

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	岩崎 竜也 いわさき りゅうや
<p>主論文の題名</p> <p>Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Ligands in Human Intervertebral Discs</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】</p> <p>腰痛は日常生活やQOLを低下させる主な健康障害の一つである。椎間板変性は腰痛と強い関連性があると報告されており、椎間板内での炎症性サイトカインや神経栄養因子の発現の増強が疼痛に関与していると考えられている。グリア細胞由来神経栄養因子(Glial-cell-line-derived neurotrophic factor: GDNF)ファミリーは神経栄養因子の一つであり、細胞の分化、神経の伸長・生存など生体内の様々な細胞の生物学的プロセスに関与し、皮膚、筋、骨などの様々な組織で発現して炎症性疼痛に関与すると報告されている。我々は過去の研究で、ヒト椎間板におけるGDNFとそのレセプターであるGDNF family receptor alpha(GFRA)1および、膜貫通タンパクであるrearranged during transfection(RET)の発現を報告した。さらに変性椎間板組織においても、GDNFおよびGFRA1の発現が有意に上昇していることを報告した。本研究ではヒト椎間板における、その他のGDNFファミリーのリガンドであるneurturin(NRTN)、artemin(ARTN)、persephin(PSPN)とそれらに対応するレセプターのGFRA2、GFRA3、GFRA4の発現を評価した。</p> <p>【方法】</p> <p>腰椎手術にて採取したヒト椎間板組織を髄核(NP)と線維輪(AF)に分離後、単層培養を行った。全てのリガンドとレセプターのmRNAの発現を、定量的PCRを用いて評価し、IL-1β投与下(0.1, 1, 10ng/ml)のmRNAの発現量の変化を評価した。また免疫組織染色とWestern Blot(WB)法でそれらの蛋白発現を評価した。さらにヒト椎間板組織をMRI(Pfirrmann分類)にて変性初期(ED)群と変性進行期(AD)群に分類し、NP、AFにおける発現を免疫組織学的に評価して、その陽性細胞率を比較検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>定量的 PCR にてヒト椎間板細胞での NRTN、ARTN、PSPN とレセプターの GFRA2、GFRA3、GFRA4 の mRNA の発現を認めた。ARTN、PSPN、GFRA2 の mRNA の発現は IL-1β の投与下で濃度依存的に上昇した。また WB 法で、NRTN(65kD)、ARTN(24kD)、PSPN(31kD)、</p>			

GFRA2(46kD)、GFRA3(72kD)、GFRA4(50kD)の蛋白発現を認めた。免疫組織染色では AF と NP において、ED 群、AD 群の両方で、NRTN、ARTN、PSPN、GFRA3、GFRA4 の免疫陽性細胞を認めた。さらに ARTN の AF と NP、PSPN の AF、GFRA2 の NP で免疫陽性細胞の割合が ED 群と比較し AD 群で有意に高かった。

【考察】

本研究ではヒト椎間板において NRTN、ARTN、PSPN とそのレセプターである GFRA2、GFRA3、GFRA4 の mRNA の発現を認めた。炎症性サイトカインが豊富な環境を模倣するために IL-1 β 投与下での mRNA の発現量の変化を評価したところ ARTN、PSPN、GFRA2 は濃度依存的に mRNA の発現量が上昇した。また、それらの免疫陽性細胞の割合は ED 群と比較し、AD 群で有意に上昇しており、ARTN、PSPN、GFRA2 が変性椎間板に多く存在することが示された。本研究では ARTN と PSPN の発現細胞の割合が変性椎間板組織で有意に上昇していたが、対応するレセプターの GFRA3 と GFRA4 は上昇していなかった。逆に NRTN の発現は上昇しなかったが、GFRA2 の割合は有意に上昇していた。リガンドと受容体の mRNA の発現の変化は領域および細胞特異的であり、互いに独立して発現するとの報告もあり、ヒト椎間板組織における GDNF ファミリーリガンドと受容体の発現は互いに独立して変化している可能性を考えた。

また、炎症性骨痛に関する報告では、ARTN/GFRA3 のシグナル伝達経路を介したペプチド作動性ニューロンの活性化と感作が関連しているとされ GDNF ファミリーが骨痛に関連するとされている。本研究と我々の過去の研究から、ヒト椎間板組織の AF と NP において 50%以上が GDNF と ARTN を発現し、椎間板が変性するとともに発現割合が上昇することから、GDNF と ARTN がヒト椎間板組織最外層に分布している感覚神経終末を感作し、椎間板性腰痛の発生に寄与する可能性が示唆された。以上より、GDNF ファミリーのリガンドの制御が椎間板性腰痛の新たな治療法となる可能性が考えられた。