

学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	佐野 友彦 <small>さのともひこ</small>
主論文の題名 Expression of the RANK/RANKL/OPG system in the human intervertebral disc: implication for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration			
主論文の要旨 【目的】近年、ヒト椎間板組織における receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK)とその ligand である RANKL、および RANKL のデコイレセプターとして働く osteoprotegerin (OPG)の発現が報告されており、それらと椎間板変性との関連性が報告されている。しかしながら、椎間板変性の進行に関連する catabolic factor (タンパク異化系因子) の発現に対する RANK/RANKL/OPG 系の影響は未だ不明である。本研究の目的は、ヒト椎間板細胞における RANK/RANKL/OPG 系の発現を検討すること、および RANK/RANKL/OPG 系の椎間板細胞における catabolic factor の発現への影響を評価することである。 【方法】脊椎手術により摘出した椎間板組織を線維輪 (Anulus Fibrosus; AF) と髄核 (Nucleus Pulposus; NP) に分け、酵素処理法により AF 細胞および NP 細胞を単離して単層培養した。免疫染色法および real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて RANK/RANKL/OPG 系の発現を確認、定量化した。次に、炎症性サイトカインによる RANK/RANKL/OPG 系の発現の変化を調べるため、遺伝子組み換えヒト interleukin-1 beta (rhIL-1 β) を椎間板細胞の培地へ投与した。椎間板細胞における RANK/RANKL/OPG 系の mRNA 発現量の変化を real-time PCR 法にて定量化した。続いて、RANKL シグナルが与える椎間板細胞による catabolic factors の発現量への影響を調べるため、椎間板細胞の培地へ遺伝子組み換えヒト RANKL (rhRANKL)、遺伝子組み換えヒト OPG (rhOPG)、および抗ヒト RANKL マウスモノクローナル抗体 (ahRANKL-mAB) を投与した。rhIL-1 β の存在下および非存在下で椎間板細胞における MMP-3、MMP-13、および IL-1 β の発現量の変化を enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) 法および real-time PCR 法を用いて比較した。 【結果】蛍光免疫組織染色および real-time PCR にて AF、NP 細胞の双方で RANK/RANKL/OPG 系の発現が確認された。RANKL および OPG の mRNA の発現量は AF 細胞に比較して NP 細胞で有意に高かった。rhIL-1 β の投与により、AF、NP 細胞の双方で RANK/RANKL/OPG の発現量が有意に増加した。RANKL 単独投与では AF、NP 細胞とも MMP-3、MMP-13、および IL-1 β の発現に有意な変化は生じなかったが、rhIL-1 β の存在下で RANKL を追加投与することにより MMP-3、MMP-13、および IL-1 β の発現が増加した。一方で、OPG および ahRANKL-mAB の投与により、rhIL-1 β の刺激で増加した MMP-3、MMP-13、および IL-1 β の発現が AF、NP 細胞の双方で抑制された。 【考察】AF 細胞に比して、NP 細胞における RANK/RANKL/OPG 系の発現が高かったことから、			

同系の基礎代謝活性は NP 細胞において高いことが示唆された。また、炎症性サイトカインである IL-1 β の投与により RANK/RANKL/OPG 系の発現が増強されたことから、炎症環境下では同系の発現が上昇することが明らかになった。続いて、IL-1 β の存在下で RANKL を投与することにより、椎間板細胞における catabolic factor の発現が増強されたことから、炎症環境下において RANKL は椎間板変性の進行に関与する可能性が示唆された。一方で、IL-1 β の存在下において、OPG および抗 RANKL 抗体の投与が catabolic factors の発現を抑制したことから、RANKL シグナルの制御により椎間板変性の進行が抑制できる可能性が考えられた。

【結論】本研究結果により、RANK/RANKL/OPG 系が椎間板変性進行に関与している可能性が示された。また、抗 RANKL 抗体および OPG を用いて RANKL シグナルを抑制することにより、椎間板変性進行を抑制できる可能性が示唆された。