

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16613

研究課題名(和文)変形性脊椎症と疼痛に対する分子標的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of molecular-targeted therapies for degenerative spondylosis and pain

研究代表者

牧野 紘士(MAKINO, HIROTO)

富山大学・附属病院・医員

研究者番号：50816022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性脊椎症は、腰痛や脊柱管狭窄の原因となる頻度の高い疾患であり、その根本的な治療法が求められている。我々はマトリックス分解酵素の上流に位置する転写因子c-Fosに注目し、選択的c-Fos/AP-1阻害薬(T-5224)の椎間板変性、椎間板に関連する疼痛や黄色靭帯肥厚に対する抑制効果を検証した。ラット尾椎椎間板穿刺モデルにおいて、T-5224の投与により、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、疼痛行動解析で疼痛に対する閾値を上昇させた。この結果より、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が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性脊椎症は、有病率の高い腰痛症や脊柱管狭窄症を引き起こし、結果として身体活動の低下を招くため、社会的な負担は大きい。しかし、現在においては対症療法が中心であり、椎間板変性や黄色靭帯肥厚を抑制する根本的な治療法はない。本研究では、選択的c-Fos/AP-1阻害が、椎間板変性の進行を抑制し、疼痛に対しても抑制的に働くことを示した。このことより、脊椎の退行変化に対する新たな治療法の一つとなり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：Spondylosis is a common disease causes low back pain and spinal canal stenosis, and therefore, a radical treatment is required. We focused on the transcription factor c-Fos, which is located upstream of the matrix-degrading enzyme, and investigated the effects of a selective inhibitor of c-Fos/AP-1 (T-5224) on disc degeneration, disc-related pain and ligamentum flavum thickening. In a rat coccygeal disc puncture model, oral administration of T-5224 suppressed disc degeneration in imaging (X-ray, MRI) and histology findings. In addition, T-5224 increased the threshold for pain in pain-related behaviour. In conclusion, it was suggested that selective c-Fos/AP-1 inhibition could prevent the progression of disc degeneration and related pain.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板変性 c-Fos 疼痛 黄色靭帯肥厚

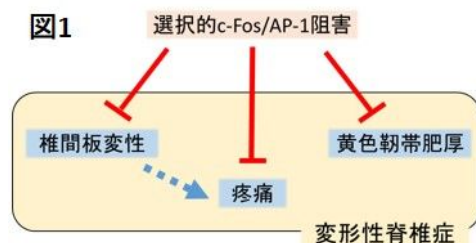
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

変形性脊椎症は、椎間板、椎間関節や黄色靭帯といった脊椎の各組織が退行変性した状態であり、臨床的には、腰痛症や脊柱管狭窄症を引き起こす。腰痛症や脊柱管狭窄症の有病率は高く、身体活動低下を引き起こすため、社会的な負担は大きい。しかし、現在においても薬物あるいは外科的加療による対症療法が中心であり、椎間板変性や黄色靭帯肥厚を抑制する根本的治療法はない。

椎間板変性の主要なメカニズムとして、細胞外マトリックスの産生と破壊の不均衡が考えられている。我々は、細胞外マトリックス分解酵素を制御することで椎間板変性を抑制する試みを行ってきており、その中で MMPs、ADAMTSs の上流に位置する転写因子 c-Fos/AP-1 に注目し、これを制御することで椎間板変性が抑制できると考えた。選択的 c-Fos/AP-1 阻害効果を持つ薬剤として、関節リウマチ治療薬として開発・設計されたヒトへの全身投与が可能な T-5224 (Nature Biotech 26:817, 2008) が椎間板変性抑制薬としての可能性を持つと考えた。さらに c-Fos は神経興奮マーカーとしても知られており、疼痛刺激において、後根神経節 (Dorsal root ganglion; DRG)、脊髄後角において発現が亢進する。c-Fos を抑制することで、疼痛に対する反応を低下させることができたという報告がある。さらに、腰部脊柱管狭窄症の主要な原因の一つである黄色靭帯の肥厚メカニズムにおいても c-Fos の関与が示唆された。

これらのことから、選択的 c-Fos/AP-1 阻害により、(1)椎間板変性の抑制、(2)疼痛の抑制、(3)黄色靭帯肥厚の抑制効果を得ることができるのではないかと考えられた(図1)。



