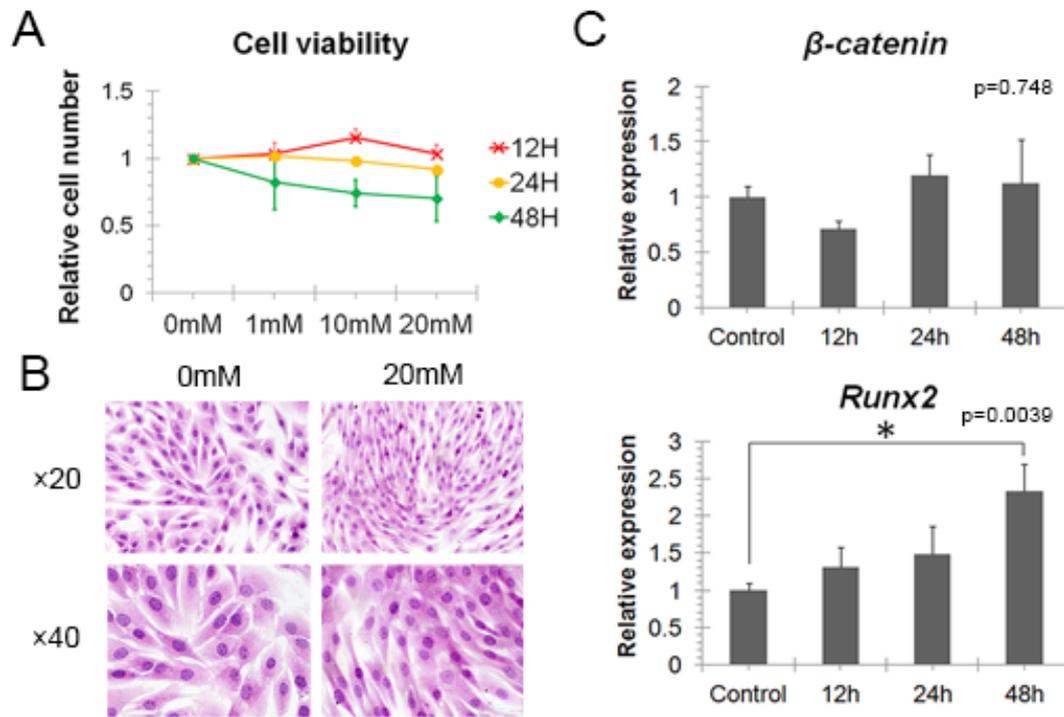


Figure. 4-5 Effect of LiCl supplementation in monolayer-cultured nucleus pulposus (NP) cells.

(A)Supplementation with 20 mM LiCl does not influence NP cells viability.

(B) Hematoxylin and eosin staining of monolayer-cultured NP cells treated with or without

20mM LiCl for 48 h. There is no remarkable difference between treated group and control

group. (C) LiCl supplementation significantly upregulates the mRNA level of Runx2 in

monolayer-cultured NP cells at 48h.

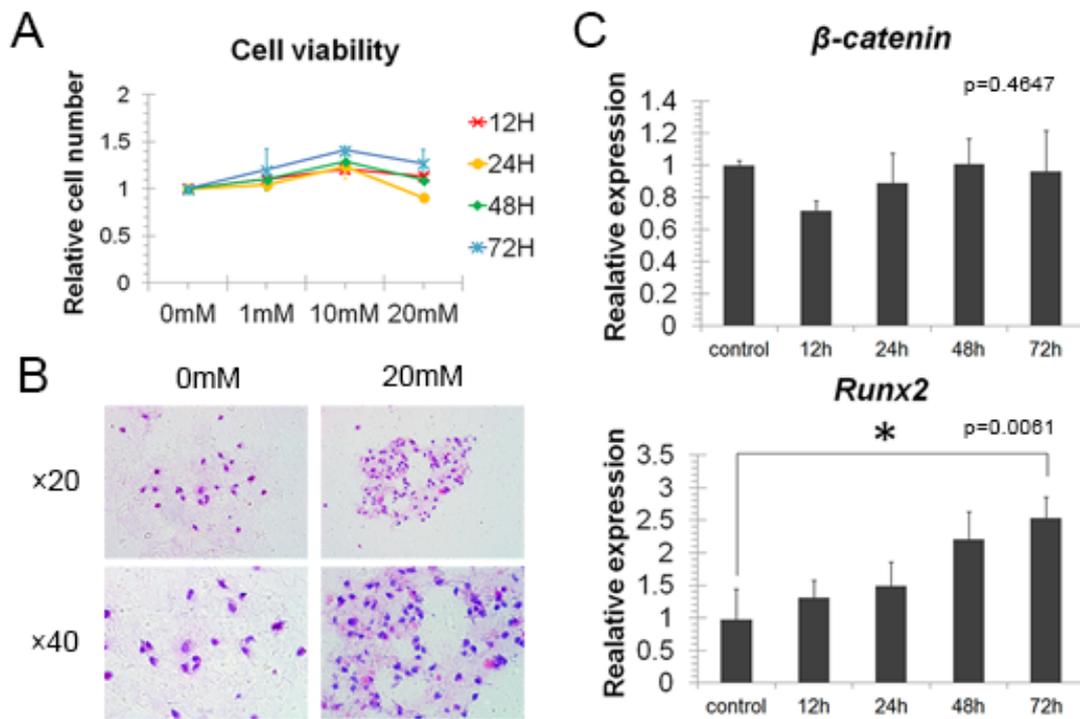


Figure. 4-6 Effect of LiCl supplementation in 3D-cultured nucleus pulposus (NP) cells.

(A) Supplementation with 20 mM LiCl does not influence NP cells viability.

(B) Hematoxylin and eosin staining of 3D-cultured NP cells treated with or without 20mM

LiCl for 72 h. There is no remarkable difference between treated group and control group.

(C) LiCl supplementation significantly upregulates the mRNA levels of Runx2 in

3D-cultured NP cells at 72 h.

