

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09510

研究課題名（和文）M2マクロファージ由来神経ペプチドを介した炎症非依存性腰痛惹起機構の解明

研究課題名（英文）Role of M2 macrophages-produced neuropeptides in inflammatory-independent low back pain

研究代表者

宮城 正行（Miyagi, Masayuki）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90627556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：腰痛の生涯罹患率は85%と報告され、超高齢者社会を迎えた我が国における腰痛患者は2,800万人にものぼる。椎間板性腰痛に関する研究の多くは炎症性メディエータに着眼した研究であり、非炎症下での腰痛については明らかになっていない。本研究では非炎症下での椎間板性腰痛メカニズムを解明するために、M2マクロファージ由来神経ペプチドの同定と疼痛との関連性を検討した。その結果、M2由来の神経ペプチドとしてPeptide Lvを同定した。また、M2への極性化に関与する因子としてTGF- β 、SEMA7Aを同定した。これらの因子は新たな腰痛治療ターゲットとなるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国において腰痛治療は極めて重要である。本研究は非炎症性メディエータによる腰痛という新たな病態の一端を明らかにしたものであり、高い社会的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Pathology of intervertebral discs (IVDs) is a major factor in chronic low back pain (LBP). A number of studies have reported that inflammatory condition plays a pivotal role in the pathology of IVD. However, the mechanism of pain mechanisms in non-inflammatory states remain unclear. We found that Peptide Lv expression increased in M2 macrophages. TGF- β stimulate M2 macrophages polarization and inhibition in TGF- β signaling reduced M2 macrophages in mice IVD injury model. In addition, we found that SEMA7A play an important role for M2 polarization. Our findings may provide novel therapeutic targets to treat LBP.

研究分野：整形外科

キーワード：マクロファージ 腰痛 非炎症性

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰痛の生涯罹患率は 85%と報告され、超高齢者社会を迎えた我が国における腰痛患者は 2,800 万人にもなる。椎間板性腰痛に関する研究の多くは炎症性メディエータに着眼した研究であり、非炎症下での腰痛については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では非炎症下での椎間板性腰痛メカニズムを解明するために、M2 マクロファージ由来神経ペプチドの同定と疼痛との関連性を検討した。

3. 研究の方法

1. C57BL/6J マウスの尾椎から椎間板を採取した。酵素処理後、抗 CD11b 抗体と磁気ビーズを用いて椎間板マクロファージを採取した。また、骨髄より有核細胞を採取し、M-CSF 存在下で培養し、骨髄由来マクロファージを作製した。両細胞群を IL-1 β 、IL-4、IL10、LPS+IFN- γ で刺激し、M1、M2 マクロファージへの polarization 後の神経ペプチドの発現を検討した。

2. 椎間板傷害後の M2 マクロファージ極性化に関与する因子を検討した。10 週齢 C57BL/6J マウスを用いた。尾椎の椎間板を採取後、コラゲナーゼ処理し、有核細胞を得た。ビオチン標識抗 CD11b 抗体とストレプトアビジン共役磁気ビーズを用いて椎間板マクロファージを分離した。M-CSF 存在下で 1 週間培養後、培養液 (vehicle)、TGF- β + IL10、TGF- β + IL10+TGF- β inhibitor (SB431542) で培養した。30 分後、蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティングによる Smad2 のリン酸化を検討した。また、24 時間後、RNA を抽出し、M2 マーカー (CD206) の発現を検討した。27G 針を用いてマウス尾椎椎間板を傷害後 5,6 日に腹腔内に SB431542 を投与した。傷害後 7 日に椎間板を採取し、CD206 の発現を検討した。

3. TGF- β 、M2 マクロファージの局在を検討した。10 週齢および 72 週齢のウイスターラットから椎間板組織を採取後、髓核と線維輪をそれぞれ採取した。RNA を抽出後、RNA シーケンスを行った。

4. 研究成果

IL-4 存在下で椎間板マクロファージにおける Peptide Lv の発現が誘導された。ゲノム編集により Peptide Lv deficient マウスを作製した。Peptide Lv 欠損マウスでは椎間板傷害後の Tnfa、Il1b の発現の亢進が認められた。また、LPS による TNF-a 産生誘導は Peptide Lv によって抑制された。このことから Peptide Lv は椎間板傷害に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

TGF- β + IL-10 刺激により培養椎間板マクロファージにおける smad2 のリン酸化 CD206 の発現は亢進し、その亢進は SB431542 存在下で抑制された (図 1,2)。椎間板傷害後の CD206 の発現上昇は SB431542 投与により抑制された (図 3)。また、TGF- β は神経成長因子 (NGF) の発現を制御していることが明らかになった。TGF- β は椎間板傷害後のマクロファージの M2 極性化と疼痛関連因子の産生に関与している可能性が示唆された。

