

181. 慢性椎間板性腰痛機序解明と新規薬物治療に関する研究

宮城 正行

北里大学 医学部 整形外科

Key words : 炎症性サイトカイン, 神経成長因子, 椎間板性腰痛, マクロファージ

緒言

慢性椎間板性腰痛はしばしば、既存の薬物治療に抵抗性であり、治療に難渋する。我々は、今までに慢性椎間板性腰痛の原因として、変性椎間板内における炎症性サイトカインの発現上昇と疼痛関連微小神経線維の侵入が、深く関与することを明らかにし、報告してきた。本研究の目的は椎間板性腰痛を模した尾椎椎間板傷害モデルを用い、これらの現象に関わる根幹の成長因子や細胞を特定し、新規薬物治療の可能性を探る事である。

方法

1. マクロファージが産生する物質の定量実験

傷害椎間板内に発現する物質を調べ、マクロファージが産生する物質を特定するために、8週齢雄性 C57BL/6J マウスを、第5/6、6/7、7/8、8/9尾椎椎間板に対して無処置群、針にて傷害した傷害群、事前にクロドロン酸内包リポソーム処置をしてマクロファージを枯渇させた後（クロドロン酸内包リポソームは元来ビスフォスフォネートであるが、これを腹腔内投与するとマクロファージが貪食し、マクロファージが枯渇化することを過去に確認している）、針にて傷害したマクロファージ枯渇群（n=各10）の3群にわけ、傷害1日後に椎間板を摘出した。椎間板はPCRにてマクロファージ、腫瘍壊死因子（TNF） α 、インターロイキン（IL）-1 β 、神経成長因子（NGF）、線維芽細胞増殖因子（bFGF）の発現を定量した。同時に各群の脾臓におけるマクロファージの割合をフローサイトメトリーにて検討を行った。

2. 炎症性サイトカイン刺激による各種成長因子の定量実験

マクロファージ以外の椎間板内の細胞に対する炎症性サイトカインの役割を評価するために、8週齢雄性 C57BL/6J マウスの第5/6、6/7、7/8、8/9尾椎椎間板を針で傷害1日後に傷害椎間板を摘出した。酵素処理により椎間板中の有核細胞を採取後、抗F4/80抗体を用いてマクロファージを除去した。マクロファージを除去した椎間板細胞に対して培養液のみで培養した群（コントロール群）、25 ng/ml TNF α を添加し培養した群（TNF群）、TNF α 及び TAK1 阻害剤を添加した群（TNF+TAK1inhibitor群）の3群に分け、NGF、bFGF、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の発現量について評価を行った。

結果

1. マクロファージが産生する物質の定量実験

フローサイトメトリーの結果、マクロファージ枯渇群は無処置群、傷害群と比べクロドロン酸リポソーム処置により脾臓におけるマクロファージの割合は有意に減少していた（ $p < 0.05$ ）。傷害群は無処置群に比べ、TNF α （図1A）、IL-1 β （図1B）、NGF（図1C）、bFGF（図1D）の発現は有意に上昇していた（ $p < 0.05$ ）のに対し、マクロファージ枯渇群は傷害群に比べ、TNF α （図1A）、IL-1 β （図1B）の発現が減少していたが、（ $p < 0.05$ ）NGF（図1C）、bFGF（図1D）の発現量には変化がなかった（ $p > 0.05$ ）。

