

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10841

研究課題名(和文) 椎間板性腰痛の軟骨変性および神経侵入におけるDUSP-1による抑制効果

研究課題名(英文) Role of DUSP-1 on the regulation of disc degeneration and innervation in the development of discogenic low back pain

研究代表者

遠藤 健司 (Endo, Kenji)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90266479

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)：椎間板性腰痛の病態を制御しうる保存療法は確立されていない。本研究は、炎症刺激の細胞内情報伝達を担うMAP kinasesおよびその脱リン酸化酵素であるDUSP1の椎間板性腰痛病態形成への関与についてDUSP1をknock downしたヒト椎間板由来細胞を用いて検討した。DUSP1 knock down細胞において、IL-1により誘導される椎間板性腰痛病態形成分子である神経成長因子および細胞外基質分解酵素の発現増強が認められた。DUSP1は椎間板性腰痛の病態を制御しうる分子であることが明らかとなり、新規薬剤開発の礎となる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞内情報伝達分子を標的とした薬剤開発が様々な疾患に適用されている。本研究ではMAP kinaseの3種類のサブタイプ(ERK, p38およびJNK)の阻害剤単独では、椎間板性腰痛の病態形成制御は困難であることを見出し、これらを包括的に制御しうるDUSP1にその可能性を見出した点は学術的意義のある研究といえる。また、椎間板性腰痛を含む腰痛症は我が国において最も有訴率の高い疾患であることから、DUSP1を調節することで椎間板性腰痛の病態制御の可能性を見出したことは、今後の新規椎間板性腰痛治療薬開発への礎となることが強く期待され、社会的意義の高い研究であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Disease modifying drugs for discogenic low back pain (DLBP) have yet to be established. This study investigated the involvement of inflammatory signaling pathway by focusing on MAP kinases and their endogenous phosphatase, DUSP1 in the development of DLBP. Expression of nerve growth factor (associated with innervation) and matrix metalloproteinases (associated with disc degeneration) induced by IL-1 was enhanced in DUSP1 knocked down cells isolated from human intervertebral disc. This study sheds light on DUSP1 as a novel target molecule for the conservative treatment of DLBP.

研究分野：整形外科学

キーワード：椎間板性腰痛 椎間板変性 神経侵入 DUSP1

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

1. 研究開始当初の背景

近年、椎間板性腰痛の分子機構が明らかになり、加齢や炎症による椎間板変性に伴い、疼痛伝達をする神経線維が椎間板内側に侵入し、さらに疼痛感作が行われることが椎間板性腰痛の病態の1つであると考えられている。椎間板変性には椎間板細胞外基質を分解する matrix metalloproteinases (MMPs)が、神経侵入には nerve growth factor (NGF)が関与し、同病態形成に重要な役割を担う分子として報告されているが、これら分子群の発現調節機序については十分解明されていない。

先行研究において我々は、腰痛治療に汎用される cyclooxygenase (COX)-2 阻害剤が MMPs および NGF 発現をむしろ促進させ、逆に COX-2 阻害剤で抑制される prostaglandin(PG)E₂ がこれら分子発現を抑制することを見出した。また、腰部脊柱管狭窄症の間欠性跛行に適応がある PGE₁ 誘導体、limaprost においても同様の効果を確認している。すなわち PGE_{1/2} は、NGF および MMPs 発現に対して抑制的に作用することが推察され、椎間板性腰痛の病態を制御しうることが考えられた。

そこで本研究は、PGE_{1/2} による NGF および MMPs 発現抑制機序を明らかにすることで新規椎間板性腰痛の標的分子を見出すことを目的として、炎症刺激の細胞内情報伝達を担う mitogen-activated protein (MAP) kinases とその内因性脱リン酸化酵素である dual specificity phosphatase (DUSP)-1 に着目し検討を行なった。

2. 研究の目的

椎間板性腰痛の病態を制御しうる標的細胞内情報伝達経路として MAP kinases-DUSP1 経路に着目し、各種 MAP kinases 阻害剤および DUSP1 knock down ヒト椎間板由来細胞を用いて椎間板性腰痛の病態形成分子である NGF および MMPs 発現に対する効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

腰椎変性疾患に対する手術時に得られる腰椎椎間板組織よりヒト椎間板由来細胞を pronase/collagenase による酵素消化法により単離培養し、以下の実験に用いた。

