

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592214

研究課題名(和文) ヒト椎間板性腰痛における椎間板変性および椎間板への神経侵入の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of disc degeneration and innervation in human discogenic pain

研究代表者

遠藤 健司 (Endo, Kenji)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90266479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板性腰痛は、組織変性した椎間板内側へ神経線維が侵入することで発症し、椎間板変性には細胞外基質分解酵素が、神経侵入には神経成長因子(NGF)が重要な役割を担う。腰痛保存治療に選択的COX-2阻害剤が汎用されるが、同薬剤の細胞外基質分解酵素およびNGF発現に対する効果は不明であった。

本研究は、ヒト椎間板細胞を用いて選択的COX-2阻害剤の細胞外基質分解酵素発現およびNGF発現に対する効果を検討し、同薬剤は細胞外基質分解酵素およびNGF発現ともに増加させること明らかにした。選択的COX-2阻害剤は急性炎症・疼痛には有用であるが椎間板変性と神経侵入をむしろ増悪させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Degeneration of the intervertebral disc (IVD) by metalloproteinases and following innervation of the sensory nerve fiber, which is dependent on nerve growth factor (NGF), is considered as one of the mechanisms of developing discogenic pain. Although selective COX-2 inhibitors are recommended and used for the conservative treatment of low back pain, their effects on metalloproteinases and NGF expressions were unclear.

The effects of selective COX-2 inhibitors on the metalloproteinases and NGF expression were investigated in isolated human IVD cells. Selective COX-2 inhibitors exaggerated the expressions of both metalloproteinases and NGF induced by IL-1. These results suggest that, although selective COX-2 inhibitors are effective for inflammatory pain, they might not be effective or could even accelerate the disc degeneration and nerve innervation.

研究分野：脊椎外科

キーワード：腰痛 椎間板変性 神経侵入 神経成長因子 細胞外基質分解酵素 非ステロイド性抗炎症薬 プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、椎間板性腰痛発症の分子機構として、椎間板の組織変性に伴い、疼痛伝達をする神経線維が椎間板内側に侵入しさらに疼痛感作が行われることが示唆されていた。また、この過程において椎間板の変性には細胞外基質分解酵素群が関与し、神経侵入および疼痛感作には神経成長因子(NGF)が重要な役割を担うことが示されていた。一方で、腰痛症に対して選択的 COX-2 阻害剤を含む非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が用いられるが、同薬剤の細胞外基質分解酵素および NGF 発現に対する効果については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、椎間板変性を背景とした慢性腰痛に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果を解明すべく、細胞外基質分解酵素および NGF 発現について解析し、さらにその発現調節機構を明らかにすることで、慢性腰痛の予防および慢性腰痛に対する新たな薬学的治療の可能性について検討することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト椎間板由来細胞の培養法の確立

椎間板細胞は関節軟骨細胞と類似し、単層培養により脱分化し、その性質が変化することが知られている。そこで、単層培養と alginate beads による 3 次元培養を試み、本研究に適した培養条件を確立する。

(2) ヒト椎間板細胞における細胞外基質分解酵素および NGF 発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果

椎間板変性に関わる細胞外基質分解酵素として主にコラーゲン分解に関わる MMP-1, -3, -13 発現およびアグリカン分解に関わる ADAMTS4 および 5 発現に対する COX-2 阻害剤の効果を遺伝子およびタンパク質レベルで検討する。さらに神経浸潤に関わる NGF 発現に対する効果についても同様に解析する。

(3) PGE2 の細胞外基質分解酵素および NGF 発現調節機構の解明

COX-2 阻害剤により阻害される PGE2 の細胞外基質分解酵素発現および NGF 発現に対する効果を検討する。さらにその分子機構について PGE2 受容体(EP1-4)に対するアゴニストを用いて PGE2 の生理活性発現に関わる受容体の同定を試みる。

4. 研究成果

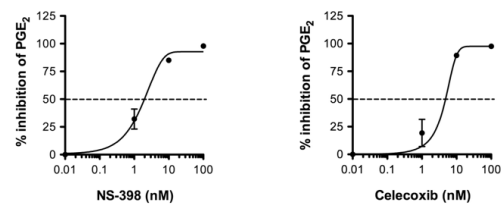
(1) ヒト椎間板細胞の培養方法の違いによる薬剤応答性の確認

ヒト椎間板細胞を単層(2次元)または alginate beads 内(3次元)で培養し、IL-1 に対する応答性について MMP および NGF 発現を指標に検討した。その結果、MMPs および NGF 発現誘導に培養法の違いによる差異は認

