

論文内容要旨

論文題目

Absence of epiphykan/biglycan accelerates the degenerative
process in mouse intervertebral disc

(エピフィカン/バイグライカンの欠損は

マウス椎間板の変性過程を加速する)

責任分野： 運動機能再建・回復学 分野

氏 名： 古 川 孝 志

【内容要旨】(1,200 字以内)

【背景】腰痛と椎間板変性の関係はいまだ不明である。しかし、有痛性の椎間板ヘルニアや脊柱管狭窄症などの疾患は、高度の椎間板変性が原因となっている可能性は高い。病的な椎間板の変性過程を観察すると、それは加齢による変化と類似しており、高度の椎間板変性は加齢変化の早期発症とも考えられている。椎間板は関節軟骨類似組織から構成されており細胞外基質の主成分は collagen と proteoglycan である。その proteoglycan の中には、ロイシンとアスパラギンが一定位置に繰り返し並んだ配列のコア蛋白質を持つ分子量サイズの小さい proteoglycan が存在し、small leucine rich repeat proteoglycan (SLRP) family を形成している。この family のメンバーである biglycan (Bgn) と epiphykan (Epn) の欠損が関節軟骨の変性を招来することが知られている。そこで、我々は遺伝的にこれらの分子が欠損している動物の椎間板では、通常より変性が加速するかどうかを検証するために、Epn, Bgn をそれぞれ単独に欠損したマウス (Epn^{-/-}, Bgn^{-/-}) 及び両方を欠損したマウス (Epn^{-/-} Bgn^{-/-}) の椎間板を組織学的に検討した。【方法】wild type 15 匹、Epn^{-/-} 15 匹、Bgn^{-/-} 15 匹と Epn^{-/-}/Bgn^{-/-} 15 匹から生後 4、6、9 ヶ月に各群 5 匹ずつ計 60 脊椎を採取した。標本は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、20% EDTA で 2 週間脱灰した。パラフィン包埋後、3 μm の脊椎正中矢状面スライスを作製し H.E 染色と Alcian blue-PAS 染色を行った。観察椎間板は L1/2 高位とし椎間板変性評価は Boos のスコアを用いて、検者 2 人による二重盲検法で行った。統計学的処理は分散分析及び Post Hoc test に Fisher' PLSD を用いた。また 2 要因分散分析は遺伝子型と椎間板の部位 (髄核・線維輪と軟骨終板) の 2 要因で変性スコアに与える影響を調べた。p<0.05 を有意水準とした。【結果】組織学的所見では 4 ヶ月齢の Bgn^{-/-} 群と Epn^{-/-}/Bgn^{-/-} 群では線維輪に軟骨様細胞の増殖変化を認めた。6 ヶ月齢ではすべての遺伝子変異マウスで明らかな変性変化を認め、特に Bgn^{-/-} 群と Epn^{-/-}/Bgn^{-/-} 群では髄核の脊索細胞は早期に消失し、かわって軟骨様細胞が増殖していた。この髄核の軟骨様細胞は 9 ヶ月齢になると著明に減少していた。また、Epn^{-/-}/Bgn^{-/-} 群では髄核が脱出している椎間板ヘルニアが高率に認められた。椎間板変性評価では、Bgn^{-/-} 群と Epn^{-/-}/Bgn^{-/-} 群の変性は、wild 群、Epn^{-/-} 群より早期に出現していた。また Bgn^{-/-} 群と Epn^{-/-}/Bgn^{-/-} 群の変性程度は、wild 群、Epn^{-/-} 群より有意に高かった。軟骨終板の変性より髄核・線維輪の変性の程度が椎間板全体の変性スコアに強く影響していた。【考察】Epn と Bgn の遺伝的欠損は椎間板の変性時期や、程度に大きく影響した。つまり椎間板の変性時期は Epn^{-/-}/Bgn^{-/-}, Bgn^{-/-}, Epn^{-/-} の順に早く出現し、変性の程度もこの順で高度になった。SLRP は関節軟骨の細胞外基質で collagen どうしを架橋する接着蛋白として働いている。また、SLRP は成長因子である TGF β と細胞外基質で結合し TGF β を介する基質の修復反応を制御している。従って SLRP の欠損は細胞外基質の構造不安定性や修復反応の低下を招来する可能性がある。【結論】Epn, Bgn は椎間板の細胞外マトリックスの恒常性の維持に大きな役割を担っており、その欠損は椎間板の変性を大きく加速させる。

平成20年1月25日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 古川孝志

報告書題目： Epiphycan/Biglycan の欠損がマウス椎間板の加齢に与える影響

審査委員：主審査委員

副審査委員

副審査委員

内藤 輝
本山 第一
細矢 貴亮



審査終了日：平成20年1月18日

【 論文審査結果要旨 】

椎間板は椎体を連結し脊柱の支持性や運動性を担う。髄核、線維輪、軟骨終板で構成され、加齢などにより恒常性が崩れると変性が始まり、進行するとヘルニアや変形性脊椎症などの疾患に至る。biglycan (Bgn) と epiphycan (Epn) は小分子量のプロテオグリカンであり、骨、関節軟骨、靱帯などの形成・維持に関与する。申請者は、これらの分子が椎間板の加齢に及ぼす影響について、遺伝子欠損動物を用いて検討した。

生後4、6、9カ月の wild type (WT)、Epn 欠損 (Epn^{-/-})、Bgn 欠損 (Bgn^{-/-})、二重欠損マウス (Epn^{-/-}/Bgn^{-/-}) 各群5匹から計60脊椎を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、20% EDTA で2週間脱灰し、パラフィン包埋後、矢状切片を作製し、HE染色と Alcian blue-PAS 染色を施し、顕微鏡観察を行った。

その結果、生後4カ月では、WTとEpn^{-/-}群の椎間板には差は認められず、Bgn^{-/-}とEpn^{-/-}/Bgn^{-/-}群の線維輪と軟骨終板に軟骨細胞の増殖、Bgn^{-/-}群とEpn^{-/-}/Bgn^{-/-}群軟骨終板に骨形成が認められるようになること、6カ月では、WTとEpn^{-/-}群の線維輪と軟骨終板に軟骨細胞の増殖がみられるようになり、Bgn^{-/-}群とEpn^{-/-}/Bgn^{-/-}群の線維輪に軟骨細胞の減少と細胞外基質の蓄積、髄核に脊索細胞の減少と軟骨様細胞の増殖、増殖した軟骨様細胞の減少とその部位の細胞外基質とムコ多糖の蓄積、蓄積した基質の裂け目や割れ目、軟骨終板に軟骨細胞の減少と4カ月に比べ進行した骨形成がみられるようになること、9ヶ月では、WTとEpn^{-/-}群は6ヶ月とほぼ同じであるが、Bgn^{-/-}とEpn^{-/-}/Bgn^{-/-}群では6ヶ月に比べ髄核の軟骨様細胞の数のさらなる減少と細胞外基質の蓄積、軟骨終板にさらに進行した骨形成がみられるようになること、どの月齢でもBgn^{-/-}群に比べEpn^{-/-}/Bgn^{-/-}群の方にやや先行した組織像が認められることなどを明らかにした。

以上の結果から、申請者は、BgnとEpnは加齢に伴う椎間板の恒常性の維持に機能するが、Bgnの方がEpnに比べより重要な機能を果たしていると考察した。

本審査委員会は、本研究が厳密な手法で行われ、得られた結果の解釈も妥当であり、椎間板の加齢の解明に寄与すると評価した。従って、本論文が学位修得に十分に値すると結論した。

(1, 200字以内)