

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790579

研究課題名(和文) 選択的COX-2阻害剤の椎間板性腰痛に対する効果の基礎研究

研究課題名(英文) Investigation of the effect of selective COX-2 inhibitor for discogenic pain.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：近年、椎間板性腰痛の分子機構が明らかになりつつあり、椎間板変性に伴い近傍の神経線維が侵入すると考えられている。椎間板変性には細胞外基質分解酵素(MMPs)が、また神経線維侵入には神経成長因子(NGF)が重要な役割を担うが、これらの発現調節機構は明らかでない。本研究は、腰痛治療に汎用されている選択的COX-2阻害剤の効果を、ヒト椎間板細胞を用いて分子生物学的に解析した。

炎症刺激で誘導されるNGFおよびMMPsは、選択的COX-2阻害剤によりむしろ増強され、椎間板変性および神経進入を増悪させる可能性が示された。

本研究成果は、現在の選択的COX-2阻害剤による腰痛治療を再考させるものである。

研究成果の概要(英文)：Degeneration of the disc by matrix metalloproteinases (MMPs) and following innervation of the peripheral nerve fiber by nerve growth factor (NGF) are considered as the molecular mechanism of developing discogenic pain. The effect of a selective COX-2 inhibitor, which is often used for managing low back pain in clinic, on the regulation of NGF and MMPs was investigated in isolated human intervertebral disc cells.

Inflammatory cytokine-induced NGF and MMPs expressions were augmented when the cells were treated with a selective COX-2 inhibitor, suggesting that inhibition of COX-2 activity may accelerate both disc degeneration and innervation.

These findings may need to be carefully taken into account when treating patients with discogenic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経成長因子 椎間板性腰痛 選択的COX-2阻害剤 プロスタグランジン 軟骨変性 神経侵入 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

腰痛は我が国において最も有訴率が高い疾患であり、また就業不能原因の第一位にもあげられ、社会的・経済的損失が大きい病態である。研究開始当初、椎間板性腰痛の分子機構が明らかになりつつあり、椎間板の変性に伴い近傍の知覚神経がその中心部へと侵入することで疼痛を惹起すると考えられていた。椎間板の変性には細胞外基質分解酵素郡(matrix metalloproteinase [MMP])が、神経侵入には神経成長因子(nerve growth factor [NGF])が重要な役割を持つ事が知られていた。

一方で、腰痛治療の第一選択薬は、炎症メディエータである prostaglandin (PG) E2 産生を抑制すべく 非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drug [NSAIDs]) または選択的 COX-2 阻害剤が汎用されるが、MMPs および NGF 発現に対する効果は不明であった。

### 2. 研究の目的

腰痛治療の第一選択薬である選択的 COX-2 阻害剤の椎間板性腰痛病態形成に対する有用性または問題点を明らかにすべく、ヒト椎間板由来細胞における MMPs および NGF 発現に対する同薬剤の作用を分子生物学的に解明し、研究当初の選択的 COX-2 阻害剤に依存した腰痛治療の概念を見直し、基礎研究結果に基づいた腰痛治療法の礎となる研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト椎間板細胞培養法の確立

腰椎変性疾患手術時に廃棄される椎間板より酵素的に細胞を単離培養し、2次元および3次元(alginate beads culture)培養を行い、炎症性サイトカインにより誘導される NGF および MMPs 発現を比較検討し、本実験に適した培養条件の確立を試みた。

(2) ヒト椎間板細胞における炎症刺激で誘導される NGF および MMPs 発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果および PGE2 の関与

上記ヒト椎間板細胞の培養法に基づき、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 により誘導される NGF および MMPs 発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果を realtime-PCR 法により遺伝子レベルで、また ELISA または Western blot 法によりタンパク質レベルで検討した。

(3) PGE2 による NGF および MMPs 発現抑制の分子機構の解明

PGE2 の細胞活性に対する作用は、EP1-EP4 受容体を介する事が知られている。そこで、EP1-EP4 に対する選択的アゴニストを用いて、NGF および MMPs 発現を調節しうる受容体を同定を試みた。

