

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592187

研究課題名(和文)慢性運動器疼痛に対する抗NGF阻害の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research of anti-NGF inhibitor for chronic musculoskeletal pain

研究代表者

高橋 和久(Kazuhisa, Takahashi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20179477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット尾椎椎間板圧迫モデルを作成し、椎間板を支配する感覚ニューロンの細胞体である後根神経節(DRG)細胞におけるcalcitonin gene-related peptide(CGRP：炎症性疼痛に関する神経ペプチド)の発現を調査した。抗NGF中和抗体の局所投与が支配感覚神経(DRG)のCGRPの発現上昇を抑制することを確認し、椎間板性疼痛に対して、抗NGF療法が有効である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Create a rat caudal vertebrae intervertebral disc pressure model, we investigated the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP: neuropeptide involved in the inflammatory disease) in a cell body of dorsal root ganglia (DRG) to dominate the sensory nerve of the intervertebral disc. Intradiscal administration of the anti-NGF neutralizing antibodies suppressed the increased expression of CGRP of dominant sensory nerve (DRG). For the discogenic low back pain, anti-NGF therapy suggesting the potential to be effective.

研究分野：整形外科学

キーワード：抗NGF療法 CGRP ラット尾椎椎間板圧迫モデル 椎間板性腰痛

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の厚生労働省の報告では、腰痛や膝関節痛に代表される運動器疼痛は常に上位に挙げられる国民的愁訴であり、多大な医療費がこれらの疼痛治療に費やされているのが現状である。超高齢化が進む現代において、近年提唱されたロコモティブシンドロームの要因として、これらの運動器疼痛が深く関与していると考えられているが、その機序については未だ殆どが解明されておらず、その治療方針も確立されていない。

運動器疼痛において、治療上問題となるのは外傷などによる急性期の疼痛よりも疼痛が遷延化した慢性疼痛の状態である。本研究では罹患頻度の高い慢性腰痛（特に椎間板性腰痛）と慢性膝関節痛について検討する予定である。

慢性腰痛に関しては、病因を確定できない非特異的腰痛が 85% を占めると報告されている。非特異的腰痛の原因として、椎間板由来、椎間関節由来、筋膜由来、神経根由来、椎骨由来などの要素が報告されているが、その明らかな病因や疼痛遷延化機序については不明な点も多い。近年これらの要因の中でも慢性腰痛研究の最先端として、特に椎間板がターゲットとされつつあり、その変性と再生、遺伝子、画像診断、リハビリテーション、手術等様々なことが研究対象となっている。

椎間板性腰痛に関して、1970 年篠原がヒト椎間板性腰痛の患者から摘出した椎間板を用い、変性椎間板では、椎間板周囲にしか存在しない自由神経終末が内層に侵入すると報告した。これが椎間板性腰痛の病理所見の最初の記載である（篠原、日本整形外科学会誌 1970）。その後、炎症性サイトカインや神経成長因子（NGF）の研究に伴い、ヒト病的椎間板ではそれらの因子が椎間板周囲にしか存在しない自由神経終末を内層に侵入させているという報告がなされ、椎間板性腰痛の機序には、椎間板内のサイトカインと NGF が密接に関係していることが明らかとなってきた（Freemont et al., Lancet 1997）。さらに様々なヒト慢性椎間板性腰痛患者の椎間板サンプルや動物モデルにおける変性椎間板を用いた研究においても、炎症性サイトカインと NGF の発現が上昇していることが、明らかにされた。（Bruke et al., JBJS 2002, Yoshida et al., Spine 2005, Miyagi et al. Spine 2011 in press）一方、椎間板を支配する感覚神経に関する研究では、椎間板を支配し痛みを伝達する C 線維やその神経細胞はほとんどが NGF により栄養される神経細胞で CGRP や Substance P などの炎症性疼痛ペプチドを含む事が証明され（Aoki et al., Spine 2004, Life Sci. Rev. 2004, Ohtori et al. Ann Anat. 2002）、同様の所見はヒト椎間板でも確認された（Ozawa et al., Spine 2006）。

