

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592195

研究課題名(和文) 椎間板ヘルニアにおける侵害受容性疼痛と神経障害性疼痛のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The pathomechanism of nociceptive pain and neuropathic pain in herniated disc disease

研究代表者

高田 徹 (TAKADA, Toru)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：00598526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板ヘルニアに於いては椎間板とマクロファージの相互作用により炎上惹起され、疼痛の原因となることを我々は示してきた。椎間板ヘルニアのみならず、腰部脊柱管狭窄症の椎間板に於いてもマクロファージが存在していることをヒト椎間板サンプルから証明した。椎間板変性度とマクロファージ量の存在の相関はなかった。感染や腫瘍に際して炎症惹起や腫瘍排除を行うM1マクロファージが腰部脊柱管狭窄症95.5%、椎間板ヘルニア95.6%であり、脊椎変性疾患全体にM1マクロファージが存在することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that intervertebral disc and macrophages interaction induces pro-inflammatory reaction and pain related behavior. We clarified macrophages existence in degenerative disc not only in herniated disc disease but also lumbar canal stenosis. M1 macrophage, which plays inflammatory and tumoricidal activity, is exists in 95.5% of herniated disc disease and 95.6% of lumbar canal stenosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：椎間板変性 侵害受容性疼痛 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

椎間板ヘルニアの疼痛の発症機序と疼痛の性質の内容は不明である。我々はヘルニア組織周辺の炎症が椎間板とマクロファージの相互作用に由来し、疼痛関連行動に強く関係することを示してきた。椎間板とマクロファージの相互作用は椎間板ヘルニアに於ける疼痛発症機序だけではなく、非ヘルニア脊椎疾患にも関与している可能性があるのではないかと考えられる。

また、マクロファージは炎症惹起に關与する M1 マクロファージと抗炎症作用を有する M2 マクロファージの 2 種類に大別される。これらのマクロファージのサブタイプの解析は今までなされたことがなく、脊椎変性疾患に於けるマクロファージの存在と働き不明な点が多い

2. 研究の目的

ヒト変性椎間板にマクロファージが存在することを証明し、これらのマクロファージの組成を明らかにする。

3. 研究の方法

椎間板変性疾患から抽出した非ヘルニア変性椎間板組織 32 症例 33 椎間から病理切片を作成し、観察を行った。まずマクロファージの表面抗原である CD68 を免疫染色し、マクロファージの有無と局在を確認した。単位面積あたりの CD68 陽性細胞数をカウントし、MRI 椎間板変性度(Pfirman 分類)との相関を検討した。これらマクロファージ様の細胞の性質を判断するために M1、M2 マクロファージに両者に共通に発現する CD14 と M1 マクロファージだけに多く発現する iNOS の多重免疫染色を行った。これらの陽性率の比率から各サンプルにおける M1/M2 マクロファージの比率を求めた。MRI 椎間板変性度と CD68 陽性細胞数の相関は Mann-Whitney ' s U test を使用して検討した。

4. 研究成果

(1) 非ヘルニア変性椎間板に於ける CD68 陽性細胞の局在を示す(図 1)。D68 陽性細胞は髄核では Matrix 間隙の Cleft に集中して存在した。線維輪では層板構造の裂隙と Cleft 内に多く認められた。

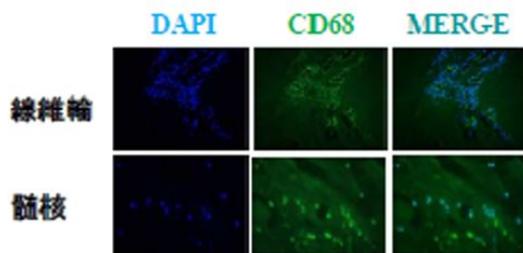


図 1 : 非ヘルニア変性椎間板に於ける CD68 陽性細胞の局在

(2) ヘルニア塊内での CD68 陽性細胞の局在を確認した(図 2)。ヘルニア組織表面、およびマトリックス裂隙に CD68 陽性細胞が沈着している様子が確認できた。

