



## A Rat Tail Temporary Static Compression Model Reproduces Different Stages of Intervertebral Disc Degeneration with Decreased Notochordal Cell Phenotype

Hirata, Hiroaki

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6004号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006004>

※ 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

### A Rat Tail Temporary Static Compression Model Reproduces Different Stages of Intervertebral Disc Degeneration with Decreased Notochordal Cell Phenotype

ラット尾椎椎間板静的圧迫モデルは圧迫期間を調節することで脊索由来細胞の減少を特徴とした多段階の椎間板変性を再現できる

平田 裕亮, 由留部 崇, 角谷 賢一朗, 前野 耕一郎, 高田 徹, 山本 潤哉,  
藏川 拓外, 秋末 敏宏, 黒田 良祐, 黒坂 昌弘, 西田 康太郎

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
整形外科学  
(指導教員: 黒坂昌弘教授)

平田 裕亮

#### 【はじめに】

腰痛は、米国で年間 1000 億ドル以上の社会経済負担を要するとされており、世界的な健康問題である。椎間板変性は腰痛の独立した危険因子であるにもかかわらず、その病態は未だ不明な点が多い。椎間板変性機序の解明には安定して変性過程を再現できる動物モデルが必要である。我々はラット尾椎椎間板に圧負荷を加えることで変性を誘起したモデルを作成し、その経時的な変性過程を報告してきた。持続的に圧負荷を加えることで画像診断学的・組織学的に椎間板変性が進行するとともに、主要なタンパク分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) および disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs (ADAMTSs) による細胞外基質 aggrecan の分解が観察された。さらには、高度変性椎間板では ADAMTSs よりも MMPs が主体となり aggrecan 分解が進行していた。これらの所見はヒト変性椎間板のものとよく一致しており、本モデルが椎間板変性モデルとして有用であることを示唆していた。

椎間板変性は細胞外基質の分解に加え細胞数の減少を特徴とする。椎間板髓核は脊索由来細胞と軟骨様髓核細胞からなる。なかでもヒトでは若年時に消失するとされる脊索由来髓核細胞が椎間板の恒常性維持に重要な役割を担うとされるが、変性機序へどのように関与するのか未だ明らかではない。そのため我々は椎間板変性の発生機序を明らかにすべく、本動物モデルにおいて圧迫期間を変えることで異なる変性度をもつ椎間板を再現し、脊索由来細胞の減少が椎間板変性に及ぼす影響を検討した。

#### 【方法】

本実験は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 SD ラット 84 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 の持続的な圧負荷を加えた。圧迫期間を調整し以下の 3 群を作成した。

Sham 群：創外固定を装着したのみで圧負荷を加えなかった群。

D1 群：圧迫 1 日後に圧負荷を解除した群。

D7 群：圧迫 7 日後に圧負荷を解除した群。

各群とも最長 56 日まで実験を継続し、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、以下の検討を行った。

#### 単純 X 線像

尾椎側面の単純 X 線像し、Masuda らが提唱した Disc Height Index (DHI) 法を用いて椎間板高を比較検討した (n=12)。

#### MRI

各群 56 日に MRI を撮影し、Pfirrmann らが提唱した T2 強調画像での椎間板髓核輝度を基にした分類法で変性度を評価した (n=12)。

#### Hematoxylin-eosin 染色および Safranin-O 染色

各群 56 日の尾椎から椎間板と椎体を一塊とした組織標本を作成し、Hematoxylin-eosin 染色および Safranin-O 染色を行った。Masuda らが提唱した組織学的分類法を用いて変性度

を評価した (n=6).

#### 免疫蛍光染色

各群 56 日の組織標本に脊索由来細胞で強発現を示す cytokeratin-8, galectin-3 および TUNEL 染色の 3 重蛍光免疫染色を行った。Cytokeratin-8, galectin-3 の両者ともに陽性の細胞を脊索由来細胞と定め、総髄核細胞数および脊索由来細胞数を計測し、各々に占める TUNEL 染色陽性細胞の割合を計測した (n=6)。

#### Real-time PCR

各群 0, 1, 3, 7, 9, 14, 28, 56 日の椎間板髄核細胞を回収し、RNA を抽出した。Real-time RT-PCR 法で MMP-3, ADAMTS-5, aggrecan-1, collagen type 2- $\alpha$ 1 の messenger RNA 発現量を検討した (n=6)。内在性遺伝子量の評価には GAPDH を用いた。

#### 統計学的検討

実験群間、圧迫および対照椎間、圧迫期間の変数を含めた multi-way ANOVA および Turkey-Kramer post-hoc test により、P<0.05 および P<0.01 を基準として統計学的有意差を検討した。

