

平成 22 年 3 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791022

研究課題名（和文）神経成長因子による腰痛発症の解明とその制御による治療法の開発

研究課題名（英文） Development of therapy against low back pain by inhibition of nerve growth factor

研究代表者

浅沼 由美子 (Yumiko Asanuma)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10361966

研究成果の概要（和文）：椎間板性腰痛患者および外傷により脊椎手術を要した患者から術中採取したヒト腰椎椎間板を組織培養し、その培養液中に含まれる NGF タンパク量を ELISA により定量評価した。その結果、腰部脊柱管狭窄症の変性椎間板における NGF タンパク発現量は、正常椎間板に比べ、線維輪、髄核ともに有意に高値を示し、特に線維輪における発現が高値であった。一方、椎間板ヘルニアの患者においても、正常椎間板に比べ有意に NGF 発現が高かったが、その発現量は線維輪と髄核で有意差がなかった。また脊柱管狭窄症患者の変性椎間板と椎間板ヘルニアにおける NGF 発現量は椎間板ヘルニアで高い傾向にあったが、統計学的有意差には至らなかった。以上の結果より腰部脊柱管狭窄症といった変性椎間板においては線維輪における NGF 発現が慢性腰痛の原因になっている可能性があり、一方、椎間板ヘルニアにおいては髄核、線維輪ともに急性腰痛発症に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：NGF expression in the media from cultured intervertebral disc tissues was evaluated at protein level in the patients with low back pain due to intervertebral disc (IVD) disease who underwent spine surgery for spinal canal stenosis (SCS), intervertebral disc herniation (IDH) or trauma. The expression of NGF protein in degenerative disc from SCS was significantly higher than that from normal IVD in both annulus fibrosus (AF) and nucleus pulposus (NP), especially in AF, its expression level was significantly higher in AF than NP. In the IDH samples, the expression of NGF protein was significantly higher than that in the normal IVDs, and the significant difference of NGF expression was not determined between AF and NP from IDH. IDH showed the trend of higher expression of NGF protein level than that of SCS, however the significant difference was not recognized. As a result, it might be possible that in the degenerative disc disease such as SCS, NGF expression from AF may be one of the causes of chronic low back pain, and in IDH patients, NGF expressed in both AF and NP may be the onset of acute low back pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：運動器

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：神経成長因子、腰痛、椎間板性疼痛、神経伸長

1. 研究開始当初の背景

正常成人の椎間板は、外層の線維輪を除いて神経支配がない。椎間板変性の進行に伴い、神経が髄核を含む内層にまで伸長、進展し、その支配領域を拡大することが示され、その疼痛への関与が示唆されている (Freemont et al., 1997, LANCET)。臨床的には、椎間板性疼痛に対して、局所麻酔剤注入、IDET等の治療法が提唱されているが、現在その科学的効果は実証されておらず、長期的臨床結果の報告も芳しくない。その他の治療法に関しても、基礎研究面で種々提唱されているが、現在までのところ、効果的な治療戦略は確立されていない。腰痛愁訴が高率で見られる原因は、その原因疾患の発生頻度にのみならず、効果的な治療法が存在しないがためにおこる結果とも考えられる。

NGF は、神経伸長や神経保護作用の他に侵害受容神経の感受性を高めたり、炎症に伴い生じる疼痛の発症にも関与し、知覚過敏やアロディニアを誘導し、疼痛と密接に関わる因子であることが知られている。またラットの椎間板を支配する後根神経節の神経細胞の多くは NGF 感受性細胞である (Aoki et al., 2004, Spine) 点は、NGF が椎間板性疼痛に重要な働きをしていることを示唆している。ヒトにおいても、腰痛患者の椎間板における NGF 産生が組織学的に証明されており、腰痛の発症における NGF の関与が次第に明らかになりつつある (Freemont et al., 2004, American Journal of Pathology)。申請者らはドナー由来のヒト培養椎間板細胞が NGF を産生し、その産生がサイトカインによって促進することを世界で始めて証明した (Abe et al., 2007, Spine)。しかしながら、椎間板性疼痛のある患者からの椎間板における NGF 発現の定量的評価や、椎間板が産生する NGF の生物学的効果、特に神経伸長作用を確認した報告はなく、NGF と椎間板性疼痛との関連を定量的に分析、さらに疼痛発現を NGF 産生抑制により制御する試みはいまだ提唱されていない。

