

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20016

研究課題名(和文) 高齢者運動器不安定症由来腰痛を惹起する神経侵入制御因子同定と新規治療シーズ探索

研究課題名(英文) The Pathomechanism of Pain in Elderly Patients with Musculoskeletal Ambulation Disability Symptom Complex

研究代表者

宮城 正行 (Miyagi, Masayuki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90627556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高齢者が抱える、骨粗鬆症、サルコペニア、変形性関節症由来の腰痛、関節痛の発症機序について動物モデルやヒト手術検体を用いて調査した。骨密度が減少した骨組織、筋肉量が減少した筋組織、変形性関節症を呈した滑膜組織において炎症性サイトカイン、各種成長因子、疼痛関連物質の発現上昇が確認され、このことが疼痛惹起に関与していることが示唆された。また、骨粗鬆症椎体において疼痛関連物質を発現した多数の神経線維が確認され、このことも疼痛に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we elucidated the patho-mechanism of low back pain and joint pain in elderly patients or animal models with osteoporosis or sarcopenia or osteoarthritis. Several molecules including inflammatory cytokines, various growth factors and pain-related molecules were observed in osteoporotic bone marrow, high aged muscle tissue and synovial tissue in osteoarthritis joints. In addition, multiple nerve fibers with pain-related molecules in osteoporotic vertebral body were observed. These findings might be related with pain in elderly patients.

研究分野：脊椎外科

キーワード：慢性疼痛 骨粗鬆症 サルコペニア 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

近年本邦において高齢化社会を迎え、本邦において急務なのがロコモティブシンドロームの効果的な予防と治療である。骨粗鬆症、サルコペニア、変形性関節症に代表される高齢者運動器不安定症は腰痛や関節痛を訴え、しばしば高齢者の ADL の低下をきたす。骨粗鬆症においては、様々な薬物治療が開発され、効果的に骨密度を上昇させ、骨折を抑制できるようになってきた。また、変形性関節症に関しては、人工関節手術の発展などで、効果的な加療ができるようになってきた。しかし、これらの患者が訴える、腰痛や関節痛の発症機序についてはいまだ不明な点が多く、疼痛治療という観点においては薬物治療が不十分な点が多い。さらに、サルコペニアにおいては、いまだ筋肉を増加させるような薬物治療は開発されておらず、サルコペニア患者が訴える腰痛や関節痛には効果的なアプローチができていないのが現状である。

我々は、過去に行ってきた椎間板由来の腰痛に関する研究の中で、変性椎間板内に侵入する微小神経と椎間板内に発現する炎症性サイトカイン、各種成長因子、疼痛関連物質が疼痛発症機序に深く関与することを明らかにしてきた。これらの研究から、骨粗鬆症、サルコペニア、変形性関節症に由来する腰痛や関節痛の発症機序においても、過去の研究と同様の変化が起こっているのではないかと仮説をたて、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は腰痛や関節痛をきたす高齢者運動器不安定症(骨粗鬆症、サルコペニア、変形性関節症)の疼痛発生機序の解明と新規薬物シーズ発掘を最終目標に、骨粗鬆症モデルにおける骨組織、筋肉量減少モデルにおける筋肉組織、変形性関節症モデルにおける関節内組織に発現する炎症性サイトカイン、各種成長因子、疼痛関連物質を同定し、これらがどのような相互関係を有し、疼痛に関与するかについて調査することである。

## 3. 研究の方法

### 骨粗鬆症動物モデルを用いた研究

骨粗鬆症マウスモデルの腰椎、大腿骨に発現する物質について調査した。10 週齢雌性 C57BL/6J マウスに対し、卵巣摘出して骨粗鬆症を模した卵巣摘出モデルを用いた。卵巣露出のみの sham 手術を行った sham 群も用意した。第 4 から 6 腰椎椎体と大腿骨を摘出し、骨密度、Bone Volume Fraction、炎症性サイ

トカイン(インターロイキン(IL)-1、IL-6、腫瘍壊死因子(TNF))の発現量、成長因子(神経成長因子(NGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF))の発現量、疼痛関連物質(カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、プロスタグランジン(PG)E2)の発現量を Real-Time PCR 法で検証した。さらに、椎体・大腿骨の免疫組織化学染色として、CGRP 陽性 PGP 9.5 陽性神経線維の評価を行い、これらに対して実験群と sham 群を比較、検討した。

### 超高齢ラットを用いた筋肉に関する研究

ラットの傍脊柱筋と大腿四頭筋における炎症性サイトカインおよびアディポサイトカインであるレプチンの発現の加齢性変化を検討した。12、24、48、96 週齢の SD ラットの傍脊柱筋および大腿四頭筋におけるレプチン、レプチンレセプターの発現、および炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6)の発現を Real-Time PCR 法で検証した。大腿四頭筋を酵素処理し、筋細胞を採取した。1 週間培養後、レプチンで刺激を行い、TNF- $\alpha$  の発現を検討した。

