

令和元年6月12日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10816

研究課題名(和文) 脊椎椎間板変性制御および再生による治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment by regeneration and suppressing degeneration in human intervertebral disc.

研究代表者

関庄二 (SEKI, Shoji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：00432112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腰椎椎間板変性は腰痛の一因であり、ヘルニアや狭窄症を引き起こす。しかし実際に椎間板変性を改善する薬はない。我々は、選択的c-Fos/AP-1阻害薬(T-5224)を用いて椎間板変性抑制効果および疼痛抑制効果を検討した。椎間板変性モデルラットにT-5224あるいは偽薬(PVP)を投与し、椎間板変性の進行抑制効果を検討したところ、X線、MRI、組織検査で有意に変性が抑制され、さらに熱刺激による疼痛抑制効果を検証したところ、有意に疼痛抑制効果が確認された。これらから椎間板性腰痛患者にとってT-5224内服により椎間板変性が抑制され、同時に痛みが緩和する可能性があることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰椎椎間板変性は、脊柱管狭窄症、ヘルニア、腰痛の原因の一つである。これらの疾患は若年-中高年まで労働生産性の高い年代に患うことが多い。現在臨床応用可能な椎間板変性抑制の薬はなく、早期臨床応用可能な治療法の開発は急務である。椎間変性が抑制できれば、多くの腰痛や狭窄症に悩む患者にとって非常に朗報である。c-fos/AP-1阻害薬(T-5224)は、動物実験レベルでは椎間板変性抑制作用とその関連痛を抑制した。この薬は実際にヒトへの投与も可能であり、実際に臨床的效果が得られれば、労働生産性の向上など社会的利益も大きい点で、極めて有益な研究であると確信する。

研究成果の概要(英文)：Lumbar intervertebral disc (IVD) degeneration is attributable mainly to LBP, called discogenic pain, which often leads to disc herniation presenting as sciatica. We investigated the effects of inhibition of c-Fos/AP-1 (T-5224) on IVD degeneration and associated pain. We used a tail disc percutaneous needle puncture method to further assess the effects of oral administration of T-5224 on IVD degeneration. Analysis of x-ray, MRI findings, and histology revealed that IVD degeneration was significantly mitigated by T-5224. Further, oral administration of T-5224 ameliorated pain as indicated by the extended tail-flick latency in response to heat stimulation of rats with needle-puncture-induced IVD degeneration. T-5224 prevented disc degeneration, and oral administration of T-5224 extended the tail flick latency as a measure of heat stimulation in the rat tail-puncture model. These findings suggest that the inhibition of c-Fos/AP-1 prevents disc degeneration and its associated pain.

研究分野：脊椎椎間板、脊椎疾患、遺伝子解析

キーワード：AP-1阻害剤 腰椎椎間板 椎間板穿刺モデル 腰痛症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症を惹起させる IL-1b は、転写因子 AP-1 を介して軟骨や椎間板を分解する蛋白分解酵素である MMP3, MMP13 や ADAMTS4,5 の発現を上昇させる。その抑制因子として、我々の研究協力が作成した低分子化合物である c-fos/AP-1 阻害剤を用いると、椎間板変性抑制が起きる可能性がある。この AP-1 候補薬(T5224)はヒトへの投与も可能であり、もし変性抑制ができれば、社会的貢献度は大きいと考える。

2. 研究の目的

臨床応用を目指してこの候補薬 (AP-1 阻害剤) をマウスに経口投与させ、椎間板穿刺モデルを用いて、椎間板変性抑制が実際に可能かどうかを検討することである。

3. 研究の方法

1. c-Fos/AP-1 阻害による椎間板変性抑制

手術時のヒト椎間板より採取した髄核細胞を用い、単層培養下で IL-1b による刺激を加え、c-Fos とその下流の遺伝子発現の変化と、c-Fos/AP-1 の特異的阻害薬 (T-5224) 4 による影響を解析した。またマウスの椎間板の器官培養モデルに対して、同様に IL-1b 刺激を加え、RT-PCR と組織学的染色法・免疫組織化学を用いて遺伝子発現の変化とその局在を解析し、さらに T-5224 による変化を評価した。次に、尾椎椎間板へ針を穿刺し、椎間板変性モデルラット 5 を作成した。これに対して T-5224 あるいは偽薬を経口投与し、椎間板変性の進行抑制効果を qPCR、X 線画像での椎間板高、MRI での T2 値、組織学的スコア 6 を用いて比較検討した。

