特集●腰痛疾患に対する interventional therapy—現在から未来へ—

腰痛性疾患に対する分子生物学的治療の可能性

西田康太郎 前野耕一郎 角谷賢一郎 由留部 崇
張 鐘穎 黒坂 昌弘 土井田 稔

Key words ■ 椎間板(Intervertebral disc), RNA 干渉(RNA interference),
遺伝子治療(Gene Therapy)

要旨: 腰痛とそれに関連する疾患群は社会的にもいまだ重要な位置を占める。その原因の一つとして、椎間板の変性に由来するものが考えられているが、病態など不明の部分も多い。分子生物学的アプローチによる椎間板再生の研究は、当初増殖因子と呼ばれる蛋白質を用いた報告から始まり、これらをコードする遺伝子を直接細胞内に運び、細胞自身に蛋白質を持続的に産生させようという遺伝子治療、さらには幹細胞などを用いた細胞療法への広がりを見せている。遺伝子治療の分野では、ウイルスベクターを用いない方法が応用され、RNA 干渉と呼ばれる方法を用いて椎間板の変性を促進する因子を抑制することによって変性過程を遅らせるといった、より安全かつ予防的・長期的な観点からの治療が中心になろうとしている。

Summary

Low back pain and associated spinal disorders are formidable problem. Although disc degeneration is believed to be one of the major causes of low back pain, patho-mechanisms are still unknown. Biological approaches to regenerating these pathological discs started by using proteins so called growth factors. To overcome relative short duration of growth factors effects, transfer the genes encoding these growth factors to the disc cells was developed. Furthermore, cell therapy is recently reported using, for example, "stem cells". Within gene therapy fields, developments were attempted to use non-viral vectors and the RNA interference technique to continuously down regulate the harmful genes for normal physiology of the discs, so that we can expect more prophylactic effect such as delay the process of disc degeneration or regenerating disc in a long periods.

緒 言

近年大きく発展してきた椎間固定術をはじめ

めとする手術的治療は、少なくとも短期的には十分効果的であり、多くの患者の苦痛を救済してきた。さらにインスツルメントの使用

図1 遺伝子治療の概念図(文献12より改変)

目的とする蛋白あるいはRNAをコードする遺伝子を細胞内に導入することで、遺伝子操作された細胞は目的とする蛋白あるいはRNAを持続的に産生するようになる。したがって、より安定した持続的な生物学的効果を得ることを目標とする。

は入院期間や外固定の軽減、ダイナミックな矯正や骨癒合率の上昇を可能にし、現在では不可欠であるといっても過言ではない。一方で高額なインプラントを要することや、固定隣接椎間障害の問題、感染、さらには骨粗鬆症の患者に対してはどうするかなど、多くの問題点も明らかになっている。こういった反省点から、昨今の脊椎外科の流れはこれらの固定術をなるべく小さい侵襲で行うことや、さらに一步踏み込んで固定を避ける術式の開発、固定をしても隣接椎間の障害をきたしにくくする工夫、例えばsemi-rigidの固定などが考案されている。分子生物学的アプローチによって椎間板の再生あるいは変性を抑制しようという試みは、これらの新たな試みのはるか延長線上にあるといつてよい。本稿では、変性椎間板に対する分子生物学的アプローチの最近の発展や考え方の変遷、これからの展望などについて論述したい。

I. 椎間板に対する分子生物学的アプローチ

変性した椎間板を再生しようとする試みは、1991年Thompsonらが増殖因子を用いて、プロテオグリカンやコラーゲンといった

椎間板にとって重要な細胞外基質の合成を促進することができることを証明して以来¹⁵⁾、多数報告されるようになった。1997年ごろからは、これら増殖因子といった蛋白質が、生体内で比較的不安定であるという欠点を克服する目的で、それをコードする遺伝子そのものを細胞内へ運び(遺伝子導入)、細胞を遺伝子操作することによって、これらの細胞から持続的に目的とする蛋白質やRNAを産生させ安定した効果を得ようという試み、つまり遺伝子治療の報告も散見されるようになった(図1)¹²⁾。