2. 研究の目的

申請者は、ヒトドナーの椎間板から分離培養した椎間板細胞から、NGF が産生分泌されること、また炎症性サイトカインである

IL-1 β および TNF- α が NGF の合成を促進することを、mRNA レベルおよびタンパクレベルにおいて明らかにした (Abe et al., 2006, Spine, 2007)。これらの炎症性サイトカインは椎間板の変性過程で椎間板細胞ならびに侵入してきた各種炎症性細胞より産生され、変性の進行に重要な役割を担うことが報告されている (Maitre et al., 2005 Arthritis Research & Therapy, Seguin et al., 2005, Spine)。申請者らは、ヒト検体から採取した変性椎間板組織を抗 NGF 抗体を用いて免疫染色し、椎間板の各層における NGF タンパクの発現を確認した。さらにこれら産生された NGF が神経伸長効果を発揮することを証明するために、ウシの椎間板細胞の Condition Medium を、幼若ラットから採取した後根神経節の器官培養に添加すると、明らかな神経伸長の増加がみられることが観察された。我々は、これらの実験結果より、炎症性サイトカインの多く産生されている変性椎間板においては、NGF 産生量が増加し、NGF 感受性神経に対する刺激が増強、これにより神経伸長をも促進されると仮説した。

しかし、これまで申請者が行ってきた実験の対象は、腰痛歴が不明であるドナーに限られていたため、臨床症状としての腰痛の程度と NGF 発現の関連については解明するに至らなかった。したがって、椎間板性腰痛が証明された患者において両者の関連性を追及することは、将来の治療戦略の開発において最重要課題と考えられた。

そこで本研究の目的は腰椎手術症例のうち、椎間板性腰痛を主訴とする患者（腰部脊柱管狭窄症と腰椎椎間板ヘルニア）とそれ以外の患者（主として外傷）から手術時に椎間板を採取し、椎間板内における NGF の発現量をタンパクレベルで比較検討することとした。またラットの腰椎椎間板に NGF 蛋白を注入し、椎間板における神経侵入について組織学的に評価した。

3. 研究の方法

腰椎手術を受ける患者から椎間板組織を採取し、これを実験に使用する。対象としたのは、2007 年から 2009 年までの間に慢性腰痛のある腰部脊柱管狭窄症患者 (n=5)、急性腰

痛のある腰椎椎間板ヘルニア患者 (n=5)、外傷などにより脊椎手術を要した正常椎間板患者 (n=4) であった。

椎間板組織の採取に当たっては、椎間板内組織を AF と NP に分けて採取。混入した血液は手術場にて可及的に生理食塩水にて除去した後、実験室内にて十分洗浄した。採取した椎間板は少量を組織学的検討に用い、主体はそれぞれ 0.5g の椎間板組織細片として、無血清培養液にて 72 時間培養する (triplicate)。この培養上清ならびに培養に使用した組織を NGF 蛋白発現の定量評価に用いた。

またラット (体重 350-400g) を対象に前方進入にて、腰椎椎間板を展開し、26G 針で NGF 蛋白を椎間板内の髓核部分に注入した。隣接する 3 つの椎間板に NGF 蛋白を注入した NGF 群 (n=3) と PBS を注入した群 (n=3) を作成し、一椎間あたり recombinant mouse NGF (100ng/2 μ l) または PBS (2 μ l) を注入した。神経伸長の程度を組織学的に評価するために、観察終了後 (椎間板注射後 3 ヶ月目) に椎間板を周囲の正常組織と一塊にして取り出し、脱灰標本を作製した。HE、サフラン-0 染色および PGP9.5 (神経線維の代表的マーカー) に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

椎間板性腰痛患者および外傷患者から術中採取したヒト腰椎椎間板を組織培養し、その培養液中に含まれる NGF タンパク量を ELISA により定量評価した。その結果、圧迫骨折などの外傷で椎間板を切除し、採取した正常椎間板 (n=4) では、AF 25.2 \pm 7.7 (pg/ml)、NP 5.3 \pm 1.2 (pg/ml) と NGF タンパク発現量がいずれの組織培養でも著しく少なかった。腰部脊柱管狭窄症に対し手術を施行した変性椎間板 (n=5) における NGF タンパク発現量は、タンパク量あたり、AF 219.7 \pm 77.1 (pg/ml)、NP 171.0 \pm 37.4 (pg/ml) と、いずれの組織培養においても正常椎間板にくらべ、NGF 蛋白発現量が有意に高かった (p<0.05)。また腰部脊柱管狭窄症の椎間板における NGF 発現量は AF が NP に比べ高値を示した (p<0.05)。一方、椎間板ヘルニアにより椎間板切除術を施行した患者 (n=5) では、AF 564.7 \pm 205.4 (pg/ml)、NP 615.1 \pm 261.1 (pg/ml) といずれも正常椎間板に比べ有意に高値であった (p<0.05)。一方、脊柱管狭窄症患者の変性椎間板と椎間板ヘルニア患者における椎間板とでは、椎間板ヘルニアにおける NGF 発現の方が高い傾向にあったが、統計学的有意差には至らなかった。以上の結果から、腰部脊柱管狭窄症のような変性椎間板を有する慢性腰痛患者においては AF における NGF 発現が腰痛の発症に関