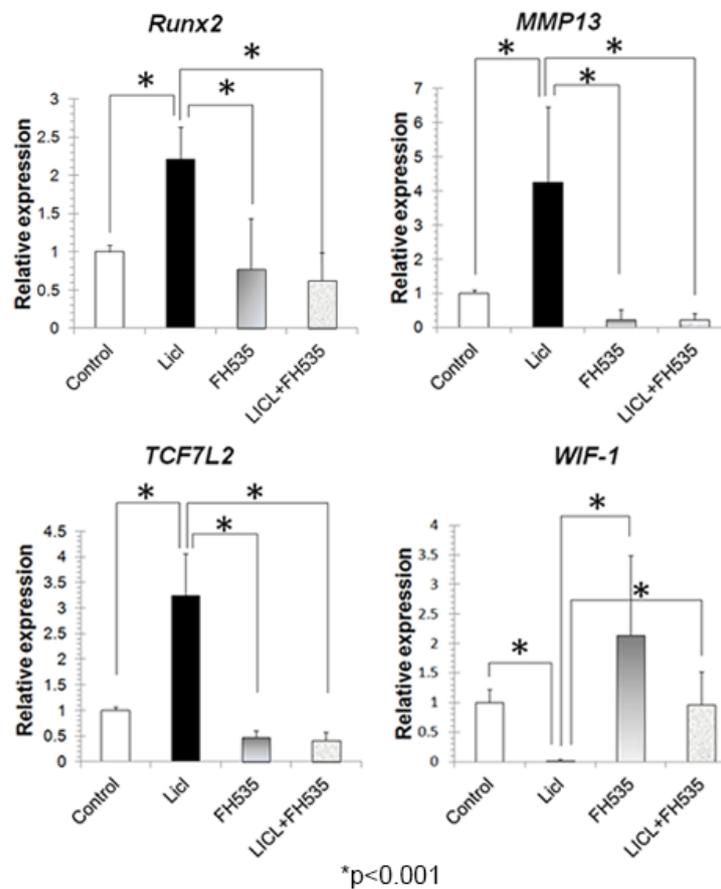


Figure. 4-7 LiCl supplementation promotes mRNA expression of  $\beta$ -catenin and Runx2 in monolayer-cultured nucleus pulposus (NP) cells. LiCl supplementation significantly upregulates the mRNA levels of Runx2, MMP13, and TCF7L2. In addition, FH535 significantly inhibits the upregulation. LiCl supplementation reduces the mRNA expression levels of Wif-1, while FH535 rescues Wif-1 expression. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.050$ ).

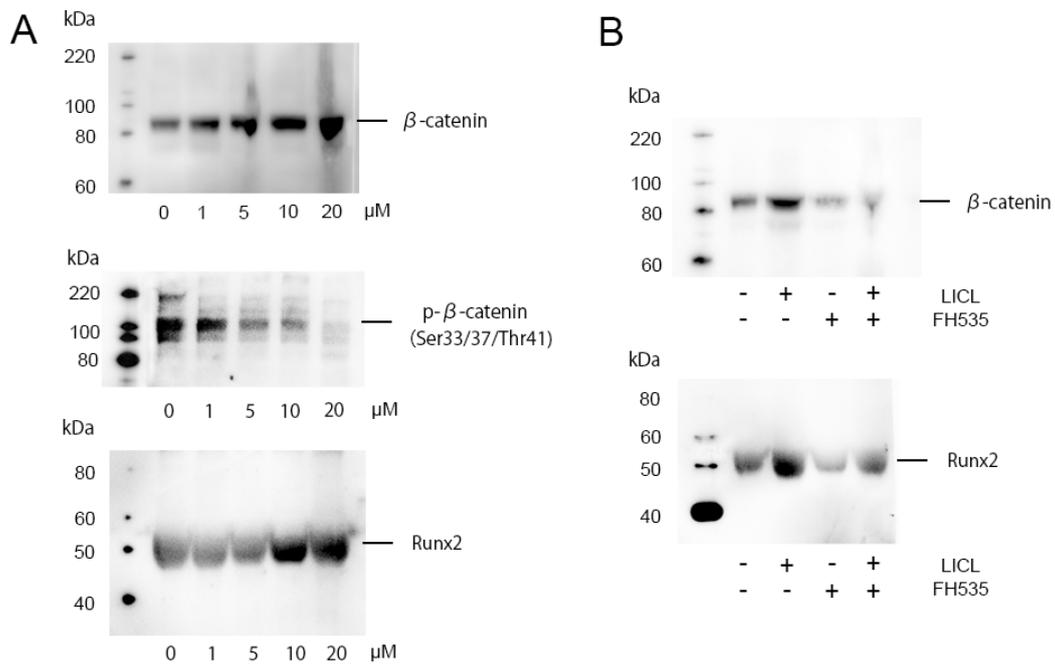


Figure. 4-8 LiCl induces Runx2 protein expression through  $\beta$ -catenin accumulation in canine nucleus pulposus (NP) cells.

(A) Significant increases of  $\beta$ -catenin and Runx2 are LiCl dose-dependent compared with the control group. Phosphorylated  $\beta$ -catenin levels decrease in a dose-dependent manner.

(B) LiCl supplementation upregulates the protein levels of  $\beta$ -catenin and Runx2.

In contrast, FH535 inhibits the upregulation.

## 第5章 総括および総合考察

椎間板ヘルニアは、椎間板髄核の変性に起因する疾患であり、骨・関節疾患の中で最も発症頻度の高い疾患のひとつである。椎間板変性に起因する背部痛および横断性脊髄障害は、運動障害および感覚障害を伴い QOL の低下を招くため、その原因解明は医学および獣医学領域において重要視されている。厚生労働省統計情報部のデータによると、日本国内の椎間板ヘルニアによる入院患者数は 7.4/1000 人であり、毎年約 5 万人が手術を受けているとされている。人口の 8 割が経験するといわれる腰痛の主たる原因となる椎間板ヘルニアは、近年の高齢化社会に伴いさらなる患者数の増加が懸念されており、社会的・経済的に大きな問題となっている。

その椎間板ヘルニアは、獣医学領域においても重要な疾患であり、イヌにおける神経機能障害の主たる原因となっている。伴侶動物としてのイヌの飼育頭数が増加するにつれ、罹患する頭数も増加している (Bray, JP.ら. 1998)。イヌの椎間板ヘルニアの症状もヒトと同様に、背部痛および横断性脊髄障害に起因する運動障害、感覚障害である。

イヌの椎間板ヘルニアは発生率は、イヌに発生するすべての疾患の 2% を占めることが認識されており、椎間板の変性様式に基づいて Hansen I 型と II 型に分類される。Hansen I 型ヘルニアは、一般に 3 から 7 歳齢の軟骨異栄養性犬種 (Chondrodystrophoid Breeds : CDBs) で多く認められ、変性および石灰化した椎間板髄核の脊柱管への逸脱を特徴とする。CDBs の椎

