

氏名 (本籍)	福 田 章 二 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 869 号
学位授与日付	平成 23 年 10 月 19 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Abundance of calpain and aggrecan-cleavage products of calpain in degenerated human intervertebral discs
審査委員	(主査) 教授 清 島 満 (副査) 教授 武 内 康 雄 教授 長 岡 仁

論文内容の要旨

【目的、緒言】 椎間板の主要成分であるプロテオグリカン (特にアグリカン) は細胞外マトリックスとして普遍的に存在しており、特に椎間板においては水分保持能をもって粘弾性を与え、脊柱の可動性・支持性に貢献している。先行研究において、椎間板変性には生化学的変化、特に炎症反応が関わっており、その際にMMPやADAMTS等のプロテアーゼが椎間板のアグリカンを分解し、椎間板変性を進行させることが明らかとなっている。

カルパインとはカルシウムイオンで活性化される細胞内プロテアーゼで、組織普遍的に μ -カルパインとm-カルパインが認められ、さらに内因性カルパイン機能抑制物質であるカルパスタチンが存在する。当教室ではこれまでm-カルパインが関節軟骨に与える影響について研究を行ってきたが、近年m-カルパインによるアグリカン分解断片を特異的に認識する抗体である VPGVA⁷⁰⁹-A⁷¹⁰VPGVE (GVA 抗体) を作成し、関節軟骨変性とm-カルパインの関係を証明し発展させてきた。一方、関節軟骨と機能的・器質的に多くの共通点を有する椎間板におけるm-, μ -カルパインのはたらき、特に椎間板変性への関与についてはほとんど解明されていないことにより、本研究の着手に至った。関節軟骨同様、椎間板変性に両カルパインが関与するとなれば、変性椎間板において両カルパインの発現及びアグリカン分解断片が増加すると想定し、ヒトの各種椎間板を用いて解析を行った。

【対象と方法】 対象としたのは当院において胸・腰椎椎体間固定術を施行した55例 (平均年齢51.2±22.3歳)。腰椎変性疾患45例、特発性脊柱側弯症 (コントロール群) 5例および腰椎椎間板ヘルニア (LDH: Lumbar Disc Herniation) 5例である。椎間板標本はそれぞれ線維輪 (AF: Annulus Fibrous)、髄核 (NP: Nucleus Pulposus) を採取した。椎間板の変性進行分類として術前施行脊椎MRIを用いた (Thompson MRI grade; I~V群)。I, II群を低変性群、III, IV, V群を高変性群とした (I群:2例, II群:3例, III群:5例, IV群:35例, V群:10例)。各症例の椎間板における蛋白発現の検討をWestern blottingおよび蛍光イメージアナライザーを用いて行った。対象蛋白質はm-カルパイン、 μ -カルパイン、カルパスタチンである。さらにGVAに対する抗体を用いてその半定量分析を行うことにより、両カルパインと椎間板変性の関係を検討した。アグリカン断片測定をより安定して行うため、全患者椎間板サンプルに対してプロテオグリカン精製を行った。さらに、各蛋白の椎間板組織における局在を確認するために組織免疫学的検査を行った。椎間板標本は55例中の12例 (低変性群:5例, 高変性群:4例, LDH:3例)。AF・NP一体の椎間板組織標本を採取した。椎間板組織領域をNPおよびinnerAF, outerAFに分け、パラフィン切片を用いm-カルパイン、 μ -カルパイン、カルパスタチン、GVAに対する抗体で染色した。評価は各抗体に対する免疫陽性細胞の割合を計測した。統計学的手法は両変性群間の比較はStudent's t testを用いた。GVAに

よる蛋白定量は post-hoc Turkey Kramer test, 組織免疫染色の評価には Mann-Whitney U test, Wilcoxon paired sample test を行った。

【結果】 m-, μ -カルパイン, カルパスタチンにおける Western Blotting で, 低変性群に対して高変性群により多くの蛋白発現を認め, 定量分析では両カルパイン, カルパスタチンともに有意に高変性群に発現を認めた ($P < 0.001$)。AF と NP の間では有意な蛋白発現の変化は認めなかった。GVA においても両カルパイン同様, 高変性群の椎間板により多くの蛋白が発現し, 変性が進行するほど GVA をより多く認めた。Grade IV に対して Grade V が有意に高度の GVA 発現を認めた ($p < 0.05$)。さらに LDH では GVA が AF よりも NP に有意に多く発現し, 変性椎間板とは異なる傾向を示した ($p = 0.001$)。組織免疫染色において, 両カルパイン, カルパスタチン共に, 核と細胞質に存在しており, いずれの抗体を用いた椎間板組織標本でも NP と IAF 領域で低変性群に対して, 高変性群では有意に陽性細胞が多かった ($p < 0.05$)。GVA に対しても同様に NP と IAF 領域で高変性群および LDH で陽性細胞が有意に多かった ($p < 0.05$)。

【考察】 今回の実験で, m-, μ -カルパインおよびカルパスタチンがヒト椎間板に存在し, 変性の進行に伴いその発現が多く認められた。さらにアグリカン断片が m-カルパインの発現に伴って増加したことで, m-カルパインが MMP や ADAMTS と同様に椎間板変性に関与していることが明らかとなった。高変性椎間板において, GVA を変性 IV 群と比較して変性 V 群で有意に多く認めたことと, LDH においても両カルパイン及び GVA を多く認めたことは, 両カルパインによるマトリックス分解が椎間板変性という緩徐に進行するプロセスのみならず, 急性/亜急性のプロセスにおいても認められることを示唆する。同様に, カルパスタチンは変性の進行に伴い有意に多く発現した。これはカルパスタチンによる両カルパインに対する抑制機構が存在することが明らかとなり, それを逸脱したものが病的な変性に移行する可能性を示唆するものである。今後は両カルパイン発現について, 蛋白レベルだけでなく, m-RNA レベルでの検討が必要であると考えられる。

【結論】 ヒト椎間板において, m-, μ -カルパインと m-カルパインによるアグリカン分解断片がヒト椎間板内に存在し, それらは変性の進行と共に多くなることを認めた。これらの結果は, m-, μ -カルパインが椎間板変性に関連することを生化学的に裏付ける重要な知見である。また, 予防医学, 再生医学的な観点からは, カルパイン作用の抑制が椎間板変性予防, 椎間板再生に結びつき, 未来の腰痛治療につながる可能性を示唆するものであると思われる。

論文審査の結果の要旨

申請者 福田章二はヒト椎間板内にカルパイン, カルパスタチン, およびカルパインによるアグリカン分解断片が存在し, しかも各蛋白の量は椎間板の変性の度合いと相関していることを証明した。本研究の結果は椎間板変性の病態の一端を解明し, さらに椎間板変性の予防・治療につながることを期待される。これらの知見は脊椎外科学ならびに整形外科の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Shoji Fukuta, Kei Miyamoto, Kiichi Suzuki, Hideaki Maehara, Toshiyuki Inoue, Kenta Kikuike, Katsuji Shimizu: Abundance of Calpain and Aggrecan-Cleavage Products of Calpain in Degenerated Human Intervertebral Discs.

Osteoarthritis and Cartilage 19, 1254-1262 (2011)