10 週齢、72 週齢とおもに線維輪で Tgfb や M2 マクロファージマーカー Cd163 の発現が高かった。このことから、M2 マクロファージは線維輪に存在し、レジデントの線維輪細胞によりその極性が制御されている可能性が示唆された。また、M2 マクロファージへの polarization を制御し得る因子として Sema7a を同定した。10 週齢 C57BL/6J マウスの骨髄から骨髄マクロファージを採取、培養後、TGF- β を添加したところ、sema7a の mRNA 発現および培養上清中の Sema7a が増加した。また、Sema7a の添加により CD163 の発現が増加した。これらのことから、線維輪由来の TGF- β が Sema7a を介して線維輪に存在するマクロファージの M2 polarization を促進している可能性が示唆された。

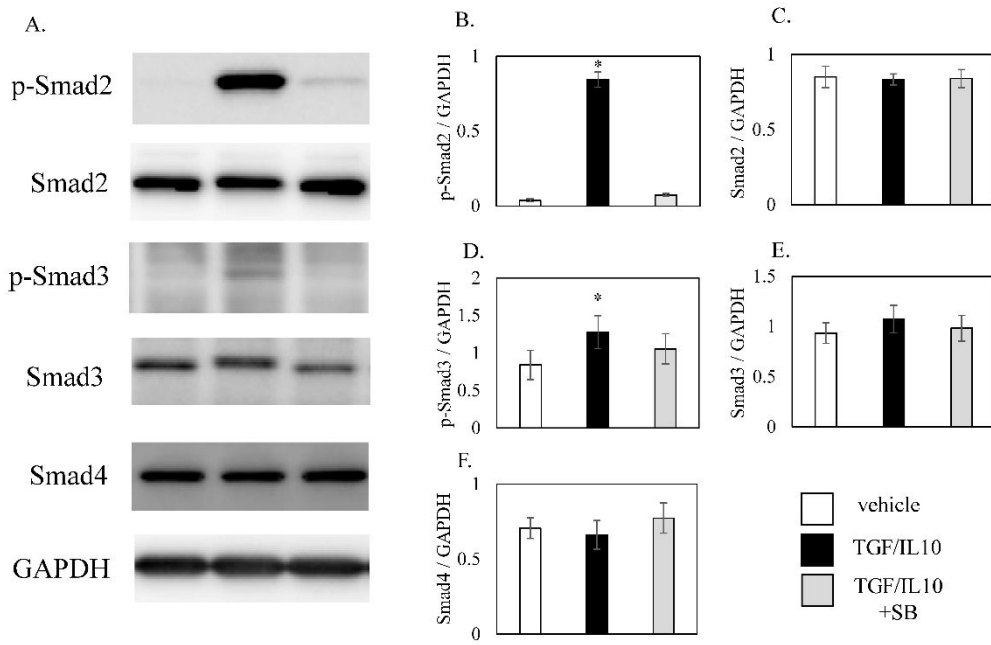


図 1. TGF- β による Smad2 のリン酸化の亢進

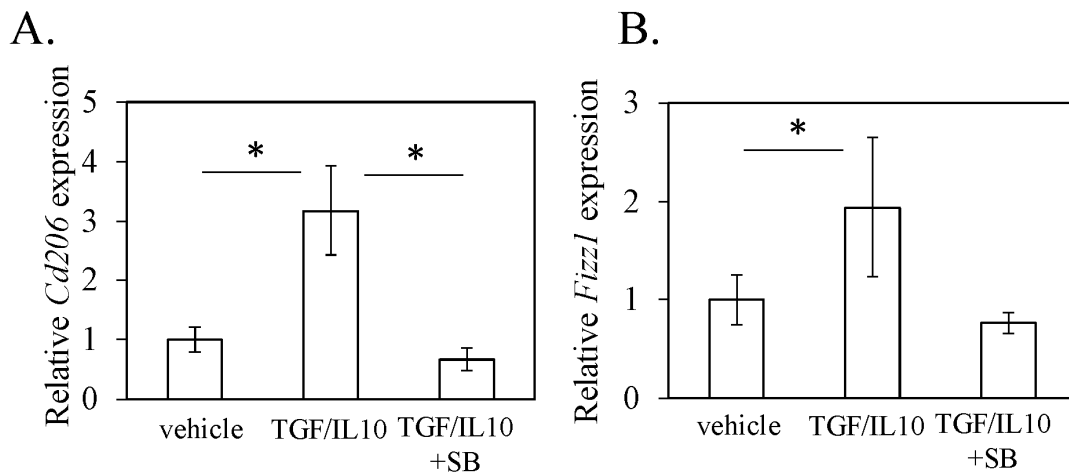


図 2. TGF- β 阻害剤が in vitro における M2 M ϕ マーカーの発現に及ぼす影響

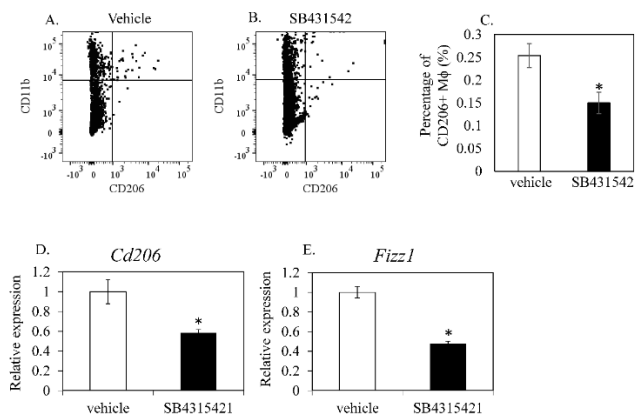


図 3. TGF- β 阻害による椎間板傷害後の M2 M ϕ の減少

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyagi M, Uchida K, Inoue S, Takano S, Nakawaki M, Kawakubo A, Sekiguchi H, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Shirasawa E, Kuroda A, Ikeda S, Yokozeki Y, Mimura Y, Akazawa T, Takaso M, Inoue G.	4. 巻 23
2. 論文標題 A High Body Mass Index and the Vacuum Phenomenon Upregulate Pain-Related Molecules in Human Degenerated Intervertebral Discs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23062973	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 Yokozeki Y, Kawakubo A, Miyagi M, Kuroda A, Sekiguchi H, Inoue G, Takaso M, Uchida K.	4. 巻 2021
2. 論文標題 Reduced TGF- Expression and CD206-Positive Resident Macrophages in the Intervertebral Discs of Aged Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 7988320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/7988320	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 Yokozeki Y, Uchida K, Kawakubo A, Nakawaki M, Okubo T, Miyagi M, Inoue G, Itakura M, Sekiguchi H, Takaso M	4. 巻 22