間板髄核は早期に変性し、生後 1 年を待たずして変性が進行していることもあると報告されているが (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952 ; Gage, ED.ら.1975)、椎間板髄核の早期の変性および石灰化は、脊索細胞の減少と相関性を示すとされている (Braund, KG.ら. 1975; Hansen, HJ.ら. 1952)。脊索細胞は椎間板髄核を構成する 2 種類の細胞のうちの一つであるが、もう 1 種類は軟骨細胞様細胞である。これらの 2 種類の細胞は円形であり、軟骨細胞と類似した形態を呈し、硝子軟骨と組成が似た細胞外基質の中でクラスターを形成している (Horner, HA.ら, 2002)。この脊索細胞はブタやウサギ、ラットおよび非軟骨異栄養性犬種の髄核では脊索細胞は生涯存在するが (Aguilar, DJ.ら.1999; Gage, ED.ら,1975)、ヒト、羊および CDBs の髄核組織では早期に消失し、線維軟骨細胞様に形質が転換してしまう (Braund, KG.ら. 1975; Oegema, TR, Jr.ら. 2002)。この脊索細胞の減少が早期の変性の原因とされており、そのため CDBs は他の動物種と比較し椎間板変性の研究におけるヒトのモデル動物として適しているとされているが (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)、椎間板変性における分子生物学的なメカニズムは未だ不明な点が多い。

椎間板髄核変性における分子生物学的機序を解明する場合、培養細胞を用いた検討は非常に重要な手法のひとつとなる。しかし髄核細胞は培養条件によって全く異なる形質を発現し、さらには動物種によっても適切な培養条件は異なる (Chou, AI.ら. 2006; Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら. 1999; Wang, JY.ら.2001)。さまざまな動物種の髄核細胞の表現型についての検討がなされているが (Horner, HA.ら. 2002 ; Gruber, HE.ら.2000; Hutton, WC. ら.

1999; Wang, JY.ら.2001 ; Wang, JY.ら.2001)、CDBs 由来の髄核細胞における培養時の表現型に関しては報告がなされていなかった為、我々は CDBs の髄核細胞の適切な培養条件の設定に関する検討を行う必要があった。

さらに我々は、設定した条件下で培養した髄核細胞を使用して、髄核変性および石灰化に関わる分子生物学的機序に関する検討を行った。

椎間板髄核では変性の過程において、分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) の発現が亢進し、Type 2 collagen (Col2A1) や aggrecan (ACAN)等の細胞外基質の分解がおこることが報告されている (Le Maitre, CL.ら. 2007; Le Maitre, CL.ら. 2006; Le Maitre, CL.ら. 2004; Haro, H. ら. 2000)。これらのうち MMP13 は Col2A1 を特異的に分解する酵素であり、椎間板変性に重要な役割を示すとされている (Itoh, H.ら. 2012)。この MMP13 の発現を誘導する因子の一つとして Runt-related transcription factor 2 (Runx2)が挙げられる。Runx2 は骨芽細胞の分化と軟骨細胞の肥大化を促進し骨形成を誘導する転写因子のひとつであり (Enomoto, H.ら. 2000 : Komori, T.ら. 2005 : Zheng, Q.ら. 2003)、急性骨髄性白血病患者の染色体転座より見つかった Runx1 を初めとする Runx ファミリーの遺伝子である (Ducy, P.ら.1997; Otto, F.ら. 1997; Trancey, WD.ら.2000)。この Runx2 は椎間板変性においても MMP13 の発現を誘導し、さらには髄核細胞の肥大化や髄核基質の石灰化を促進する等、重要な役割を持つことが分かっている (Itoh, H.ら. 2012)。さらにこの Runx2 は骨形成の過程において Wnt/ $\beta$ -catenin signal によって誘導されることが報告されている (Gaur, T.ら.2006; Dong, YF.

ら. 2006)。

Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway におけるリガンドである Wnt は、分子量約 4 万の分泌性糖タンパク質で、線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて保存され、初期発生や形態形成、器官形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動などを制御する (Logan, C.Y. ら.2004)。Wnt/ $\beta$ -catenin signal はがん関連遺伝子として注目され、さらに骨形成においても重要な役割を担う因子のひとつであるが、変形性膝関節症 (Osteoarthritis : OA) の発症においても関与すると報告されており、OA の軟骨細胞では  $\beta$ -catenin の蓄積が進行し Col2A1 や ACAN の産生量が低下することがわかっている (Yuasa, T. ら.2008)。この Wnt/ $\beta$ -catenin signal は椎間板髄核においても発現しており、髄核の変性に重要な役割を示すと報告されている (Smolders, LA. ら. 2012; Hiyama, A. ら. 2010)。そのため、髄核変性の過程において、変性および石灰化を誘導する Runx2 の発現は、Wnt/ $\beta$ -catenin signal によって誘導されている可能性が推測される。

Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway の椎間板変性における Runx2 発現への関わりを明らかにすることは、椎間板髄核変性において複雑に絡み合う分子生物学的機構をひも解くひとつの糸口となる可能性がある。その為、本研究では CDBs の椎間板変性および石灰化に関わる Runx2 の発現への Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway の関わりについて検証することを目的とした。本論文で行った検討では、まず MR 信号強度を用いた髄核変性の定量的評価法について検討を行い、その評価方法により選別した非変性髄核から単離した細胞を用いて CDBs の髄核

細胞の適切な培養条件の設定に関する検討を行った。次いで組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、髄核変性および石灰化における Runx2 の発現への Wnt/ $\beta$ -catenin signal の関与について検討した。

その結果、以下の知見が得られた。

#### 1. MR 信号強度を用いた髄核変性の定量的評価法

髄核組織は変性の進行と、MRI における T2 強調画像の信号強度の低下が相関性を有すると報告されており、MRI における T2 強調画像を用いた髄核変性の評価方法としては Pfirrmann Grading System が一般的に用いられている (Pfirrmann, CW.ら.2001)。しかしこの方法は主観的であり、定量的評価法ではないゆえに測定者間による誤差が生じやすいと考えられる。*In vitro* における検討に髄核組織を供する際、変性の進行したサンプルの選択は、誤った結果を導きかねない。故に明確な選択基準の設定が必要不可欠であった。

Image J software (NIH) による信号強度の解析を行った結果、Pfirrmann Grading System において Grade1 に分類されるものは信号値が 86 以上を示し、Grade2 は 45 以上 85 未満、Grade3 は 45 未満を示す結果となった。本検討により 12 ヶ月齢という若い個体であっても Grade3 まで変性が進行しているものが 21%も存在することが分かった。Grade2 に関しても全体の 18%を占めており、Grade1 の全く変性していない髄核組織は全体の 61%でしかなかった。ヒトと髄核の性質が類似しており、モデル動物として適していると考えられる CDBs