### 4. 研究成果

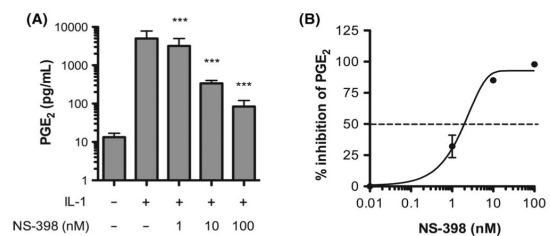
#### (1) ヒト椎間板細胞培養法の確立

ヒト椎間板細胞を2次元(単層)培養または3次元(Alginate beads)培養し、IL-1 に対する応答性を比較検討した。その結果、2次元と3次元培養との間に NGF および MMPs 発現誘導に差異は認められなかった(結果省略)。上記結果より本研究は、より簡便な2次元培養で行うこととした。

(2) ヒト椎間板細胞における炎症刺激で誘導される NGF および MMPs 発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果および PGE2 の関与

まず、本研究に用いた選択的 COX-2 阻害剤(NS-398)の COX-2 阻害活性を検討するため、ヒト椎間板細胞を NS-398 (1, 10 または 100 nM) 存在下、IL-1 処理し、産生される PGE2 量を ELISA により測定した。

その結果、ヒト椎間板細胞において IL-1 により誘導される PGE2 産生は、1 nM NS-398 から 100 nM NS-398 まで濃度依存的に抑制され、100 nM NS-398 により PGE2 産生はほぼ完全に抑制された。なお、本実験系における NS-398 の IC50 はおよそ 2.4 nM であった(下図)。

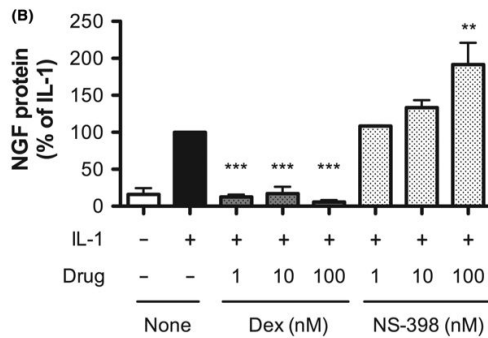
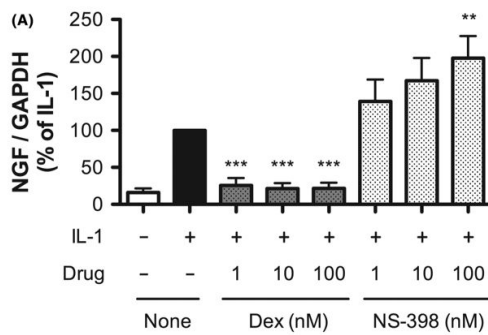


次に、IL-1 により誘導される NGF 発現に対する NS-398 の効果を検討し、強力な抗炎症効果をもつステロイド(Dexamethasone [Dex])と比較検討した。

その結果、IL-1 により誘導される NGF 遺伝子発現は、Dex により強力に抑制されたのに対し、NS-398 は NGF 発現を濃度依存的に促進した(下図 A)。

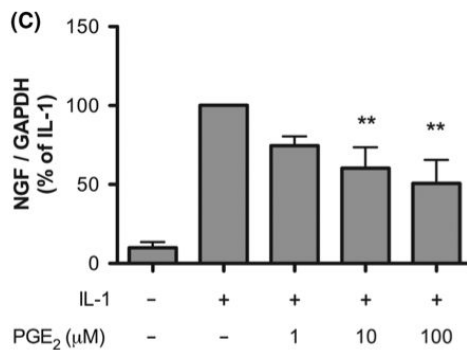
NGF タンパク質レベルについて ELISA 法により検討したところ、遺伝子発現と同様、Dex は強力に抑制するのに対し、NS-398 は NGF タンパク質産生も濃度依存的に促進した(下図 B)。

また、IL-1 により誘導される MMP-1 および MMP-13 においても、Dex は強力に抑制したのに対し、NS-398 はこれらの発現を増強させることが明らかとなった(結果省略)。