2. c-Fos/AP-1 阻害の疼痛に対する影響

まず Fluoro-gold を用いた逆行性神経回路標識を行い、ラット尾椎 6/7 椎間板を神経支配する背側後神経節の高位を同定した。尾椎 6/7 椎間板へ針穿刺による椎間板変性を導入したラットに対して、T-5224 あるいは偽薬を経口投与し、責任高位の後根神経節での遺伝子発現を評価した。また、ラット尾への熱刺激による Tail flick 動作の潜時を測定し、疼痛行動学的評価を行った。

4. 研究成果

1. ヒト髄核細胞への c-Fos/AP-1 阻害による椎間板変性抑制 (In vitro)

ヒト髄核細胞への IL-1b 刺激により c-Fos の mRNA レベル、蛋白レベルで発現の増加がみられ (Fig.1 a, b)、MMP-3, 13, ADAMTS-5、IL-1b の遺伝子発現が有意に増加した。この増加は T-5224 投与により濃度依存的に抑制された (Fig. 1c)。

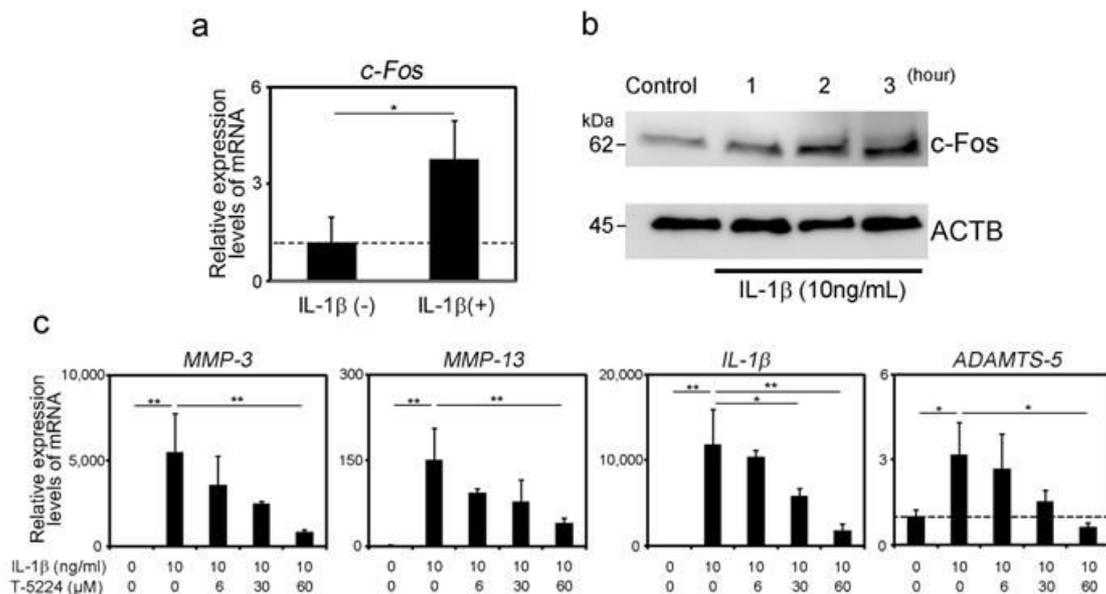


Figure 1. ヒト髄核細胞に対する c-Fos/AP-1 阻害

2. マウス椎間板器官培養における椎間板変性抑制 (Ex vivo)