椎間板に対する遺伝子治療は、1998年には生体内(*in vivo*)での最初の成功例が報告され、比較的長期間の導入遺伝子発現が可能であることも示された⁹⁾。翌年1999年には増殖因子の一つ、Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)をコードする遺伝子を生体内で椎間板細胞へ導入することによって、プロテオグリカンの合成能を約2倍に促進することが可能であることが報告されている¹⁰⁾。これらの例はアデノウイルスをベクターとして用いた方法であったが、さらにその後も宿主の免疫反応を起こしにくく、毒性も低いとされるアデノ随伴ウイルス(AAV)

表1 これまでに報告された導入遺伝子

増殖因子

TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)

GDF-5 (growth and differentiation factor-5)

BMP-2 (bone morphogenetic proteins-2)

転写因子

Sox-9 (Sry-type high-mobility-group box transcription factor-9)

阻害因子

IL-1Ra (interleukin-1 receptor antagonist)

TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases)

その他

hTERT (human telomerase reverse transcriptase)

を用いた報告や、昆虫のウイルスであるバキュロウイルスを用いたものが報告されている¹²⁾。私共は、ウイルスベクターを用いた際の安全性の問題やコストの問題を解決すべく、ウイルスを用いない超音波コントラスト法を椎間板に応用し、長期間の導入遺伝子発現が可能であることを報告した¹¹⁾。

導入された遺伝子の種類も多岐にわたり、先述のTGF- β 1に始まり、GDF-5やBMP-2といった増殖因子、Sox-9といった転写因子、さらには炎症性サイトカインであるIL-1 β の効果を競合的に阻害するIL-1Raと呼ばれるものや、細胞の老化に関連した因子に関連するものなどが報告されている(表1)¹²⁾。いずれも一定の効果をあげているが、残念ながら遺伝子治療によって変性した椎間板を再生できたとする報告はまだ見当たらない。

一方、これまでに増殖因子Osteogenic protein-1 (OP-1)⁷⁾、GDF-5¹⁾の直接的な椎間板内注入、あるいは自己血小板由来の増殖因子の効果を比較的長期間維持する目的で、特殊なキャリアとともに椎間板内へ注入することで、外傷によって変性したラットや家兎

椎間板の再生が可能であったことが報告されている⁸⁾。さらに骨髓由来の間葉系幹細胞を用いても、同様に椎間板の再生が可能であったと報告されるようになった¹³⁾。これらの報告は、使用された椎間板変性モデルが適当かどうかとする議論はあるとしても、これまで椎間板再生は不可能とされてきた状況を考慮すると大きな進歩といえる。ヒトに対する治療も一部では始まっているようであるが、現時点での結果は筆者の知る限り報告はない。

II. 椎間板再生における障壁

Thompsonらの報告に始まり、20年近くが経過しようとしているのに、いまだに変性椎間板の再生が難しいとされる理由は何であろうか？考えられる理由はいくつかあるが、その最大の原因として椎間板そのものの解剖生理学的特徴があげられる。椎間板は人体最大の無血管組織であり、特に髄核は厚い線維輪と軟骨終板によって囲まれた構造となっている。椎間板内部への栄養や酸素の供給は、軟骨終板近傍の盲端状小血管(capillary buds)からの拡散がメインであり、したがっ

図2 siRNAによるRNA干渉(文献5より改変)

細胞内で形成された siRNA- 蛋白複合体 RISC が、標的とする mRNA に配列特異的に結合することでこれを分断し、遺伝子発現を抑制する。RISC は細胞内で安定しており、再利用されることで効率よく遺伝子発現が抑制される。

て中心部へいくほど低酸素、低栄養の傾向が強まる³⁾。低酸素状態の代謝により乳酸が産生され、pHは大きく酸性に傾いている。さらに髄核に豊富に含まれるプロテオグリカンの性質により水分を強力に吸収する結果、椎間板内部は高压に維持されている。このような生命体にとっては極めて生存することが困難な環境下にあっても髄核細胞が生存していることは、これがその環境に適応すべく高度に分化した細胞であることを示唆している。しかし、髄核細胞の活動性そのものは極めて低く、分裂能や代謝活性が非常に低く維持されているとともに、その細胞密度も低い。これは厳しい環境下で髄核細胞が生存するための必然であるとともに結果であるともいえる。組織が再生あるいは修復されるためには、多くの活発な細胞やこれらを維持する十分な酸素や栄養の供給が絶対的に必要であり、し