- (1) **ヒト椎間板細胞における MAP kinases 阻害剤の NGF および MMPs 発現に対する効果**
ヒト椎間板細胞を、MAP kinases のサブタイプである ERK, p38 および JNK 阻害剤 (U0126 for ERK, SB203580 for p38, SP600125 for JNK) 存在下、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 β で刺激し、誘導される NGF および MMPs 発現を realtime PCR 法により測定した。
- (2) **DUSP1 を knock down したヒト椎間板細胞における NGF および MMPs 発現調節**
ヒト椎間板細胞に DUSP1 siRNA を遺伝子導入し DUSP1 knock down 細胞を作成した。同細胞を IL-1 β 刺激し、誘導される MAP kinases のリン酸化を Western blot 法により、NGF および MMPs 発現を realtime PCR 法により測定し、非 knock down 細胞と比較検討した。
- (3) **MAP kinase 経路および DUSP1 発現調節に対する PGE_{1/2} の作用**
PGE_{1/2} の MAP kinases-DUSP1 経路に対する効果を Western blot 法により、DUSP1 発現に対する効果を realtime PCR 法により評価した。

4. 研究成果

(1) **ヒト椎間板細胞における MAP kinases 阻害剤の NGF および MMPs 発現に対する効果**
ヒト椎間板細胞を、ERK (U0126), JNK (SP600125) または p38 (SB203580) 阻害剤存在下 IL-1 β 刺激し、NGF および MMPs 発現に対する効果を検討した。IL-1 β により誘導される NGF 発現は、JNK 阻害剤により有意に抑制されたが、ERK 阻害剤はむしろ促進させ、p38 阻害剤は影響を及ぼさなかった (Fig 1)。

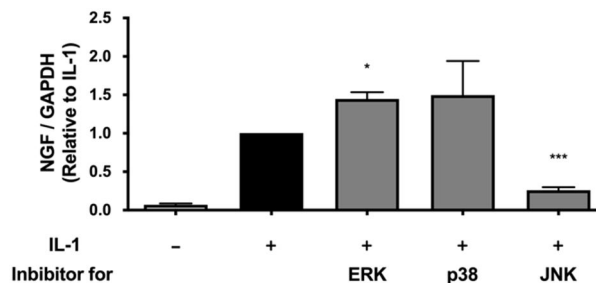


Fig 1. Effect of MAP kinase inhibitors on NGF expression in human intervertebral disc cells

一方、IL-1 β により誘導される MMP-13 発現は、ERK および p38 阻害剤により有意に抑制されたのに対し、JNK 阻害剤は全く影響を及ぼさなかった (Fig 2) . また、IL-1 β により誘導される MMP-1 および MMP-3 発現は ERK および JNK 阻害剤により有意に抑制され、p38 阻害剤では抑制されなかった (結果省略) . すなわち、NGF および MMPs-1, -3, -13 は MAP kinase のうち ERK, p38 および JNK のサブタイプにより異なる調節を受けることが明らかとなった .

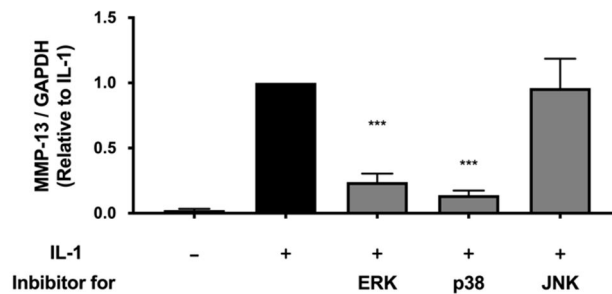


Fig 2. Effect of MAP kinase inhibitors on MMP-13 expression in human intervertebral disc cells

(2) DUSP1 を knock down したヒト椎間板細胞における NGF および MMPs 発現調節

MAP kinases の ERK, JNK および p38 経路を脱リン酸化する DUSP1 を調節することで椎間板性腰痛の病態形成分子を制御可能か否か検討するため、DUSP1 siRNA を遺伝子導入することで DUSP1 knock down 細胞を調整し検討した . siRNA により DUSP-1 発現は約 75%抑制された (Fig 3) .

DUSP-1 knock down 細胞における MAP kinases (p38, JNK および ERK)のリン酸化は、非 knock down 細胞と比べ、リン酸化の増強および遷延が観察された (Fig 4) .