は検討によく用いられるが、12 ヶ月齢という若い個体においても髄核の変性が進行しているため、事前の MRI による評価が強く推奨された。

## 2. 長期 3 次元培養における軟骨異栄養性犬種由来椎間板髄核細胞の表現型の推移。

CDBs 由来の椎間板髄核細胞の適切な培養条件の設定を目的として、長期 3 次元培養における軟骨異栄養性犬種由来の椎間板髄核細胞の表現型の推移および細胞周囲に産生される細胞外基質によって構築される微小環境について検討を行った。検討により、一般的な単層培養では形質が大きく変わってしまう CDBs の髄核細胞は、agarose hydrogels を用いた 25 日間にわたる長期三次元培養を行うことで、生体の髄核組織の表現型に近づくことが明らかとなった。単層培養において形質が大きく変化してしまう理由としては、本来増殖することのない髄核細胞が無秩序な分裂を繰り返し、指数関数的に増殖することが深く関わっていると考えられる。agarose hydrogels で作成した scaffold 内では細胞は円形を呈し、増殖もほとんど見られなかった。さらに髄核細胞自身が産生する細胞外基質が agarose hydrogels にトラップされ細胞周囲に留まり、微小環境を構築する。これにより長期間の培養を経ることで、少しずつ本来の形質へと再分化が促されるものであると考えられる。CDBs の髄核はヒトの髄核形質が似ているゆえ、我々が樹立した *in vitro* における髄核モデルは、人医領域および獣医学領域の双方にとって有益である新たな知見を提供し、椎間板髄核変性の病態解明に貢献するものであると考えられた。

### 3. 椎間板髄核変性および石灰化において発現する Runx2 に対する Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway の関与に関する検討

組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、Runx2 の発現を介した Wnt/ $\beta$ -catenin signal による椎間板髄核の変性および石灰化について検討した。第 2 章に記載した手法により変性の程度を分類した髄核を使用して、 $\beta$ -catenin および Runx2 の免疫染色を行った結果、変性の進行とともに双方の発現が増加することが明らかとなった。また MRI signal intensity の低下と  $\beta$ -catenin および Runx2 の mRNA の発現量に関しても相関性が認められた。in vitro における解析では LiCl の感作により  $\beta$ -catenin のタンパクおよび Runx2 の mRNA およびタンパクの発現が増加し、p- $\beta$ -catenin の発現は低下した。LiCl により誘導された  $\beta$ -catenin および Runx 2 の発現増加は、FH535 により抑制された。以上の結果から、CDBs の椎間板変性および石灰化に Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway が深くかかわっていることが証明され、加えて Runx2 の発現誘導に関与していることが示唆された。

以上のように本研究では髄核変性の評価法に始まり、適切な培養方法、そして CDBs の椎間板髄核変性および石灰化における Runx2 発現に関わる Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway の影響について検討を行った。今回の検討によって得られた結果は、椎間板髄核変性において複雑

に絡み合う分子生物学的機構をひも解くひとつの糸口となる可能性がある。

CDBs の髄核は早期に椎間板髄核の変性が発生し、1 歳齢までにゼリー状の髄核が線維軟骨様の組織に置換され、その後に石灰化が生じるが、一方で非軟骨異栄養性犬種の椎間板ではゼリー状の髄核が生涯にわたり維持される (Bray, JP.ら.1998)。この CDBs の髄核の変性様式はヒトの椎間板髄核の変性と類似している (Harris, RI.ら.1954; Farfan, HF.ら.1970; Taylor, TK.ら.1981; Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)。ヒトの椎間板髄核では変性時に石灰化がみられる (Boos, N.ら.1997; Aigner, T.ら.1998)。巨視的には CDBs、非軟骨異栄養性犬種そしてヒトの椎間板変性は大きく異なるが、病理学的変化は非常に類似している。それは CDBs の髄核では生後 1 年を待たずして脊索細胞が消失し始め、線維芽細胞様細胞に置き換わることに加え (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)、細胞の周りに同心円状に基質が産生されるという独特な終末変化の組織像を特徴とすることに由来する (Hansen, HJ.ら.1954; Boos, N.ら.1997; Aigner, T.ら.1998)。ヒトの髄核においても脊索細胞は 10 歳代までに消失するとされている (Cappello, R.ら. 2006; Sakai, D.ら.2009)。

また CDBs が非軟骨異栄養性犬種やその他の動物種と比較し、早期に変性が生じるということは、早期に細胞の恒常性が失われていることを意味している可能性がある。細胞の恒常性を維持する因子の一つとして SIRT1 (sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1) が挙げられる。SIRT1 は  $\text{NAD}^+$  依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり哺乳類においては、7つの Sirtuin (SIRT1~7) の存在が確認されている。これら哺乳類 Sirtuin の細

胞内局在はそれぞれ異なり、多種多様なタンパク質を基質とし、低酸素や熱刺激、代謝障害等のストレスから細胞を保護する働きがあることに加え、老化や寿命など多くの細胞・生体機能に関与していることが明らかになりつつある (Schwer, B.ら.2008; Michan, S.ら.2007)。細胞の恒常性維持に重要な役割を示すとされるこの SIRT1 は軟骨細胞においても重要な役割をもつと報告されている。SIRT1 のコンディショナルノックアウトマウス (CKO) (Col2a1-Cre; Sirt1<sup>flox/flox</sup>) を使用して関節炎モデルマウスを作成し、Wild Type と OA の進行を比較した検討において、SIRT1 CKO マウスにおいて OA の顕著な進行が確認されている (Matsuzaki, T.ら.2013)。また、髄核細胞では、培養下において変性髄核由来細胞の SIRT1 の活性を増加させた場合、アポトーシスが減少したという報告も存在する (Wang, D.ら.2013)。まだ現時点では髄核における報告が少なく、不明な点が多いが、早期に細胞が消失し変性が誘導される CDBs の髄核においてもこの SIRT1 が何らかの関わりをもっている可能性も考えられる為、是非検討してみたい内容ではある。

ヒトの椎間板変性には遺伝的素因が関わっていることが報告されている。Seki, S.ら (2005) は、遺伝子多型を用いたゲノムワイド相関解析を行って、CILP (cartilage intermediate layer protein) が椎間板ヘルニアの原因遺伝子のひとつであることを発見した。CILP は軟骨細胞の周囲の基質に存在するタンパクで、軟骨細胞の主要な成長因子である TGF- $\beta$  と結合して、TGF- $\beta$  による軟骨基質を生み出す働きを抑制する。Seki, S.らによれば、この TGF- $\beta$  に対する抑制作用が、椎間板ヘルニアの罹り易さの違いにつながるという。CILP のあるタイプの