たがって椎間板のこのような状況下では、少なくとも短期間に再生を促すことは困難であることは想像に難くない。

さらには椎間板変性の過程は緩徐な経過をたどることもあって、臨床を良く反映した動物モデルの作成が極めて難しい点も問題となろう。これまでも多くの椎間板変性のモデルが報告されているが、完璧なものは存在しない。その扱いやすさやコストの観点から、多くはラットや家兎といった齧歯類を用いたものである。近年の報告では齧歯類においてはヒトの場合と異なり、脊索細胞が成獣の椎間板にも存在する、いわゆる notochordal discを持つ動物であるとされている。これらの notochordal discにおいては、細胞の密度が高く、その代謝能もヒトなどの non-notochordal discを持つ動物と比較すると、圧倒的に高いことが報告されている⁶⁾。したがっ

図3 ホタルルシフェラーゼに対する *in vivo* での遺伝子発現抑制効果 (文献 14 より改変)
対照群と比較して少なくとも約半年 (24 週) 以上の遺伝子発現抑制効果が認められた。

て、外傷によって導入した齧歯類の椎間板変性モデルは、最も椎間板再生がしやすいモデルであるということが出来るかもしれない。先述のとおり、この変性椎間板モデルを用いて再生が可能になったことは大きな一歩であることには間違いないが、上記の意味合いからすると臨床とはまだ隔たりが大きく、これらの結果をそのままヒトに当てはめることには無理があると考えるべきであろう。今後の研究発表を待ちたいところである。

Ⅲ. RNA 干渉

前述の椎間板における障壁を克服するためには、代謝活性を高め、基質の合成を促すような、酸素や栄養の多大な供給を必要とする方法には限界があると思われる。したがって、骨粗鬆症に対する治療が奏効しているように、椎間板の変性を促進する因子を抑制することによって変性の過程を遅らせる、あるいは再生を促すといった、やや予防的な見地に立った方法の方が椎間板の理に適っているとの考えに至った。そこで私どもは RNA 干渉に着目し、これを椎間板に应用すべく研究

を開始した。

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) は、1988 年に初めて報告されたもので、二本鎖 RNA によって配列特異的に、対象となる mRNA が分解され、結果として遺伝子発現が抑制 (ノックダウンあるいはサイレンシング) される現象である (図 2)。2001 年 Elbashir らは、人工的に合成した 21 ~ 23 塩基の短い二本鎖 RNA (short interfering RNA/ siRNA) を用いることで、哺乳動物細胞においても RNA 干渉を誘導することに成功した²⁾。それ以来、この siRNA を用いた RNA 干渉は、その簡便さと配列特異性、遺伝子発現抑制効果の高さから爆発的に浸透し、現在までは困難であった特定の遺伝子解析への応用や、病原遺伝子の抑制による遺伝子治療への応用などへの広がりをみせている。

私共は、siRNA を髄核細胞に遺伝子導入することで、RNAi 現象を引き起こすことが可能であることを証明し、報告してきた。共著者の Kakutani らは *in vitro* の実験で、椎間板由来細胞における RNAi を初めて報告した⁵⁾。

図4 椎間板変性モデルにおける MMP-3 発現

ラット尾椎静的圧迫モデルにおいて、MMP-3をはじめとした基質を分解する因子の遺伝子発現が変性ととも増加していた。一方、基質を合成する因子の遺伝子発現は減少し、基質の合成と分解の間には分解が相対的に優位となる不均衡が存在していることが確認された。