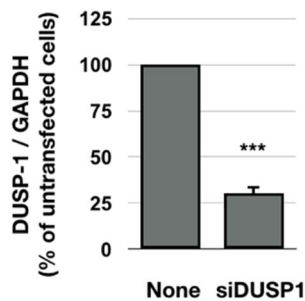


Fig 3. Knock down DUSP1 by siRNA in human intervertebral disc cells.

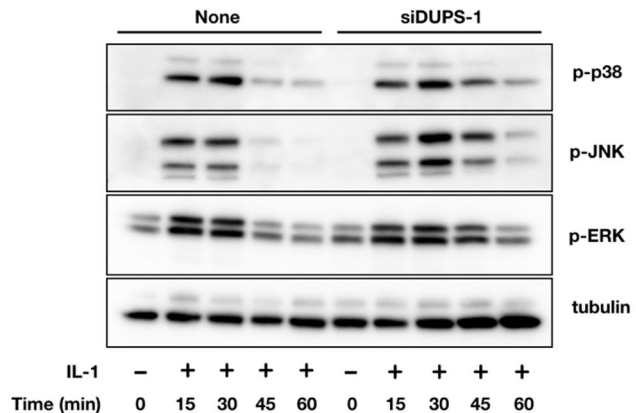


Fig 4. DUSP1 knock down exaggerated the phosphorylation of MAP kinases in human intervertebral disc cells

DUSP-1 knock down 細胞における NGF および MMPs 発現に対する効果を検討した . IL-1 β により誘導される NGF (Fig 5 左図)および MMP-13 (Fig 5 右図)発現は、DUSP1 knock down 細胞において有意に促進した . 同様に IL-1 β により誘導される MMP-1 および MMP-3 発現においても DUSP1 knock down 細胞において有意な促進効果が観察された (結果省略) .

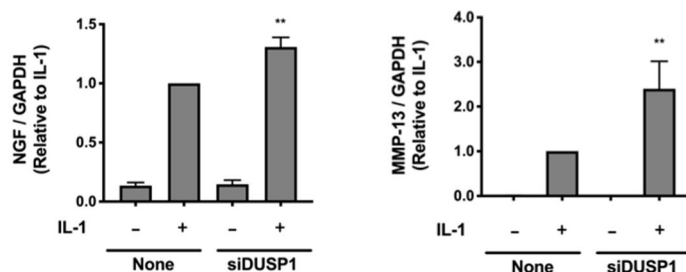


Fig 5. DUSP1 knock down exaggerated the IL-1-induced NGF and MMP-13 expression in human intervertebral disc cells

(3) MAP kinase 経路および DUSP1 発現調節に対する PGE_{1/2} の作用

先行研究において PGE_{1/2} が、NGF および MMPs 発現を抑制することを見出したことから、PGE_{1/2} の MAP kinases のリン酸化および DUSP1 発現に対する作用について検討した。IL-1 β 刺激により誘導される MAP kinases (p38, JNK および ERK) のリン酸化は、PGE_{1/2} の添加により抑制された (Fig 6 左図)。また、DUSP1 発現は IL-1 β により誘導され、PGE_{1/2} の添加により濃度依存的に有意に促進した (Fig 6 右図)。以上の結果から、PGE_{1/2} は DUSP1 発現を促進させることで MAP kinases のリン酸化を抑制し、椎間板性腰痛の病態形成に関わる NGF および MMPs 発現を制御するものと思われる。

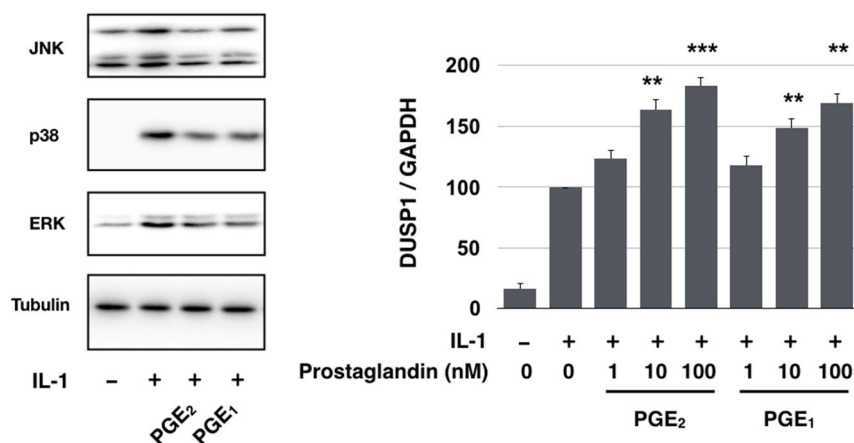


Fig 6. PGE_{1/2} suppressed IL-1-induced MAP kinase phosphorylation with enhancing the expression of DUSP1 in human intervertebral disc cells

