

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22984

研究課題名(和文) マクロファージを介した椎間板内神経成長因子誘導機構の解明と腰痛との関連性の検討

研究課題名(英文) Regulation of NGF by macrophage in intervertebral discs

研究代表者

中脇 充章 (Nakawaki, Mitsufumi)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00623175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板組織内における神経成長因子(NGF)の発現制御機構を検討した。傷害椎間板組織からマクロファージを分離し、TNF- α 、TGF- β 、NGFの発現を検討した結果、TNF- α はマクロファージ分画、TGF- β は椎間板細胞分画で高発現を認めた。TNF- α ノックアウトマウスを用いて椎間板傷害モデルを作製し、NGFの発現を検討したが、野生型とKOマウスでNGFの発現に有意な差は認められなかった。一方、椎間板傷害モデルにTGF- β 阻害剤(SB431542)を投与したところ、NGFの発現は有意に減少した。このことから、椎間板組織内ではTGF- β がNGFを制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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2,800万人にもものぼる。腰痛による経済損失は年間7,000億円と推定されている。本研究で異化はNGFおよびNGF制御因子を標的とした腰痛治療の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied NGF regulation in a mouse model of IVD injury. We examined mRNA levels of Tnfa, Tgfb, and Ngf in IVDs from control and IVD-injured mice. We used magnetic cell separation to isolate macrophage-rich and IVD cell-rich fractions from injured IVDs. We also examined Ngf expression in injured IVDs from C57BL/6 J and Tnfa-knockout (KO) mice. To study the effect of TGF- β on Ngf expression, C57/BL6J mice were given an intraperitoneal injection of TGF- β inhibitor, SB431542 one and two days before harvesting IVDs. Tnfa, Tgfb, and Ngf expression was significantly increased in injured IVDs. Tnfa was predominantly expressed in the CD11b (+) fraction, and Tgfb in the CD11b (-) fraction. Ngf expression was comparable between CD11b (+) and CD11b (-) fractions, and between wild-type and Tnfa-KO mice. SB431542 suppressed TGF- β -mediated Ngf expression and NGF production in vitro. Further, SB431542 significantly reduced Ngf expression in IVDs. TGF- β may regulate NGF expression in vivo.

研究分野：整形外科

キーワード：神経成長因子 椎間板性腰痛 TGF-

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 万人にもものぼる。腰痛による経済損失は年間 7,000 億円と推定されており、腰痛機序の解明と治療法の開発は社会・医療経済的にも重要な意義を持つ。しかし、腰痛の 85%は病因を確定できない非特異的腰痛であり、未だ機序は明らかになっていない。申請者はマウス椎間板傷害モデルを用いて NGF の発現動態の検討を行った。その結果、長期に渡って NGF の発現上昇が持続することを示した。また、急性期には M1 マクロファージ (M ϕ) および TNF- α 発現が増加すること、慢性期には M2 M ϕ および TGF- β が増加することを示した。さらに、in vitro において TNF- α , TGF- β は NGF の産生を増加させた (J Orthop Res, 37(8): 1798-804, 2019)。しかし、生体内での NGF 制御機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、M ϕ および M ϕ 産生サイトカインを介した NGF 制御機構の解明により椎間板性腰痛メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

3-1. 椎間板傷害モデル *Tnfa*, *Tgfb* および *Ngf* の発現

C57BL/6J マウスを用いて、椎間板損傷後の *Tnfa*, *Tgfb*, *Ngf* の発現を検討した。椎間板損傷群のマウスには、27 ゲージの針で椎間板を 10 回穿刺した。対照マウスは、穿刺損傷以外のすべての処置を受けた。損傷後 0 日目 (PID0)、1 日目 (PID1)、3 日目 (PID3)、7 日目 (PID7) の *Tnfa*, *Tgfb*, *Ngf* の発現は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を用いて検討した。PID7 の椎間板から分離した CD11b(+)細胞 (マクロファージ) および CD11b(-)細胞 (椎間板細胞) における *Tnfa*, *Tgfb* および *Ngf* の発現を調べた。椎間板組織をコラゲナーゼ処理し、ビオチン結合抗体、ストレプトアビジン結合磁性ビーズを用いて分離した。分離した細胞における遺伝子発現解析には、qPCR を用いた。

