

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591727

研究課題名 (和文) 腰部神経根性疼痛に対するアシアロエリスロポエチンの効果に関する研究

研究課題名 (英文) Non-erthoropoietic derivative erythropoietin (A-Epo) improves pain-related behavior induced by application of autologous nucleus pulposus (NP) on nerve root in rats.

研究代表者

菊地 臣一 (KIKUCHI SHIN-ICHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・学長

研究者番号：80045773

研究成果の概要：

腰部神経根に髄核を留置することで、プロテインキナーゼの発現の増加と神経損傷が惹起され疼痛閾値が低下した。貧血の治療としてすでに臨床で使用されているエリスロポエチンと、類似薬で血球増加作用のないアシアロエリスロポエチンを投与することにより、プロテインキナーゼの発現が1日目に抑制され、疼痛閾値の低下が21日目より回復することが明らかになった。腰椎疾患に対する症状を軽減することが期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：神経、疼痛、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

腰部神経根の障害により下肢痛が惹起され、この疼痛発現機序には神経根に存在する後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) が関与していると考えられている。腰部神経根性疼痛モデルで、疼痛の発現に伴いアポトーシス (細胞死) が誘導されることが知られている (Campane WM, et al. Eur J Neurosci 18, 2003)。このことから、我々は、アポトーシ

スの発現を抑制することによって、神経根由来の疼痛を改善させる可能性について以下について検討した。貧血の治療としてすでに臨床で使用されているエリスロポエチンには、脳内での神経保護作用を有することが報告されている (Morishita E, et al. Neuroscience 76, 1997)。我々は、神経根性疼痛モデルを用いて、エリスロポエチンの皮下投与後に、下肢疼痛と神経細胞でのアポト

ーシスの発現の関与について検討した。その結果、神経根性疼痛モデルにエリスロポエチンを皮下投与した後に、脊髄後角の神経細胞のアポトーシスが抑制されることを明らかにした。さらに、痛覚過敏も抑制することから、腰部脊髄神経に対しても神経保護作用を有していることを明らかにした (Sekiguchi Y, Kikuchi S, et al. *Spine* 28 (23), 2003)。貧血の治療としてすでに臨床で使用されているエリスロポエチンには、貧血のない正常の血液に対して血球増加作用が多血症の状態を引き起こすという危険性が指摘されている。そこで、血球増強作用を有していないアシアロエリスロポエチン (asialoerythropoietin) を用いることでその危険性を回避し、神経保護作用のみを神経障害に対して有効に利用できることが予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腰椎椎間板ヘルニアを反映した髄核留置ラットモデルを用いて投与後に、神経保護作用を有するか否かについて、行動学的、組織学的に明らかにすることである。本研究の独創的な点としては、アシアロエリスロポエチンを用いることと、臨床にそくした病態モデルによる検討を行う点である。

3. 研究の方法

ラット (Sprague-Dawley) 120 匹を用いて、全身麻酔下に第5腰神経根を展開する。髄核留置モデル (NP model) として、尾椎より髄核を採取し、第5腰神経根に移植するモデルを作成した。Sham モデル (Sham model : Sham) として、神経根部を展開するのみで終了した。NP モデルを4群に分け、sham 群とで5群とした。NP の1群と sham 群は、薬物を投与しない未治療群とした。NP 群の3群に対して、アシアロエリスロポエチン : asialoerythropoietin (AEpo)、エリス

ロポエチン (Epo)、または対照として溶媒 (vehicle) を、皮下より全身へ投与した。すなわち、NP-non-treatment 群 : 薬物を投与しない群、NP-AEpo 群 : 髄核留置モデルに AEpo を投与する群、NP-Epo 群 : 髄核留置モデルに Epo を投与する群、NP-vehicle 群 : 髄核留置モデルに溶媒を投与する群、Sham 群 : 薬物を投与しない群とした。上記の5群に対して、モデル作製前3日、術後3, 7, 14, 21, 28日を観察期間とした。行動学的検討として、von Frey test を用いて、両下肢足底の疼痛の閾値を測定した。さらに、各計測時点で灌流固定を行い、両側第5腰神経の DRG を採取し、ホルマリン固定後に、パラフィンブロックに包埋し、切片を作成した。免疫化学染色法で DRG の ATF3 (神経細胞傷害のマーカー)、p38 (サイトカインの刺激で活性化されるプロテインキナーゼ) を染色した。顕微鏡を接続したコンピューターに組織画像を取り込み、神経細胞の ATF3 陽性細胞数データ解析システムを使用する。さらに、ウェスタンブロットで、DRG 内の活性化 p38 と TNF-alpha (サイトカイン) の発現の動向を計測した。

4. 研究成果

(1) 行動学的検討

未治療の NP 群では、sham 群と比較して疼痛閾値が低下し、28日間持続した。A-Epo と Epo 投与群では、疼痛閾値が低下し、21日目から疼痛閾値の改善が認められた。一方、溶媒 (vehicle) 群では、疼痛閾値の低下が28日間持続した (図1)。すなわち、A-Epo と Epo は、疼痛閾値を改善させる作用を有することが示された。