2. 研究の目的

本研究では、(1)選択的 c-Fos/AP-1 阻害により、椎間板変性を抑制できるか？、(2)椎間板関連疼痛に対し選択的 c-Fos/AP-1 阻害がいかなる影響を有するか？、(3)選択的 c-Fos/AP-1 阻害によって黄色靭帯肥厚を抑制できるか？を検証することを目的とする。これらの効果を検証することにより、脊椎の退行変化に対する治療法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vivo における c-Fos/AP-1 阻害による椎間板変性の抑制

12週令の Sprague-Dawley ラットの尾椎椎間板を穿刺し、椎間板変性モデルを作製する。このラットに選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬(T-5224)あるいは偽薬を経口ゾンデで投与し、椎間板変性に対する治療効果を評価する。まず、椎間板への針穿刺によって、c-Fos の発現と、その下流に位置する MMPs、ADAMTSs の発現が増加することを qPCR、ウエスタンブロットを用いて確認する。そして、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬の投与によって、穿刺した椎間板における MMPs、ADAMTSs が抑制されることを確認する。さらに、X線像における Disc height index (椎体高に対する椎間板高を示す指標) MRI における T2 シグナル強度、組織学的スコアを用いて比較検討を行う。これらを行うことで、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬の椎間板変性抑制効果を明らかにする。

(2) c-Fos/AP-1 阻害による椎間板関連疼痛の抑制

(1)で用いたラット尾椎椎間板穿刺モデルを用いる。尾椎椎間板を穿刺したラットに対して T-5224 あるいは偽薬を経口投与し、穿刺した椎間板を支配する DRG における遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析する。引き続き、過去に報告のある NGF やカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、c-Fos の下流に位置する PDYN (プロディノルフィン; ディノルフィンの前駆体) の発現を個々に qPCR で比較検討する。

疼痛行動解析として、プロジェクターランプの輻射熱に対する掉尾反射の潜時を測定する方法である Tail-flick test を用いる。尾椎椎間板を穿刺したラットに対して T-5224 あるいは偽薬を経口投与し、熱刺激に対する掉尾反射の潜時を縦断的に測定し、比較検討を行う。これらを行うことで、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬の椎間板に関連する疼痛抑制効果を明らかにする。

(3) c-Fos/AP-1 阻害による黄色靭帯肥厚の抑制

手術時に採取したヒト黄色靭帯より、黄色靭帯細胞(LF cells)を単離し、TGF- β 刺激を加え、線維化関連遺伝子の発現の変化を検証する、さらに T-5224 を付加し、これらの遺伝子発現が抑制されるかを qPCR で比較検討する。

4. 研究成果

(1) in vivo における c-Fos/AP-1 阻害による椎間板変性の抑制

12週令のprague-Dawleyラットの尾椎椎間板を穿刺した椎間板変性モデルに選択的c-Fos/AP-1阻害薬(T-5224)あるいは偽薬をゾンデで経口投与し、椎間板変性に対する治療効果を評価した。穿刺した椎間板位において、c-Fosの遺伝子発現が有意に上昇することを示した。T-5224投与群では、偽薬群と比較して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、Adams-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。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、組織学的スコアも有意に改善していた。これにより、選択的c-Fos/AP-1阻害薬であるT-5224はin vivoにおいて、椎間板変性抑制効果を持つことが明らかになった。

(2) c-Fos/AP-1 阻害による椎間板関連疼痛の抑制

尾椎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、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。その結果、ラット尾椎椎間板への針穿刺後1週時点で、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。このことから、選択的c-Fos/AP-1阻害薬であるT-5224は、椎間板に関連する疼痛に対して抑制的に作用することが示唆された。