椎間板損傷時の *Ngf* 発現に対する *Tnfa* 欠損の影響

40 匹の C57BL/6J マウスと *Tnfa*-KO マウスを用いて、NGF 発現における TNF- の役割を調べた。10 匹のマウスを無作為に選んで対照群とし、残りの 30 匹を椎間板損傷群とした。NGF の発現は、PID0、PID1、PID3、および PID7 において、qPCR (各時点につき n=10) を用いて測定した。

椎間板細胞培養における NGF 発現・産生に対する TGF- 阻害剤 SB431542 の効果

5 匹のマウスから単離した椎間板細胞の TGF- を介した *Ngf* 発現および NGF 産生に対する SB431542 の影響を調べた。椎間板細胞を培養し 1 週間後、-MEM、10ng/ml リコンビナント TGF-、または 10ng/ml リコンビナント TGF- + 1 μ M SB431542 で 6 時間および 24 時間刺激し、その後 RNA を抽出し、qPCR を用いて分析した。また、ELISA を用いて培養上清中の NGF 濃度を検討した。

椎間板損傷モデルマウスにおける TGF- 阻害剤の効果

上述の椎間板損傷を受けた 60 匹のマウスを、溶媒対照群と治療群の 2 つの均等なグループに無作為に割り当てた。治療群の 30 匹のマウスには、椎間板を採取する 1 日前と 2 日前に、5% DMSO 溶液に溶解した 10mg/kg SB431542 を腹腔内注射した (SB43152 群)。残りの 30 匹には、同じ時点で 5% DMSO 溶液を腹腔内注射した (溶媒対照群)。PID1, PID3, PID7 で椎間板を採取し、qPCR 分析した。

統計解析

統計解析には SPSS を用いた。各群における遺伝子およびタンパク質の発現の差異は、一元分散分析を行った後、多重比較検定 (Bonferroni 法) を用いて解析した。CD11b(+) 分画と CD11b(-) 分画における遺伝子発現の差異を比較するために、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った後、Wilcoxon 符号付き順位検定またはペア t 検定を用いた。さらに、Kolmogorov-Smirnov 検定後、t 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて、各時点における野生型マウスと *Tnfa*-KO マウス、または溶媒対照群と SB431542 群の違いを比較した。P < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

4-1 椎間板損傷後の *Tnfa*, *Tgfb*, *Ngf* の発現

野生型マウスでは、*Tnfa*の発現がPID1、3、7 (PID1, $P < 0.001$; PID3, $P < 0.001$; PID7, $P < 0.001$)、*Tgfb*の発現がPID3、7 (PID1, $P = 1.000$; PID3, $P < 0.001$; PID7, $P < 0.001$)で有意に増加していた(図1)。同様に、*Ngf*の発現は、野生型マウスのPID1、3、7 (PID1, $P < 0.001$; PID3, $P = 0.001$; PID7, $P < 0.001$)で有意に増加した。CD11b(+)細胞と(-)細胞の間では、CD11b(+)細胞では*Cd11b*、*F4/80*、*Tnfa*が有意に発現していた(*F4/80*, $P = 0.018$; *Cd11b*, $P = 0.018$; *Tnfa*, $P = 0.026$)、一方、*Col2a1*と*Tgfb*は、CD11b(-)細胞に有意に発現していた(*Col2a1*, $P = 0.026$; *Tgfb*, $P = 0.026$)、一方、*Ngf*の発現はCD11b(+)細胞とCD11b(-)細胞の間で同等であった($P = 0.459$)。