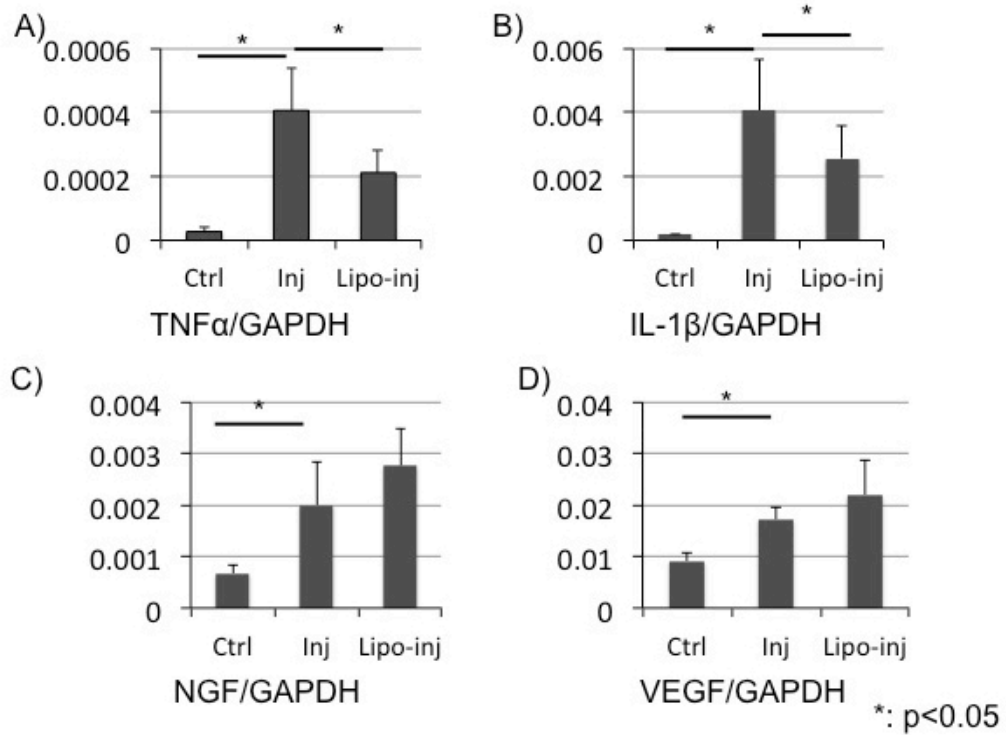


図1. 椎間板内の TNF α (A)、IL-1 β (B)、NGF (C)、bFGF (D) の発現量

椎間板傷害により炎症性サイトカイン (TNF α (A)、IL-1 β (B)) と各種成長因子 (NGF (C)、bFGF (D)) の発現が上昇した。マクロファージ枯渇化により炎症性サイトカインの発現上昇は抑制されたが、各種成長因子の発現上昇は抑制されなかった。p < 0.05、repeated measures ANOVA 検定。

2. 炎症性サイトカイン刺激による各種成長因子の定量実験

TNF 群における NGF の発現はコントロール群に比べ有意に上昇した (p < 0.05)。さらに TNF+TAKlinhibitor 群は TNF 群と比べ、NGF の発現は有意に減少していた (p < 0.05) (図2) (bFGF と VEGF の発現量に関しては、コントロール群に比べ、TNF 群が高い傾向にあったが、p > 0.05 と統計学的有意差を認めなかったため、現在検体数を増やし、再実験中である)。

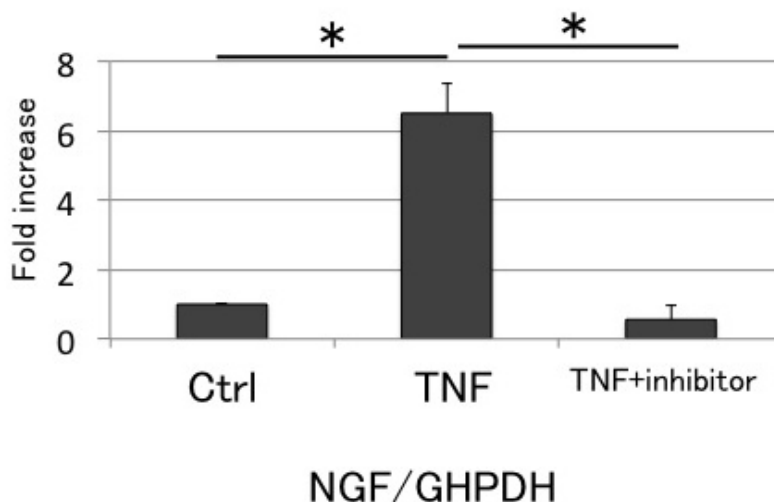


図2. マクロファージ除去後椎間板細胞における TNF α 刺激による NGF の産生量

マクロファージ除去後椎間板細胞に対する TNF α 刺激により NGF の産生量が増加し、TNF α 阻害薬追加により抑制された。p < 0.05、repeated measures ANOVA 検定。

