

論文審査の結果の要旨

申請者氏名：岩田宗峻

人医療そして獣医療において、椎間板ヘルニア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、椎間板ヘルニアは軟骨異栄養性犬種（Chondrodystrophoid Breeds：CDBs）を主体として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。罹患動物では疼痛そして横断性脊髄障害に起因した不全麻痺や麻痺などの障害が発現するが、中には呼吸筋麻痺あるいは進行性脊髄軟化症を続発し致命的転帰をとることもある。一方、人医学領域においても椎間板変性に起因した背部痛そして横断性脊髄障害の発生率が高い。厚生労働省統計情報部のデータによると、国内では椎間板ヘルニアによる入院患者は0.7%を占め、年間約5万人が手術を受けると報告されている。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。

犬の椎間板ヘルニアは、椎間板髄核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 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。この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考えられており、そのため CDBs は他の動物種（豚、ウサギ、ラット）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考えられている。しかしながら、CDBs における椎間板変性のメカニズムは十分に解明されていない。椎間板髄核では変性の過程において、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 においても椎間板変性に重要な役割を示すと考えられている。これまでに CDBs では MMP13 の発現を誘導する因子の一つとして Runt-related transcription factor 2 (Runx2) の関与が示唆されている。

本研究では人医療そして獣医療において大きな問題となる椎間板変性のメカニズムを解明することを目的として企画されており、申請者は、CDBsの椎間板髄核変性および石灰化に関わる椎間板髄核細胞内におけるRunx2発現に着目し、さらにRunx2の発現誘導におけるWnt/ β -catenin signal pathwayの関与について検討している。本論文は6章から構成され、第1章は序論で、第5章が総括である。実験内容は、以下に示した要約について第2章から第4章に記述されている。

第2章：MR信号強度を用いた髄核変性の定量的評価法

椎間板髄核は変性の進行と、MRIにおけるT2強調画像の信号強度の低下が相関性を示すことが報告されている。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。In vitroにおける検討に髄核組織を供する場合、変性の進行したサンプルを選択することは、誤った結果を導きかねない。申請者は椎間板髄核の変性の程度を客観的に分類可能な選択基準を設定することを目的として、Pfirrmann Grading SystemにおけるGrade分類と各Gradeの変性髄核のMR信号値を比較検討している。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MR信号値が86以上を示し、Grade2では45以上85未満、そしてGrade3では45未満を示すことを明らかにしている。本検討により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ものが21%も存在すること、Grade2の変性に関しても全体の18%を占めること、そしてGrade1の全く変性していない髄核組織は全体の61%に過ぎないことを証明した。申請者は、以上の結果より、CDBsでは、12ヶ月齢という若い固体においても髄核の変性が進行しているため、検討に使用する髄核を選択するためには事前のMRIによる評価が強く推奨されると結論づけている。

第3章：長期三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発現形質の推移

椎間板髄核の変性過程における分子生物学的機序を解明する場合、培養細胞を使

用した検討は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。さまざまな動物種の髄核細胞の発現形質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発現形質に関しては報告されていない。申請者は CDBs の髄核細胞の適切な培養条件を設定し、さらに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ている。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、三次元培養法そして平面培養法における CDBs 由来の椎間板髄核細胞の発現形質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比較検討を行っている。第 2 章に記載した手法により Pfirrmann Grading System において Grade1 の髄核を同定し、同椎間板から採取した髄核細胞を実験に供している。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、TypeII 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を明らかにしている。平面培養法において髄核細胞の形質が大きく変化する理由としては、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察している。一方、三次元培養法では agarose hydrogels で作成した scaffold 内では髄核細胞自身が産生する細胞外基質が agarose hydrogels に蓄積することにより細胞周囲に留まり、微小環境が構築されることが細胞の再分化を促進している要因になると考察している。

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/ β -catenin signal pathway の関与に関する検討

本症では *in vivo* そして *in vitro* の検討を行い、CDBs の椎間板髄核の変性および石灰化における Runx2 の発現、そしてそれに対する Wnt/ β -catenin signal pathway の関与について検討している。

In vivo における検討では、第 2 章に記載した手法により分類された Grade1 と

Grade3 の椎間板髄核から採取した髄核細胞、そして臨床例（Hansen-I 型ヘルニア罹患症例）から外科的に採取された椎間板物質中の髄核細胞を使用して、 β -catenin および Runx2 の免疫染色を行っている。その結果、変性の進行とともに双方の発現が増加することを明らかにしている。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を示すことを明らかにしている。

また *in vitro* における検討では、培養細胞を対象として、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 発現における Wnt/ β -catenin signal pathway の関与について検討している。第 3 章で確立した長期三次元培養法により準備した培養髄核細胞に対して LiCl ($GSK-3\beta$ 活性阻害剤) を感作させることにより 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 の発現が低下すること、さらに LiCl により誘導された β -catenin および Runx 2 の発現増加は、FH535 (β -catenin 阻害剤) により抑制されることを明らかにしている。申請者は、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 が深く関与していること、そして同細胞内シグナルが Runx2 の発現誘導に関与していることを示唆している。

以上のように、申請者は MR 信号値を使用した椎間板髄核変性の定量的評価法に始まり、CDBs 由来の椎間板髄核細胞の適切な培養条件の設定、そして CDBs の椎間板髄核変性および石灰化に関わる Runx2 発現における Wnt/ β -catenin signal pathway の影響について検討を行い、CDBs の椎間板髄核変性には髄核細胞内での Wnt/ β -catenin signal pathway の活性化により Runx2 発現が誘導されることを証明している。特に CDBs の髄核はヒトの髄核と形質が似ているゆえ、申請者が確立した *in vitro* における CDBs 由来髄核細胞の長期三次元培養法は、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と考えられる。これらの成績は、獣医療のみならず、人医療においても極めて重要であり、学術上、応用上、貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。