



Anti-Inflammatory Effects of Adiponectin Receptor Agonist AdipoRon against Intervertebral Disc Degeneration

大西, 洋輝

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2023-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8717号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485901>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Anti-Inflammatory Effects of Adiponectin Receptor Agonist AdipoRon against Intervertebral Disc Degeneration

アディポネクチン受容体作動薬 AdipoRon の椎間板変性に対する抗炎症作用

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科科学
(指導教員：黒田 良祐教授)

大西 洋輝

【目的】

腰痛は有訴率が高く、また社会的・経済的にも非常に大きな問題となっている世界的な健康問題である。腰痛の原因として様々な要因が報告されているが、椎間板変性は主要な要因の一つである。椎間板変性の機序や腰痛を生じさせる病態の解明とそれに基づいた椎間板機能を温存する低侵襲治療の開発が強く望まれており、遺伝子導入や幹細胞移植、成長因子の投与などの様々な生物学的治療法の有効性が日々研究されている。椎間板は髄核、周囲を囲む線維輪、そしてこれらと脊椎椎体を隔てる軟骨終板で構成される人体最大の無血管組織である。その特殊な組織構造のために栄養供給の大部分は軟骨終板を介した椎体からの拡散に頼っている。そのため、加齢や機械的ストレス、遺伝的要素などに伴う軟骨終板の硬化・軟骨下骨の石灰化により栄養供給の低下が生じ、細胞外基質代謝の不均衡、椎間板細胞死さらに椎間板変性を引き起こす。

椎間板の細胞外基質代謝において変性椎間板は炎症性サイトカインを放出し、炎症性サイトカインはさらに細胞外基質異化因子の発現を誘導する。つまり椎間板変性において、椎間板細胞外基質代謝バランスは異化優位の状態となっている。このため本論文のコンセプトはこの基質代謝異化を抑制することを目的とした。そこで我々はアディポネクチン受容体作動薬である **AdipoRon** に注目した。アディポネクチンは脂肪細胞から放出されるアディポサイトカインの一つであり抗糖尿病効果、抗動脈硬化効果、抗炎症効果を有することが知られている。また近年椎間板髄核細胞への投与により炎症性サイトカイン発現の抑制が報告されている。近年アディポネクチン受容体へ選択的に作動する経口薬である **AdipoRon** が発見され、様々な研究に応用されている。しかし **AdipoRon** 投与が椎間板変性、また炎症条件下で及ぼす影響について検討はなされておらず、また **AdipoRon** を椎間板へ用いた動物実験の検討もされていない。本研究の目的は **AdipoRon** の臨床応用を目指し、**AdipoRon** 投与がヒト椎間板細胞の細胞外基質代謝に与える影響を検討すること、またラット椎間板変性モデルを用いて椎間板変性治療の可能性について検討することである。

【方法】

細胞実験では腰椎変性疾患の手術時に採取したヒト椎間板髄核組織 (n=22、年齢 16-70 歳) を用いた。椎間板髄核細胞への **AdipoRon** の投与効果を検証すべく、髄核細胞を三次元培地 **Tapered Soft Stencil for Cluster Culture (TASCL)** へ 1.0×10^6 個/TASCL ずつ播種し、48 時間後に **AdipoRon** (2 μ M) または炎症刺激として IL-1 β (10 ng/ml) もしくはその両者を投与した。細胞外基質 (aggrecan、type II collagen)、細胞外基質異化因子 (MMP-13、ADAMTS-4)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) を RT-PCR で評価した。さらに細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインは蛍光免疫染色、ウエスタンブロット (WB) 法を用いて追加評価した。コントロール群、**AdipoRon** 単独投与群、IL-1 β 単独投与群、**AdipoRon**/IL-1 β 共投与群の 4 群で比較した。さらに同様に作製した 4 群間で AMPK/NF- κ B 経路である AMPK、p65 のリン酸化 (p-AMPK、p-p65 の発現) を WB 法で比較した。

動物実験では 12 週齢雄 **Sprague-Dawley** ラット尾椎を 20G 針で穿刺して変性椎間板モデル (穿刺群) を作製し、穿刺後 **AdipoRon** (2 μ M/2 μ L) 投与群、穿刺後 PBS (2 μ L) 投与群を作成した。また 20G 針による穿刺変性群と比較するため 33G 針による **AdipoRon** (2 μ M/2 μ L)