2. 論文標題 TGF- regulates nerve growth factor expression in a mouse intervertebral disc injury model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord	6. 最初と最後の頁 634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-021-04509-w	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 Miyagi M, Uchida K, Takano S, Nakawaki M, Sekiguchi H, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Shirasawa E, Kawakubo A, Akazawa T, Inoue G, Takaso M	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of CD14-positive cells in inflammatory cytokine and pain-related molecule expression in human degenerated intervertebral discs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24839	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 Kawakubo A, Uchida K, Miyagi M, Nakawaki M, Satoh M, Sekiguchi H, Yokozeki Y, Inoue G, Takaso M	4. 巻 38
2. 論文標題 Investigation of resident and recruited macrophages following disc injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 1703-1709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24590	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒田 晃義, 内田 健太郎, 宮城 正行, 中脇 充章, 川久保 歩, 井上 玄, 関口 裕之, 齋藤 亘, 高相 晶士
2. 発表標題 椎間板傷害後のApelinおよびその受容体APJの発現動態に関する検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横関 雄司, 内田 健太郎, 川久保 歩, 宮城 正行, 黒田 晃義, 井上 玄, 齋藤 亘, 高相 晶士
2. 発表標題 TGF- β を介した椎間板組織内神経成長因子の発現上昇機構の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田 晃義, 内田 健太郎, 川久保 歩, 宮城 正行, 井上 玄, 横関 雄司, 高相 晶士
2. 発表標題 椎間板傷害後のM2マクロファージ分化におけるTGF- β の役割の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮城 正行, 内田 健太郎, 高野 昇太郎, 中脇 充章, 井上 翔, 黒田 晃義, 川久保 歩, 横関 雄司, 井上 玄, 高相 晶士
2. 発表標題 腰痛のメカニズム 椎間板性腰痛のメカニズム
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田健太郎 川久保 歩 大久保直 宮城正行 井上 玄 横関雄司 迎 学 関口裕之 高相晶士
2. 発表標題 Peptide Lvは椎間板傷害後のMacrophage polarizationを制御する
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	内田 健太郎 (Uchida Kentaro) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究 分担者	大久保 直 (Okubo Tadashi) (10450719)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

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
---------	---------