#### 【結果】

##### 画像診断学的検討

単純 X 線像において D1 群では 14 日以降に椎間板高は有意に減少せず%DHI は 56 日に 76.8% と比較的保たれていたのに対し、D7 群では進行性の減少を認め%DHI は 56 日に 53.3% と D1 群に比べ有意に低下していた (P<0.01)。MRI では圧迫期間に伴い髓核輝度が低下しており、sham 群、D1 群と比較して D7 群で有意に変性度が高かった (P<0.01)。

##### 組織形態学的検討

Hematoxylin-eosin 染色および Safranin O 染色では D1 群、D7 群で髓核細胞の減少および脊索由来細胞を示唆する空胞の消失、細胞外基質の凝縮、線維輪の破綻が観察された。Masuda 分類では D7 群、D1 群、sham 群の順で有意に変性度が高かった (P<0.01)。蛍光免疫染色において総髄核細胞数は sham 群と比較し、D7 群、D1 群の順で有意に減少していた (P<0.01)。加えて、cytokeratin-8, galectin-3 共陽性細胞は sham 群の 73.4% に対して D1 群で 45.7%、D7 群で 19.5% と、脊索由来細胞が総髄核細胞数に占める割合は圧迫期間に従いさらに減少していた (P<0.01)。TUNEL 染色陽性細胞が総髄核細胞に占める割合は圧迫期間に従い有意に増加し (P<0.01)、D1 群では非脊索由来細胞で、D7 群では非漿細胞および脊索由来細胞で有意に増加していた (P<0.01)。

##### 細胞生物学的検討

Real-time RT-PCR において MMP-3 は D1 群では変動を認めなかったのに対し、D7 群では 7 日より有意に発現が増大し 56 日まで持続していた (P<0.01)。ADAMTS-5 は D1 群では 56 日に有意の発現上昇を認めたが (P<0.01)、D7 群では変動を認めなかつた。Aggrecan-1, collagen type 2- $\alpha$ 1 は D1 群、D7 群で圧迫解除後に一過性の発現増大を示したが、両群とも 56 日では有意に発現が低下していた (P<0.01)。

#### 【考察】

本研究ではまず、我々が確立したラット椎間板変性モデルにおいて圧負荷を加える期間を変えることで多様な変性度をもつ椎間板が作成可能かどうかを画像診断学的に検証した。単純 X 線像では D1 群で椎間板高が比較的保たれるのに対して、D7 群では進行性に低下しており、両群とも圧迫解除後に一旦回復したにもかかわらずその後の経過に差を認めた。MRI でも D1 群と D7 群で変性度に差を認めており、圧負荷を加える期間を変えることで画像診断学的に異なる変性度の椎間板を再現することが可能であった。

続いて組織形態学的に検証を行ったところ、圧迫期間に伴って変性度は高くなっていた。総細胞数は圧迫期間に従って減少しており、なかでも大きな空胞をもつ脊索由来と考えられる細胞が著しく消失していた。そこで脊索由来組織で強発現を示す cytokeratin-8 と galectin-3 を用いた蛍光免疫染色で細胞表現型を検討した結果、脊索由来細胞は著しく減少していたことから、脊索由来細胞はメカニカルストレスに脆弱であることが示唆された。さらに脊索由来細胞の消失が細胞死によるものか細胞表現型の変化であるのかを検証したところ、TUNEL 染色陽性細胞は圧迫期間に従い増加していたが、それは主に非脊索由来細胞で増加しており、脊索由来細胞での増加はわずかであった。このことから、多くの細胞は脊索由来細胞から非脊索由来細胞へと細胞表現型を変化させ、その後に細胞死に至ることが示唆された。

最後に、圧迫期間が細胞外基質分解に及ぼす影響を検討するために PCR 解析を行った。MMP-3 の発現が D7 群で持続的で増大していたのに対して、ADAMTS-5 は D1 群の 56 日でのみ増加しており、このことはヒト椎間板において MMP-3 の発現は変性度によく相関する一方で、ADAMTS-5 の発現は相関しないことと一致していた。細胞外基質 aggrecan-1, collagen type 2- $\alpha$ 1 の発現は両群とも 56 日では低下しており、細胞外基質の分解が進行していることが示唆された。これらのことから、細胞生物学的に異なる変性度の椎間板が再現されており、本モデルは椎間板変性の進行を決定付ける因子を検討するうえで有用であると考えられた。