単独投与群、そしてコントロール群を作成し、4群間で経時的（ $n=6$ 、投与後2週、4週）に単純X線撮影を行い、椎間板高を比較した。またサフラニン-Oを染色行い、椎間板変性を組織学的に比較し、蛍光免疫染色を行い細胞外基質異化因子(MMP-13、ADAMTS-4)、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)およびAMPK/NF- κ B経路のリン酸化(p-AMPK、p-p65)の発現度を比較した。

【結果】

細胞実験：RT-PCRでは細胞外基質である aggrecan、type II collagen は IL-1 β 単独投与群ではコントロール群と比較して有意な発現低下を認めたが（ $P < 0.01$ ）、AdipoRon/IL-1 β 共投与群で発現低下の改善は認めなかった。また IL-1 β 単独投与群ではコントロール群と比較して MMP-13、ADAMTS-4、TNF- α 、IL-6 の有意な発現増加を認めたが、AdipoRon/IL-1 β 共投与群では IL-1 β 単独投与群と比較して MMP-13、ADAMTS-4、TNF- α 、IL-6 の発現増加の有意な抑制を認めた（ $P < 0.05$ ）。

細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインについて蛍光免疫染色、WB法でも検討し、同様の結果が得られた。WB法において AdipoRon 単独投与群、AdipoRon/IL-1 β 共投与群は IL-1 β 単独投与群と比較して p-AMPK の有意な発現増加を認めた（ $P < 0.01$ ）。また IL-1 β 単独投与群と比較して AdipoRon/IL-1 β 共投与群は p-p65 の有意な発現抑制を認めた（ $P < 0.01$ ）。

動物実験：20G針で穿刺した2群（穿刺後PBS投与群、穿刺後AdipoRon投与群）はコントロール群と比較して穿刺後14日、28日とも有意に椎間板高は低下し（ $P < 0.01$ ）、組織学的にも有意に椎間板変性の進行を認めた（ $P < 0.01$ ）。穿刺後28日では穿刺後AdipoRon投与群は穿刺後PBS投与群と比較して有意に椎間板高の低下は抑制され（ $P < 0.01$ ）、組織学的な椎間板変性の有意な進行抑制を認めた（ $P < 0.05$ ）。33G針によるAdipoRon単独投与群は椎間板高、組織学的な変性ともにコントロール群と有意な変化は認めなかった。蛍光免疫染色法ではTNF- α 、IL-6、ADAMTS-4、MMP-13、p-p65の発現は穿刺後14日で穿刺後PBS投与群、穿刺後AdipoRon投与群ともにコントロール群と比較して有意に高値であった（ $P < 0.01$ ）、AdipoRon単独投与群はコントロール群と比較して発現に有意差を認めなかった。一方で穿刺後28日ではMMP-13、ADAMTS-4、TNF- α 、IL-6、p-p65の発現は、穿刺後PBS投与群と比較して穿刺後AdipoRon投与群は有意に低値であった（ $P < 0.01$ ）。またAdipoRon単独投与群、穿刺後AdipoRon投与群は穿刺後14日、28日ともにコントロール群、穿刺後PBS投与群と比較して有意にp-AMPKの発現が増加していた（ $P < 0.01$ ）。

【考察】

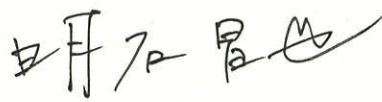
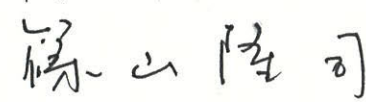
本研究はAdipoRon投与による椎間板細胞への抗炎症効果を細胞実験・動物実験を通して証明した初めての研究である。細胞実験では三次元培養下髄核細胞へAdipoRonを投与することで細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインの発現抑制を認めた。動物実験ではAdipoRonはラット尾椎を用いた椎間板変性モデルにおいて、椎間板高の低下および椎間板変性を抑制した。またAdipoRonは椎間板変性による細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインの発現低下を抑制した。細胞実験および動物実験とも炎症条件下においてAdipoRonはAMPK/NF- κ B経路のAMPKのリン酸化を促進させ、p65のリン酸化を抑制することで抗炎症作用をもたらし、椎間板変性の抑