### ヒト変形性膝関節症の滑膜組織を用いた研究

手術時に採取した滑膜組織を用いて CGRP の発現制御機構を検討するために、手術を予定された変形性膝関節症患者から膝人工関節置換術時に滑膜組織を採取した。採取した組織より RNA を抽出後、リアルタイム PCR を用いて CGRP および TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-8、IL-6、COX-2 の発現を検討し、CGRP 発現との相関について検討した。また、発現に特色があった物質に関しては、免疫組織化学染色も追加、産生細胞についても検討を加えた。さらに臨床スコアと CGRP の発現量との相関関係も同時に調査した。

次に、滑膜組織から酵素処理により有核細胞を採取し、1 週間培養した。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6、PGE2 で刺激後、リアルタイム PCR を用いて CGRP や CGRP の受容体である受容体活性調節蛋白 1(RAMP1)の発現を検討した。また、培養した細胞にプロスタグランジン受容体(EP1、EP2、EP3、EP4)のアゴニストを添加し、リアルタイム PCR を用いて CGRP や RAMP1 の発現を検討した。さらに、抗 CD14 抗体を用いて滑膜組織を分離し、それぞれの分画で同様の検討も行った。

## 4. 研究成果

### 骨粗鬆症動物モデルを用いた研究

卵巣摘出骨粗鬆症モデルの椎体、大腿骨内に発現する物質を評価した結果、炎症性サイトカインである IL-1 (図 1)と NGF (図 2)と CGRP (図 3)の発現が上昇していることがわかった。

また、椎体骨内に侵入する微小神経につい

て、免疫組織学的に評価を行った結果、骨粗鬆症椎体内に侵入する多数の CGRP 陽性の神経線維を多数確認した。これらの神経線維が疼痛伝達に関与している可能性が示唆された。

また、骨粗鬆症椎体、大腿骨内に発現上昇していた IL-1 と NGF の関係を調査する目的で、卵巣摘出マウスから摘出した両側大腿骨の骨髓を採取し、コラゲナーゼ連続処理法を用いて、骨組織から骨芽細胞の抽出を行った。in vitro の系において、骨芽細胞に対して、IL-1 刺激の有無による NGF の発現量を調査したところ、IL-1 刺激により NGF の発現量は上昇していた。以上より、炎症性サイトカインはアラキドン酸カスケードを促進し、PG 発現を促進し、疼痛に関わる他、NGF の産生を促進し、NGF 自体も疼痛に関与するため、骨粗鬆症状態が疼痛を惹起している可能性が示唆された。

図 1：椎体大腿骨における IL-1 発現量

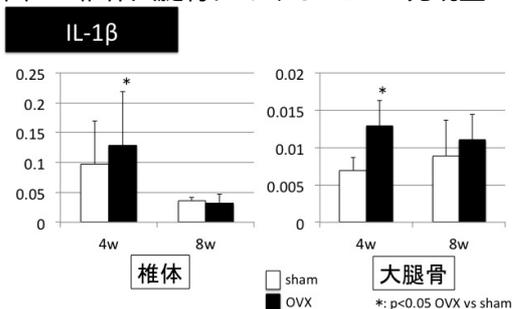


図 2：椎体大腿骨における NGF 発現量

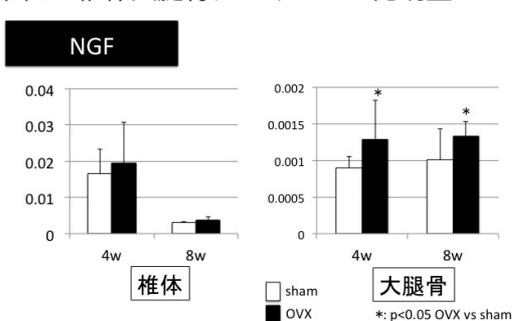
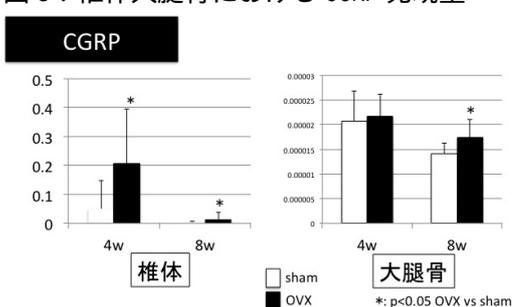


図 3：椎体大腿骨における CGRP 発現量



#### 超高齢ラットを用いた筋肉に関する研究

傍脊柱筋におけるレプチン発現は 12 週齢と比較して、48 週齢で 6.6 倍、96 週齢で 35.5 倍に増加した。一方、TNF は

96 週齢で 1.9 倍、IL6 は 4.3 倍に増加した。大腿四頭筋においてもレプチン発現は 48 週齢で 6.4 倍、96 週齢で 9.7 倍に増加した。TNF は 1.8 倍、IL6 は 3.3 倍に増加した。筋細胞における TNF- 発現はレプチン刺激により増加した。

近年、レプチン投与によって培養マクロファージにおける炎症関連物質 (COX2, iNOS, MMP-9) の発現が上昇することが報告されており、炎症促進作用を有することが示されている。本研究結果から、加齢に伴い骨格筋におけるレプチン発現が増加し、TNF- を誘導することで炎症性環境形成に関わる可能性が示された。骨格筋におけるレプチンの発現機構の解明が、サルコペニアの制御に繋がる可能性が示唆された