以上の結果より、NS-398 による NGF 発現増強効果は、COX-2 活性阻害、すなわち PGE2 産生抑制に起因すると推察された。このことは、元来炎症のメディエータとして知られている PGE2 が NGF 発現に対しては抑制的に作用している可能性が考えられた。

そこで、外因性に PGE2 を添加し、PGE2 の NGF および MMPs 発現に対する効果を検討した。

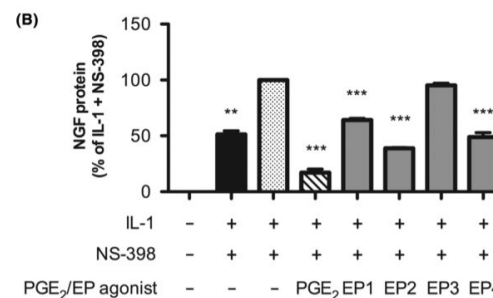
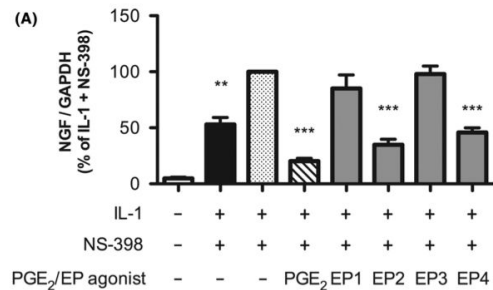


PGE2 は IL-1 で誘導される NGF 発現を濃度依存的に抑制することが判明した(上図)。IL-1 により誘導される MMP-1 および-13 発現も外因性 PGE2 により濃度依存的に抑制された(結果省略)。

以上の結果より、PGE2 は急性炎症のメディエータとしての生理活性に加え、NGF および MMPs 産生に対しては negative feedback 様に抑制効果を示すことが明らかとなった。

### (3) PGE2 による NGF および MMPs 発現抑制の分子機構の解明

PGE2 による NGF および MMPs 発現抑制の分子機構を解明すべく PGE2 の細胞膜受容体 EP1~EP4 の選択的アゴニストを用いて、NGF および MMPs 発現を制御する受容体の同定を試みた。



PGE2 による NGF 遺伝子発現抑制は、EP2 および EP4 アゴニストにより再現された(上図 A)。NGF タンパク質レベルにおいても EP2 および EP4 アゴニストによる抑制効果が観察された(上図 B)。すなわち、PGE2 は EP2 および EP4 受容体を介して、NGF 発現を抑制的に制御する事が推察される。

一方、IL-1 により誘導される MMP-1 および-13 発現は、EP1 および EP3 アゴニストにより抑制され(結果省略)、NGF 発現とは異なる受容体を介して制御されていると考えられる。

以上より、炎症メディエータとして知られ、急性痛、急性炎症に関わる PGE2 は、慢性腰痛、特に椎間板性腰痛の病態形成に関わる NGF と MMPs の発現に対しては negative feedback 様に抑制的な生理活性を有することが明らかとなった。また、PGE2 は EP2/4 を介して NGF 発現を、EP1/3 を介して MMP-1 および-13 発現を制御することも判明した。国内外の臨床で汎用される腰痛保存治療の第一選択薬である選択的 COX-2 阻害剤は、PGE2 産生を抑制し、急性痛、急性炎症を緩和するものの、NGF および MMPs 発現を増強させ腰痛の慢性化を惹起しかねないと考えられる。本研究成果は、現在の選択的 COX-2 阻害剤による腰痛治療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)

著者: Wuqikun Alimasi, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Makiko Yorifuji, Hidekazu Suzuki, Taiichi Kosaka, Takaaki Shishido, Kengo Yamamoto

論文 標 題: 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. (査読有)

雑誌名: Spine (2013), volume 38, number 17, pp 1466-1472

DOI: 10.1097/BRS.0b013e318294edb1

[学会発表](計 12 件)

発表者: 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクナルマス, 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  
発表標 題: 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  
学会名: 第 6 回 日本運動器疼痛学会  
発表年月日: 2013 年 12 月 7 日~12 月 8 日  
発表場所: 兵庫県神戸市