以上のことから、ラット尾椎間板圧迫モデルでは圧迫期間を調整することで多段階の椎間板を再現することが可能であった。これらの変性は脊索由来細胞の減少により特徴づけられており、非脊索由来細胞において細胞死が進行することが示された。さらに、椎間板への圧負荷により異化と同化の不均衡が生じており、脊索由来細胞における基質代謝能の変化が進行性椎間板変性の契機となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2395 号	氏名	平田 裕亮
論文題目 Title of Dissertation	ラット尾椎椎間板静的圧迫モデルは圧迫期間を調節することで脊索由来細胞の減少を特徴とした多段階の椎間板変性を再現できる  A Rat Tail Temporary Static Compression Model Reproduces Different Stages of Intervertebral Disc Degeneration with Decreased Notochordal Cell Phenotype		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 甲村 美己 副査 Vice-examiner 伊藤 遼史 副査 Vice-examiner 寺島 復雄		
(要旨は1,000字~2,000字程度)			

(要旨は1,000字~2,000字程度)

椎間板変性は腰痛の独立した危険因子であるにもかかわらず、その病態は未だ不明な点が多い。研究者らのグループはこれまでに、ラット尾椎椎間板に持続的な圧負荷を加えることで変性を誘起したモデルを作成し、その経時的な変性過程を報告してきた。今回研究者らは、本動物モデルにおいて圧迫期間を変えることで異なる変性度の椎間板変性を再現し、脊索由来細胞の減少が変性に及ぼす影響を検討した。

## 方法

12週齢雄SDラット84匹の第8-10尾椎体にイリザロフ型創外固定器を装着し、1.3MPaの持続的な圧負荷を加えた。圧迫期間を調整することにより、創外固定を装着したのみで圧負荷を加えなかった群(Sham群)、圧迫1日後に圧負荷を解除した群(D1群)、圧迫7日後に圧負荷を解除した群(D7群)を作成した。各群とも最長56日まで実験を継続し、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。単純X線像で椎間板高、MRI像で椎間板髓核輝度、組織像で変性度を検討した。脊索由来細胞で強発現を示すcytokeratin-8, galectin-3およびTUNEL染色の3重蛍光免疫染色を行った。総髓核細胞数とcytokeratin-8, galectin-3が両者ともに陽性の脊索由来細胞数を計測し、各自に占めるTUNEL染色陽性細胞の割合を計測した。さらに、Real-time RT-PCR法でMMP-3, ADAMTS-5, aggrecan-1, collagen type 2- $\alpha$ 1のmessenger RNA発現量を検討した。統計学的には実験群間、圧迫および対照椎間、圧迫期間の変数を含めたmulti-way ANOVAおよびTurkey-Kramer post-hoc testにより、P<0.05およびP<0.01を基準として統計学的有意差を検討した。

## 結果

単純X線像において椎間板高はD1群では56日に76.8%と比較的保たれていたのに対して、D7群では56日に53.3%と進行性の減少を認め、D1群に比べて有意に低下していた(P<0.01)。MRI、組織像でも圧迫期間に伴い髓核輝度の低下、変性度の増大を認めた(P<0.01)。蛍光免疫染色において総髓核細胞数はsham群と比較し、D7群、D1群の順で有意に減少し(P<0.01)、cytokeratin-8, galectin-3共陽性細胞はsham群の73.4%に対して、D1群で45.7%，D7群で19.5%と、脊索由来細胞が総髓核細胞数に占める割合は圧迫期間に従いさらに減少をしていた(P<0.01)。TUNEL染色陽性細胞が総髓核細胞に占める割合は圧迫期間に従い有意に増加し(P<0.01)、D1群では非脊索由来細胞で、D7群では非脊索由来細胞および脊索由来細胞で有意に増加していた(P<0.01)。Real-time RT-PCRにおいてMMP-3はD7群では7日より56日まで有意に発現が上昇し(P<0.01), ADAMTS-5はD1群では56日に有意の発現上昇を認めた(P<0.01)。Aggrecan-1, collagen type 2- $\alpha$ 1はD1群、D7群ともに56日で有意に発現が低下していた(P<0.01)。

## 考察

本研究は、ラット尾椎椎間板圧迫モデルにおいて圧負荷を加える期間を変えることにより、画像診断学的、組織診断学的、細胞生物学的に多様な変性度をもつ椎間板が作成可能であることを報告した。脊索由来細胞は椎間板の恒常性維持に重要な役割を担うとされているが、変性機序へどのように関与するのかは未だ明らかではない。本研究で再現された多様な椎間板変性は脊索由来細胞の減少により特徴づけられており、非脊索由来細胞において細胞死が進行することが示された。さらに、椎間板への圧負荷により異化と同化の不均衡が生じており、脊索由来細胞における基質代謝能の変化が進行性椎間板変性の契機となる可能性が示唆された。

本研究は動物モデルを用いて脊索由来細胞の減少が椎間板変性に及ぼす影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった多段階の椎間板変性を再現する動物モデルを確立し、変性過程における脊索由来細胞減少の意義を明らかにした点で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ものと認める。