



Matrix Metalloproteinase (MMP-3) Gene Up-Regulation in a Rat Tail Compression Loading-Induced Disc Degeneration Model

由留部, 崇

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5074

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005074>

※ 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。



氏 名 由留部 崇
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 5074 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 2010 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Matrix Metalloproteinase (MMP-3) Gene Up-Regulation in a Rat Tail Compression Loading-Induced Disc Degeneration Model(ラット尾椎椎間板圧迫モデルを用いて再現した変性椎間板におけるマトリックスマタロプロテアーゼ (MMP-3) 遺伝子の発現上昇)

審 査 委 員

主 査 教 授 寺島 俊雄
教 授 甲村 英二
教 授 戸田 達史

**Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 Gene Up-Regulation
in a Rat Tail Compression Loading-Induced
Disc Degeneration Model**

ラット尾椎間板圧迫モデルを用いて再現した変性椎間板における
マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-3) 遺伝子の発現上昇

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科系講座 整形外科学
(指導教員: 黒坂 昌弘 教授)

由 留 部 崇

はじめに

腰痛は、罹患率の高さと治療や就労困難に伴う社会経済的な損失の面から、世界的な関心事となっている。その正確な発症原因は未だ明らかではないが、椎間板変性は主たる要因の一つとされ、病態の解明や予防法・治療法の確立が切望されている。

椎間板変性は基質の分解に特徴付けられた退行性変化であり、椎間板が周囲から隔離された人体最大の無血管組織であるという解剖学的特徴と相まって、その細胞生物学的な変動が病態に大きく関与することが示唆されている。しながら研究材料として、ヒト椎間板組織では各検体の変性度の差が大きく、倫理的な問題も含めて、変性過程を段階的に再現することは難しい。そのため我々は、まず椎間板変性に対する安定した動物モデルの確立が重要であると考え、椎間板に圧負荷を加えて変性を誘起するモデルを作成した。

本研究の目的は、本モデルに対し画像診断学的及び組織学的な評価を行うことで椎間板変性モデルとしての妥当性を検証すること、さらには、タンパク分解酵素の一つであるマトリックスメタロプロテアーゼ (以下 MMP)-3 遺伝子の発現を経時的に検討し椎間板変性の指標としての有用性を検討すること、とした。

方法

本実験は全て神戸大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。骨格的に成熟した 12 週齢雄 Sprague-Dawley ラット 60 匹を用いた。第 8-10 尾椎体にイリザロフ型創外固定器を装着し、1.3 MPa の持続的な静的圧迫負荷をそれぞれ 0, 3, 7, 14, 28, 56 日間ずつ加えた。第 8/9, 9/10 尾椎間を圧迫群、第 11/12, 12/13 尾椎間を対照群とした。

画像診断学的解析：単純 X 線像を創外固定器装着前と椎間板回収前で撮影した。単純 X 線像では Masuda らが提唱した Disc Height Index (以下 DHI) を用いて、各群の椎間高を経時的に比較検討した。また、MRI を同様に撮像し、Pfirrmann らが提唱した T2 強調画像での椎間板輝度を基にした分類法を用いて、各群の変性度を経時的に比較検討した。

組織学的解析：椎間板と椎体を一塊とした組織標本を作成した。Hematoxylin and eosin 染色と Safranin-O 染色を行い、Masuda らが提唱した組織学的分類法を用いて、各群の変性度を経時的に比較検討した。

細胞生物学的解析：回収した椎間板髓核組織から RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法を用いて、対照群を基準とした圧迫群における MMP-3 の mRNA 発現量を検討した。さらには、MMP-3 発現量と単純 X 線像における DHI もしくは MRI における Pfirrmann の変性度との相関性について統計学的検討を行った。また、タンパクレベルでの遺伝子発現を確認するため、MMP-3 の免疫組織化学染色を行い、陽性細胞の検出率を比較検討した。

結果

画像診断学的解析：単純 X 線像では圧迫期間に相関して椎間板高が低下しており、術後 3 日より統計学的に有意な DHI の減少が確認された。MRI では圧迫に伴い椎間板輝度が低下しており、Pfirrmann 分類においても術後 7 日より統計学的に有意な変性度の差がみられた。

組織学的解析：圧迫群では対照群と比較して、髓核細胞の減少と細胞外基質の変動、線維輪の破綻が観察された。Masuda らの組織学的分類でも、術後 7 日より圧迫群と対照群で変性度に明らかな有意差を認め、圧迫群で経時的に変性度が増大していた。

細胞生物学的解析：Real-time RT-PCR 法による mRNA 発現解析では、MMP-3 遺伝子の発現が術後 7 日で 4.2 倍と有意に上昇しており、以後も発現の経時的な増大が認められた。また、MMP-3 mRNA 発現量と DHI (単純 X 線像) との間のスピアマンの順位相関係数は -0.75、Pfirrmann 変性度 (MRI) との間では 0.80 と、いずれも有意の相関関係を認めた。免疫組織化学染色では、術後 0 日での MMP-3 陽性細胞率は 14.4% であったが、術後 7 日では 87.6% と有意に上昇しており、その増加傾向は全追跡期間にわたって維持されていた。

