

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592354

研究課題名(和文) 椎間板性腰痛における疼痛発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of mechanism of lumbar discogenic pain

研究代表者

伊吹 京秀 (Ibuki, Takae)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90232587

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)：日本人の腰痛生涯罹患率は約85%で対応が急務である。今回椎間板性腰痛発症機序における炎症の関与を、プロスタグランジン(PG)合成系やサイトカインに注目して調べた。正常動物椎間板及び周辺組織で極めて強いCOX-1の発現が見られ、これは椎間板穿刺後著変はなかった。COX-2の発現は正常では認められなかったが、穿刺24時間後穿刺椎間板や軟骨に強い陽性所見が観察された。又末梢炎症モデルで、炎症局所でのPG合成はCOX-2、mPGES-1等の発現上昇に依存すること、COX-2の上流でiPLA2が機能していることがわかった。痛覚過敏とPG系動態も対応した。今後、椎間板性腰痛におけるPG系の関与を解明する。

研究成果の概要(英文)：Lifetime susceptibility of lumbar pain among Japanese people is approximately 85% and prompt measures need to be taken. In this study, we tried to elucidate mechanism of lumbar discogenic pain focusing on prostaglandin (PG) synthesis and inflammatory cytokines. COX-1 was strongly expressed in the lumbar discs and neighboring tissues and its expression did not change following disc puncture. COX-2 was not expressed in normal animals, but strong expression was observed in punctured disc and surrounding tissues 24 hours following disc puncture. Using peripheral inflammatory pain model, we found that PG synthesis is dependent on COX-2 and mPGES-1 expression and iPLA2 is involved in the expression of COX-2. Further, behavioral hyperalgesia was correlated with expression of PG synthesis in peripheral inflammatory pain model. Involvement of PG synthesis in lumbar discogenic pain would be elucidated.

研究分野：麻酔学

キーワード：腰痛 プロスタグランジン 炎症 椎間板性腰痛

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の平成 19 年度国民生活基礎調査によると男女とも腰痛は、有訴率や通院傷病名の一、二位に位置し、さらに生涯罹患率は 85% を占めると報告されており、迅速な対応が急務である。

椎間板性腰痛の疼痛発生メカニズムとして最近特に注目されているのが炎症の関与である。変性し脱出した椎間板およびその周囲に早期から集積するマクロファージ・線維芽細胞・Schwann 細胞などにおける TNF α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインや PGE₂、COX-2、NGF などの発現が、疾患モデル動物や、椎間板組織と集積した細胞の共培養において確認されている。

2. 研究の目的

本研究では痛覚メディエータであるプロスタグランジンの合成系の発現を、正常動物と椎間板疾患モデル動物で比較することを目的とした。また、ラットにおいて末梢炎症による痛覚過敏におけるプロスタグランジン系酵素、サイトカイン発現も検討した。

3. 研究の方法

(1) 正常動物の椎間板組織におけるプロスタグランジン系合成系酵素の発現

マウスおよびラットをイソフルレンとペントバルビタール深麻酔、安楽死させ、椎間板を含む椎骨周辺の組織を採取し、凍結保存した。免疫組織化学法により、シクロオキシゲナーゼ 1 (COX-1)、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現を検討した。またウェスタンブロット法によっても検討した。

(2) 椎間板疾患モデル動物におけるプロスタグランジン系合成系酵素の発現

椎間板疾患モデル動物は椎間板穿刺により作成した。ラットをイソフルレン麻酔、次いでペントバルビタールで麻酔する。腹部を切開し、椎骨 L4 と L5 の間の椎間板を 26 G 注射針で針先が髄核に到達するよう、10 箇所穿刺した。縫合後麻酔から回復させ、24 時間後に椎骨周辺組織を採取した。

(3) 末梢炎症モデル動物におけるプロスタグランジンとプロスタグランジン系合成系酵素の発現

椎間板における PG 系と痛覚過敏の関係を研究する準備として、末梢性炎症における PG 系と痛覚過敏の関係を検討した。末梢性炎症のモデルとしてカラゲニンラット後肢足底部に投与した。炎症部位でのプロスタグランジン E₂ (PGE₂)、PGF₁ を EIA 法で測定した。phospholipase A₂ (PLA₂) 阻害剤を足底部に同時投与し、PGE₂、6-ketoPGF_{1 α} 量への影響と、

痛覚過敏反応への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 正常動物の椎間板組織におけるプロスタグランジン系合成系酵素の発現

COX-1

正常マウス・ラットにおいて、椎間板およびその周辺組織に COX-1 が発現していた。特に、マウス髄核 (NP) における COX-1 の発現は、他の組織と比較して極めて高いものであった。また、線維輪の細胞も COX-1 を発現していた。これらの COX-1 陽性所見は、2 種類の抗体 (pCOX-1、mCOX-1) と COX-1KO マウス (図 1)、ウェスタンブロット法により裏付けられた。(図 2)

