

学位論文の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 生命医科学専攻 病態解明医学講座 腫瘍集学治療学分野	氏 名	森 本 亮
<p>主論文の題名</p> <p style="text-align: center;">Tissue Renin-Angiotensin System in the Intervertebral Disc</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】</p> <p>椎間板変性と腰痛との関連性が指摘されており、その進行は脊柱管狭窄などの脊椎変性疾患を惹起すると考えられている。しかし、椎間板変性の原因、病態に関しては解明されていない点が多い。生化学的な解析では椎間板変性が進行するとプロテオグリカンやII型コラーゲンの減少やI型コラーゲンの増加を来とし組織の線維化が生じていることが知られている。</p> <p>レニン-アンギオテンシン系は循環器系において重要な役割を担っており、最終産物であるアンギオテンシン II は血圧や血流量の恒常性を制御において重要なホルモンとして知られている。一方、アンギオテンシン II は局所の炎症や線維化に関与していることも報告されている。近年、組織内においてレニン-アンギオテンシン系（以下 tRAS）が存在することが報告され、動脈硬化や腎線維症などの退行性、炎症性疾患の病態に大きく関与することが報告されている。しかし、椎間板組織における tRAS の発現とその意義に関しては解明されていない。</p> <p>本研究の目的は椎間板組織内に tRAS が存在するかを確認し、tRAS の活性化に対する椎間板細胞の細胞増殖活性及び基質代謝の影響を検討することである。</p> <p>【対象と方法】</p> <p><u>細胞培養</u>: 12週齢のSprague-Dawleyラットの腰椎椎間板から線維輪 (AF) 及び髄核 (NP) を別々に摘出し、酵素処理にて細胞を単離し培養した。また、15-18月齢のウシの尾の椎間板からも同様にAF細胞及びNP細胞を単離し培養を行った。</p> <p><u>Real-time PCR解析</u>: ラット椎間板細胞からmRNAを単離し、TaqMan Gene Expression Assayにて定量的real-time PCRを行った。以下の遺伝子に関して定量的評価を行った。(アンギオテンシノゲン、レニン、アンギオテンシン変換酵素(以下ACE)、アンギオテンシンII受容体1型(以下AT1)及び2型(以下AT2)、カテプシンD)。</p> <p><u>免疫組織学的解析</u>: ラット及びウシの椎間板細胞の免疫組織学的解析を以下の抗体を用いてを行った。(抗ACE抗体、抗AT1抗体、抗AT2抗体、抗アンギオテンシンII抗体、抗カテプシンD抗体)。またラット椎間板組織においても免疫組織学的解析を行い、同様の抗体を使用した。</p>			

細胞増殖活性：AF, NP細胞をアンジオテンシンII ペプチド存在下にて培養し、細胞増殖活性を評価した(MTS法)。

基質代謝解析：ラット椎間板細胞におけるアンジオテンシンIIペプチドの基質合成への影響を定量的real-time PCR法にて検討した。I型及びII型コラーゲン、アグリカン、TGF- β 、IGF-1、IL-1 β 、MMP-3、MMP-13、ADAMTS-5 の mRNA発現レベルを定量化した。

【結果】

ラットAF及びNP細胞においてレニンを除くtRASシグナルの各成分（アンジオテンシノゲン、ACE、AT1、AT2）のmRNAの発現を確認した。レニンに代わり、レニン類似生体活性を有するカテプシンDの発現が確認された。免疫組織学的検討では、ラットおよびウシ椎間板細胞にtRAS各成分(カテプシンDを含む)の発現を認めた。同様にウシ椎間板細胞においてもtRASの各成分が発現していることが判明した。ラット椎間板細胞をアンジオテンシンIIペプチド存在下に培養することにより細胞増殖活性は増加傾向にあった。また、アンジオテンシンIIペプチドの刺激により1型及び2型コラーゲン、アグリカン、TGF- β 、IGF-1、ADAMTS-5 の mRNA発現は増加傾向を示したが、IL-1 β 、MMP-3 及びMMP-13 の mRNA発現は有意な変化が認められなかった。

【結論】

今回我々はラット椎間板に tRAS 成分が mRNA レベル及びタンパクレベルにおいて発現することを確認した。さらにウシ椎間板においても tRAS 成分の発現がタンパクレベルにおいて発現することが確認された。椎間板細胞においてアンジオテンシン II の刺激が、軽度な反応ではあるが細胞増殖および細胞外基質の合成を促進する傾向にあるということが判明したことにより、理論上、tRAS は椎間板内でシグナルが活性化され、基質代謝を刺激する可能性が示唆された。