制に繋がる可能性が示唆された。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に我々は椎間板変性細胞に対して炎症条件下のみでしか検討していない。第二に本研究では動物実験において AdipoRon 投与濃度を単一濃度のみ採用している。第三に動物実験において変性モデル作成と同時に AdipoRon を投与しており、他の投与タイミングを検討していない。今後、AdipoRon が効果を発揮する最適な条件を明らかにすることが必要である。

【結語】

AdipoRon は椎間板に対し抗炎症効果を有し、椎間板変性を抑制することが示された。AdipoRon は椎間板変性抑制への新たな治療戦略となり得る。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3306 号	氏 名	大西 洋輝
論 文 題 目 Title of Dissertation	Anti-Inflammatory Effects of Adiponectin Receptor Agonist AdipoRon against Intervertebral Disc Degeneration アディポネクチン受容体作動薬 AdipoRon の 椎間板変性に対する抗炎症作用		
審 査 委 員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner   		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【目的】腰痛は有訴率が高く、社会的・経済的にも非常に大きな問題となっている。椎間板変性は腰痛の主要な要因の一つで、病態の解明とそれに基づいた椎間板機能を温存する低侵襲治療の開発が強く望まれている。椎間板は髄核、周囲を囲む線維輪、そしてこれらと脊椎椎体を隔てる軟骨終板で構成される人体最大の無血管組織である。その特殊な組織構造のために栄養供給の大部分は軟骨終板を介した椎体からの拡散に頼っている。そのため、加齢や機械的ストレス、遺伝的要素などに伴う軟骨終板の硬化・軟骨下骨の石灰化により栄養供給の低下が生じ、細胞外基質代謝の不均衡、椎間板細胞死さらに椎間板変性を引き起こす。

椎間板の細胞外基質代謝において変性椎間板は炎症性サイトカインを放出し、炎症性サイトカインはさらに細胞外基質異化因子の発現を誘導する。つまり椎間板変性において、椎間板細胞外基質代謝バランスは異化優位の状態となっている。アディポネクチンは脂肪細胞から放出されるアディポサイトカインの一つであり抗糖尿病効果、抗動脈硬化効果、抗炎症効果を有することが知られている。また椎間板髄核細胞への投与により炎症性サイトカイン発現の抑制が報告されている。近年アディポネクチン受容体へ選択的に作動する経口薬である AdipoRon が発見され、様々な研究に応用されている。しかし AdipoRon 投与が椎間板変性、また炎症性条件下で及ぼす影響について検討はなされておらず、また AdipoRon を椎間板へ用いた動物実験の検討もされていない。本研究の目的は AdipoRon の臨床応用を目指し、AdipoRon 投与がヒト椎間板細胞の細胞外基質代謝に与える影響を検討すること、またラット椎間板変性モデルを用いて椎間板変性治療の可能性について検討することである。

【方法】細胞実験では腰椎変性疾患の手術時に採取したヒト椎間板髄核組織 (n=22、年齢 16-70 歳) を用いた。椎間板髄核細胞への AdipoRon の投与効果を検証すべく、髄核細胞を三次元培地 Tapered Soft Stencil for Cluster Culture (TASCL) へ 1.0×10^6 個/TASCL ずつ播種し、48 時間後に AdipoRon ($2 \mu\text{M}$) または炎症刺激として IL-1 β (10 ng/ml) もしくはその両者を投与した。細胞外基質 (aggrecan、type II collagen)、細胞外基質異化因子 (MMP-13、ADAMTS-4)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) を RT-PCR で評価した。さらに細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインは蛍光免疫染色、ウェスタンブロット (WB) 法を用いて追加評価した。コントロール群、AdipoRon 単独投与群、IL-1 β 単独投与群、AdipoRon/IL-1 β 共投与群の 4 群で比較した。さらに同様に作製した 4 群間で AMPK/NF- κB 経路である AMPK、p65 のリン酸化 (p-AMPK、p-p65 の発現) を WB 法で比較した。動物実験では 12 週齢雄 Sprague-Dawley ラット尾椎を 20G 針で穿刺して変性椎間板モデル (穿刺群) を作製し、穿刺後 AdipoRon ($2 \mu\text{M}/2 \mu\text{L}$) 投与群、穿刺後 PBS ($2 \mu\text{L}$) 投与群を作成した。また 20G 針による穿刺変性群と比較するため 33G 針による AdipoRon ($2 \mu\text{M}/2 \mu\text{L}$) 単独投与群、コントロール群を作成し、4 群間で経時的 (n=6、投与後 2 週、4 週) に単純 X 線撮影を行い、椎間板高を比較した。またサフラニン-O を染色を行い、椎間板変性度を組織学的に比較し、蛍光免疫染色を行い細胞外基質異化因子 (MMP-13、ADAMTS-4)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) および AMPK/NF- κB 経路のリン酸化 (p-AMPK、p-p65) の発現度を比較した。