図 1

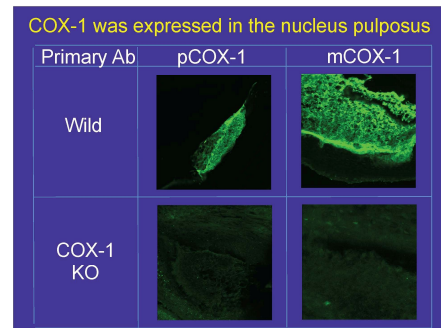
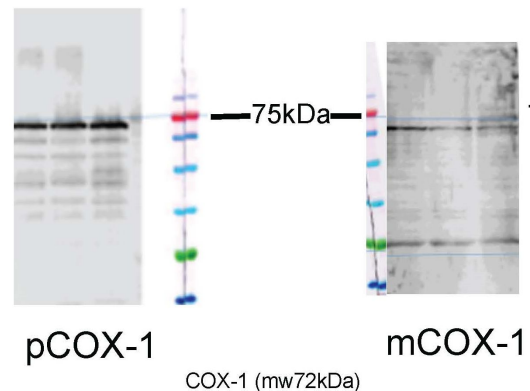


図 2

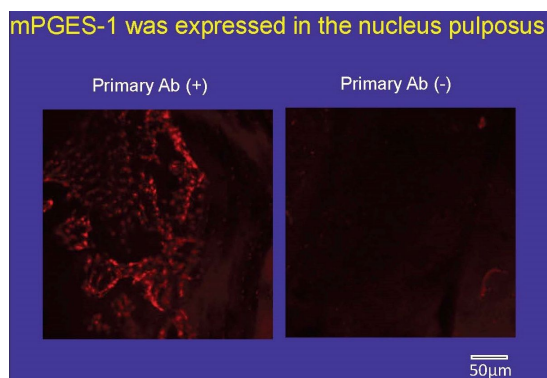


また脊髄では COX-1 陽性ミクログリアや、脊髄周辺には COX-1 陽性血管内皮細胞も観察された。

mPGES-1, cPLA₂

プロスタグランジン合成酵素である mPGES-1 および cPLA₂ も正常動物髄核で発現が見られた。(図 3)

図 3



COX-2

正常マウス・ラットにおいて、椎間板およびその周辺組織に COX-2 陽性構造は認められなかった。

(2) 椎間板疾患モデル動物におけるプロスタグランジン系合成系酵素の発現

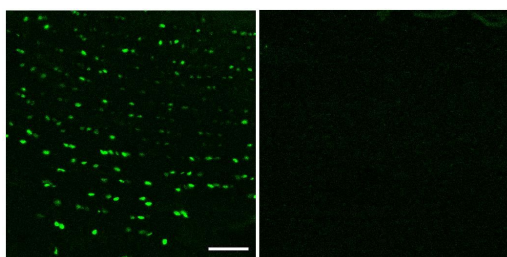
COX-1

ラット椎間板穿刺モデルにおいて、穿刺後 24 時間で COX-1 発現に著変は見られなかった。

COX-2

椎間板穿刺 24 時間後、線維輪に強い COX-2 発現を示す細胞が多数現れた(図 4 左)。一方、隣接する L3/L4 間の椎間板には、全く COX-2 陽性細胞は認められなかった(図 4 右)。また椎間板と椎骨の境界部分(軟骨)にも強い COX-2 陽性所見が認められた。一方、髄核には COX-2 陽性細胞は認められなかった。

図 4 (スケールバー50 µm)



(3) 末梢炎症モデル動物におけるプロスタグランジンとプロスタグランジン系合成系酵素の発現

カラゲニン(Car)投与後 3 時間で、炎症部位の PGE₂ および 6-ketoPGF_{1α}の量は生理食塩水(Sal)投与と比較して有意に上昇した。また、その上昇は iPLA₂ 阻害剤である BEL で有意に抑制された。一方、cPLA₂ 阻害剤である AACOCF₃ は有意な作用を示さなかった(図 5)。

次に RT-PCR で iPLA₂ アイソザイム、つまり iPLA_{2β} と iPLA_{2γ} 両方の mRNA が正常状態の足趾に存在し炎症惹起後も変化のないことが明

らかになった(図 6)。

図 5

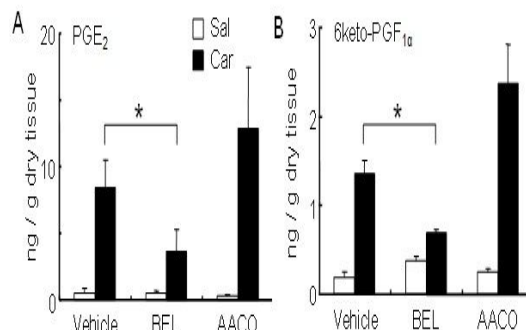
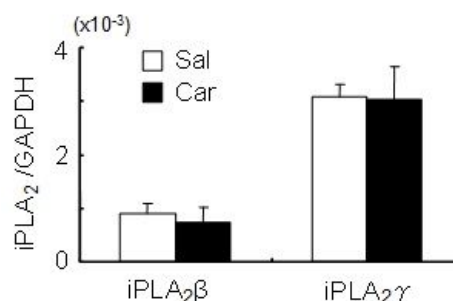
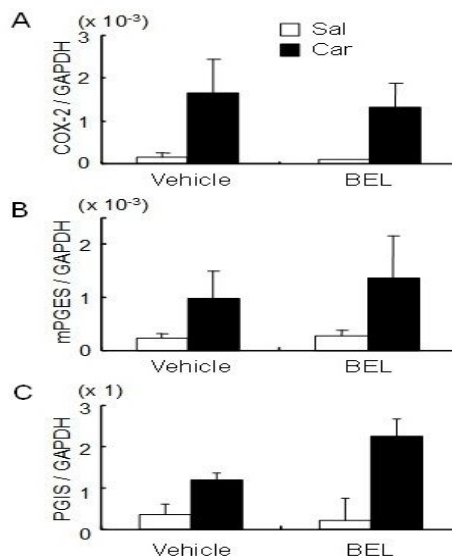


