

# 学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	乙 三重大学大学院医学系研究科 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	やまだ じゅんいち 山田 淳一
主論文の題名 Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human intervertebral disc			
主論文の要旨 【目的】 椎間板はプロテオグリカンと水分に富んだ髄核(NP)を線維性組織である線維輪(AF)が囲み構成されており、椎体間の衝撃を緩和する重要な組織である。椎間板変性と腰痛には強い関連性があり、変性椎間板で亢進する炎症性サイトカインの発現が椎間板変性を進行させ、さらに椎間板性疼痛の発現に関与すると考えられている。そのメカニズムの一つとして、炎症性サイトカインにより刺激された神経栄養因子の発現は無神経組織である椎間板への神経伸張や末梢性および中枢性感作に寄与することで椎間板性疼痛を誘発すると考えられている。神経栄養因子は nerve growth factor (NGF)、brain derived neurotrophic factor (BDNF)などの Neurotrophins family と Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) などの GDNF Family ligands (GFLs) family に分類される。Transforming Growth Factor (TGF) superfamily に属する GDNF は Neurotrophins family と同様に中枢・末梢神経系の発達、維持に関与する。また、神経系以外の組織においても発現し、疼痛伝達に関与すると考えられている。NGF などの Neurotrophins family はヒト椎間板での発現し、炎症性サイトカイン刺激により発現が亢進するため、椎間板性疼痛に関与していると考えられている。しかし、ヒト椎間板に GDNF 及びその受容体が発現するかは調べられていない。 本研究の目的はヒト椎間板における GDNF 及びその受容体 GDNF family receptor (GFR) $\alpha 1$ 、rearranged during transfection (RET)の発現を調べ、炎症性サイトカイン刺激による発現の変化、組織変性度による発現の違いを検討することである。 【方法】 ① ヒト椎間板細胞における GDNF 及びその受容体の免疫組織学的検討：腰椎手術で得られたヒト椎間板組織を線維輪(AF)及び、髄核(NP)に分離し単層培養を行った。培養細胞における GDNF 及びその受容体のタンパク発現は蛍光免疫組織学的手法を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。 ② ヒト椎間板細胞を用いた Western blot 法：ヒト椎間板細胞における GDNF 及びその受容体のタンパク発現を Western blot 法にて検討した。 ③ GDNF 及びその受容体の mRNA 発現の検討：ヒト AF、NP 細胞の単層培養後 real			

time-Polymerase Chain Reaction (PCR)法を用いて GDNF 及びその受容体の mRNA 発現を検討した

- ④ IL-1 $\beta$  による GDNF 及びその受容体の mRNA 発現の変化の検討：前培養の後 (0.01、0.1、1.0、10 ng/ml) 存在下にヒト椎間板細胞を培養し、GDNF 及びその受容体の mRNA 発現量を real time-PCR 法にて評価した。
- ⑤ ヒト椎間板組織での変性度の違いによる GDNF 及びその受容体の発現量の検討：腰椎手術時に摘出したヒト椎間板組織 (Pfirrmann grade 2-4) を用いた。Pfirrmann grade 2 および 3 を変性初期群、grade 4 を変性進行群とした。パラフィン切片を作製し、抗 GDNF、GFR $\alpha$ 1、RET 抗体を用いて組織免疫染色を行い、AF、NP 領域での細胞陽性率を両群間で比較検討した。

#### 【結果】

- ① 蛍光免疫組織学的手法にて培養椎間板 AF、NP 細胞における GDNF、GFR $\alpha$ 1、RET のタンパク発現が確認された。
- ② Western blot 法にて、培養椎間板 AF、NP 細胞における GDNF、GFR $\alpha$ 1、RET のタンパク発現を single band 形成にて確認した。
- ③ Real time-PCR 法にて培養椎間板 AF、NP 細胞における GDNF、GFR $\alpha$ 1、RET の mRNA 発現を確認した。mRNA 発現量は AF、NP 間で有意差はなかった。
- ④ GDNF の mRNA 発現量は AF、NP とも IL-1 $\beta$  濃度依存的に上昇し、GDNF:10 ng/ml 群で AF、NP ともに対照群に対して統計学的な有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。一方、GFR $\alpha$ 1、RET の mRNA 発現量は IL-1 $\beta$  刺激による明らかな変化を示さなかった。
- ⑤ ヒト椎間板組織の変性進行群では AF 及び NP 領域ともに GDNF 陽性細胞率が変性初期群と比較し、統計学的に有意に高かった ( $P < 0.05$ ) が、GFR $\alpha$ 1、RET では両群間の有意差を認めなかった。

#### 【考察及び結論】

本研究では初めてヒト椎間板において GDNF とその受容体の発現を確認した。AF、NP 細胞における GDNF の mRNA 発現は IL-1 $\beta$  刺激により促進されたが、受容体の mRNA 発現の変化はなかった。同様に変性進行群の AF 及び NP 組織では GDNF 発現が亢進していた。

炎症性サイトカインが異常発現している変性椎間板内の微小環境下では、GDNF の発現が増強していることが考えられる。GDNF は神経伸長に参与するほか、末梢組織での疼痛発現に参与するタンパク質であり、GDNF の腰椎椎間板変性での発現は腰痛の発症に参与している可能性がある。