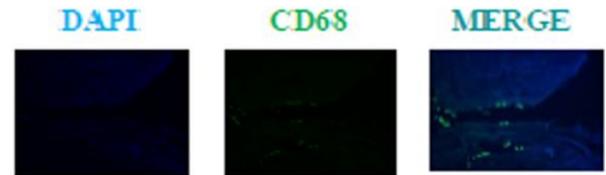


図 2 : ヘルニア塊内での CD68 陽性細胞の局在

(3) 変性椎間板に於ける iNOS と CD14 共発現からみた M1 マクロファージの局在を示す(図 3)。また、椎間板変性度と CD68 陽性細胞の数との相関関係は無かった。CD14 陽性のマクロファージは、そのほとんどが iNOS を発現していた。

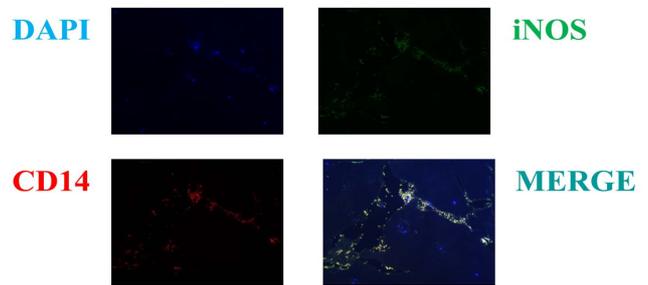


図 3 . 変性椎間板に於ける iNOS と CD 1 4 共発現からみた M1 マクロファージの局在

iNOS と CD14 の共発現から見た M1 マクロファージの比率を示す(図 4)。非ヘルニア椎間板に浸潤しているマクロファージの 95.5%が M1 マクロファージであった。ヘルニア塊に浸潤しているマクロファージの 95.6%も M1 マクロファージであった。

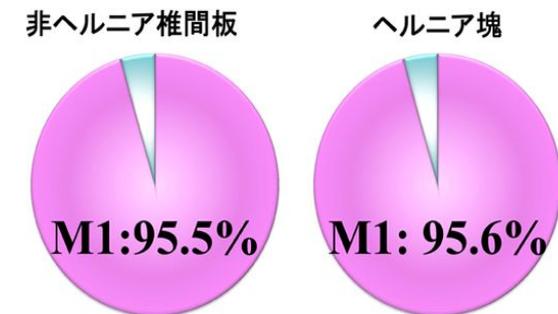
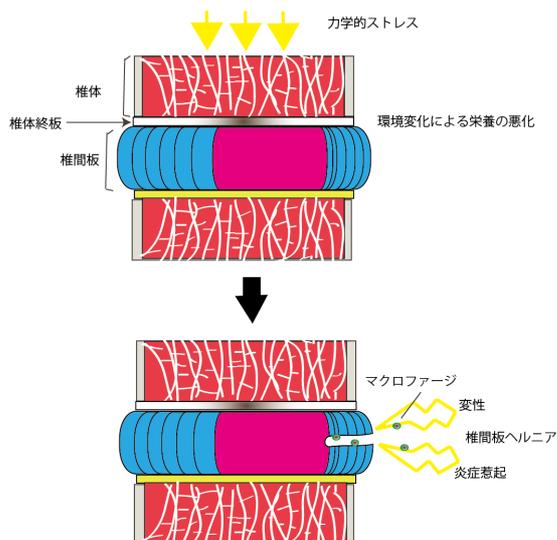


図 4 : iNOS と CD14 の共発現から見た M1 マクロファージの比率

今回の研究から、腰部脊柱管狭窄症の非ヘルニア変性椎間板、椎間板ヘルニアのヘルニア組織ともに M1 マクロファージが多数存在し、これらのほとんどが M1 マクロファージであることが判明した。これらの表面抗原と局在からはマクロファージは髄核細胞の

phenotype が変化したものではなく、変性の過程でマトリックスの間に浸潤してきたことが推測された。M1 マクロファージは感染や腫瘍に際して炎症惹起や腫瘍排除を行う役割があり、椎間板とマクロファージの総合作用によって根性疼痛、腰痛に關与している可能性がある。