以上の研究結果より、椎間板性腰痛は椎間

板局所においても、支配感覚神経においても NGF が深く関与しており、疼痛の一因となっていると考えられている。さらに NGF 阻害により、ラット椎間板傷害で起こる支配感覚神経の感作を抑制できることが明らかにされ、椎間板性腰痛に対する NGF 阻害が効果的である可能性が示唆されている（Orita et al., J Orthop Res 2010）。しかし、現在までの動物モデルを用いた基礎研究では非生理的であり、ヒト椎間板に起こる現象を正確に再現できていない事や NGF 阻害の詳細な鎮痛機序が不明であることが問題点であった。そこで我々はヒト椎間板に起こる現象を忠実に再現するため、ラット尾椎椎間板穿刺・圧迫モデルを考案し、本モデルにおける椎間板局所の NGF の発現上昇が長期間持続する事を確認した（Miyagi et al. Spine 2011 in submission）。本研究では、このモデルを用いて、NGF 阻害の詳細な鎮痛機序を解明したいと考えた。疼痛に関する基礎研究が盛んになったのは、Bennett と Xie らが 1988 年にラット坐骨神経を結紮することで、ヒトで見られるような疼痛反応が引き起こされることを報告してからである。それ以降、疼痛に関する生理学的、解剖学的、分子生物学的手法を用い、様々な疼痛因子、受容体がクローニングされた。これらの研究は、神経傷害後の痛み、いわゆる神経障害性疼痛といわれるものである。しかしながら、神経傷害性疼痛に比べ、整形外科領域における運動器疼痛に関する基礎研究はあまり進んでいないのが現状である。その理由のひとつに、動物モデルが作製しにくいことが挙げられる。そのため、よりヒトと類似した生理的な動物モデルで、疼痛現象を客観的にとらえる確立した方法がある事が必要である。

## 2. 研究の目的

NGF 阻害が疼痛局所の炎症や支配感覚神経の感作に対して与える影響について。抗 NGF 抗体の投与量、投与方法の違いによる効果の違いについて調べることにある。現段階で得られている知見から予想される結果として、NGF 阻害によりそれぞれの運動器疼痛モデルにおいて疼痛局所の炎症と支配感覚神経の感作を抑制できると考えられる。しかし、投与量、投与方法による効果、副作用発現の違いなどについては全く基礎的なデータがなく、現時点で結果を予想する事が出来ない。しかし、本研究結果は、臨床応用に向けたトランスレーショナルリサーチのための非常に重要なデータとなり、安全かつ効果的な疼痛治療へつながるものと考えられる。また、近年、サルコペニアや筋損傷による疼痛が課題となるが、その機序は不明な点が多い。我々は、筋損傷の疼痛機序として、急性期におけるサイトカイン（TNF、IL-6、nerve growth factor（以下 NGF））と支配感覚神経における疼痛ペプチドの上昇を報告

した。治験段階であるが、NGF の抗体に関しては、難治性の変形性膝関節性疼痛、腰痛治療に大きな成果が報告されている。筋損傷モデルに抗 NGF 抗体を使用し、筋肉由来の支配感覚神経の特性変化を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 椎間板性腰痛に対する抗 NGF 療法の効果を確認するため、雄性 SD ラットの第 5/6 尾椎 (以下 Co) 椎間板を 24G 針にて 10 回穿刺したのち Co5、Co7 椎体に K ワイヤ刺入しバンドにて圧迫を加えて尾椎椎間板穿刺圧迫モデルを作成した。処置 4 週間後に Co5/6 椎間板に逆行性神経トレーサーである FluoroGold (以下 FG) を留置し、そのうち、無治療群、抗 NGF 中和抗体 50 µg、100 µg を局所投与した群と、抗 NGF 中和抗体 50 µg、100 µg を腹腔内投与した群に分け、さらに Co5/6 に対して無処置で FG のみ留置したコントロール群を用意した。処置 1、2、4 週間後に還流固定、両側の S1-S3 DRG を摘出した。DRG は抗 CGRP (炎症性疼痛ペプチド) 抗体、TRPV1 (カプサイシン受容体) による免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて FG 陽性細胞中の FG と CGRP、FG と TRPV1 でそれぞれ二重標識される細胞の割合を算出し、各群間で比較検討した。

(2) ラット膝 OA モデルを用い、疼痛伝達経路における炎症性サイトカインの定量を行い、各部位における比較検討を行った。8 週齢雄性 SD ラットを用い、右膝関節に MIA (モノヨードアセテート) を関節内注射 (2mg) した群 (MIA 群: n=16) と生食を関節内注射した群 (生食群: n=16) を作成した。注射後 4 週にて、右膝滑膜、脊髄 (L2 レベル)、脳 (海馬レベル) を摘出し、それぞれ ELISA 法にて炎症性サイトカイン (IL-6, TNF, NGF) の定量評価を行った。各部位における平均定量値を MIA 群と生食群において統計学的手法を用いて検討した (有意差  $P < 0.05$ )。

(3) ラット筋損傷後疼痛に対する抗 nerve growth factor 抗体の効果 8 週齢雄性 SD ラット 24 匹を用いた。支配感覚神経評価のために、損傷前に両側腓腹筋に神経トレーサーである FluoroGold (FG) を留置した。右後肢を挫傷側、左後肢を健常側とし、ドロップマスをを用いて腓腹筋を損傷した。損傷後、半数に、抗 NGF 抗体を腓腹筋に注射した。組織評価は損傷後 12 時間、1、2 週目の腓腹筋を H-E 染色で評価した。損傷後 1 週目に両側 L1 から L6 までの後根神経節 (以下 DRG) を摘出し、CGRP (疼痛関連ペプチド) による免疫組織化学染色を行った。全 FG 陽性細胞中の CGRP で二重標識される細胞の割合を算出し統計学的手法を用いて検討した (有意差  $P < 0.05$ )。

