

## 主 論 文 要 旨

| 報告番号  | 甲 ㊦ 第 号 | 氏 名 | 藤 井 武 |
|---|---------|-----|-------|
| <p>主 論 文 題 名</p> <p>The Unfolded Protein Response Mediated by PERK Is Casually Related to the Pathogenesis of Intervertebral Disc Degeneration<br/>(小胞体ストレス応答PERK経路は椎間板変性の病態に関与している)</p>  |         |     |       |
| <p>(内容の要旨)</p> <p>腰椎疾患の原因である椎間板変性には加齢やメカニカルストレス等が関与しているが、現在のところ椎間板変性に至る分子メカニズムは完全には解明されておらず、変性を抑制する有効な治療法も確立されていない。</p> <p>小胞体に不良タンパク質が過剰に蓄積した小胞体ストレスに対して、IRE1<math>\alpha</math>、ATF6、PERKの3つの経路を介した小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response: UPR) が存在する。これまでにUPRが神経変性疾患や運動器加齢性疾患に関与することが報告されているが、椎間板変性との関係については不明であった。本研究の目的は、小胞体ストレス応答の一つであるPERK-ATF4-CHOP経路と椎間板変性の関係について検討することである。</p> <p>まず、術中採取した変性椎間板を電子顕微鏡で観察したところ、椎間板細胞の小胞体の膨張および構造の乱れを認めたことから、椎間板変性と小胞体ストレスとの関与が示唆された。ラット椎間板変性モデルにおいては、椎間板の外側に位置する線維輪で、椎間板変性マーカーであるTNF-<math>\alpha</math>やMMP3、IL-6などのmRNA発現が上昇するのと同時に、UPR標的遺伝子であるCHOPやHERPのmRNA発現の上昇を認め、免疫染色およびWestern Blotにおいてもp-PERK、ATF4、CHOPのタンパクレベルでの発現上昇が認められた。ヒト変性椎間板の繊維輪においても、免疫染色でp-PERK、ATF4、CHOPの発現が健常椎間板と比較して有意に高く認められた事から、椎間板変性では、繊維輪においてPERK-ATF4-CHOP経路が活性化している事が示唆された。一方、椎間板の中心に位置する髄核においては、ラットおよびヒトの健常椎間板の免疫染色で、p-PERK、ATF4、CHOPの発現を認めたことから、髄核においては生理的環境下でも本経路が活性化していることが示唆された。</p> <p>次に<i>in vitro</i>で、ラット線維輪細胞に小胞体ストレス誘導剤であるTunicamycin (TM) およびDithiothreitol (DTT) を添加したところ、共にUPR標的遺伝子の発現を誘導するのと同様に、変性マーカーの発現もmRNAレベルで有意に上昇した。ヒト椎間板細胞を無血清培地で培養すると、変性マーカーの発現上昇と共に、UPR標的遺伝子の発現も有意に誘導されたが、PERK阻害剤であるGSK2606414を添加すると、これらの変性マーカーの発現上昇は有意に抑制された。同様に、繊維輪細胞におけるPERKとATF4の発現を、レンチウイルスを用いたshRNAによって低下させると、変性マーカーの発現も有意に低下した。また、無血清培養のヒト椎間板細胞に、GSK2606414を添加すると、cleaved caspase-3の発現が抑制され、TUNEL染色においてもTUNEL陽性細胞が減少し、アポトーシスが抑制された。また、ラット線維輪細胞にTMを添加すると、p65のリン酸化上昇を認め、更に、TM添加による炎症性サイトカインの発現上昇は、NF-<math>\kappa</math>B阻害剤DHMEQ (dehydroxymethylepoxyquinomicin) を同時添加することにより有意に抑制された。</p> <p>以上より、PERK-ATF4-CHOP経路の活性化が椎間板変性を惹起している可能性があり、そのメカニズムにはNF-<math>\kappa</math>Bシグナルを介していることが明らかとなった。さらにPERK阻害剤により変性マーカーの発現が抑制され、アポトーシスも減少したことから、本経路は椎間板変性の治療標的となることが示唆された。</p> |         |     |       |