器官培養したマウス椎間板への IL-1b 刺激により、c-Fos の遺伝子発現とその下流に位置する Mmp-3, 13, Adamts-5、Il-1b の発現が増加し、一方で Col2a1 の発現は低下した。T-5224 により濃度依存的に Mmp-3, 13, Adamts-5、Il-1b の遺伝子発現は抑制され、Col2a1 の発現は上昇した。器官培養椎間板に対するサフラニン O 染色では、IL-1b 刺激により椎間板の線維輪内層と椎体終板における染色性が低下したが、T-5224 により染色性の改善がみられた。

3. ラット尾椎椎間板への針穿刺により、c-Fos の遺伝子発現は有意に上昇した。偽薬群と比較して T-5224 群では、尾椎椎間板における Mmp-13 の遺伝子発現は有意に抑制され、Mmp-3, Adamts-5 の遺伝子発現は抑制される傾向にあった。X 線画像の評価では、穿刺後 8 週時点において、偽薬群と比較し、T-5224 群で椎間板高が有意に保たれていた(Fig. 2b)。また、MRI での T2 値は、穿刺後 8 週時点で偽薬群と比較して T-5224 群で有意に高く(Fig. 2c, d)、組織学的スコアも有意に改善していた(Fig.2e)。

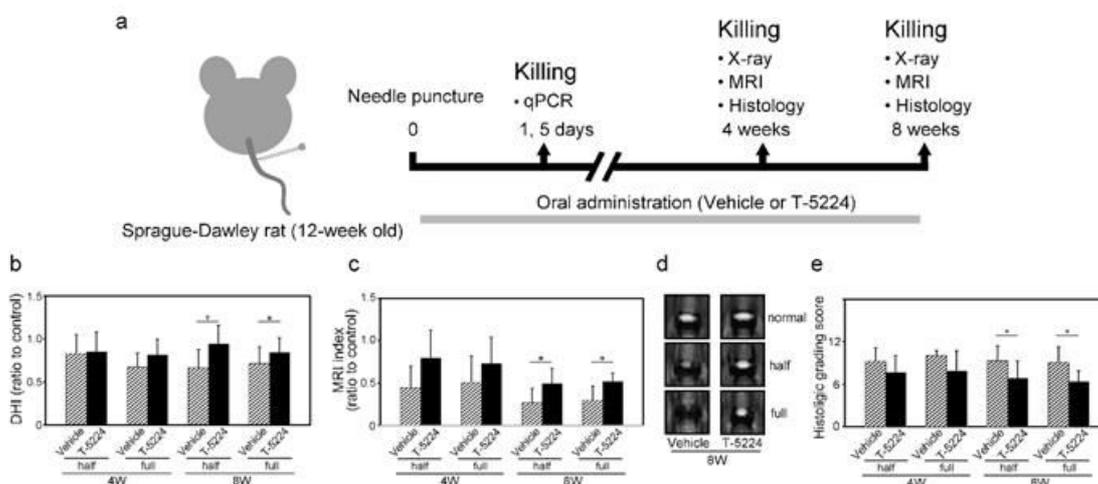


Figure 2. 椎間板穿刺モデルに対する c-Fos/AP-1 阻害の効果

a. ラット尾椎椎間板穿刺モデルを用いた実験プロトコル、b. 椎間板高の比較、c. MRIT2 値の比較、d. MRI の代表的画像、e. 組織学的スコアを用いた比較、*; $p < 0.05$ 、Half; 半分穿刺、full; 貫通

4. c-Fos/AP-1 阻害の疼痛に対する影響

逆行性神経回路標識により、ラット尾椎第 6/7 椎間板への神経支配は、S2-4 後根神経節と判断された。ラット尾椎椎間板への針穿刺後 1 週時点で、S2-4 後根神経節における Ngf, Calca, Pdyn の遺伝子発現は増加した。偽薬群と比較し、T-5224 群では、Pdyn の遺伝子発現は有意に抑制された。また、穿刺後 8 週における熱刺激に対する flick 動作の潜時は、偽薬群と比較し、T-5224 群で有意に延長していた。