Suzukiらは、先述のウイルスベクターを用いない超音波コントラスト法を用いて *in vivo* においても siRNA を髄核細胞に遺伝子導入することが可能であることを証明した¹⁴⁾。さらに通常の細胞であれば数週間程度の効果しか得られないところを、椎間板の生体内においては少なくとも半年以上の長期にわたって RNAi 現象を観察できることを明らかにした(図3)。しかもこの RNAi による特異的な遺伝子発現の抑制効果は、外部から運んだ外来性遺伝子に対してのみならず、髄核細胞が本来発現している内因性の遺伝子発現に対しても有効であった。これらの結果は、RNAi によって、椎間板の生理的な状態に対して負の因子を長期にわたって抑制することで、椎間板に対する治療が成り立つであろうことを示唆している¹²⁾。したがって、われわれの次なる目標は『ではどの遺伝子発現(群)を抑制することが椎間板変性に対する治療につながる

のか?』を調査することとなった。

IV. 椎間板変性と遺伝子発現

椎間板における RNA 干渉が技術的には可能となったが、椎間板の変性に伴う遺伝子発現の変動を詳細かつ包括的に示した報告はない。したがって、どの遺伝子をターゲットとすべきかに関しては断片的な情報しかないのが実情である。そこで共著者の由留部らは、種々の制約の中でもより臨床に近い椎間板変性モデルを用いて、一度に多種類の遺伝子発現がチェックできるとされる PCR array という方法を用いることで、椎間板の変性過程における遺伝子発現の変動を包括的に調査した。そのために使用したモデルであるが、外傷性の変性ではなく、比較的緩やかに変性が生じるモデルとして、ラットの尾椎椎間板に静的圧迫力を加えるモデルを採用し⁴⁾、これに少々工夫を加えることで椎間板

図5 (文献12より改変)

a: 合成と分解の間に存在する不均衡を是正するための戦略

細胞外基質の合成と分解の間に存在する不均衡状態を正すためには、大きく2通りの方法が存在する。1つは合成を促進することで不均衡を是正しようというもので、もう1つは分解を抑制することで不均衡を正そうというものである。後者の方がより少ない酸素や栄養供給下でも可能なはずである。

b: RNA干渉による変性椎間板へのアプローチ

細胞外基質の分解を促進する因子の発現を持続的に抑制することで、合成と分解の不均衡を正す、あるいは相対的に合成を優位にすることが可能であれば、少なくとも変性過程を遅らせる、あるいは長期的には椎間板を再生することが可能となることが期待される。

変性の初期から末期までの全過程を長期間観察可能なモデルを作成した。まず、このモデルが本当に臨床で遭遇する椎間板変性と近いものかどうかを検討するため、単純レントゲン、MRI、病理組織、また代表的な細胞外基質であるtype1, 2コラーゲンの変動、あるいは椎間板変性のマーカーとして認識されているMMP-3の発現について検討した。結果として、組織学的な変性像の進行に伴った経時的な椎間板高の低下、T2強調MRIにおける髄核の輝度の低下がみられ、それに伴ってType1コラーゲンは増加し、Type2コラーゲンは低下していた。さらにMMP-3も変性にしがって経時的に発現が上昇することが確認された。これらの結果は、過去に報告されてきた椎間板変性に伴って生じるとされる変化をよく再現していることが確認され、したがってこのモデルは齧歯類を用いているという点は問題であるが、椎間板変性モデルとし

て遺伝子発現の変動を調査するに値するとの結論を得た。

次なるステップとして、それぞれの期間において経時的に髄核組織を回収し、先述のPCR arrayにより各変性段階の同一組織を用いて、種々の遺伝子発現の変動を一度に解析した。結果として、椎間板の変性度が進行する過程で、MMP-3をはじめとした基質の分解に作用する多くの因子の発現が上昇することが確認され(図4)、一方基質の合成を促す因子は発現が低下するという、合成と分解の不均衡が存在することが確認された。以上の結果から、基質の分解を促進する因子の発現を持続的に抑制することで、合成と分解の不均衡を正す、あるいは相対的に合成を優位にすることが可能であれば、少なくとも椎間板の変性過程を遅らせる、ひいては椎間板を再生することも可能となるのではないかと推察された(図5)。

