

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791523

研究課題名(和文) 椎間板性腰痛に対するエリスロポエチンの効果に関する検討

研究課題名(英文) The effectiveness of erythropoietin for discogenic low back pain

研究代表者

井上 玄 (Inoue, Gen)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80594209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用い、エリスロポエチンが椎間板性腰痛に対して与える影響を検討した。ラット椎間板より椎間板髄核細胞を単離し、培養した上澄を採取した。上澄には炎症性サイトカインや成長因子が豊富に含有されており、この上澄で培養シュワン細胞を刺激し、MAPキナーゼの発現を定量した。エリスロポエチンを前投与すると、MAPキナーゼの発現は有意に抑制された。さらに、ラット腰椎椎間板を穿刺し作成した椎間板性腰痛モデルにエリスロポエチンを局所投与すると、後根神経節において、MAPキナーゼが抑制され、脊髄後角においてグリア活性が有意に抑制された。エリスロポエチンが椎間板性腰痛の有効な治療薬となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effectiveness of erythropoietin for rats discogenic low back pain was evaluated. The cells from nucleus pulposus were isolated and cultured, and supernatant of medium was obtained. This supernatant, which includes many kinds of cytokines and growth factors stimulates primary Schwann cells and the expression of MAP kinase were evaluated. Pretreatment with erythropoietin suppressed MAP kinase expression significantly. Also, in vivo, erythropoietin suppressed MAP kinase expression in dorsal root ganglion and glial activation in dorsal horn in spinal cord. Erythropoietin could be one of the effective treatment for discogenic low back pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：シュワン細胞 椎間板細胞 疼痛

### 1. 研究開始当初の背景

近年、疼痛による経済損失は年間3,500億円を超えると試算されている。中でも腰痛は、平成22年に行なわれた厚生労働省の国民生活基礎調査の結果、男性で1位、女性で2位を占めており、実際に多くの運動器系の疾患が上位を占めるに至っており、その対策は急務である。

一方で近年、我が国は急速に高齢化が進んでおり、この傾向は世界でも類を見ない。これによりいわゆる加齢性変化に伴う腰痛、関節痛も増加しており、中には痛みが慢性化して治療に難渋する症例も多い。日本の総人口の13%が何らかの慢性痛を持っているとの報告もある。そのような中で医療費は高騰し、我が国の経済を圧迫している。今後は投入した医療費に対して、いかに効果が得られたかが重要となる。

エリスロポエチンは貧血の治療に既に用いられており、人体に対する安全性が確立された造血性ホルモンである。近年、エリスロポエチンの神経組織に対する効果が報告されており、これまで脳挫傷後の神経細胞の壊死を抑制すること、末梢神経損傷後の神経組織の修復を促すことが報告されている。本研究は、既存の薬剤であるエリスロポエチンが、腰痛の主要な原因の1つとされる椎間板に対して、治療薬となりうるかを検討するものである。

### 2. 研究の目的

人体に対する安全性が確立された既存の薬剤であるエリスロポエチンが、椎間板生腰痛の治療薬として機能するかを検証することが目的である。腰椎椎間板を支配する神経細胞、ならびにシュワン細胞に対し、各疼痛伝達物質の発現を mRNA およびタンパク質レベルで比較・検討し、至適な投与条件を検討した。

### 3. 研究の方法

ラット椎間板より椎間板髄核を採取し、髄

核に存在する細胞を単離・培養した。髄核細胞培養は単層で行い、位相差顕微鏡視下に細胞の飽和度が90%程度になるまで培養を行い、培養上澄を採取、生後1日のラットより単離・精製したシュワン細胞を上澄内で培養した。上澄を添加する30分前にエリスロポエチンを0.2nMおよび10nMの2つの濃度で添加し、MAPキナーゼであるAkt、Erkのタンパク発現をWestern blottingで比較した。また、炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ とIL1 $\beta$ の発現を、ELISAで比較した。次にin vivoの研究として尾椎椎間板圧迫・穿刺モデルにおいて、圧迫・穿刺前にエリスロポエチン500nMを局所注射し、圧迫後、椎間板およびS2後根神経節を3日、7日、2週後に摘出し、免疫組織学的検討を行った。

### 4. 研究成果

我々は以前、エリスロポエチンにより、末梢神経損傷後のシュワン細胞の接着・遊走能が促進され、機能回復が促されることを報告した(Inoue G, et al. *Glia*, 2010)。また、ラットの髄核細胞上澄を後根神経節細胞に添加すると、疼痛を伝達するNGF依存性の神経線維が伸長することを報告している(Yamauchi K, et al. *Spine*, 2009)。また、椎間板穿刺に伴い、椎間板を支配する神経細胞が損傷を受け、その軸索が伸長することを報告している(Inoue G, et al. *Spine*, 2006)。これらの結果より、椎間板穿刺によってもたらされる神経損傷が、投与したエリスロポエチンにより修復が促されることにより、椎間板性腰痛の治療促進につながるのではないかと着想した。本研究の細胞培養実験の結果、エリスロポエチンを添加した群で、pAkt、pErkの発現がコントロールと比較して有意に抑制された。また、TNF $\alpha$ およびIL1 $\beta$ の発現をELISAで比較すると、エリスロポエチン10nM添加群で、その発現が有意に抑制された。これらの細胞実験の結果より、エリスロポエチンの効果により、椎間板性腰痛の病態の過