考察

本研究において、単純 X 線像及び MRI での持続的な椎間高の狭小化や髓核の輝度変化ならびに組織像での髓核及び線維輪の破綻が観察された。これらの変化はいずれも臨床的な椎間板変性所見に矛盾せず、多角的な面から本モデルの椎間板変性モデルとしての妥当性が示唆された。

細胞生物学的解析では、変性過程の進行に沿った MMP-3 遺伝子の発現上昇が mRNA レベルならびにタンパクレベルで確認され、加えて、MMP-3 mRNA 発現量と画像診断学的な変性度は統計学的に有意の相関を示した。このことは MMP-3 が椎間板変性に重要な役割を果たす可能性を示唆するとともに、椎間板変性の指標としての MMP-3 の有用性を支持する結果となった。

以上の結果から、本研究で用いたラット尾椎椎間板圧迫モデルは、椎間板変性機序の解明に大きく貢献するとともに、腰痛や神経痛を来す脊椎変性疾患に対する新たな細胞生物学的治療の開発へ向けて有益な基礎的情報を与えるものと推測された。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2127 号	氏名	由留部 崇
論文題目 Title of Dissertation	Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 Gene Up-Regulation in a Rat Tail Compression Loading-Induced Disc Degeneration Model ラット尾椎間板圧迫モデルを用いて再現した変性 椎間板におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-3) 遺伝子の発現上昇		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 寺島 俊雄 副査 Vice-Examiner 甲村 茂二 副査 Vice-Examiner 幸田 達史		
審査終了日	平成 22 年 08 月 20 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

【はじめに】

椎間板変性は腰痛の主たる要因の一つとされ、病態の解明や治療法の確立が切望されている。そのために研究材料として椎間板変性に対する安定した動物モデルの確立が重要であると考え、椎間板に圧負荷を加えて変性を誘起するモデルを作成した。本研究の目的は、画像診断学的及び組織学的な検討により本モデルの椎間板変性モデルとしての妥当性を検証すること、本モデルを用いてタンパク分解酵素の一つであるマトリックスメタロプロテアーゼ（以下 MMP）-3 遺伝子の変性指標としての有用性を検討することとした。

【材料と方法】

12 週齢雄 Sprague-Dawley ラット 60 匹の第 8-10 尾椎体にイリザロフ型創外固定器を装着し、1.3 MPa の静的圧負荷を 0、3、7、14、28、56 日間加えた。第 8/9、9/10 尾椎間を圧迫群、第 11/12、12/13 尾椎間を対照群とした。

画像診断学的解析：単純 X 線像を撮像し、椎間板高を計測して、各群間で経時的に比較検討した。また、MRI を撮像し、Pfirrmann 分類による各群の変性度を経時的に比較検討した。

組織学的解析：椎間板組織に対して Hematoxylin and eosin 染色と Safranin-O 染色を行い、Masuda 分類による各群の変性度を経時的に比較検討した。

細胞生物学的解析：real-time RT-PCR 法を用いて、椎間板髓核組織における MMP-3 の messenger RNA 発現量を経時的に検討した。また、MMP-3 発現量と単純 X 線像での椎間板高ならびに MRI 変性度との相関性について統計学的検討を行った。MMP-3 の免疫組織化学染色を行い、発現細胞の陽性率を各群間で比較検討した。

【結果】

画像診断学的解析：単純 X 線像では圧迫期間に相関して椎間板高が低下し、術後 3 日より有意な減少が確認された。MRI では圧迫に伴い椎間板輝度が低下し、Pfirrmann 分類において術後 7 日より有意な変性の進行がみられた。

組織学的解析：圧迫群では、髓核細胞の減少と線維輪の破綻が観察され、

Masuda らの組織学的分類でも術後 7 日より有意に変性度が増大していた。

細胞生物学的解析：MMP-3 messenger RNA の発現は術後 7 日で 4.2 倍と有意に上昇し、以後も発現の経時的な増大が認められた。MMP-3 mRNA 発現量と椎間板高（単純 X 線像）との間のスピアマンの順位相関係数は-0.75、Pfirrmann 変性度（MRI）との間では 0.80 といずれも強い相関関係を認めた。免疫組織化学染色における MMP-3 陽性細胞率は、14.4%（術後 0 日）から 87.6%（術後 7 日）と有意に上昇し、その傾向は全追跡期間に渡り維持されていた。

考察ならびに結論

本研究で観察された画像診断学的ならびに組織学的变化はいずれも臨床的な椎間板変性所見に矛盾せず、多角的な面から本モデルの椎間板変性モデルとしての妥当性が示唆された。

細胞生物学的解析では、変性の進行に伴った MMP-3 遺伝子の発現上昇が messenger RNA ならびにタンパクレベルで確認されるとともに、MMP-3 mRNA 発現量と画像診断学的な変性度は統計学的に有意の相関を示した。このことは MMP-3 が椎間板変性に重要な役割を果たす可能性を示唆するとともに、椎間板変性の指標としての MMP-3 の有用性を支持する結果となった。

本研究は、静的圧負荷による椎間板変性モデルの確立を目指したものであるが、従来解明されていなかった椎間板静的圧迫モデルの詳細を報告するとともに MMP-3 遺伝子の椎間板変性指標の有用性を提示した点において、価値ある業績であると認める。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。