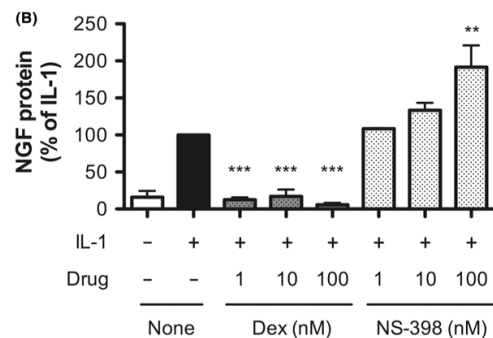
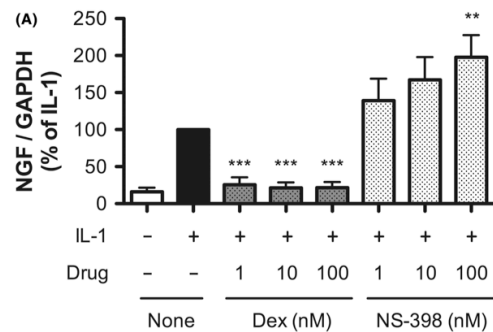
められなかった(結果省略)。そこで本研究は、より簡便な単層培養で行うこととした。

(2) ヒト椎間板細胞における選択的 COX-2 阻害剤の細胞外基質分解酵素および NGF 発現に対する効果

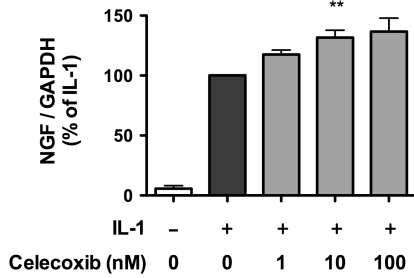
本研究に用いる選択的 COX-2 阻害剤として、基礎研究で汎用される NS-398 と臨床で汎用される celecoxib を用いることとした。研究に先立ちこれら薬剤の濃度を検討するため、IL-1 により誘導される PGE2 産生に対する阻害活性を指標とし実験を行った。その結果、NS-398 および celecoxib は、1-100 nM の範囲で PGE2 産生を濃度依存的に抑制することを確認した(IC50 of NS-398 and celecoxib; 2.4 nM and 4.2 nM, respectively)(下図)。



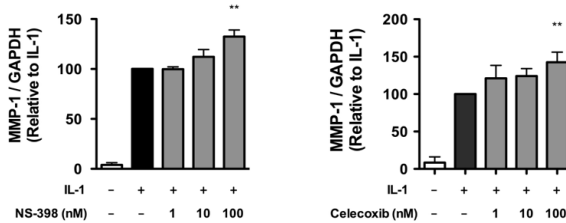
次に、IL-1 により誘導される NGF 発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果について、強力な抗炎症効果を持つステロイド(dexamethasone)と比較検討した。その結果、IL-1 により誘導される NGF 発現は、ステロイドにより強力に抑制されたのに対し、選択的 COX-2 阻害剤である NS-398 はむしろ NGF 発現を遺伝子(下図 A) およびタンパク質レベル(下図 B) で増強させた。



また、この作用は celecoxib 処理においても同様に観察された（下図）。



さらに、選択的 COX-2 阻害剤の MMP-1 および MMP-13 発現に対する効果について検討したところ、IL-1 により誘導される MMP-1 発現は、選択的 COX-2 阻害剤により増強されたが（下図）、MMP-13 発現には影響を及ぼさなかった（結果省略）。

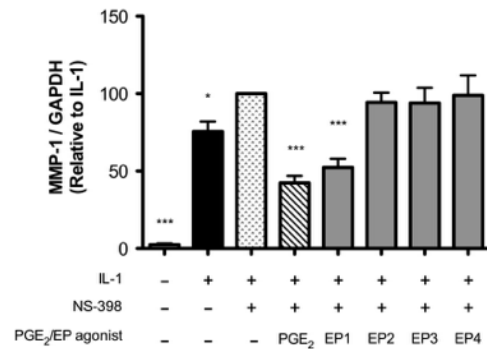
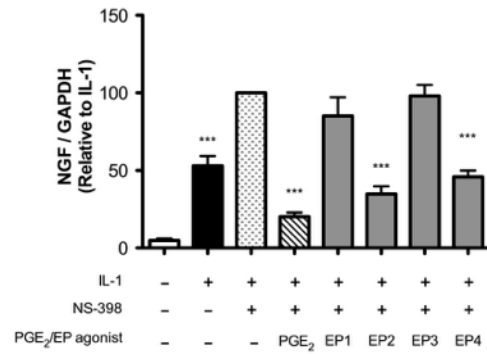