(3) c-Fos/AP-1 阻害による黄色靭帯肥厚の抑制

手術時に採取したヒト黄色靭帯より、細胞を単離後、単層培養し、in vitroにおける遺伝子発現の変化を解析した。黄色靭帯肥厚過程において重要な役割を果たすとされているTGF- β 刺激(10ng/mL)後24時間において、線維化関連遺伝子であるCOL1A2, COL3A1, MMP-2そしてc-Fosの遺伝子発現は有意に上昇していた。これに選択的c-Fos/AP-1阻害薬を加え、この発現が抑制されるかを検討したが、線維化関連因子の遺伝子発現に有意な変化を認めなかった。過去の報告では、皮膚線維芽細胞において、選択的c-Fos/AP-1阻害薬の線維化関連因子の抑制効果が示されていることから、細胞種や条件に関しては更に検討することが必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makino H, Seki S, Kitajima I, Motomura H, Nogami M, Yahara Y, Ejiri N, Kimura T	4. 巻 20
2. 論文標題 Differential proteome analysis in adolescent idiopathic scoliosis patients with thoracolumbar/lumbar curvatures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2640-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yahara Y, Seki S, Makino H, Watanabe K, Uehara M, Takahashi J, Kimura T	4. 巻 101
2. 論文標題 Three-Dimensional Computed Tomography Analysis of Spinal Canal Length Increase After Surgery for Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Multicenter Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Joint Surg Am	6. 最初と最後の頁 48-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seki S, Yahara Y, Makino H, Kobayashi K, Nakano M, Hirano N, Watanabe K, Takahashi J, Kawaguchi Y, Kimura T	4. 巻 24
2. 論文標題 Differential rod contouring on thoracolumbar/lumbar curvature in patients with adolescent idiopathic scoliosis: An analysis with intraoperative acquisition of three-dimensional imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 780-786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi Y, Kitajima I, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Yahara Y, Makino H, Ujihara Y, Ueno T, Kimura T	4. 巻 9
2. 論文標題 Increase of the Serum FGF-23 in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Global Spine J	6. 最初と最後の頁 492-498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yahara Y, Yasuda T, Kawaguchi Y, Suzuki K, Seki S, Kondo M, Makino H, Kamei K, Kanamori M, Kimura T	4. 巻 21
2. 論文標題 Sacroiliac joint variation associated with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-020-3105-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Yahara Y, Makino H, Kobayashi K, Kanamori M, Kimura T	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 The effect of multiple lesions in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Yahara Y, Makino H, Kobayashi K, Kanamori M, Kimura T	4. 巻 32
2. 論文標題 Clinical impact of ossification of the posterior longitudinal ligament progression after cervical laminoplasty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Spine Surgery	6. 最初と最後の頁 E133 ~ E139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BSD.0000000000000747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki S, Hirano N, Matsushita I, Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Motomura H, Suzuki K, Yahara Y, Watanabe K, Makino H, Kimura T	4. 巻 18
2. 論文標題 Lumbar spine surgery in patients with rheumatoid arthritis (RA): what affects the outcomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Spine Journal	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.spinee.2017.06.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Makino H, Seki S, Kawaguchi Y, Yasuda Y, Suzuki K, Watanabe K, Kimura T
2. 発表標題 腰部脊柱管狭窄症における脊柱管内の骨化・石灰化病変の関与
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野紘士、関庄二、亀井克彦、箭原康人、近藤美穂、川口善治、安田剛敏、木村友厚
2. 発表標題 特発性側弯症に対する後方矯正固定術における局所カクテル注射の術後鎮痛効果
3. 学会等名 第53回日本側彎症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野 紘士, 関 庄二, 下条 竜一, 川口 善治
2. 発表標題 AISに対する後方矯正固定術後早期における身体活動状況の前向き調査
3. 学会等名 第30回日本臨床スポーツ医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makino H, Seki S, Kawaguchi Y, Yasuda Y, Suzuki K, Watanabe K, Kimura T
2. 発表標題 Coronal MRI analysis of angular deformity of nerve roots in patients with lumbar foraminal stenosis
3. 学会等名 ORS 2018 Annual meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野紘士, 関 庄二, 川口善治, 小林賢司, 亀井克彦, 木村友厚
2. 発表標題 AISに対する後方矯正固定術後超早期における身体活動状況の前向き調査
3. 学会等名 第52回日本側彎症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野紘士, 川口善治, 安田剛敏, 関 庄二, 鈴木賀代, 箭原康人, 小林賢司, 木村友厚
2. 発表標題 骨形態における非リウマチ性上位頸髄障害に対する危険因子の検討
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野紘士, 関 庄二, 箭原康人, 塩沢俊一, 妻木範行, 木村友厚
2. 発表標題 椎間板変性および椎間板関連の疼痛に対する選択的c-Fos/AP-1阻害の治療効果
3. 学会等名 第131回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野紘士, 関 庄二, 川口善治, 安田剛敏, 鈴木賀代, 木村友厚
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第130回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------