#### ヒト変形性膝関節症の滑膜組織を用いた研究

術前疼痛スコア (VAS) が高い群 (VAS ≥ 6) では低い群 (VAS < 6) に比べ有意に CGRP 発現が高かった (P < 0.05)。

滑膜組織における CGRP、COX-2、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8、TNF-) の発現の関係を検討したところ、CGRP と COX-2 の発現量の間には正の相関を認めた。

CGRP と COX-2 の局在を検討するために滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところ、CGRP と COX-2 は共に lining layer に存在していた。また、CGRP 陽性細胞の多くは CD14 陰性の滑膜線維芽細胞であった。

COX-2/PGE2 経路による CGRP 発現制御機構を検討した in vitro 実験結果では IL-1、TNF-、PGE2 を添加した細胞では CGRP の発現が上昇し、PGE2 を添加した細胞では RAMP1 の発現が上昇した。また、培養した細胞にプロスタグランジン受容体のアゴニストを添加したところ、EP4 アゴニストを添加した細胞で CGRP の発現が上昇し、EP1、EP2 アゴニストを添加した細胞では RAMP1 の発現が上昇した。

抗 CD14 抗体を用いて滑膜組織を分離し、それぞれの分画を検討したところ、PGE2 の添加により CGRP の発現が上昇するのは CD14 陰性細胞 (線維芽細胞) のみであった。

上記の結果より、滑膜組織における CGRP の発現増加は TNF-、IL1 などの炎症性サイトカインではなく COX-2/PGE2 経路が関与している可能性が示唆され、この疼痛に関与する可能性がある PGE2 受容体も明らかにすることができた。近年、滑膜組織へのメカニカルストレスは TNF-a、IL1B を増加させることなく、PGE2 を増加させることが報告されている。このことからメカニカルストレスが CGRP を制御しているかもしれない。

以上の研究成果より、骨密度減少による骨粗鬆症由来の疼痛、筋肉量低下による筋肉由来の疼痛、変形性変化による関節痛の病態を詳細に評価することができた。それぞれの疼

痛には炎症性サイトカインや NGF などの成長因子、さらには PGE2 や CGRP といった疼痛関連物質の関与がそれぞれ明らかになった。これらの研究成果は今後、トランスレーショナル研究を展開できる可能性を秘めており、超高齢社会を迎え増加の一途を辿っているこれらの疼痛治療に、大きなインパクトをもたらすものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Aikawa J, Iwabuchi K, Takaso M. Adrenomedullin Regulates IL-1 Gene Expression in F4/80+ Macrophages during Synovial Inflammation. J Immunol Res. 2017;9832430. (査読有) DOI: 10.1155/2017/9832430

Minatani A, Uchida K, Inoue G, Takano S, Aikawa J, Miyagi M, Fujimaki H, Iwase D, Onuma K, Matsumoto T, Takaso M.

Activation of Calcitonin Gene-related Peptide Signaling Through the prostaglandin E2-EP1/EP2/EP4 receptor pathway in synovium of knee osteoarthritis patients. J Orthop Surg Res. 2016.11.117 (査読有) DOI: 10.1186/s13018-016-0460-4

### 〔学会発表〕(計 6 件)

宮城正行  
重症骨粗鬆症に対する薬物治療  
相模原市内科医学会講演会(招待講演)  
2017.2.22. 神奈川県相模原市

高野昇太郎、内田健太郎、宮城正行、井上 玄、相川 淳、藤巻寿子、南谷 淳、岩瀬 大、東山礼治、高相晶士  
滑膜組織マクロファージ由来の IL-1 は変形性膝関節症マウスの滑膜組織におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体の発現を制御する  
第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2016.10.13~14 福岡県福岡市

南谷 淳、内田健太郎、井上 玄、相川 淳、高野昇太郎、宮城正行、藤巻寿子、岩瀬 大、井村貴之、東山礼治、高相晶士  
変形性膝関節症の滑膜組織において COX-2/PGE2 経路はカルシトニン遺伝子関連ペプチドの発現を制御する  
第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2016.10.14 福岡県福岡市

高野昇太郎、内田健太郎、宮城正行、相川 淳、迎 学、南谷 淳、岩瀬 大、東山礼治、井上 玄、高相晶士  
滑膜炎モデルマウスにおいてアドレノメデュリンは IL-1 のネガティブフィードバック機構に参与する  
第 35 回日本運動器移植・再生医学研究会  
2016.9.24 広島県広島市

宮城正行  
骨粗鬆症と痛み  
第 4 回伊豆ペインフォーラム(招待講演)  
2016.6.25. 静岡県伊東市

宮城正行  
骨粗鬆症診療最新の話  
第 6 回相模原骨粗鬆症 Update 研究会(招待講演)  
2016.6.16. 神奈川県相模原市

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

### 〔その他〕特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮城 正行 (MIYAGI, Masayuki)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号: 90627556