V. 問題点と将来への展望

椎間板の変性は私達が臨床で遭遇する腰椎変性疾患において頻繁に認められ、これら疾患群に対して間接的あるいは直接的になんらかの関連があることには疑いの余地はない。しかし一方で、近年の多くの研究はMRIで認められるほとんどの椎間板の変性が腰痛などの症状と直結しないことを示している。また椎間板変性の機序に関しても一定の見解はなく、混沌とした状況といえる。したがって大々的な研究、あるいはこれまで以上に包括的かつ詳細な内容の研究により、椎間板変性を促進する因子とその機序の解明が待たれる。また腰痛をはじめとする症状の原因となり得る椎間板変性と、ただ単に加齢の一環として変性し、あまり症状とは関係しない椎間板変性の二種類の椎間板変性の比較検討から、症状の出現にいたる病態を特定するとともに、こういった変性椎間板が分子生物学的治療の対象となり得るかを決定することも、極めて重要な課題と思われる。

一方これまで述べてきたように、椎間板の解剖整理学的特徴から考えると、「椎間板を再生する」ということは決して易しい道ではない。特にヒトのような大きな椎間板を短期間に再生することは、どう考えても見通しは明るくない。そうすると、短期的な椎間板機能の再建のためには一時的にせよなんらかの人工物に頼る必要があるのかもしれない。Scaffoldなどの細胞の足場となり得る人工物を補助的に使用することもその選択肢の一つとなるであろう。分子生物学的アプローチ単独で椎間板変性に対する治療を行うとすれば、先述のとおりもっと予防的な観点、あるいは長期的な視点からの治療を考慮すべき

ではないかと思われる。

いろいろとネガティブなことばかり述べてきたが、この分野における研究数は増加の一途をたどっており、日本人の研究者の活躍も目覚ましいものがある。近い将来になんらかのブレイクスルーがこれら研究者の中から出てくることを確信しているとともに、分子生物学的なアプローチを用いたより低侵襲の椎間板治療が、そう遠くない未来に実現することを心待ちにしている。

文 献

- 1) Chujo T, An HS, Akeda K et al. Effects of growth differentiation factor-5 (GDF-5) on the intervertebral disc: in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study. *Spine*. 2006; 31: 2909-2917.
- 2) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411: 494-498.
- 3) Grunhagen T, Wilde G, Soukane DM et al. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg*. 2006; 88A: 30-35.
- 4) Iatridis JC, MentePL, Stokes IA et al. Compression -induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model. *Spine*. 1999; 24: 996-1002.
- 5) Kakutani K, Nishida K, Uno K et al. Prolonged Down Regulation of Specific Gene Expression in Nucleus Pulposus Cells Mediated by RNA interference in vitro. *J Orthop Res*. 2006; 24: 1271-1278.
- 6) 小林 茂, 竹野健一, 宮崎 剛ほか. 椎間板変性とバイオエンジニアリング. *脊椎脊髄ジャーナル*. 2007; 20: 56-64.
- 7) Masuda K, Imai Y, Okuma M et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit annular puncture model. *Spine*. 2006; 31: 742-754.
- 8) Nagae M, Ikeda T, Mikami Y et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel

- microspheres. *Tissue Eng.* 2007; 13: 147–158.
- 9) Nishida K, Kang JD, Suh JK et al. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine.* 1998; 23: 2437–2442.
- 10) Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG et al. Modulation of the biological activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated gene transfer of the human TGF- β 1 encoding gene. *Spine.* 1999; 24: 2419–2425.
- 11) Nishida K, Doita M, Takada T et al. Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by micro-bubble enhanced ultrasound gene therapy. *Spine.* 2006; 31: 1415–1419.
- 12) Nishida K, Suzuki T, Kakutani K et al. Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders. *Eur Spine J.* 2008; 17: S459–466.
- 13) Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials.* 2003; 24: 3531–3541.
- 14) Suzuki T, Nishida K, Kakutani K et al. Sustained long term RNA interference in nucleus pulposus cells in vivo mediated by unmodified small interfering RNA. *Eur Spine J.* 2009; 18: 263–270.
- 15) Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine.* 1991; 16: 253–260.

*

*

*