Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Functional Impact of Integrin α5β1 on the Homeostasis of Intervertebral Discs: A Study of Mechanotransduction Pathways Using a Novel Dynamic Loading Organ Culture System

Kurakawa, Takuto

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2015-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6374号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006374

※ 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

Functional Impact of Integrin α5β1 on the Homeostasis of Intervertebral Discs: A Study of Mechanotransduction Pathways Using a Novel Dynamic Loading Organ Culture System

Integrin α5β1 は椎間板の組織恒常性維持に関与する：動的負荷培養装置を用いたメカノトランスダクション経路の検討

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）

藏川　拓外

Keywords: intervertebral disc, degeneration, organ culture, mechanoreceptor, integrin

【目的】

椎間板変性は腰痛や神経痛をきたす脊椎変性疾患の主因と考えられている[1]。その発生機序には椎間板組織にくり返し加わる機械的刺激が関与しており[2]、この機序を理解することは細胞死や生合成能の低下、異化反応の亢進に特徴づけられる椎間板退行変性を制御する上で重要である。一方、細胞ー細胞外基質間結合を担う膜貫通型蛋白である integrin α5β1 には、力学的負荷を受容する分子（メカノレセプター）としての機能が報告されている[3]。本研究では椎間板組織培養モデルを用い、動的圧迫刺激による組織学的、生化学的変化を観察した。また、これらの変化に integrin α5β1 が及ぼす影響を検討し、椎間板変性過程における integrin α5β1 の役割を検討した。

【方法】

14 週齢 SD ラット 36 匹の尾椎より頭尾側の軟骨終板を含めて摘出した椎間板 72 検体を、以下の 4 群に分け、動的負荷培養装置を用いて 6 日間組織培養を行った。各群の条件は、DMEM/10%FBS 中で静置培養した C 群、初期値 1.3MPa, 1Hz の軸圧負荷を加えながら培養した L 群、integrin α5β1 の fibronectin 結合部に対する競合阻害蛋白である GRGDSP（Calbiochem）を添加した培養液を用いて静置培養した I 群、GRGDSP 添加培養液中で動的負荷培養した IL 群である。

培養後の検体について、1) Calcein AM（Sigma-Aldrich）を用いて生細胞染色を行い、生細胞率を髄核(NP)と線維輪(AF)に分けて評価した（N=4）。2) 組織学的変性度を Masuda らの分類に従い評価した（N=4）。3) 免疫染色を行い、integrin α5β1 発現の有無および局在を確認した（N=2）。4) aggrecan、type-2 collagen、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法を用いて NP、AF で相対定量評価した（N=6）。

【結果】

1) NP における生細胞率は、C 群(91.6%)に対し動的圧迫刺激を加えた L 群(69.9%)および IL 群(79.7%)で有意に低下していたが($P<0.05$)、L 群と integrin α5β1 に対する競合阻害蛋白を添加した IL 群の比較では、IL 群が L 群に比べ高かった($P<0.05$)。AF における生細胞率は、4 群とも 80%以上で各群間の有意差はなく、動的圧迫刺激や integrin α5β1 阻害蛋白による影響を認めなかった。

2) 各群の組織像において、動的圧迫刺激を加えた L 群および IL 群では椎間板高の減少や髄核細胞形態の扁平化、髄核細胞数の減少、線維輪の層間解離を認めた。C 群および integrin α5β1 に対する競合阻害蛋白を添加して静置した I 群ではこれらの変化を認めなかった。組織学的変性度は、C 群 4.0 点に対し L 群 7.6 点、IL 群 6.3 点と、動的圧迫刺激による変性度の有意な増大を認めた($P<0.05$)。L 群と IL 群の比較では、integrin α5β1 に対する競合阻害蛋白を添加した IL 群の変性度は L 群に比べ有意に低かった($P<0.05$)。

3) 4 群全ての NP、AF に integrin α5β1 陽性細胞を認めた。動的圧迫刺激や integrin α5β1 阻害蛋白による明らかな染色性の差異や局在の変化は認めなかった。

4) NP 細胞における aggrecan、type-2 collagen の mRNA 発現量は、C 群に比べ動的圧迫刺激を加えた L 群では有意差を認めなかったが、integrin α5β1 に対する競合阻害蛋白を添加した IL 群では増大(C 群比 1.6 倍、1.9 倍)していた($P<0.05$)。NP 細胞における MMP-3、MMP-13 の発現量は、C 群に対し L 群で増大(2.2 倍、1.7 倍)していたが($P<0.05$)、IL 群では C 群に比べ有意な増大を認めなかった。AF 細胞における MMP-3、MMP-13 の発現量も同様に、C 群に対し L 群で増大(1.7 倍、1.9 倍)していたが($P<0.05$)、IL 群では C 群と

の有意差を認めなかった。AF 細胞における aggrecan、type-2 collagen の発現量は、L 群(C 群比 1.8 倍、2.4 倍)、IL 群(1.8 倍、2.3 倍)ともに増大しており($P<0.05$)、L 群、IL 群間の有意差は認めなかった。