(3) PGE₂ による細胞外基質分解酵素および NGF 発現調節機構

上記結果より、PGE₂ は元来炎症のメディエーターとして知られているが、NGF および MMP-1 発現に対しては抑制的作用している可能性が推察された。そこで、本培養系に外因性に PGE₂ を添加し、NGF 発現に対する PGE₂ の作用について検討した。その結果、PGE₂ は濃度依存的に NGF および MMP-1 発現を抑制することが明らかとなった（結果省略）。そこで、PGE₂ による NGF および MMP-1 発現に関わる PGE₂ 受容体を同定すべく、それぞれの受容体アゴニストを用いて検討した。

その結果、NS-398 により増強される NGF 発現は、EP2 および EP4 アゴニストにより PGE₂ 同様抑制された（右図上）。一方、NS-398 により増強される MMP-1 発現は EP1 アゴニストにより PGE₂ と同様の抑制効果が観察された（右図下）。

以上の結果より、PGE₂ による NGF 発現抑制作用は EP2 および EP4 受容体を介し、一方、MMP-1 発現抑制作用は EP1 受容体を介することが明らかとなった。



本研究結果により、PGE₂ は急性炎症および急性疼痛を惹起する炎症メディエーターであるが、組織変性に関わる MMP-1 および神経侵入・疼痛感作に関与する NGF に対しては negative feedback 様に抑制的に制御するといった生理活性を有することが明らかとなった。さらにその機序として NGF 発現は EP2 および EP4 受容体を介することが、また MMP-1 発現は EP1 受容体を介することが明らかとなった。腰痛治療に汎用される選択的 COX-2 阻害剤は、PGE₂ 産生を抑制し炎症性疼痛に有用であることは周知の事実であるが、組織変性および神経侵入に対してはむしろ増悪させてしまう可能性が危惧された。

本研究は、椎間板細胞を用いた in vitro の研究であり、動物を用いた in vivo の研究は行っていないが、腰痛治療の第一選択薬として推奨されている選択的 COX-2 阻害剤の使用法およびその位置づけを再考させるものであると考えられ、意義のある研究であると思われる。

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）

- ① Wuqikun Alimasi, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Makiko Yorifuji, Hidekazu Suzuki, Taiichi Kosaka, Takaaki