### 4. 研究成果

(1) 抗 NGF 中和抗体を投与した 4 群において、

FG 陽性細胞中の FG と CGRP、FG と TRPV1 でそれぞれ二重標識される細胞の割合は生食を投与した群と比べ、有意に少なかった。しかし、抗 NGF 中和抗体を投与した 4 群間では明らかな有意さを認めなかった。

上記より、椎間板性腰痛に対して抗 NGF 中和抗体の投与が有効である可能性が示唆された。しかし、抗 NGF 中和抗体の投与量、投与方法による支配感覚神経における CGRP と TRPV1 の発現量の違いは認められなかった。抗 NGF 中和抗体の有効投与量、有効投与方法については今後検討の余地がある。

(2) 滑膜における IL-6, TNF, NGF すべての平均定量値は、生食群と比較し MIA 群では有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。一方で、脊髄、脳においては IL-6, TNF, NGF すべてに関して各群に有意差を認めなかった。局所 (滑膜) においては、炎症性サイトカインの上昇を認め、その疼痛への関与が示された。一方で、中枢 (脊髄、脳) においては、炎症性サイトカインの上昇は認めず、その影響は少ない可能性が示された。本研究により、膝 OA に関連する疼痛においては、局所での炎症性サイトカインが重要な働きを示しており、前述の抗サイトカイン療法に関しても局所に作用しその効果が発揮されている可能性が示唆された。

(3) H-E 染色は、挫傷後 3 日では損傷部の好塩基球や好酸球の集簇を認めた。挫傷後 3 週では、瘢痕組織の形成が認められた。その傾向は、抗 NGF 抗体により、抑制された。筋を支配する FG 陽性細胞中の FG と CGRP で二重標識される細胞の割合は、挫傷側は健常側と比し、有意に上昇していたが、抗 NGF 抗体により有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。

本研究では筋損傷後の疼痛機序に、筋組織の NGF を中心とした炎症が関与しており、抗 NGF 抗体により抑制された。難治性慢性腰痛への抗 NGF 抗体皮下注の臨床治験がオピオイド後凌駕する結果が示されているが、同様に、筋性疼痛の機序に、局所の NGF 制御が今後の治療のターゲットになり得る可能性が示唆された。

### 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

日本運動器疼痛学会誌 2014;6:136 - 139.  
慢性椎間板性腰痛の基礎研究から導かれた  
新たな治療戦略の可能性

(査読なし)

Patho - mechanism of discogenic low back pain and the new strategy of treatment

宮城正行 1) 石川哲大 2) 鴨田博人 2)

佐久間詳浩 2) 西能健 2) 高相晶士 1)

井上玄 1) 高橋和久 2) 大鳥精司 2)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者：鈴木 雅博

表題名：ラット筋損傷後疼痛に対する抗  
nerve growth factor 抗体の効果  
学会名：脊椎脊髄病学会  
発表日時：2015年4月16日  
発表会場：福岡国際会議場(福岡県福岡  
市)  
発表者：Masahiro Suzuki  
表題名：Effect of administration of  
antibodies against nerve growth  
factor in a rat model of muscle injury  
発表学会：国際腰痛学会(ISSLS)  
発表日時：2015年6月10日  
発表場所：サンフランシスコ(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 和久(Kazuhisa Takahashi)  
千葉大学 大学院医学研究院 教授  
研究者番号：20179477

### (2) 研究分担者

大鳥 精司(Seiji Ohtori)  
千葉大学 大学院医学研究院 講師  
研究者番号：40361430

井上 玄(Gen Inoue)  
北里大学 医学部 准教授  
研究者番号：80594209

折田 純久(Sumihisa Orita)  
千葉大学医学部附属病院 材料部 助教  
研究者番号：60638310

### (3) 連携研究者

宮城 正行(Miyagi Masayuki)  
北里大学 医学部 助教  
研究者番号：90627556

鈴木 都(Miyako Suzuki)  
千葉大学 予防医学センター 助教  
研究者番号：70734242

豊根 知明(Tomoaki Toyone)  
帝京大学 溝口病院 整形外科 教授  
研究者番号：10407918

男澤 朝行(Tomoyuki Ozawa)  
帝京大学 溝口病院 整形外科 講師  
研究者番号：60375706

青木 保親(Yasuchika Aoki)  
千葉大学 大学院医学研究院 特任教授  
研究者番号：70584001