SNP (CILP タンパクの 395 番目のアミノ酸のイソロイシン (Ile) がスレオニン(Thr)に置換)を持っている人では CILP の活性が増強し、椎間板ヘルニアの発症リスクがおよそ 1.6 倍になることが明らかとされている。

また、THBS2 (thrombospondin 2) も椎間板変性に関わっているとされている。Hirose Y. ら (2008) は THBS2 に存在する SNP について、日本人の椎間板ヘルニア患者でケース・コントロール相関解析を行ったところ、ある SNP (遺伝子の 10 番目のイントロンの後ろから 8 番目の塩基がシトシン (C) からチミン (T) に変わる多型) に非常に強い相関が見つかったと報告している。この SNP の感受性アレルを持つ人は、持たない人に比べ、約 1.4 倍も椎間板ヘルニアになりやすいことも明らかとなった。そして、この感受性アレルでは、遺伝子が転写される際に異常なスプライシングが起こり、その結果、細胞外基質分解酵素である MMP との結合が低下することを証明した。THBS2 タンパク質は MMP と結合し、その活性を抑制するとされているため、その結合が低下すると MMP の活性が高まり、椎間板が変性して椎間板ヘルニアになりやすくなると考えられる。さらに、MMP2、MMP9 遺伝子においても同様のケース・コントロール相関解析を行ったところ、MMP9 遺伝子内のある多型にも強い相関が見つかった。THBS2、MMP9 両遺伝子内に多型の感受性アレルを持つ人は、持たない人に比べ、約 3.0 倍も椎間板ヘルニアになりやすいことが判明したと報告されている。

加えて、Type 9 collagen (Col9)の欠損が椎間板変性に関わっているという報告も存在する

(Annunen, S.ら.1999)。COL9A2においてグルタミンからトリプトファンへのコドンが変わる為に COL9A2 の欠損が起こるとしている。また、COL9A1 のノックアウトマウスにおいても椎間板変性が起こることから、COL9A1 が椎間板変性に関与している可能性は高い (Kimura, T.ら.1996; Boyd, LM.ら.2008)。

その他では 25,000 人を対象としたゲノムワイド連鎖解析によって CHST3 (Carbohydrate (Chondroitin 6) Sulfotransferase 3) の SNP が椎間板変性に強い相関性を持つと報告されている (Song, YQ. 2013)。

以上のように医学領域では、ヒトの椎間板髄核変性に関わる遺伝子の重要な変異がいくつか報告されている。獣医学領域においても報告はないことはないが、CDBs の椎間板髄核変性における遺伝子変異に関する情報はまだ十分なものではない。

獣医学領域においては Mogensen, MS.ら (2011) が椎間板髄核変性に関与する遺伝子について報告している。報告によると、生後から一度も背部痛を訴えたことのない 10 歳以上のダックスフント 46 頭と、椎間板ヘルニアに罹患したダックスフント 48 頭の DNA を収集し、ゲノムワイド連鎖解析を使用して疾患に関連する遺伝子を網羅的に調べた。その結果、12 番染色体上に存在する遺伝子において椎間板変性と強い相関性が認められた。この報告では遺伝子の特定にまでは至っていないが、ヒトのデータと照らし合わせた結果、以下の疾患関連遺伝子が関わっている可能性があるとして報告している。FAM135A (family with sequence similarity 135, member A)、C12H6orf57 (chromosome 12 open reading frame)、OGFRL1 (opioid

growth factor receptor-like 1)、RIMS1 (regulating synaptic membrane exocytosis 1)、KCNQ5 (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5)、DDX43 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 43)、OOEP (oocyte expressed protein)、MTO1 (MTO1 mitochondrial tRNA translation optimization 1)、LOC610634 (similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2)、SLC17A5 (solute carrier family 17 (acidic sugar transporter), member 5)、CD109 (CD109 molecule)。Mogensen, MS.らは、以上の遺伝子の中で椎間板変性と関連の深いものの配列を解析し、特定する必要があるとしている。

本研究においては椎間板髄核の変性における Runx2 発現に関わる Wnt/ $\beta$ -catenin signal について検討したが、Wnt/ $\beta$ -catenin signal 以外にも Runx2 発現に関与する因子は多く存在する。近年の研究により、Runx2 を調節する分子生物学的機序が明らかにされている。BMP, FGF, レチノイン酸、TGF- $\beta$ 、エストロゲン、PTH、ビタミン D や TNF- $\alpha$  などが Runx2 の発現調節に複雑に関わっていることが示されている (Komori, T.ら. 2005)。最近の研究ではヒストンジアセチラーゼ (HDAC4) が Runx2 を直接的に抑制していることが報告されている。HDAC はクロマチン構造のヒストンの脱アセチル化を制御し、転写因子の活性を調整することで細胞の発達と分化を調節している。HDAC4 欠損マウスは軟骨の早期肥大化により正常に骨化が起こらず、この表現型は Runx2 を過剰発現したマウスと同様であった。また HDAC4 の増殖軟骨層特異的過剰発現マウスでは、軟骨の肥大化と分化が抑制され、Runx2 欠損マウスと同様の表現型を示した。このことから HDAC4 は Runx2 を直接抑制すること

で、軟骨の肥大化と分化を抑制している可能性がある。

また Myocyte Enhancer Factor 2C (Mef2c) が Runx2 と Osterix の上流に存在し、軟骨の肥大化を調節し、骨形成を制御していると報告されている (Alexandre, S.ら. 2011)。

上述の通り、椎間板髄核変性は複雑に絡み合う分子生物学的機構により誘導されている。

このひとつひとつを紐解くことは、近い将来の予防医療に繋がると考えられる。椎間板髄

核は血行的に隔離されておりドラッグデリバリーは困難であるため、ウイルスベクターを

用いた遺伝子治療が注目されている。近年の椎間板再生に関する研究の発展は目覚ましい

ものであり、遺伝子治療に関しても報告がなされている。アデノウイルスを使用して

osteogenic protein-1 (OP1) と SOX9 の二つの遺伝子をウサギの変性した椎間板髄核に導入す

ると、Col2A1 およびプロテオグリカンの発現量が増加したという報告がある (Ren, S.

