

主 論 文 要 旨

報 告 番 号	甲 ㊦ 第	号	氏 名	鈴 木 悟 士
主 論 文 題 名				
Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration (過剰な活性酸素種は椎間板変性の治療標的である)				
(内 容 の 要 旨)				
腰椎疾患の原因の一つに椎間板変性が挙げられ、日本の超高齢化に伴い腰椎疾患患者数は更に増大することが予想されるが、現在のところ、椎間板変性を抑制する有効な治療法は確立されていない。本研究の目的は、過剰な活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) が椎間板変性に与える影響を分子生物学的に解明し、抗酸化剤投与が椎間板変性に対する治療標的となりうるかを検討する事である。 ラット尾椎椎間板穿刺による椎間板変性モデルを用いて、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor-α (TNF-α)、interleukin-1β (IL-1β)、および代表的な酸化ストレスマーカーである nitrotyrosine の発現を免疫染色および Western blotting で検討したところ、穿刺後4週で TNF-α、IL-1β の発現上昇と共に nitrotyrosine の著明な発現を認めた。ヒト変性椎間板 においても同様の結果であり、更に椎間板変性の程度に比例して nitrotyrosine の発現量も上昇していた。 次に過剰な ROS が椎間板変性に与える影響を検証するため、過酸化水素 (H₂O₂) または細胞内グルタチオン合成阻害剤 buthionine sulfoximine (BSO) をラット培養線維輪細胞に添加し、real-time RT-PCR にて各遺伝子の発現の変動を測定したところ、濃度依存性に椎間板変性マーカーである TNF-α、matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)、cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現は上昇し、代表的な軟骨基質であるアグリカンの発現は低下していた。さらに、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤を添加する事によって COX-2 の mRNA 発現量は有意に抑制されたことから、ROS の下流シグナルとして MAPK を介している事が示唆された。また、ROS 添加による各遺伝子発現の変動は抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) および α-tocopherol (Vitamin E) の投与により有意に抑制された。 一方、炎症性サイトカイン TNF-α をラット培養線維輪細胞に添加したところ、細胞内 ROS は有意に上昇し、酸化ストレスのモニターとして OKD48 construct を用いて、ルシェフエラーゼアッセイを行ったところ、TNF-α 添加により有意に酸化ストレスが上昇した。更に TNF-α 添加により上昇した COX-2 およびアグリカンの mRNA 発現量の変動は NAC 投与により有意に抑制された。 最後に椎間板変性モデルにおいて NAC の有効性を検証したところ、穿刺後1週の線維輪における TNF-α およびアグリカンの mRNA 発現量の変動は、NAC 投与により有意に抑制され、穿刺4週の線維輪では nitrotyrosine の発現および p38 のリン酸化が有意に NAC 飲水群で抑制されていた。更に、穿刺8週で Magnetic Resonance Imaging (MRI) および組織学的検討を行ったところ、NAC 飲水群で T2 高輝度領域も有意に保たれ、髄核および線維輪の変性も抑制されていることが判明した。 以上の結果より、過剰な ROS は MAPK を介して椎間板変性マーカーの発現上昇やアグリカンの発現低下に関与し、更に、上昇した TNF-α 自体が細胞内 ROS および酸化ストレスを上昇させ、椎間板変性においては活性酸素と炎症性サイトカインの間で positive feedback loop を形成していることが分かった。更に、抗酸化剤投与はこれらの影響を、In vitro および In vivo においても抑制することが判明した。本研究より過剰な ROS は椎間板変性に関与し、抗酸化剤投与は椎間板変性に対する治療標的となりうると思われた。				