与している可能性が考えられた。また腰椎椎間板ヘルニアにおける急性腰痛では、AF、NP ともに著しい NGF 発現量の増加を認め、これが急性腰痛の発症に関与している可能性が示唆された。

次にラットにおいて NGF 蛋白を腰椎椎間板に注入することにより椎間板への神経伸長作用を免疫組織染色により確認した。NGF 蛋白注入群では PBS 注入群に比べ線維輪における PGP9.5 抗体により染色される神経線維の数が多く観察されたことから腰痛の発症に NGF の神経伸長作用が関与している可能性が示唆された。

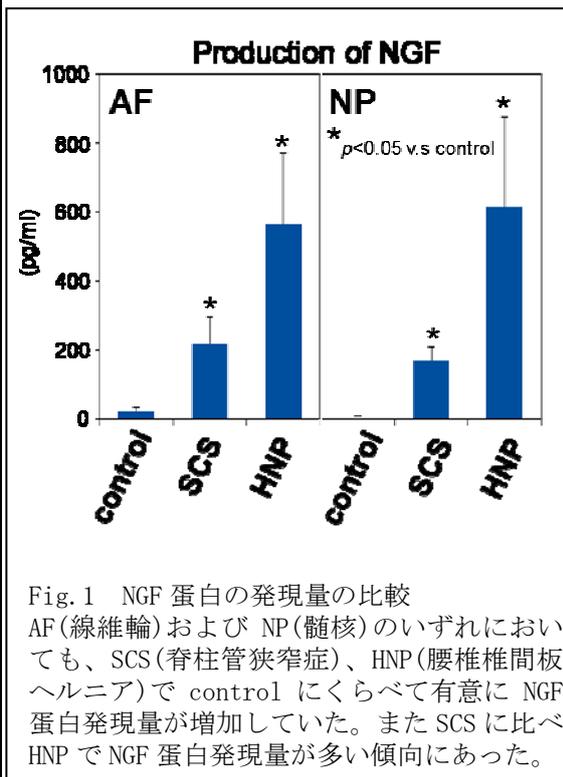


Fig. 1 NGF 蛋白の発現量の比較
AF (線維輪) および NP (髓核) のいずれにおいても、SCS (脊柱管狭窄症)、HNP (腰椎椎間板ヘルニア) で control にくらべて有意に NGF 蛋白発現量が増加していた。また SCS に比べ HNP で NGF 蛋白発現量が多い傾向にあった。

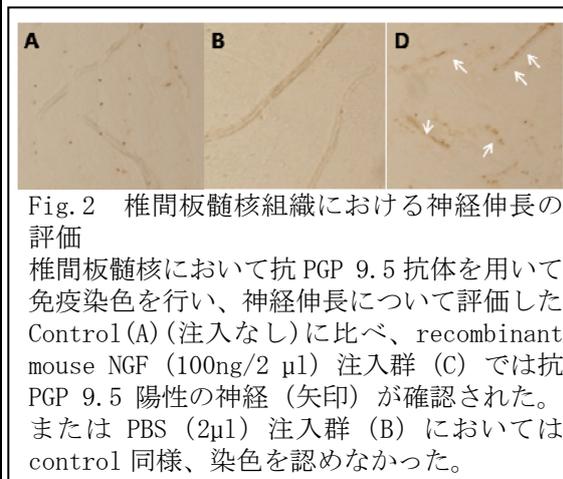


Fig. 2 椎間板髓核組織における神経伸長の評価
椎間板髓核において抗 PGP 9.5 抗体を用いて免疫染色を行い、神経伸長について評価した。Control (A) (注入なし) に比べ、recombinant mouse NGF (100ng/2 μ l) 注入群 (C) では抗 PGP 9.5 陽性の神経 (矢印) が確認された。または PBS (2 μ l) 注入群 (B) においては control 同様、染色を認めなかった。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅沼 由美子 (Yumiko Asanuma)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10361966

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：