考察

ヒト髄核細胞の単層培養、マウス椎間板の器官培養において、IL-1 b により惹起された ECM 蛋白分解酵素の発現増加は、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬により濃度依存的に抑制された。ラット尾椎椎間板穿刺モデルにおいて、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬の経口投与により、画像 (X 線、MRI) 的・組織学的に椎間板変性が抑制された。さらに、尾椎椎間板穿刺で後根神経節の疼痛関連遺伝子発現の変化が惹起されるが、これに選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬を経口投与すると、Pdyn の発現が抑制され、さらに Tail flick テストでの解析で疼痛に対する閾値を優位に上昇させた。これらの結果は、c-Fos/AP-1 阻害により脊椎椎間板変性の進行を阻止することができ、さらに疼痛の軽減にも働くことを示唆している。本研究で用いた c-Fos/AP-1 の特異的阻害薬は、ヒトに対しても経口投与可能な薬剤であり、椎間板変性と椎間板関連疼痛に対する治療に対して、応用可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- 1) Makino H, Seki S, Yahara Y, Shiozawa S, Aikawa Y, Motomura H, Nogami M, Watanabe K, Sainoh T, Ito H, Tsumaki N, Kawaguchi Y, Yamazaki M, Kimura T. A selective inhibition of c-Fos/activator protein-1 as a potential therapeutic target for intervertebral disc degeneration and associated pain. *Sci Rep.* 2017 Dec 5;7(1):16983.
- 2) Motomura H, Seki S, Shiozawa S, Aikawa Y, Nogami M, Kimura T. A selective c-Fos/AP-1 inhibitor prevents cartilage destruction and subsequent osteophyte formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 497(2): 756-761. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.147. OPEN ACCESS
- 3) Seki S, Hirano N, Matsushita I, Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Motomura H, Suzuki K, Yahara Y, Watanabe K, Makino H, Kimura T. Lumbar spine surgery in patients with rheumatoid arthritis(RA): what affects the outcomes. *Spine J.* 2018 Jan; 18(1): 99-106. doi: 10.1016/j.spinee.2017.06.030. OPEN ACCESS

- 4) Seki S, Kawaguchi Y, Mine H, Kimura T. A novel screwing method to prevent decubitus and skin ulcer in severe kyphoscoliosis after spinal cord injury: A case report. J Orthop Sci. 2017 Oct 3. pii: S0949-2658(17)30248-8.
- 5) Seki S, Yahara Y, Makino H, Kobayashi K, Nakano M, Hirano N, Watanabe K, Takahashi J, Kawaguchi Y, Kimura T. Differential rod contouring on thoracolumbar/lumbar curvature in patients with adolescent idiopathic scoliosis: An analysis with intraoperative acquisition of three-dimensional imaging. J Orthop Sci. 2019 Jan 22. doi: 10.1016/j.jos.2019.01.001. OPEN ACCESS
- 6) Yahara Y, Seki S, Makino H, Watanabe K, Uehara M, Takahashi J, Kimura T. Three-Dimensional Computed Tomography Analysis of Spinal Canal Length Increase After Surgery for Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Multicenter Study. J Bone Joint Surg Am. 2019 Jan 2;101(1):48-55. doi: 10.2106/JBJS.18.00531. OPEN ACCESS
- 7) Makino H, Kawaguchi Y, Seki S, Nakano M, Yasuda T, Suzuki K, Ikegawa S, Kimura T. Lumbar disc degeneration progression in young women in their 20's: A prospective ten-year follow up. J Orthop Sci. 2017 Jul;22(4):635-640.
- 8) Seki S, Yahara Y, Makino H, Kawaguchi Y, Kimura T. Selection of posterior spinal osteotomies for more effective periapical segmental vertebral derotation in adolescent idiopathic scoliosis-An in vivo comparative analysis between Ponte osteotomy and inferior facetectomy alone. J Orthop Sci. 2018; 23(3): 488-94. doi: 10.1016/j.jos.2018.02.003. OPEN ACCESS
- 9) Seki S, Newton PO, Yahara Y, Makino H, Nakano M, Hirano N, Kawaguchi Y, and Kimura T. Differential rod contouring is essential for improving vertebral rotation in patients with adolescent idiopathic scoliosis: thoracic curves assessed with intraoperative CT. Spine (Phila Pa 1976), 43:E585-E591, 2018 doi: 10.1097/BRS.0000000000002428. OPEN ACCESS
- 10) 関 庄二 腰痛に対する選択的 c-fos/AP-1 阻害薬の効果 5th Toyama-Base Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Drug Development, 5:40-41, 2018
- 11) 関 庄二 . 富山県における側弯症検診の現状と課題 - 秘伝, 側弯症を早期に発見する方法 - . 日本小児科医会会報; 2017; 54:108-112 .