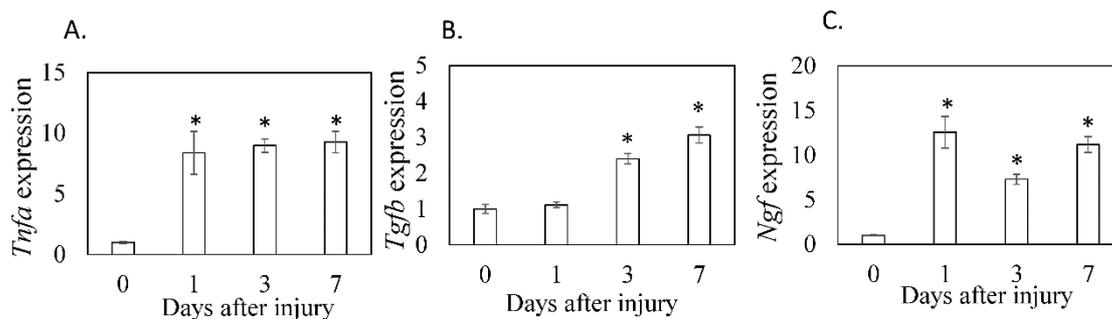


図1: 椎間板損傷後の *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現

損傷後0日目、1日目、3日目、7日目における *Tnfa* (A)、*Tgfb* (B)、*Ngf* (C) の発現 (各時点で $n = 10$) を示す。0日目 (コントロール) と比較して、*は有意差を示す ($p < 0.05$)

4-2. 椎間板損傷後の *Ngf* 発現に対する *Tnfa* 欠損の影響

Ngf の発現は、調べたすべての時点で、野生型マウスと *Tnfa*-KO マウスの間で同等であった (図2, PID1, $P = 0.842$; PID3, $P = 0.578$; PID7, $P = 0.053$)

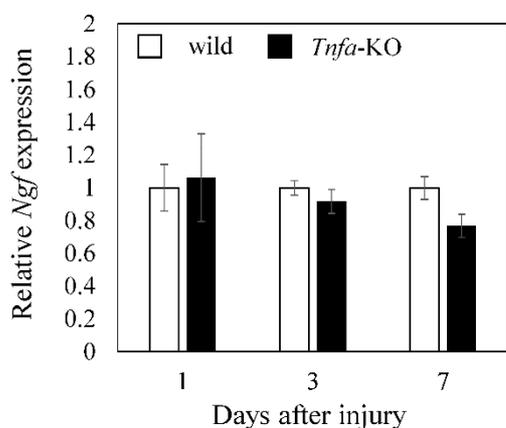


図2: *Tnfa* 欠損が in vivo での *Ngf* 発現に及ぼす影響

野生型マウス (C57BL/6 J) および *Tnfa*-KO マウスにおける椎間板損傷の1日後、3日後、7日後の *Ngf* の発現を示す (各時点で $n = 10$)。数値は平均値 ± 標準誤差を示した。相対的な *Ngf* 発現量は、各時点での野生型マウスの *Ngf* 発現量に基づいて算出した。同時期の野生型と比較した。*は有意差を示す ($p < 0.05$)

4-3. 椎間板細胞培養における TGF- 阻害剤の効果

TGF- 投与 6、24 時間後において *Ngf* の発現が有意に増加した (6 時間、 $P = 0.013$; 24 時間、 $P = 0.038$) この増加は TGF- 阻害剤 SB431542 の投与により抑制された (6 時間、 $P = 0.025$; 24 時間、 $P = 0.040$)。同様に、TGF- 投与 6、24 時間後において、上清の NGF タンパク質レベルが溶媒対照群に比べて増加し (6 時間、 $P = 0.049$ 、24 時間、 $P = 0.001$) この増加は SB431542 の投与で抑制された (6 時間、 $P = 0.036$ 、24 時間、 $P = 0.002$)。

4-4 椎間板損傷モデルにおける TGF- 阻害剤の効果

PID1 における *Ngf* の発現は SB421542 群と溶媒対照群間に違いは見られなかった (図3, $P = 0.354$)。一方、PID3 と PID7 における *Ngf* の発現は溶媒対照群に比べ SB431542 群でと有意に低かった (PID3, $P = 0.0381$; PID7, $P = 0.0001$)。

