

# 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 chondrodystrophoid dog breed)

要旨

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)

椎間板ヘルニア (IVDH) は椎間板髄核の変性に起因する疾患であり、犬における代表的な脊髄損傷製疾患として認識されている。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。椎間板髄核の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。しかし軟骨異栄養性犬種 (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い。従って、培養細胞を使用する検討を計画する前に適切な培養条件の設定を行う必要があった。さらに著者は、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。また Runx2 は CDBs の椎間板変性において髄核細胞の肥大化や基質の石灰化を促進することが分かっている。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。さらにヒトではこの Wnt/ $\beta$ -catenin signal は椎間板髄核においても発現しており、変性に重要な役割を示すと報告されている。そのため、CDBs における髄核変性および石灰化を誘導する Runx2 の発現には、Wnt/ $\beta$ -catenin signal が関与している可能性が推測される。

本研究では、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った。撮影によって得られた MR 画像における髄核の信号強度を Image J software (NIH) を使用して解析した結果、CDBs では 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髄核が全体の 21% も存在することが分かった。また Pfirrmann Grading System において Grade1 に分類されるものは、画像解析において信号値が 86 以上を示すことが明らかとなった。次にこの評価方法により選別した Grade1 の CDBs の非変性髄核から単離した髄核細胞を用いて、CDBs の髄核細胞の適切な培養条件の設定を目的として検討を行った。髄核細胞を単離後、二種類の方法、すなわち low-melting agarose-hydrogel に包埋した三次元培養法そして平面培養法で 37°C および 5%CO<sub>2</sub> 存在下で 0、5、10、25 日間に渡り培養し、それぞれの表現型の推移を比較検討した。その結果、平面培養法では CDBs の髄核細胞の形態は線維芽細胞様に変化し、そして Type I collagen mRNA 発現の増強、Type II collagen mRNA そしてアグリカン mRNA 発現の減少など、発現形質が著しく変化すること、そして agarose hydrogels を使用した 25 日間にわたる長期三次元培養を行うことで、細胞は円形を呈し形態的にも髄核細胞に近似していること、さらに発現形質も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。さらに CDBs の髄核変性および石灰化における Runx2 の発現への Wnt/ $\beta$ -catenin signal の関与を明らかにすべく、25 日間三次元培養培養した cell-agarose construct を使用して検討を行った。あらかじめ変性の程度を評価するために MRI 撮影を行った 1 歳齢の健常ビーグル犬 12 頭より髄核組織を採取した。また IVDH に罹患したミニチュア・ダックスフント 15 頭 (MD) より手術時に摘出された椎間板物質も検討に使用した。その結果、CDBs の髄核では変性の進行に伴い Runx2 および  $\beta$ -catenin の発現量が増加することがわかった。LiCl および FH535 を用いた *in vitro* における検討により、髄核組織では Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway が Runx2 の発現調節を行い、石灰化および変性を誘導している可能性が示唆された。