

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)

論文内容の要約

岩田 宗峻

日本獣医生命科学大学大学院生命科学研究科

(指導教員：原 康 教授)

要約

人医療そして獣医療において、椎間板ヘルニア（IVDH）はその背景に椎間板髄核の変性が関連して発生することが認識されている。小動物臨床領域において、IVDH は軟骨異栄養性犬種（Chondrodystrophoid Breeds : CDBs）を主体として犬に好発する代表的な脊髄損傷性疾患であり、犬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いる。一方、厚生労働省統計情報部のデータによると、日本国内の IVDH 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 IVDH 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。犬の IVDH 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。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、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。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生涯存在するが、人、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。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人のモデル動物として適しているとされているが、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。椎間板髄核では変性の過程においては、細胞外基質の

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。これらのうち MMP13 は Col2A1 を特異的に分解する酵素であり、CDBs において椎間板変性に重要な役割を示すとされている。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、この Runx2 は CDBs の椎間板変性においても MMP13 の発現を誘導し、さらには髓核細胞の肥大化や髓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。さらにこの Runx2 は骨形成の過程において Wnt/ β -catenin signal によって誘導されていることが報告されている。Wnt/ β -catenin signal pathway におけるリガンドであるウイント (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。

そこで、本研究は CDBs の椎間板髓核変性および石灰化に関わる Runx2 の発現に対する Wnt/ β -catenin signal pathway の関わりについて検証することを目的として実施した。本研究では、まず MR 信号強度を用いた髓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髓核から単離した細胞を用いて CDBs の髓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、髓核変性および石灰化における Runx2 の発現への Wnt/ β -catenin

signal の関与について検討した。

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。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。モデル動物として適していると考えられ、検討によく用いられる CDBs は、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3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 に蓄積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な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/ β -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、CDBs の椎間板変性において発現する Runx2 に対する Wnt/ β -catenin signal pathway の関与を明確にすることを目的として検討を行った。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、 β -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 MR 信号強度の低下と β -catenin および Runx2 の mRNA の発現量に関する負の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 β -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- β -catenin の発現は低下した。LiCl により誘導された β -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/ β -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/ β -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。