程で損傷された椎間板支配神経を構成するシュワン細胞に対し、エリスロポエチンが疼痛を軽減する作用をもつ可能性が示唆された。これらの結果に基づき、椎間板穿刺・圧迫モデルを用いて *in vivo* の実験を行った結果、術後 3 日、7 日時点で TNF $\alpha$ 、IL1b の後根神経節細胞における陽性細胞率はエリスロポエチンを投与した群で有意に抑制されていた。また、脊髄後角において免疫染色を行なうと、Iba1 陽性のミクログリア細胞がエリスロポエチン投与群で有意に減少していた。圧迫開始 6 週間後にも検討を行ったが、椎間が骨性に癒合する傾向を認め、各サイトカインの発現に有意差は認めなかった。この傾向は、我々が過去に穿刺・圧迫モデルを用いて炎症性サイトカインを定量した際のものと同様の傾向であった (Miyagi M, et al. Spine, 2012)。

以上の検討より、エリスロポエチンが椎間板性腰痛に対して抗炎症効果を介して疼痛を軽減する可能性が示唆された。エリスロポエチンは既に臨床の現場で用いられている薬剤であり、椎間板性腰痛に一定の効果が得られるとすると、社会・経済的にも恩恵は大きいと考えられる。将来の臨床応用を目指してさらに基礎実験を重ねて行く予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kimura S, Sakuma Y, Suzuki M, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, Aoki Y, Ishikawa T, Miyagi M, Kamoda H, Kubota G, Oikawa Y, Inage K, Sainoh T, Sato J, Nakamura J, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Evaluation of pain behavior and calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory nerve fibers in the spinal dorsal horn after sciatic nerve compression and application of nucleus pulposus in rats. Spine、査読有、39 巻、2014、455-462 DOI: 10.1097/BRS.000000000000180.

Sadamasu A, Sakuma Y, Suzuki M, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, Aoki Y, Ishikawa T, Miyagi M, Kamoda H, Kubota G, Oikawa Y, Inage K, Sainoh T, Sato J, Nakamura J, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S.

Upregulation of NaV1.7 in dorsal root ganglia after intervertebral disc injury in rats. Spine、査読有、39 巻、2014、E421-426 DOI: 10.1097/BRS.000000000000229.

Fujii T, Sakuma Y, Orita S, Inoue G, Ochiai N, Kuniyoshi K, Aoki Y, Ishikawa T, Miyagi M, Kamoda H, Suzuki M, Kubota G, Inage K, Sainoh T, Sato J, Yamauchi K, Toyone T, Nakamura J, Kishida S, Takahashi K, Koshi T, Ohtori S. Dichotomizing sensory nerve fibers innervating both the lumbar vertebral body and the area surrounding the iliac crest: a possible mechanism of referred lateral back pain from lumbar vertebral body. Spine、査読有、38 巻、2013、E1571-1574 DOI: 10.1097/BRS.0b013e3182a879cd.

Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Sakuma Y, Orita S, Oikawa Y, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Ohtori S. Assessment of pain behavior in a rat model of intervertebral disc injury using the CatWalk gait analysis system. Spine、査読有、38 巻、2013、1459-1465 DOI: 10.1097/BRS.0b013e318299536a.

Sakuma T, Kamoda H, Miyagi M, Ishikawa T, Arai G, Eguchi Y, Suzuki M, Oikawa Y, Sakuma Y, Kubota G, Inage K, Saino T, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, Takahashi K, Ohtori S. Comparison of CatWalk analysis and von Frey testing for pain assessment in a rat model of nerve crush plus inflammation. Spine、査読有、38 巻、2013、E919-924 DOI: 10.1097/BRS.0b013e318297bfb6.

Ishikawa T, Miyagi M, Yamashita M, Kamoda H, Eguchi Y, Arai G, Suzuki M, Sakuma Y, Oikawa Y, Orita S, Inoue G, Ozawa T, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Yamaguchi A, Ohtori S. In-vivo transfection of the proopiomelanocortin gene, precursor of endogenous endorphin, by use of radial shock waves alleviates neuropathic pain. J Orthop Sci、査読有、18 巻、2013、636-645 DOI: 10.1007/s00776-013-0397-y.

〔学会発表〕(計 2 件)

井上玄、内田健太郎、上野正喜、齋藤巨、藤巻寿子、中澤俊之、井村貴之、高平尚伸、高相晶士、慢性疼痛における塩基性線維芽細胞増殖因子の役割-痛みへの関与と治療への可能性、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2013 年 10 月 18 日、千葉市)

Inoue G, Ohtori S, Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Eguchi Y, Suzuki M, Sakuma Y, Oikawa Y, Takaso M, Takahashi K. Quantitative measurement of rats myofascial low back pain using CatWalk gait analysis system. The 14<sup>th</sup> EFFORT Congress (2013 年 6 月 5 日、イスタンブール (トルコ))

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

井上 玄 (INOUE, Gen)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80594209