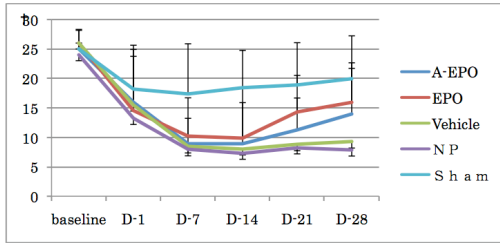
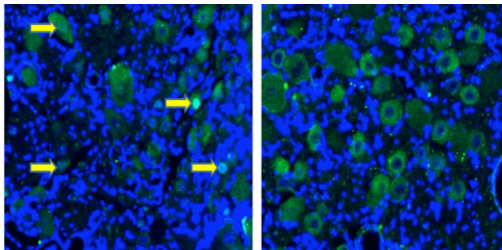


図1 疼痛閾値(g) (von Frey test)

(2) ATF3 の発現と陽性細胞数の比較

Day1 から DRG 内の神経細胞に ATF 3 が発現した(図 2)。陽性細胞数の発現割合の比較を行った (図 3)。NP(未治療)群では、sham 群と比較して Day1 から Day14 まで ATF3 の発現が有意に増加した($p < 0.05$)。A-Epo と Epo 投与群では、溶媒(vehicle)群と比較して、ATF 3 の発現が Day7 で有意に減少した($p < 0.05$)。



a) NP-vehicle 群 (Day 28)

b) NP-A-EPO 群 (Day 28)

図 2 ATF 3 の免疫化学蛍光染色

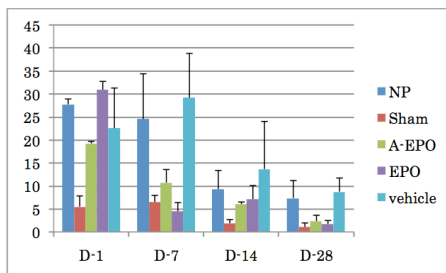


図 3 ATF 3 陽性細胞数 (個/DRG)

(3) p-p38 の発現

活性化 p-38(p-p38)は、神経細胞マーカーである NeuN と共染色され、神経細胞に発現していた(図 4)。

DRG 内での p-p38 の発現量をウエスタンブロット法にて比較した(図 5)。NP-A-Epo 群で、NP(未治療)群と NP-vehicle 群と比較して有意に p-p38 の発現量が減少した($p < 0.05$)。

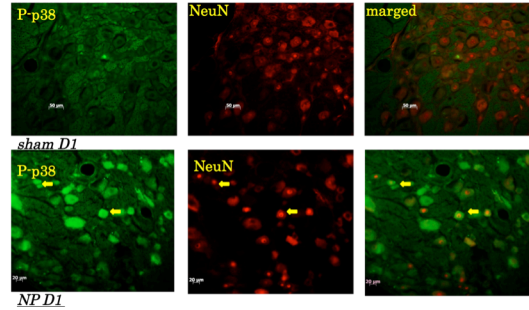
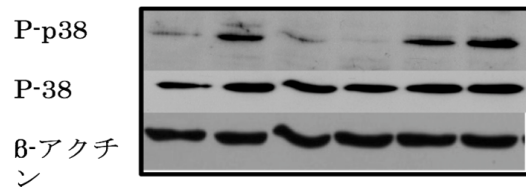


図 4 p-p38 発現 (DRG 細胞)



a) naïve(非手術)、b)NP (未治療)、c)sham 群、d)NP-A-EPO 群、e) NP-EPO 群、f) NP-Vehicle 群

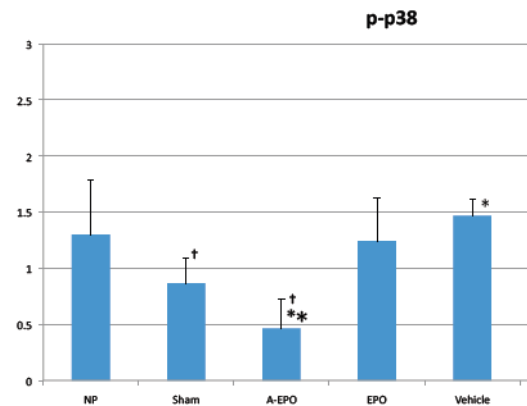


図 5 p-p38 ウエスタンブロット

(4) 結果のまとめと今後の課題

以上の結果から、NP 留置を神経に留置することにより、疼痛閾値が低下する。A-Epo と Epo の投与により、溶媒投与に比較して有意に疼痛閾値と神経損傷マーカーの発現が改

善する。また、疼痛閾値の改善より早期から、**A-Epo** 投与により活性化 **p-38** の発現が抑制されることが判明した。**TNF- α** の定量結果が出ていないことから、今後さらにサイトカインと **p-38** の発現の関係と行動学的検討との比較が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 臣一 (KIKUCHI SHIN-ICHI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・
学長
研究者番号：80045773

(2) 研究分担者

紺野 慎一 (KONNO SHIN-ICHI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・
教授
研究者番号：70254018

関口 美穂 (SEKIGUCHI MIHO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・
助教
研究者番号：00381400

(3) 連携研究者

なし