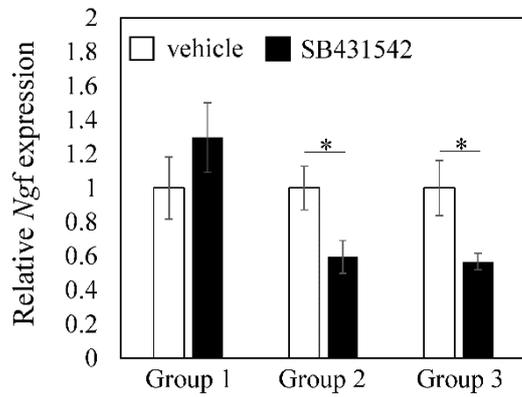


図3: in vivoでのNgf発現に対するTGF- β 阻害剤の効果

SB431542 または DMSO を椎間板損傷マウスに、損傷後1日目(Group1)、3日目(Group2)、7日目(Group3)に椎間板を採取する1日前および2日前に腹腔内注射した(各時点でn = 10)。相対的なNgf発現量は、各時点における溶媒対照群のNgf発現量を基に算出した。溶媒対照群と比較して、*は有意差を示す(p < 0.05)

NGFの発現は、炎症部位で局所的に上昇することが多くの報告で示されている。TNF- α は椎間板の炎症の主要な因子であり、in vitroでマウス椎間板細胞やヒトAFおよびNP細胞においてNGFの発現および産生を促進することが示されている。したがって、TNF- α は椎間板損傷においてNGFを制御していると考えられる。しかし、我々の研究ではPID1で野生型マウスの損傷した椎間板でTnfaとNgfの発現が直ちに上昇するが、Tnfaの欠損では損傷した椎間板でのNgfの発現は変化しなかった。我々の椎間板穿刺モデルでは、Tnfaは損傷した椎間板のマクロファージで主に発現していた。我々は以前、マウス椎間板損傷モデルにおいて、クロドロネートリポソームを用いてマクロファージを枯渇させると、PID1でのNgfの発現ではなくTnfaが減少することを報告した。また、in vitroにおいてTNF- α はヒト滑膜線維芽細胞とマクロファージにおけるNGF発現、NGF産生を亢進させるが、NGFのレベルはヒト滑膜組織におけるTNF- α の発現レベルとは相関していなかった。このように、椎間板ではマクロファージの増加に伴いTNF- α レベルが上昇する可能性があるが、TNF- α レベルの上昇は椎間板損傷後のNGF発現の制御には主要な役割を果たしていない可能性がある。

これまでの研究では、変性した椎間板ではTGF- β レベルが上昇すること、椎間板の線維芽細胞に比べて軟骨細胞様細胞で上昇することが報告されている。しかし、TGF- β は腎障害下ではマクロファージによっても産生される。腎障害モデルマウスの腎臓のマクロファージは、回復期に高いレベルのTGF- β を発現している。同様に、アドリアマイシン誘発腎症モデルマウスでは、マクロファージがTGF- β を発現している。我々は、椎間板細胞と椎間板から分離したマクロファージにおけるTGF- β の発現を比較したところ、TGF- β は椎間板細胞で有意に発現していた。さらに、TGF- β 刺激はin vitroで椎間板細胞のNGF産生を増加させ、TGF- β 阻害剤の投与は椎間板損傷マウスモデルのin vivoでのNGF発現を減少させた。これらの結果から、TGF- β は椎間板変性時のNGFを制御しており、Ngf発現の変化は椎間板細胞由来のTGF- β のオートクライン/パラクライン活性の増加によるものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 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 39
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 2021年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 1755-1762
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokozeaki 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中脇充章、内田健太郎、川久保歩、宮城正行、大久保 直、横関雄司、関口裕之、井上 玄、齋藤 亘、高相晶士
2. 発表標題 TNF- は椎間板組織内のiNOS発現を制御している
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
---------------------------	-----------------------	----

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