【結果】細胞実験：RT-PCR では細胞外基質である aggrecan、type II collagen は IL-1 β 単独投与群ではコントロール群と比較して有意な発現低下を認めたが ($P < 0.01$)、AdipoRon/IL-1 β 共投与群で発現低下の改善は認めなかった。また IL-1 β 単独投与群ではコントロール群と比較して MMP-13、ADAMTS-4、TNF- α 、IL-6 の有意な発現増加を認めたが、AdipoRon/IL-1 β 共投与群では IL-1 β 単独投与群と比較して MMP-13、ADAMTS-4、TNF- α 、IL-6 の発現増加の有意な抑制を認めた ($P < 0.05$)。

細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインについて蛍光免疫染色、WB 法でも検討し、同様の結果が得られた。WB 法において AdipoRon 単独投与群、AdipoRon/IL-1 β 共投与群は IL-1 β 単独投与群と比較して p-AMPK の有意な発現増加を認めた ($P < 0.01$)。また IL-1 β 単独投与群と比較して AdipoRon/IL-1 β 共投与群は p-p65 の有意な発現抑制を認めた ($P < 0.01$)。

動物実験：20G 針で穿刺した 2 群（穿刺後 PBS 投与群、穿刺後 AdipoRon 投与群）はコントロール群と比較して穿刺後 14 日、28 日とも有意に椎間板高は低下し ($P < 0.01$)、組織学的にも有意に椎間板変性の進行を認めた ($P < 0.01$)。穿刺後 28 日では穿刺後 AdipoRon 投与群は穿刺後 PBS 投与群と比較して有意に椎間板高の低下は抑制され ($P < 0.01$)、組織学的な椎間板変性の有意な進行抑制を認めた ($P < 0.05$)。33G 針による AdipoRon 単独投与群は椎間板高、組織学的な変性ともにコントロール群と有意な変化は認めなかった。蛍光免疫染色法では TNF- α 、IL-6、ADAMTS-4、MMP-13、p-p65 の発現は穿刺後 14 日で穿刺後 PBS 投与群、穿刺後 AdipoRon 投与群ともにコントロール群と比較して有意に高値であった ($P < 0.01$)、AdipoRon 単独投与群はコントロール群と比較して発現に有意差を認めなかった。一方で穿刺後 28 日では MMP-13、ADAMTS-4、TNF- α 、IL-6、p-p65 の発現は、穿刺後 PBS 投与群と比較して穿刺後 AdipoRon 投与群は有意に低値であった ($P < 0.01$)。また AdipoRon 単独投与群、穿刺後 AdipoRon 投与群は穿刺後 14 日、28 日ともにコントロール群、穿刺後 PBS 投与群と比較して有意に p-AMPK の発現が増加していた ($P < 0.01$)。

【考察】AdipoRon 投与による椎間板細胞への抗炎症効果が細胞実験・動物実験を通して初めて証明された。細胞実験では三次元培養下髄核細胞へ AdipoRon を投与することで細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインの発現抑制を認めた。動物実験では AdipoRon はラット尾椎を用いた椎間板変性モデルにおいて、椎間板高の低下および椎間板変性を抑制した。また AdipoRon は椎間板変性による細胞外基質異化因子、炎症性サイトカインの発現低下を抑制した。細胞実験および動物実験とも炎症条件下において AdipoRon は AMPK/NF- κ B 経路の AMPK のリン酸化を促進させ、p65 のリン酸化を抑制することで抗炎症作用をもたらし、椎間板の変性の抑制に繋がる可能性が示唆された。

本研究は、AdipoRon が椎間板に対し抗炎症効果を有し、椎間板変性を抑制することを示した。AdipoRon が椎間板変性抑制への新たな治療戦略となり得る可能性が示された価値ある業績であると考え。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。