現在まで、変性椎間板研究は髓核細胞やマトリックスの研究が主体で、変性末期に至った椎間板性疼痛に対する治療方法は確立されていなかったが、マクロファージは椎間板変性のどの時期にも存在することから、今後、マクロファージに対する治療が椎間板変性の加療に応用できる可能性が高まった。

## 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 4 件)

Kakutani K, Doita M, Yoshikawa M, Okamoto K, Maeno K, Yurube T, Sha N, Kurosaka M, Nishida K. C1 laminectomy for retro-odontoid pseudotumor without atlantoaxial subluxation: review of seven consecutive cases. Eur Spine J、査読あり、vol22、No.5、2013、pp1119-26.

Hirata H, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Yamamoto J, Kurakawa T, Akisue T, Kuroda R, Kurosaka M, Nishida K. A rat tail temporary static compression model reproduces different stages of intervertebral disc degeneration with decreased notochordal cell phenotype. J Orthop Res、査読あり、vol32、No.3、2014、pp 455-63.

Yamamoto J, Maeno K, Takada T, Kakutani K, Yurube T, Zhang Z, Hirata H, Kurakawa T, Sakai D, Mochida J, Doita M, Kurosaka M, Nishida K. Fas ligand plays an important

role for the production of pro-inflammatory cytokines in intervertebral disc nucleus pulposus cells. J Orthop Res 査読あり、vol31、No4、2013、pp 608-15.

Nishida K, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Yurube T, Kuroda R, Kurosaka M. Efficacy of hemostasis for epidural venous plexus and safety for neural structure using soft coagulation system in spinal surgery: a laboratory investigation using a porcine model. Journal of spinal disorders & techniques、査読あり、vol26、No.7、2013 E281-5. doi: 10.1097/BSD.0b013e31828677f9.

〔学会発表〕(計 4 件)

高田 徹、前野 耕一郎、角谷 賢一郎、由留部 崇、平田 裕亮、蔵川 拓外、宮崎 真吾、寺嶋 良樹、土井田 稔、黒坂 昌弘、西田 康太郎、非ヘルニア変性椎間板には古典的活性(M1)マクロファージが存在する、第 42 回脊椎脊髄病学会 2013 年 4 月 25-27 日 沖縄国際会議場

高田 徹、前野 耕一郎、角谷 賢一郎、由留部 崇、平田 裕亮、蔵川 拓外、宮崎 真吾、寺嶋 良樹、土井田 稔、黒坂 昌弘、西田 康太郎、脊椎変性疾患の変性椎間板には M1 マクロファージが存在する、2014 年 4 月 17-19 日 第 43 回脊椎脊髄病学会 京都国際会議場

T. Takada, K. Maeno, K. Kakutani, T. Yurube, J. Yamamoto, H. Hirata, T. Kurakawa, S. Miyazaki, M. Kurosaka, K. Nishida, M1 MACROPHAGE EXISTS IN THE NON-HERNIATED DEGENERATIVE DISC. 13<sup>^</sup>17 May 2013 Scottsdale, USA

T. Takada, K. Maeno, K. Kakutani, T. Yurube, H. Hirata, T. Kurakawa, S. Miyazaki, Y. Terashima, M Doita, M. Kurosaka, K. Nishida International Society for the Study of the Lumbar Spine 3<sup>^</sup>7 June 2014, Seoul Korea

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田 徹 (TAKADA Toru)  
神戸大学・医学研究科・医学研究員  
研究者番号：00598526

(2)研究分担者

西田 康太郎 (NISHIDA Kotaro)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：00379372

角谷 賢一郎 (KAKUTANI Kenichiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10533739

前野 耕一郎 (MAENO Koichiro)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：70403269