ら.2013)。また患者から摘出した変性髄核に、アデノウイルスを用いて TIMP1 を過剰発現

させるとプロテオグリカンの産生量が増加したとの報告も存在する (Wallach, CJ.ら.2003)。

加えて、ウサギ髄核細胞に対して Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) の導入によりプロ

テオグリカンの産生量が増加したとする報告もある (Nishida, K.ら.1999) いまはまだ実験室

レベルでの展開に限られてはいるが、近い将来に、椎間板変性を抑制し、正常な細胞外基

質の産生を増加させるような遺伝子治療は可能になる技術であると考えられる。そのため

にも、さらなる病態に関する報告が必要であると考えられる。

本論文で行った検討では、まず MR 信号強度を用いた髄核変性の定量的評価法について

検討を行い、その評価方法により選別した非変性髄核から単離した細胞を用いて CDBs の髄核細胞の適切な培養条件の設定に関する検討を行った。次いで組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を使用して、髄核変性および石灰化における Runx2 の発現への Wnt/ $\beta$ -catenin signal の関与について検討した。このことから、椎間板変性に関わる Runx2 の発現は Wnt/ $\beta$ -catenin signal によって誘導されていることが示唆された。

## 謝辞

本研究を行うに際して終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました日本獣医生命科学大学  
外科学教室 原康教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に対し有益なご指導とご援  
助を賜りました東京医科歯科大学 整形外科学教室 大川淳教授、麻生義則准教授、山梨  
大学 整形外科教室 波呂浩孝教授、相川動物医療センター 相川武院長、日本獣医生命  
科学大学 獣医外科学教室 多川政弘前教授、余戸拓也講師、原田泰治講師に深く感謝の  
意を表します。

本研究に対し、ご協力頂きました日本獣医生命科学大学 獣医外科学教室、東京医科歯  
科大学 整形外科学教室の皆様には感謝の意を表します。

そして最後に、長年にわたり温かい励ましと協力を頂いた岩田法親氏および岩田越子氏  
に心より感謝いたします。

## 参考文献

Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR Jr. 1999. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: Regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res* 246:129–37.

Aigner T, Gresk-otter KR, Fairbank JC, von der Mark K, Urban JP. et al. 1998. Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs. *Calcif Tissue Int* 63:263-8.

Annunen S, Paasilta P, Lohiniva J, Perälä M, Pihlajamaa T. et al.1999. An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science* 285:409-12.

Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, et al. 1996. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the bio-synthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* 98: 996–1003.

Bayliss MT, Johnstone B, O'Brien JP. 1988. Proteoglycan synthesis in the human intervertebral disc; variation with age, region and pathology. *Spine* 13:972–81.

Bo N, Peng W, Xinghong P, Yingquan K, Jun S, et al. 2011. Dual function of  $\beta$ -catenin in articular cartilage growth and degeneration at different stages of postnatal cartilage development. *International Orthopaedics* 36:655–664

Boos N, Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K, Aebi M, et al. 1997. Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration. *Histochem Cell Biol.* 108:471-80.

Boyd LM, Richardson WJ, Allen KD, Flahiff C, Jing L, et al. 2008. Early-onset degeneration of the intervertebral disc and vertebral end plate in mice deficient in type IX collagen. *Arthritis Rheum.* 58:164-71.

Braund KG, Ghosh P, Taylor TK, Larsen LH. 1975. Morphological studies of the canine intervertebral disc: the assignment of the beagle to the achondroplastic classification. *Res Vet Sci* 19: 167–172.

Bray JP, Burbidge HM.1998. The canine intervertebral disk. Part Two: Degenerative changes--nonchondrodystrophoid versus chondrodystrophoid disks. *J Am Anim Hosp Assoc* 34:135-44.

Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, Bayliss MT, Dudhia J. 2006. Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus. *Spine* 31: 873–882.

Chou AI, Bansal A, Miller GJ, Nicoll SB.2006. The effect of serial monolayer passaging on the collagen expression profile of outer and inner annulus fibrosus cells. *Spine* 31: 1875–1881.

Denny HR. 1978. The lateral fenestration of canine thoracolumbar disc protrusions: a review of 30 cases. *J Small Anim Pract.* 19(5):259-66.

Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O’Keefe RJ, Drissi H. 2006. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 208:77–86.

ED G. 1975. Incidence of clinical disc disease in the dog. *J Am Anim Hosp Asso* 11:135–8.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, et al. 2000.

Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275:8695–702.

Farfan HF, Cossette JW, Robertson GH, Wells RV, Kraus H, et al. 1970. The effects of torsion on the lumbar intervertebral joints: the role of torsion in the production of disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am* 52:468-97.

Gage ED. 1975. Incidence of clinical disc disease in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 11: 135–138.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. 2006. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280:33132–40.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653:1–24.

Gill PJ, Lippincott CL, Anderson SM.1996. Dorsal laminectomy in the treatment of cervical intervertebral disk disease in small dogs: a retrospective study of 30 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 32(1):77-80.

Gordon MD, Nusse R. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 281:22429–33.

Green JL, Kuntz SG, Sternberg PW.2008. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *TrendsCell Biol* 18:536–544.

Gruber HE, Hanley EN. 2000 Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation. *BMC Musculoskelet Disord* 1:1.

Handeli S, Simon JA. 2008. A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPARdelta activities. 2008. *Mol Cancer Ther* 7:521–9.

Hansen HJ.1952. A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dogs: with special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthop Scand Suppl* 11:1–117.

Haro H, Crawford HC, Fingleton B, MacDougall JR, Shinomiya K, Spengler DM, et al. 2000. Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 105:133–41.

Harris RI, Macnab I. 1954. Structural changes in the lumbar intervertebral discs; their relationship to low back pain and sciatica. *J Bone Joint Surg Br* 36:304-22.

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131:1663-1677

Hirose Y, Chiba K, Karasugi T, Nakajima M, Kawaguchi Y, et al. 2008. A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *Am J Hum Genet* 82:1122-9

Hiyama A, Sakai D, Risbud MV. 2010. Enhancement of intervertebral disc cell senescence by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-induced matrix metalloproteinase expression. *Arthritis Rheum* 62:3036–47.

Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T, Sakai D, Mochida J. 2013. A complex interaction between Wnt signaling and TNF- $\alpha$  in nucleus pulposus cells. *Arthritis Research & Therapy* 15:R189

Horner HA, Roberts S, Bielby RC, et al. 2002. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. *Spine* 27:1018–28.

Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, et al. 1999. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398:431–6.

Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, Hyon S, Toribatake Y, et al. 1999. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. *Spine* 24: 1507–1515.

Itoh H, Hara Y, Tagawa M, Kato T, Ochi H, Koga D, et al. 2012. Evaluation of the association between runt-related transcription factor 2 expression and intervertebral disk aging in dogs. *Am J Vet Res* 73:1553–9.

Iwata M, Ochi H, Asou Y, Haro H, Aikawa T, Harada Y, et al. 2013. Variations in Gene and Protein Expression in Canine Chondrodystrophic Nucleus Pulposus Cells following Long-Term

Three-Dimensional Culture. *PLOS One* 5:e63120.

Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. 2006. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 54:2462–70.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., & Kishida, S. 2007. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell. Signal* 2007 19:659-71.

Kimura T, Nakata K, Tsumaki N, Miyamoto S, Matsui Y. et al. 1996. Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int Orthop* 20:177-81.

Komori T. 2005. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95:445–53.

Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. 2004. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol* 204:47–54.

Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. 2006. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression. *Biotech Histochem* 81:125–31.

Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. 2007. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans* 35:652–5.

Logan, CY. & Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781—810.

Matsuzaki T, Matsushita T, Takayama K, Matsumoto T, Nishida K, et al. 2013. Disruption of Sirt1 in chondrocytes causes accelerated progression of osteoarthritis under mechanical stress and during ageing in mice. *Ann Rheum Dis*. May 30.

Michan S. & Sinclair D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404: 1-13

Mogensen MS, Karlskov-Mortensen P, Proschowsky HF, Lingaas F, Lappalainen A, et al. 2011. Genome-wide association study in Dachshund: identification of a major locus affecting

intervertebral disc calcification. *J Hered* 102 1:S81-6.

Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon SH, Suh JK, et al.1999. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine* 24:2419-25.

Nusse R. 2003. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130:5297–305.

Oegema TR Jr. 1993 .Biochemistry of the intervertebral disc. *Clin Sports Med.* 12:419–39.

Oegema TR Jr. 2002.The role of disc cell heterogeneity in determining disc biochemistry: A speculation. *Biochem Soc Trans* 30:839–44.

Peifer M, McEwen DG. 2002. The ballet of morphogenesis: unveiling the hidden choreographers. *Cell* 109:271–4.

Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. 2001. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 26:1873–8.

Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-1851.

Priester WA. 1976. Canine intervertebral disc disease: occurrence by age, breed, and sex among 8117 cases. *Theriogenology* 6:293–303.

Ren S, Liu Y, Ma J, Liu Y, Diao Z, et al. 2013. Treatment of rabbit intervertebral disc degeneration with co-transfection by adeno-associated virus-mediated SOX9 and osteogenic protein-1 double genes in vivo. *Int J Mol Med* 32:1063-8.

Roberto G, Michele T, Marco P, Tina R, Giorgio C, et al. 2007. The RNA-Binding Protein KSRP Promotes Decay of b-Catenin mRNA and Is Inactivated by PI3K-AKT Signaling. *Plos Biology* 5(1): e5. doi:10.1371/journal.pbio.0050005

Sakai D, Nakai T, Mochida J, Alini M, Grad S. 2009. Differential phenotype of intervertebral disc cells: microarray and intervertebral disc cells microarray and immunohistochemical analysis of

canine nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Spine* 34: 1448–1456.

Schwer B. & Verdin E. 2008. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab* 7:  
104-12

Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H. et al. 2005. A functional SNP in CILP,  
encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease.  
*Nat Genet* 37:607-12

Sive JI, Baird P, Jeziorsk M, Watkins A, Hoyland JA, et al. 2002. Expression of chondrocyte  
markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol* 55: 91–97.

Smolders LA, Meij BP, Riemers FM. 2012. Canonical Wnt signaling in the notochordal cell is  
upregulated in early intervertebral disk degeneration. *J Orthop Res* 30:950–7.

Somerville ME, Anderson SM, Gill PJ, Kantrowitz BJ, Stowater JL. 2001. Accuracy of localization  
of cervical intervertebral disk extrusion or protrusion using survey radiography in dogs. *J Am Anim  
Hosp Assoc* 37(6):563-72.

Song YQ, Karasugi T, Cheung KM, Chiba K, Ho DW, et al. 2013. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J Clin Invest*. doi:pii: 69277. 10.1172/JCI69277

Stephens AS, Stephens SR, Hobbs C, Hutmacher DW, Bacic-Welsh D, et al. 2011. Myocyte enhancer factor 2c, an osteoblast transcription factor identified by dimethyl sulfoxide (DMSO)-enhanced mineralization. *J Biol Chem* 286:30071-86.

Stock M, Böhm C, Scholtysek C, Englbrecht M, Fürnrohr BG, Klinger P, et al. 2013. Wif-1-deficiency uncouples cartilage and bone destruction in TNF $\alpha$ -mediated experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 65:2310-22

Taylor TK, Ghosh P, Bushell GR. 1981. The contribution of the intervertebral disk to the scoliotic deformity. *Clin Orthop Relat Res* 156:79-90

Tejpar S, Nollet F, Li C, Wunder JS, Michils G, et al. 1999. Predominance of  $\beta$ -catenin mutations and  $\beta$ -catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene* 18:6615-20.

Wang JY, Baer AE, Kraus VB, Setton LA. 2001. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture. *Spine* 26: 1747–1751.

Wang, HY, Liu T, Malbon CC. 2006. Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal* 18:934-941.

Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, et al. 2002. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* 3:69–75.

Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. 2008. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest* 88:264–74.

Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. 2003. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 162:833–42.

Studies on intervertebral disc degeneration  
in the chondrodystrophoid dog breed

Summary of Doctoral Thesis

Munetaka Iwata

Division of Veterinary Surgery, Department of Veterinary Science,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Nippon Veterinary and Life Science University

## **Introduction**

Low back pain resulting from intervertebral disc (IVD) degeneration is a leading cause of incapacity in human and veterinary health. IVD degeneration leads to loss of proteoglycans and water content in the nucleus pulposus (NP), which contains large amounts of aggregating proteoglycans and type II collagen (Col2), typical of compression-resisting tissues. NP cells display a rounded, chondrocyte-like morphology and secrete extracellular matrix (ECM) macromolecules composing the hyaline cartilage.

Cells in the NP originate from the notochord. There is a significant difference in the lifespan of notochordal cells among different species, and their loss correlates with early disc degeneration. In pigs, rabbits, rodents, and non-chondrodystrophoid dogs, the notochordal cell population persists into late adult life. However, in humans, sheep, and chondrodystrophoid breeds (CDBs), such as the Beagle and the Dachshund, those cells disappear with age and are replaced by fibrochondrocyte-like cells. CDBs are affected by a profound degenerative disc disease with early onset, often developing within the first year of life; clinical symptoms derived from abnormal endochondral ossification develop between 3 and 7 years of age, with high incidence and high relative risk of developing disc herniation. Indeed, the relative risk for disc herniation is approximately 10–12 times higher in the Dachshund than in non-chondrodystrophoid breeds. It is thought that the chondrodystrophoid phenotype of CDB is similar to that of humans.