〔学会発表〕(計 33 件)

- 1) Makino H, Seki S, Kawaguchi Y, Yasuda T, Suzuki K, Watanabe K, Kimura T. Coronal MRI analysis of angular deformity of nerve roots in patients with lumbar foraminal stenosis. ORS 2018 Annual meeting; 2018 Mar 10-13; New Orleans.
- 2) 関 庄二, 筋原康人, 牧野紘士, 小林賢司, 亀井克彦, 川口善治, 安田剛敏, 木村友厚 . 特発性側弯症患者における胸腰椎カーブでの Differential Rod Contouring の効果について . 第 52 回日本側弯症学会学術集会 ; 2018 Nov 2-3 ; 東京 .
- 3) 関 庄二, 筋原康人, 牧野紘士, 小林賢司, 亀井克彦, 材木美穂, 高橋 淳, 上原将志, 倉石修吾, 大場悠己, 渡辺 慶, 平野 徹, 大橋正幸, 川口善治, 安田剛敏 . 思春期特発性側弯症の矯正固定術における脊柱管距離の 3DCT 解析多施設共同研究 . 第 52 回日本側弯症学会学術集会 ; 2018 Nov 2-3 ; 東京 .
- 4) 牧野紘士, 関 庄二, 川口善治, 小林賢司, 亀井克彦, 木村友厚 . AIS に対する後方矯正固定術後超早期における身体活動の前向き調査 . 第 52 回日本側弯症学会学術集会 ; 2018 Nov 2-3 ; 東京 .
- 5) 亀井克彦, 関 庄二, 牧野紘士, 川口善治, 安田剛敏, 中野正人, 木村友厚 . 富山県における Scoliometer を用いた側弯症検診 - 装具治療対象患者の Cut Off 値 - . 第 52 回日本側弯症学会学術集会 ; 2018 Nov 2-3 ; 東京 .
- 6) 亀井克彦, 関 庄二, 牧野紘士, 筋原康人, 小林賢司, 材木美穂, 川口善治, 安田剛敏, 木村友厚 . 思春期特発性側弯症患者における術前椎弓根形態と術後スクリュウのミスマッチ率の検討 . 第 52 回日本側弯症学会学術集会 ; 2018 Nov 2-3 ; 東京 .
- 7) 関 庄二, 牧野紘士, 小林賢司, 亀井克彦, 川口善治, 安田剛敏, 鈴木賀代, 木村友厚 . 胸腰椎カーブを持つ特発性側弯症患者における Differential Rod Contouring の効果 . 第 29 回北陸脊椎脊髄外科研究会 ; 2018 Dec 1 ; 福井
- 8) 関 庄二 腰椎変性側弯症における LIF 併用 Saccura Spinal System の使用経験 Saccura Spine Seminar 2018 Sep 15 東京
- 9) 関 庄二, 牧野紘士, 亀井克彦, 材木美穂, 中野正人, 木村友厚 脊柱後側弯症に対する手術法と合併症対策 2018 Sep 8 ; 岐阜 中部 MIST 研究会
- 10) 溝内龍樹, 渡辺 慶, 関 庄二, 平野 徹, 庄司 寛和, 遠藤直人 思春期特発性側弯症に対する後方固定術後の肺容積変化と呼吸機能の検討 : CT を用いた 3 次元画像解析での検討 第 52 回日本側弯症学会学術集会 2018、11、2-3 東京
- 11) 材木美穂, 関 庄二, 牧野紘士, 亀井克彦, 木村友厚 思春期特発性側弯症患者における骨代謝動態の解析 第 7 回 JASA 2018 Aug 4-5 広島