【考察】

椎間板変性過程の特に早期において、髄核細胞数の減少や細胞密度の減少が変性進行の契機となることが報告されている[4]。また、代表的な基質分解酵素である MMP-3 や MMP-13 が椎間板変性に関与することも多数報告されている[5, 6]。本研究では、椎間板に動的圧迫刺激を加えることで椎間板髄核の生細胞率が低下し、アグリカン分解酵素である MMP-3、およびコラーゲン分解酵素である MMP-13 の mRNA 発現が増大していた。また組織レベルでも、髄核細胞数の減少、細胞外基質の濃縮、線維輪の層間解離など椎間板変性に特徴づけられる変化を認め[7]、本研究の椎間板組織培養モデルは、動的圧迫刺激による椎間板変性過程を再現したものと考えられた。一方、integrin α5β1 の fibronectin 結合部に対する低分子量の競合阻害蛋白（GRGDSP）を用いることで動的圧迫刺激による細胞死や基質分解酵素の発現量増大が部分的に抑制されており、integrin α5β1 による力学的負荷の受容が椎間板変性過程の端緒のひとつとなっている可能性が示唆された。

培養細胞を用いた過去の研究では、動的圧迫刺激により髄核細胞のアグリカン合成能が低下したが、integrin α5β1 阻害蛋白を用いることでアグリカン合成能の低下が抑制されたと報告されている[8]。しかし、細胞外基質から細胞を一旦解離し、基質組成の異なる培養系で培養した細胞を用いる実験では、in vivo と異なる細胞－細胞外基質間結合が構築されている可能性が考えられる。今回我々は、組織培養下の椎間板に精密な力学的刺激を加えることで、基質から細胞を解離することなく、力学的刺激に対する integrin α5β1 を介した細胞応答を観察することができた。

一方、線維輪細胞では、本研究の力学的条件において動的圧迫刺激による生細胞率の低下や細胞形態の変化を認めなかった。mRNA 発現は動的圧迫刺激により MMP-3、MMP-13 だけでなく、aggrecan や type-2 collagen の発現も増大しており、線維輪細胞では基質のリモデリングを亢進させることで力学的負荷に適応する能力が髄核細胞に比べて高い可能性が示唆された。

Elliott らは、げっ歯類の尾椎椎間板とヒト腰椎椎間板とで力学的特性が類似することを報告している[9]。我々はこれまで、ラット尾椎に創外固定器を用いて 1.3MPa の持続的な圧迫負荷を加え、圧迫期間に応じて段階的な椎間板変性が再現できることを報告してきた[10]。ヒト腰椎椎間板において 1.3MPa は、前屈位で荷物を持ち上げる際の内圧に相当するとされており[11]、本研究における動的圧迫刺激は比較的高負荷の条件であることが考えられる。一方、低負荷条件で行った我々の先行的研究では、動的圧迫刺激による生細胞率や MMP-3 の変化量が小さく、integrin α5β1 に対する阻害蛋白の効果を検出することが困難と考えられたため、本研究では 1.3MPa の条件を選択した。

【結論】

本研究の結果から、integrin α5β1 は細胞に加わった機械的刺激を受容し、特に髄核細胞の生存能や基質代謝に影響を及ぼすことで椎間板変性過程に関与する可能性が示された。髄核細胞と線維輪細胞はともに integrin α5β1 を発現していたが、動的圧迫刺激による変化は異なる傾向を示しており、今後は異なる力学的条件や integrin α5β1 と異なる力学的特性を有するメカノレセプターの検討も行うことで、機械的刺激による椎間板変性過程をさらに明らかにすることが可能と考えられた。

【文献】

1. Luoma, K., et al., *Low back pain in relation to lumbar disc degeneration.* Spine (Phila Pa 1976), 2000. **25**(4): p. 487-92.
2. Urban, J.P. and S. Roberts, *Degeneration of the intervertebral disc.* Arthritis Res Ther, 2003. **5**(3): p. 120-30.
3. Millward-Sadler, S.J., et al., *Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes.* J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 183-9.
4. Zhao, C.Q., et al., *The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration.* Ageing Res Rev, 2007. **6**(3): p. 247-61.
5. Maclean, J.J., et al., *Anabolic and catabolic mRNA levels of the intervertebral disc vary with the magnitude and frequency of in vivo dynamic compression.* J Orthop Res, 2004. **22**(6): p. 1193-200.
6. Yurube, T., et al., *Matrix metalloproteinase (MMP)-3 gene up-regulation in a rat tail compression loading-induced disc degeneration model.* J Orthop Res, 2010. **28**(8): p. 1026-32.
7. Masuda, K., et al., *A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration.* Spine (Phila Pa 1976), 2005. **30**(1): p. 5-14.
8. Le Maitre, C.L., et al., *Altered integrin mechanotransduction in human nucleus pulposus cells derived from degenerated discs.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(2): p. 460-9.
9. Elliott, D.M. and J.J. Sarver, *Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc.* Spine (Phila Pa 1976), 2004. **29**(7): p. 713-22.
10. Hirata, H., et al., *A rat tail temporary static compression model reproduces different stages of intervertebral disc degeneration with decreased notochordal cell phenotype.* J Orthop Res, 2014. **32**(3): p. 455-63.
11. Wilke, H.J., et al., *New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life.* Spine (Phila Pa 1976), 1999. **24**(8): p. 755-62.