図 6



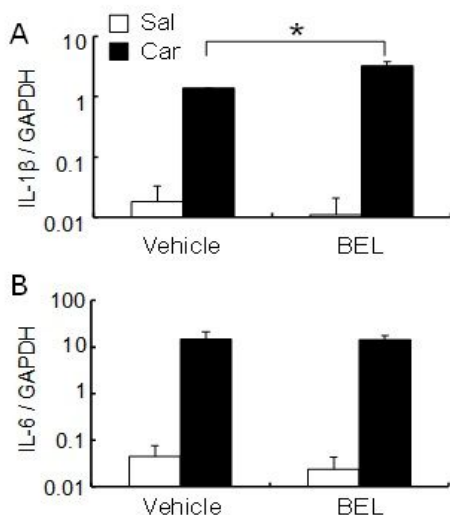
次にカラゲニンによるプロスタグランジン産生増加に参与する可能性がある COX-2、mPGES-1、PGIS の誘導に参与するかを調べた。統計学的に有意ではなかったが、カラゲニン投与により炎症局所における COX-2mRNA、PGES-1mRNA、PGISmRNA の発現は増加した。これらの発現増加に対する BEL 投与の影響は観察されなかった(図 7)。但し BEL 投与群における COX-2mRNA と PGISmRNA の発現増加には有意差があった。

図 7



また、カラゲニン投与により誘導される炎症性サイトカイン mRNA に及ぼす BEL の効果を調べた。カラゲニン投与後 IL1 β mRNA および IL6mRNA のレベルは有意に上昇した。そして BEL の投与によりわずかではあるが IL1 β mRNA のレベルを有意に上昇させたが、カラゲニン投与により惹起された IL6mRNA の上昇に対しては、影響しなかった(図 8)。

図 8

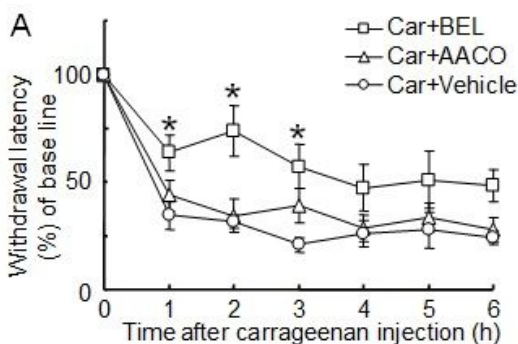


これらの結果より、BEL は iPLA₂ の酵素活性のみに対して作用し、その結果炎症局所におけるプロスタグランジンレベルに影響を与えることが、示唆された。

以上の結果から、カラゲニン惹起炎症において、炎症部位の PGE₂、6-ketoPGF_{1 α} の上昇は、COX-2、mPGES-1、PGIS の発現上昇によると考えられる。また COX-2 の上流で、iPLA₂ が機能していることが明らかとなった。

最後に、カラゲニン投与により誘発される熱性痛覚過敏に対する BEL の効果について調べた。BEL によって、カラゲニン投与 1, 2, 3 時間後の痛覚過敏反応が有意に抑制された(図 9)。

図 9



この実験により、痛覚過敏と PG 系を対応させることができた。今後、この手法を椎間板疾患モデルに適用し、椎間板疾患の疼痛における PG 系の関与メカニズムを明らかにする。

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)

Tsuchida K, Ibuki T, Matsumura K.
Bromo-enol Lactone, an Inhibitor of Calcium-Independent Phospholipase A₂, Suppresses Carrageenan-Induced Prostaglandin Production and Hyperalgesia in Rat Hind Paw. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:605727. doi: 10.1155/2015/605727. Epub 2015 Apr 30. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

井上智博、伊吹京秀、伊東雅和、松村潔
マウス椎間板髄核におけるプロスタグランジン合成酵素の発現、第 37 回日本神経科学大会 2014.09.13 横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

伊吹 京秀 (Ibuki Takae)

京都府立医科大学、医学研究科、講師

研究者番号：90232587

(2)研究分担者

松村 潔 (Matsumura Kiyoshi)

大阪工業大学、工学部

教授

研究者番号：10157349

(3)連携研究者

()

研究者番号：