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

澤地恭昇, 鈴木秀和, 遠藤健司, 村田寿馬, 依藤麻紀子, 日下部拓哉, 小西隆允, 山本謙吾
「ヒト椎間板細胞を用いた椎間板組織変性と疼痛制御を目指した基礎研究」 日本運動器疼痛学会誌, 査読有, 10 巻, 2018 年, pp 262-267

<http://www.jamp.so/>

澤地恭昇, 遠藤健司, 鈴木秀和, 村田寿馬, 日下部拓哉, 小西隆允, 粟飯原孝人, 山本謙吾
「【腰痛治療の最前線】腰痛の機序 腰痛発症のメカニズム」 関節外科, 査読無, 37 巻, 2018 年, pp 1288-1294

<http://www.medicalview.co.jp/catalog/MAGA12363-18-12-0.html>

澤地恭昇, 鈴木秀和, 遠藤健司, 村田寿馬, 小坂泰一, 山本謙吾 「椎間板性腰痛における神経成長因子の制御」 日本運動器疼痛学会誌, 査読有, 9 巻, 2017 年, pp 147-152

<http://www.jamp.so/>

Kazuma Murata, Yasunobu Sawaji, Wuqikun Alimasi, Hidekazu Suzuki, Kenji Endo, Hidetoshi Tanaka, Makiko Yorifuji, Taiichi Kosaka, Takaaki Shishido, Kengo Yamamoto
“PGE₁ attenuates IL-1 β -induced NGF expression in human intervertebral disc cells” Spine, 査読有, Vol. 41, 2016, pp E710-716

DOI:10.1097/BRS.0000000000001379

[学会発表](計 17 件)

Takuya Kusakabe, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Takamitsu Konishi, Asato Maekawa, Kazuma Murata, Taichiro Takamatsu, Yuji Matsuoka, Hidekazu Suzuki, Takato Aihara, Kengo Yamamoto “Role of DUSP1 on the regulation of NGF and MMPs in human intervertebral disc cells” The 46th International Society for the Lumbar Spine Annual Meeting, 2019 年

Takamitsu Konishi, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Hidekazu Suzuki, Yuji Matsuoka, Kazuma Murata, Takeshi Seki, Takuya Kusakabe, Takato Aihara, Kengo Yamamoto
“Regulation of endogenous interleukin (IL)-1 by exogenous IL-1 in human intervertebral

disc” The 46th International Society for the Lumbar Spine Annual Meeting, 2019 年

日下部拓哉, 澤地恭昇, 遠藤健司, 栗飯原孝人, 鈴木秀和, 松岡佑嗣, 高松太一郎, 関健, 前川麻人, 小西隆允, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における NGF および MMPs 発現制御における DUSP1 の関与」 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2018 年

小西隆允, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 前川麻人, 松岡佑嗣, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における外因性 IL-1 による内因性 IL-1 の発現調節」 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2018 年

Takuya Kusakabe, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Takamitsu Konishi, Asato Maekawa, Takeshi Seki, Taichiro Takamatsu, Yuji Matsuoka, Hidekazu Suzuki, Takato Aihara, Kengo Yamamoto “Role of DUSP1 on the regulation of NGF and MMPs in human intervertebral disc cells” The 28th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, 2018 年

日下部拓哉, 澤地恭昇, 遠藤健司, 栗飯原孝人, 鈴木秀和, 松岡佑嗣, 高松太一郎, 村田寿馬, 小西隆允, 前川麻人, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における NGF および MMPs 発現制御における DUSP1 の関与」 第 26 回 日本腰痛学会, 2018 年

小西隆允, 澤地恭昇, 遠藤健司, 鈴木秀和, 村田寿馬, 日下部拓哉, 前川麻人, 松岡佑嗣, 高松太一郎, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における IL-1 の autocrine 機構と DUSP1 による制御」 第 26 回 日本腰痛学会, 2018 年