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 2488 号	氏名	藏川拓外
論文題目 Title of Dissertation	**Functional Impact of Integrin α5β1 on the Homeostasis of Intervertebral Discs: A Study of Mechanotransduction Pathways Using a Novel Dynamic Loading Organ Culture System** **Integrin α5β1 は椎間板の組織恒常性維持に関与する：動的負荷培養装置を用いたメカノトランスダクション経路の検討**		
審査委員 Examiner	主 査 寺島俊雄 Chief Examiner 副 査 甲村英二 Vice-Examiner 副 査 錦織千佳子 Vice-Examiner		
審査終了日	平成 27 年 2 月 17 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【はじめに】椎間板変性は腰痛や神経痛をきたす脊椎変性疾患の主因と考えられている。その発生機序には椎間板組織にくり返し加わる機械的ストレスが関与しているとされ、この病態を理解することは椎間板変性を制御する、あるいは椎間板変性に対する治療戦略を考える上で不可欠であるが、椎間板変性に対する根本的治療はいまだ確立されていない。

研究者らのグループは機械的ストレスを受容し細胞内の生化学的反応に置換する分子、すなわちメカノレセプターの働きに注目し、メカノレセプターのひとつである integrin α5β1 の機能解析を通じて椎間板変性機序を明らかにするという新しいアプローチを試みた。

研究内容は新たな解析を行う実験モデルとして椎間板組織培養モデルの確立と、そのモデルを使用した integrin α5β1 の機能解析結果から構成されていた。

【方法】ラットの尾椎椎間板を組織単位で摘出し、これを動的負荷培養装置なる独自開発した装置で精密な圧迫負荷を加えながら組織培養する手法を用いた。実験群を 2 種類の力学条件（静置培養と 1.3 MPa 相当の動的負荷培養）、および 3 種類の培養液条件（標準培養液および integrin 阻害薬である GRGDSP 添加、陰性コントロール蛋白添加）からなる 6 群に分け、6 日間の培養実験を行った。

培養後の検体に対し、4 種類の解析が行われた。すなわち、1) 生細胞染色による生細胞率の評価（N=4）、2) 組織学的変性度の評価（N=4）、3) 免疫染色による integrin α5β1 発現の確認（N=2）、4) integrin α5β1、細胞外基質蛋白（aggrecan, type1/2 collagen）、および基質分解酵素（MMP-3/-13）についての mRNA 定量評価（N=6）である。解析は主に椎間板髄核に対して行われた。

【結果】免疫染色では全群で integrin α5β1 の発現が確認された。椎間板に対する動的圧迫負荷によって生じた変化は、生細胞率の低下（コントロー

ル群 92%に対し圧迫群 70%)、組織学的変性度の上昇（12 点中、コントロール群 4 点に対し圧迫群 7.6 点)、mRNA 定量における integrin α5β1 の増大（コントロール比 1.4-2.2 倍)及び MMP-3/MMP-13 の増大(コントロール比 1.7-2.2 倍）であった。圧迫負荷による変化のうち mRNA 定量における integrin α5β1 および MMP-3/MMP-13 の増大は integrin 阻害薬の添加により完全に抑制された。一方、生細胞率の低下（integrin 阻害薬＋圧迫群 80%）および組織学的変性度の上昇（integrin 阻害薬＋圧迫群 6.3 点）は部分的な抑制にとどまった。

【考察および結論】本研究で確認された機械的ストレスによる変化（生細胞率の低下、組織学的変性度の上昇、mRNA 定量における MMP-3/MMP-13 の増大）椎間板変性過程に特徴づけられる変化として、過去の研究でも確認されているものである。よって本研究の椎間板組織培養モデルは、機械的ストレスによる椎間板変性過程を観察できる有用性を認めるものと考えられた。一方、integrin α5β1 に対する阻害蛋白を用いることで機械的ストレスによる細胞死や基質分解酵素の発現量増大が抑制されており、integrin α5β1 による機械的ストレスの受容が椎間板変性過程の端緒のひとつとなっている可能性が示唆された。

本研究は、機械的ストレスが惹起する椎間板変性に対する抑制効果、治療的効果を研究したものであるが、従来行われていない integrin α5β1 メカノレセプターに対する阻害蛋白 GRGDSP の椎間板変性過程に対する抑制効果を、独自開発した椎間板組織培養モデルを用いて初めて証明した報告である。
機械的ストレスが誘導する椎間板変性に対してメカノレセプター阻害剤を用いることが、新たな治療アプローチと成り得ると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。