Shishido, and Kengo Yamamoto.
“Regulation of nerve growth factor
by anti-inflammatory drugs, a steroid,
and a selective cyclooxygenase 2
inhibitor in human intervertebral
disc cells stimulated with
interleukin-1” *Spine*, 2013, vol.
38(17), pp.1466-1472, DOI:
10.1097/BRS.0b013e318294edb1, 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① Yasunobu Sawaji, Hidekazu Suzuki, Kenji Endo, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kengo Yamamoto. “PGE2 negatively regulates NGF expression by inducing DUSP-1 in human intervertebral disc cells” *International Society for the Study of Lumbar Spine*, 2015年6月8日～2015年6月12日, San Francisco, CA (U. S. A.).
- ② Makiko Yorifuji, Yasunobu Sawaji, Hidekazu Suzuki, Kenji Endo, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kengo Yamamoto. “PGE2 negatively regulates MMP-1 expression by inducing DUSP-1 in human intervertebral disc cells” *International Society for the Study of Lumbar Spine*, 2015年6月8日～2015年6月12日, San Francisco, CA (U. S. A.).
- ③ 澤地恭昇, 村田寿馬, 鈴木秀和, 遠藤健司, 依藤麻紀子, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 “椎間板性腰痛に関わる神経成長因子のプロスタグランジンによる発現制御機構” 第44回日本脊椎病学会, 2015年4月16日～2015年4月18日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
- ④ 村田寿馬, 澤地恭昇, 依藤麻紀子, 鈴木秀和, 遠藤健司, 小坂泰一, 山本謙吾 “ヒト椎間板性腰痛における神経成長因子発現調節の分子機構” 第12回整形外科痛みを語る会, 2014年6月28日～2014年6月29日, 翠香園ホテル (福岡県久留米市).
- ⑤ 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクン・アルマス, 依藤麻紀子, 西村浩輔, 鈴木秀和, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 “椎間板細胞における神経成長因子発現に対する PGE1 の新規薬理作用” 第6回日本運動器疼痛学会, 2013年12月7日～2013年12月8日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
- ⑥ 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクン・アルマス, 依藤麻紀子, 西村浩輔, 鈴木秀和, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 “椎間板軟骨細胞における神経成長因子発現に対する PGE1 の新規薬理作用” 第28回日本整形外科基礎学術集会, 2013年10月17日～2013年10月18日, 幕張メッセ (千葉県千葉市).
- ⑦ 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクン・アルマス, 依藤麻紀子, 西村浩輔, 鈴木秀和, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 “腰部脊柱管狭窄症における PGE1 の MMP/NGF の発現調節” 第62回東日本整形災害外科学会, 2013年9月19日～2013年9月21日, 軽井沢プリンスホテル (長野県北佐久郡).
- ⑧ 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクン・アルマス, 依藤麻紀子, 西村浩輔, 鈴木秀和, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 “椎間板軟骨細胞における神経成長因子発現に対する PGE1 の薬理作用” 第11回整形外科痛みを語る会, 2013年7月6日～2013年7月7日, ホテルハマツ郡山 (福島県郡山市).
- ⑨ Yasunobu Sawaji, Wuqikun Alimashi, Kenji Endo, Hidekazu Suzuki, Hidetoshi Tanaka, Kengo Yamamoto “A novel pharmacological action of prostaglandin E1 for intervertebral disc degeneration and innervation” *International Society for the Study of Lumbar Spine*, 2013年5月13日～2013年5月17日, Arizona (U. S. A.).
- ⑩ 澤地恭昇, ウチクン・アルマス, 遠藤健司, 小坂泰一, 山本謙吾 “腰椎椎間板変性と神経浸潤に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果” 第5回日本運動器疼痛学会, 2012年11月17日～2012年11月18日, TFT ホール (東京都江東区).
- ⑪ Wuqikun Alimasi, Yasunobu Sawaji, Dai Kimura, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kenji Endo, Kengo Yamamoto “Roles of PGE2 on the intervertebral disc degeneration and nerve ingrowth in human intervertebral disc cells” 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10月26日～2012年10月27日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).
- ⑫ 澤地恭昇, ウチクン・アルマス, 遠藤健司, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾 “ヒト椎間板変性に対する選択的 COX-2 阻害剤および PGE2 の効果” 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10

月 26 日～2012 年 10 月 27 日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）。

- ⑬ 澤地恭昇，ウチクン・アルマス，遠藤健司，山本謙吾 “腰椎椎間板変性および NGF 発現と PGE2，EP 受容体の関係～NSAIDs 無効の慢性疼痛機序に関連して～” 第 10 回整形外科痛みを語る会，第 5 回麻酔科痛みメカニズムを語る会合同開催，2012 年 6 月 16 日～2012 年 6 月 17 日，土佐ロイヤルホテル（高知県安芸郡）。
- ⑭ Wuqikun Alimashi, Yasunobu Sawaji, Dai Kimura, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kenji Endo, Kengo Yamamoto “EP2/4 receptor suppresses the expression of NGF in human IVD cells” International Society for the Study of Lumbar Spine, 2012 年 5 月 28 日～2012 年 6 月 1 日，Amsterdam (Netherlands).
- ⑮ Yasunobu Sawaji, Wuqikun Alimashi, Kenji Endo, Taiichi Kosaka, Dai Kimura, Kengo Yamamoto “EP1/3 pathway suppresses exaggeration of IL-1-induced collagenases by a selective COX-2 inhibitor in human IVD cells” International Society for the Study of Lumbar Spine, 2012 年 5 月 28 日～2012 年 6 月 1 日，Amsterdam (Netherlands).
- ⑯ Wuqikun Alimashi, Yasunobu Sawaji, Dai Kimura, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kenji Endo, Kengo Yamamoto “Roles of PGE2 on the intervertebral disc degeneration and nerve ingrowth in human intervertebral disc cells” 第 41 回日本脊椎脊髄病学会，2012 年 4 月 19 日～2012 年 4 月 21 日，石橋文化センター（福岡県久留米市）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 健司 (ENDO, Kenji)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：90266479

(2) 研究分担者

澤地 恭昇 (SAWAJI, Yasunobu)
東京医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号：20571152

小坂 泰一 (KOSAKA, Taiichi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：10328213

鈴木 秀和 (SUZUKI, Hidekazu)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：40317871

山本 謙吾 (YAMAMOTO, Kengo)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：10246316