日下部拓哉, 澤地恭昇, 遠藤健司, 鈴木秀和, 小西隆允, 松岡佑嗣, 田中英俊, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における NGF および MMPs 発現抑制における DUSP1 の関与」 第 47 回 日本脊椎脊髄病学会, 2018 年

小西隆允, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 松岡佑嗣, 田中英俊, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における IL-1 により誘導される内因性 IL-1 の発現制御」 第 47 回 日本脊椎脊髄病学会, 2018 年

澤地恭昇 「Molecular mechanism and management of development of discogenic low back pain」 第 21 回 脊椎と神経を語る会 (招待講演), 2018 年

澤地恭昇, 鈴木秀和, 遠藤健司, 村田寿馬, 依藤麻紀子, 日下部拓哉, 小西隆允, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞を用いた椎間板性腰痛における椎間板組織変性と疼痛制御を目指した基礎研究」 第 10 回 日本運動器疼痛学会 (招待講演), 2017 年

澤地恭昇, 鈴木秀和, 遠藤健司, 西村浩輔, 松岡佑嗣, 田中英俊, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞における PGE_{1/2} による NGF および MMP-1 発現抑制機序における DUSP1 の関与」 第 46 回 日本脊椎脊髄病学会, 2017 年

日下部拓哉, 澤地恭昇, 遠藤健司, 鈴木秀和, 岩城敬博, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞におけるステロイドによる神経成長因子および細胞外基質分解酵素の発現制御機構」 第 15 回 整形外科痛みを語る会, 2017 年

澤地恭昇, 鈴木秀和, 遠藤健司, 田中英俊, 村田寿馬, 西村浩輔, 松岡佑嗣, 山本謙吾 「ヒト椎間板細胞におけるステロイドによる NGF および MMP-1 発現抑制に DUSP1 の関与」 第 32 回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2017 年

Yasunobu Sawaji, Hidekazu Suzuki, Kenji Endo, Hidetoshi Tanaka, Hirosuke Nishimura, Taiichi Kosaka, Kengo Yamamoto “Protective role of prostaglandin E₁ for disc degeneration by reciprocally regulating collagenases and their endogenous inhibitor TIMP-3 in human intervertebral disc cells” SpineWeek 2016, 2016 年

澤地恭昇, 村田寿馬, 鈴木秀和, 遠藤健司, 田中英俊, 山本謙吾 「PGE₁ による MMP-1/-13 と TIMP-3 発現の相対的調節による椎間板変性保護効果」 第 31 回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2016 年

澤地恭昇, 村田寿馬, 鈴木秀和, 遠藤健司, 依藤麻紀子, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 「プロスタグランジンによる椎間板変性制御機構の検討 ～ヒト椎間板細胞における MMP-1/13 発現に着目して～」 第 45 回 日本脊椎脊髄病学会, 2016 年

〔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〕

ホームページ等

<http://www.tmuortho.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 山本 謙吾
ローマ字氏名: (YAMAMOTO, Kengo)
所属研究機関名: 東京医科大学
部局名: 医学部
職名: 主任教授
研究者番号(8桁): 10246316

研究分担者氏名: 澤地 恭昇
ローマ字氏名: (SAWAJI, Yasunobu)
所属研究機関名: 東京医科大学
部局名: 医学部
職名: 助教(特任)
研究者番号(8桁): 20571152

研究分担者氏名: 鈴木 秀和
ローマ字氏名: (SUZUKI, Hidekazu)
所属研究機関名: 東京医科大学
部局名: 医学部
職名: 兼任講師
研究者番号(8桁): 40317871

研究分担者氏名: 西村 浩輔
ローマ字氏名: (NISHIMURA, Hirosuke)
所属研究機関名: 東京医科大学
部局名: 医学部
職名: 助教
研究者番号(8桁): 80516047

研究分担者氏名: 松岡 佑嗣
ローマ字氏名: (MATSUOKA, Yuji)
所属研究機関名: 東京医科大学
部局名: 医学部
職名: 助教
研究者番号(8桁): 50408126

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 日下部 拓也
ローマ字氏名: (KUSAKABE, Takuya)

研究協力者氏名: 小西 隆允
ローマ字氏名: (KONISHI, Takamitsu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。