The mechanism underlying age-related IVD degeneration, however, is poorly understood. Many studies have shown an increase in the expression and activity of matrix metalloproteinases (MMPs) during IVD degeneration, and prominent ECM

components of the disc, including Col1 and Col2 and aggrecan, have been shown to be substrates of various MMPs.

It has been reported that, in osteoarthritic articular cartilage, there is increased accumulation of  $\beta$ -catenin and decreased expression of aggrecan and Col2a1. Several research groups have suggested that Wnt/ $\beta$ -catenin signal play an important role in IVD degeneration. Wnt signals typically involve a noncanonical pathway or a canonical pathway, and of these, the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, which activates the transcription factors T-cell factor (TCF) and lymphoid enhancer factor (LEF) through  $\beta$ -catenin activity, is well known. When the Wnt ligand is absent,  $\beta$ -catenin undergoes glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )-mediated phosphorylation and proteasome-mediated degradation. When the Wnt ligand is present, it interacts with its receptor, low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein (LRD) 5/6, which recruits Axin to facilitate its decomposition. In addition, Dishevelled proteins facilitate the dissociation of the adenomatous polyposis coli/Axin/GSK-3 $\beta$  complex, whereas frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma/GSK-3 binding protein (FRAT/GBP) directly inhibits GSK-3 $\beta$  phosphorylation activity. As a result, the phosphorylation of  $\beta$ -catenin by GSK-3 $\beta$  is inhibited and the  $\beta$ -catenin is stabilized. The stabilized  $\beta$ -catenin moves into the nucleus and, together with TCF and LEF, controls the formation of the body axis and somites, as well as cellular proliferation and differentiation. The quantitative changes of  $\beta$ -catenin are therefore an extremely important factor. However, the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signals in IVD cells is not yet well understood.

Another important factor in the process of disc degeneration is Runt-related

transcription factor 2 (Runx2) expression. A previous report suggested that Runx2 is also implicated in the progression of intervertebral disk aging and calcification in CDBs. Runx2 is an essential transcription factor for osteoblast differentiation and chondrocyte maturation. Runx2 expression is also induced in the articular cartilage of wild-type mice in early stages of osteoarthritis, and this induction occurs prior to MMP-13 expression, indicating that Runx2 has an important role in the osteoarthritis disease process. In addition, Wnt signaling enhances Runx2 expression through the direct binding of TCF7 or LEF1/ $\beta$ -catenin on the Runx2 promoter and through DNA binding of small mothers against decapentaplegic (SMAD) proteins and TCF7L2/ $\beta$ -catenin to their cognate sequences as well as protein–protein interactions between them.

The objective of this study was to evaluate whether the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enhances NP cell degeneration and calcification. We hypothesized that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling would enhance Runx2 expression in intervertebral degeneration and lead IVD calcification.

### **1. Quantitative evaluation of degeneration of NP tissue**

To evaluate its degeneration, we graded the NP tissue based on the MR signal intensity that was measured using Image J software. NP tissue which exhibits signal intensity  $>86$  is classified as grade 1, 45–85 as grade 2, and  $<45$  as grade 3. The results showed that the average signal intensity (ASI) of grade 1 NP tissue was 112.3, grade 2 was 68.3, and grade 3 was 34.2. Moreover, the percentage of tissue occupied by the grade 1 was 61%,

grade 2 was 18%, and grade 3 was 21%. It should be noted that, although all NP tissue was derived from 12-month-old CDBs, grade 3 NP tissues were detected, indicating that CDBs are affected by a profound degenerative disc disease with early onset that often develops within the first year of life.

## **2. Variations in Gene and Protein Expression in Canine Chondrodystrophic**

### **Nucleus Pulposus Cells Following Long-Term Three-Dimensional Culture**

Specifically, we evaluated the potential of a three-dimensional (3D) culture of healthy NP as an in vitro model system to investigate the mechanisms of IVD degeneration.

Agarose hydrogels were populated with healthy NP cells from beagles after performing magnetic resonance imaging, and mRNA expression profiles and pericellular extracellular matrix (ECM) protein distribution were determined. After 25 days of 3D culture, there was a tendency for redifferentiation into the native NP phenotype, and mRNA levels of *Col2A1*, *COMP*, and *CK18* were not significantly different from those of freshly isolated cells. Our findings suggest that long-term 3D culture promoted chondrodystrophic NP redifferentiation through reconstruction of the pericellular microenvironment. Further, lipopolysaccharide (LPS) induced expression of *TNF- $\alpha$* , *MMP3*, *MMP13*, *VEGF*, and *PGES* mRNA in the 3D cultures, creating a molecular

milieu that mimics that of degenerated NP. These results suggest that this in vitro model represents a reliable and cost-effective tool for evaluating new therapies for disc degeneration.

### **3. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enhances intervertebral disc degeneration and calcification through Runx2 signaling**

Here, we demonstrate that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling would enhance Runx2 expression in intervertebral degeneration and lead to IVD calcification.

NP tissue was obtained from 12-month-old male Beagle dogs after evaluation of the degeneration based on the magnetic resonance (MR) signal intensity. Histological analysis showed that lack of Safranin-O staining, calcified area, and MMP13-positive cells increased with progression of the degeneration. Furthermore,  $\beta$ -catenin- and Runx2-positive cells also increased with the progression of the degeneration. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed that the MRI signal intensity and mRNA expression levels of  $\beta$ -catenin and Runx2 are correlated in NP tissues.

Moreover, to evaluate the role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the regulation of NP cells degeneration, we studied the effects of LiCl on cultured canine NP cells.

Using western blotting analysis, we found that the levels of  $\beta$ -catenin were consistently upregulated by LiCl. A supplementation of 20 mM LiCl induced  $\beta$ -catenin accumulation and Runx2 expression. In contrast, FH535, an inhibitor of  $\beta$ -catenin/TCF activity, inhibits the upregulation. These results indicate that Wnt/ $\beta$ -catenin signals have a significant role in degeneration and calcification in IVD through Runx2 signal.

In summary, our findings support a pivotal role for culture microenvironment on chondrocytic disc cell behavior and further suggest that the length is an important factor in 3D scaffolds. Because the phenotype of NP cells of CDBs is similar to that of humans, these results also suggest that the same basic mechanism of accelerated degeneration functions in human NP tissue.

In addition, our results suggest that Wnt/ $\beta$ -catenin signals may have a significant role in degeneration and calcification in IVD through Runx2 signal.

Our data support the possibility that Wnt/ $\beta$ -catenin induces Runx2 and MMP expression in disc cells of CDBs.