考 察

本研究結果より、1) クロドロン酸内包リポソーム処置をすることにより効率的にマクロファージを枯渇化できること、2) 椎間板傷害により椎間板における TNF α 、IL-1 β 、NGF、bFGF といった炎症性サイトカインや各種成長因子の発現上昇が確認されたこと、3) 炎症性サイトカインは主にマクロファージによって産生され、各種成長因子は主にマクロファージ以外の細胞によって産生される可能性があること、4) 炎症性サイトカインがマクロファージ以外の椎間板細胞を刺激し、神経成長因子の発現を促進することがわかった。

Burke らは手術により摘出したヒトの変性椎間板内に TNF α などの炎症性サイトカインが発現上昇していることを報告している¹⁾。同様に我々は動物実験において椎間板性腰痛を模した様々なモデルにおいて、椎間板内に炎症性サイトカインや NGF の発現が上昇することを報告した^{2,3)}。また、我々はラット椎間板傷害モデルに TNF α 阻害薬、抗 NGF 中和抗体、を投与すると支配感覚神経の疼痛関連神経ペプチドの発現上昇が抑制されることを報告している^{4,5)}。以上より、傷害椎間板に発現する炎症性サイトカインや各種成長因子が椎間板性腰痛を惹起する可能性があると考えられた。

炎症性サイトカインを産生する細胞については、椎間板内因性の細胞なのか、マクロファージなどの外因性の細胞なのか詳細に検討している報告は少なく、いまだ Controversial である。本研究結果より、炎症性サイトカインは主にマクロファージによって産生され、成長因子はその他の椎間板内細胞によって産生されることが示唆された。

また、マクロファージによって産生された炎症性サイトカインの働きについては、TNF α が NGF の発現を促進するという報告がある⁶⁾。本研究結果も同様であり、マクロファージが産生した炎症性サイトカインがマクロファージ以外の椎間板内細胞を刺激し各種成長因子産生を促進することがわかった。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北里大学医学部整形外科学の井上玄、内田健太郎である。

文 献

- 1) Burke JG, Watson RW, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. J Bone Joint Surg Br. 2002 Mar; 84(2):196-201. PMID: 11924650.

- 2) Miyagi M, Ishikawa T, Orita S, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Suzuki M, Inoue G, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Disk injury in rats produces persistent increases in pain-related neuropeptides in dorsal root ganglia and spinal cord glia but only transient increases in inflammatory mediators: pathomechanism of chronic diskogenic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Dec 15;36(26):2260-6. doi: 10.1097/BRS.0b013e31820e68c7. PMID: 21228748.
- 3) Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Murakami K, Shibayama M, Orita S, Eguchi Y, Arai G, Sakuma Y, Kubota G, Oikawa Y, Ozawa T, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Kawakami M, Ohtori S. ISSLS prize winner: disc dynamic compression in rats produces long-lasting increases in inflammatory mediators in discs and induces long-lasting nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating discs: a pathomechanism for chronic discogenic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Oct 1;37(21):1810-8. PMID: 22366969. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31824ffac6.
- 4) Horii M, Orita S, Nagata M, Takaso M, Yamauchi K, Yamashita M, Inoue G, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Kuniyoshi K, Suzuki M, Nakamura J, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Direct application of the tumor necrosis factor- α inhibitor, etanercept, into a punctured intervertebral disc decreases calcitonin gene-related peptide expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Jan 15;36(2):E80-5. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181d4be3c. PMID: 21057386.
- 5) Orita S, Ohtori S, Nagata M, Horii M, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Takahashi K. Inhibiting nerve growth factor or its receptors downregulates calcitonin gene-related peptide expression in rat lumbar dorsal root ganglia innervating injured intervertebral discs. *J Orthop Res*. 2010 Dec;28(12):1614-20. doi: 10.1002/jor.21170. PMID: 20973063.
- 6) Cheng CF, Cheng JK2, Chen CY1, Lien CC1, Chu D3, Wang SY4, Tsaur ML5. Mirror-image pain is mediated by nerve growth factor produced from tumor necrosis factor alpha-activated satellite glia after peripheral nerve injury. *Pain*. 2014 May;155(5):906-20. doi: 10.1016/j.pain.2014.01.010. Epub 2014 Jan 18. PMID: 24447514.