- 12) 関 庄二 腰痛に対する選択的 c-fos/AP-1 阻害薬の効果 第 5 回富山・バーゼル医薬品研究開発シンポジウム, 富山, 2018
- 13) 牧野紘士、関 庄二、木村友厚 思春期特発性側弯症の血清マーカーについて JST 新技術説明会 東京 Sep 13, 東京
- 14) 関 庄二, 平野典和, 川口善治, 中野正人, 安田剛敏, 鈴木賀代, 箭原康人, 牧野紘士, 小林賢司, 木村友厚 思春期特発性側弯症患者における主胸椎カーブでの Differential Rod Contouring の効果 - 術中 CT による椎体回旋改善度の評価 - .第 47 回日本脊椎脊髄病学会学術集会; 2018 Apr 12-14; 神戸 .
- 15) 鈴木賀代, 安田剛敏, 川口善治, 関 庄二, 金森昌彦, 木村友厚 . 胸椎化膿性脊椎炎の臨床的特徴と手術療法 .第 130 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会; 2018 Apr 20-21; 松山 .
- 16) 牧野紘士, 関 庄二, 川口善治, 安田剛敏, 鈴木賀代, 木村友厚 . 脊椎手術における手術創感染 (SSI) に対する予防的バンコマイシン (VCM) の投与法に関する検討 . 第 130 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会; 2018 Apr 20-21; 松山 .
- 17) 亀井克彦, 関 庄二, 牧野紘士, 山上 亨, 中野正人, 木村友厚 . 富山県における scolimeter を用いた検診での現状と問題点 .第 130 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会; 2018 Apr 20-21; 松山 .
- 18) 関 庄二, 川口善治, 安田剛敏, 鈴木賀代, 箭原康人, 牧野紘士, 小林賢司, 木村友厚 . 思春期特発性側弯症患者における主胸椎カーブでの differential rod contouring の効果 - 術中 CT による椎体回旋改善度の評価 - . 第 91 回日本整形外科学会学術総会; 2018 May 24-27; 神戸 .
- 19) 関 庄二、中野正人、平野典和、川口善治、安田剛敏、鈴木賀代、箭原康人、木村友厚 . 成人脊柱変形に対して OLIF を用いた矯正固定術 - 後方単独法との画像的比較検討 - 日本 MIST 研究会, 2017, 1, 25-26, 東京 .
- 20) 関 庄二、川口善治、安田剛敏、鈴木賀代、箭原康人、木村友厚 特発性側弯症患者に対する Differential Rod Contouring (DRC) の効果について - 術中 CT による椎体回旋改善度の測定から - 第 46 回日本脊椎脊髄病学会 2017, 4.13-15, 札幌
- 21) 関 庄二、川口善治、安田剛敏、鈴木賀代、渡辺健太、箭原康人、牧野紘士、平野典和、中野正人、松下 功、元村 拓、木村友厚 関節リウマチ患者の腰椎手術の成績 除圧か固定か 第 46 回日本脊椎脊髄病学会 2017, 4.13-15, 札幌
- 22) 小林賢司 関 庄二、和田輝至、川口善治、木村友厚 . 腰椎固定術後に脊柱変形が増悪し前後同時矯正固定術を施行した 1 例 中部 MIST 研究会, 2017, 9, 2-3, 福井 .
- 23) 関 庄二、川口善治、安田剛敏、鈴木賀代、小林賢司、木村友厚 脊柱後側弯症に対する手術法と合併症対策第 129 回中部日本整形災害外科学会 2017, 10.6-7, 富山
- 24) 関 庄二、牧野紘士、箭原康人、塩沢俊一、Kouichi Masuda、妻木範行、木村友厚 . 椎間板変性抑制を目指した治療標的因子と椎間板再生に向けて 第 20 回日本低侵襲脊椎外科学会学術集会, 2017, 7, 27 - 28, 札幌