発表者: 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクナルマス, 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  
発表標 題: 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  
学会名: 第 28 回 日本整形外科基礎学術集会  
発表年月日: 2013 年 10 月 17 日~10 月 18 日  
発表場所: 千葉県千葉市

発表者: 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクナルマス, 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  
発表標 題: 腰部脊柱管狭窄症における PGE1 の MMP/NGF の発現調節  
学会名: 第 62 回 東日本整形災害外科学会  
発表年月日: 2013 年 9 月 19 日~9 月 21 日  
発表場所: 長野県北佐久郡

発表者: 村田寿馬, 澤地恭昇, 遠藤健司, ウチクナルマス, 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  
発表標 題: 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  
学会名: 第 11 回整形外科痛みを語る会  
発表年月日: 2013 年 7 月 6 日~7 月 7 日  
発表場所: 福島県郡山市

発表者: Yasunobu Sawaji, Wuqikun Alimasi, Kenji Endo, Hidekazu Suzuki, Hidetoshi Tanaka, Kengo Yamamoto  
発表標 題: A novel pharmacological action of

prostaglandin E1 for intervertebral disc degeneration and innervation.

学会名: International Society for the Study of the Lumbar Spine

発表年月日: 2013 年 5 月 13 日~5 月 17 日

発表場所: Arizona, U.S.A.

発表者: 澤地恭昇, ウチクナルマス, 遠藤健司, 小坂泰一, 山本謙吾  
発表標 題: 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  
学会名: 第 5 回 日本運動器疼痛学会  
発表年月日: 2012 年 11 月 17 日~11 月 18 日  
発表場所: 東京都江東区

発表者: Wuqikun Alimasi, Yasunobu Sawaji, Dai Kimura, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kenji Endo, Kengo Yamamoto  
発表標 題: Roles of PGE2 on the intervertebral disk degeneration and nerve ingrowth in human intervertebral disk cells.

学会名: 第 27 回 日本整形外科基礎学術集会  
発表年月日: 2012 年 10 月 26 日~10 月 27 日  
発表場所: 愛知県名古屋

発表者: 澤地恭昇, ウチクナルマス, 遠藤健司, 田中英俊, 小坂泰一, 山本謙吾  
発表標 題: 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  
学会名: 第 27 回 日本整形外科基礎学術集会  
発表年月日: 2012 年 10 月 26 日~10 月 27 日  
発表場所: 愛知県名古屋

発表者: 澤地恭昇, ウチクナルマス, 遠藤健司, 山本謙吾  
発表標 題: 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~  
学会名: 第 10 回整形外科痛みを語る会 第 5 回 麻酔科痛みをめカニズムを語る会 合同開催  
発表年月日: 2012 年 6 月 17 日~6 月 18 日  
発表場所: 高知県安芸郡

発表者: Wuqikun Alimasi, Yasunobu Sawaji, Dai Kimura, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kenji Endo, Kengo Yamamoto  
発表標 題: EP2/4 receptor suppresses the expression of NGF in human IVD cells.  
学会名: International Society for the Study of the Lumbar Spine  
発表年月日: 2012 年 5 月 28 日~6 月 1 日  
発表場所: Amsterdam, Netherlands

発表者: Yasunobu Sawaji, Wuqikun Alimasi, Kenji Endo, Taiichi Kosaka, Dai, Kimura, Kengo Yamamoto  
発表標 題: EP1/3 pathway suppresses

exaggeration of IL-1-induced collagenases by a selective COX-2 inhibitor in human IVD cells.

学会名：International Society for the Study of the Lumbar Spine

発表年月日：2012年5月28日～6月1日

発表場所：Amsterdam, Netherlands

発表者：Wuqikun Alimasi, Yasunobu Sawaji, Dai Kimura, Hidetoshi Tanaka, Taiichi Kosaka, Kenji Endo, Kengo Yamamoto

発表標題：Roles of PGE2 on the intervertebral disc degeneration and nerve ingrowth in human intervertebral disc cells.

学会名：第41回日本脊椎脊髄病学会

発表年月日：2012年4月19日～4月21日

発表場所：福岡県久留米市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤地 恭昇 (SAWAJI, Yasunobu)

東京医科大学・医学部・ポスドクター

研究者番号：20571152