- 25) 関 庄二、松下 功、元村 拓、平野典和、川口善治、安田剛敏、鈴木賀代、木村友厚 関節リウマチ患者の腰椎手術の成績 除圧か固定か 第 61 回日本リウマチ学会総会 2017, 4.20-22, 福岡
- 26) 材木美穂、関 庄二、箭原康人、牧野紘士、野上真紀子、渡邊健太、木村友厚 思春期特発性側弯症患者における骨代謝動態の解析 第 51 回日本側弯症学会学術集会 2017, 8, 24 - 25 札幌
- 27) 関 庄二、材木美穂、箭原康人、牧野紘士、渡邊健太、川口善治、木村友厚 思春期特発性側弯症患者における凹側、凸側の黄色靭帯の比較検討 第 51 回日本側弯症学会学術集会 2017, 8, 24 - 25 札幌
- 28) 関 庄二, 川口善治, 安田剛敏, 箭原康人, 渡邊健太, 牧野紘士, 木村友厚 特発性側弯症患者においてどの椎体が最も Direct Vertebral Rotation (DVR) の効果が高いか - 術中 CT による椎体回旋改善度の測定から - 第 51 回日本側弯症学会学術集会 2017, 8, 24 - 25 札幌
- 29) 牧野紘士、関 庄二、箭原康人、野上真紀子、元村 拓、渡邊健太、川口善治、木村友厚 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動を用いた特発性側弯症患者 (AIS) 血漿タンパク解析 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 10. 26-28 沖縄
- 30) 材木美穂、関 庄二、箭原康人、牧野紘士、野上真紀子、渡邊健太、木村友厚 思春期特発性側弯症患者における骨代謝動態の解析 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 10. 26-28 沖縄
- 31) 関 庄二、材木美穂、箭原康人、牧野紘士、野上真紀子、渡邊健太、川口善治、木村友厚 思春期特発性側弯症患者における凹側、凸側の黄色靭帯の比較検討 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 10. 26-28 沖縄
- 32) 関 庄二、川口善治、安田剛敏、鈴木賀代、箭原康人、渡邊健太、牧野紘士、材木美穂、木村友厚 特発性側弯症患者における Differential Rod Contouring の効果について - 術中 cone-beam CT による椎体回旋改善度の測定から - 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 10. 26-28 沖縄

- 33) 関 庄二、牧野紘士、箭原康人、塩沢俊一、妻木範行、木村友厚. 椎間板変性抑制を目標とした治療標的因子と椎間板再生に向けて 日本腰痛学会, 2017, 11, 3, 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 特発性側弯症マーカー
発明者: 関 庄二、木村友厚、牧野紘士
権利者: 関 庄二、木村友厚、牧野紘士
種類:
番号: 3 0 5 0 6 0 5 6 7
出願年: H30.2.26
国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 川口 善治
ローマ字氏名:(KAWAGUCHI, yoshiharu)
所属研究機関名: 富山大学
部局名: 大学院医学薬学研究部(医学)
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 00262527

研究分担者氏名: 箭原 康人
ローマ字氏名:(YAHARA, yasuhito)
所属研究機関名: 富山大学
部局名: 附属病院
職名: 医員
研究者番号(8桁): 60456390

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 野上 真紀子
ローマ字氏名:(NOGAMI, makiko)

研究協力者氏名: 牧野 紘士
ローマ字氏名:(MAKINO, hiroto)