

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10938

研究課題名(和文)動物モデルを用いたストレスによる慢性腰痛発症機序の解明

研究課題名(英文) Possible mechanisms of chronic low back pain secondary to stress utilizing disc degeneration in the rat

研究代表者

川上 守 (Kawakami, Mamoru)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20195051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット腰椎椎間関節切除後7週に出現する歩行異常は、既存の腰痛モデルの疼痛行動と同様であり、罹患椎間の不安定性や椎間板変性が認められた。寒冷反復ストレスで、歩行異常がさらに増悪したが、健常ラットへの寒冷反復ストレスや拘束ストレスでは歩行異常は認められなかった。変性椎間板での炎症性サイトカイン発現ならびに腰髄後根神経節での炎症とミエリン障害が疼痛発現に関連し、種々の薬剤投与により下行性抑制系が寄与することを証明した。腰痛行動を観察可能な新しい椎間板変性モデルを確立し、ストレスによる痛みの増強機序を解明するための一助を示した。慢性腰痛に対する運動や薬物の有用性を検証し得る動物モデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腰痛の発症メカニズムを解明するためには有用な動物モデルが必要である。椎間板に直接侵襲を加えることなく、腰痛行動を観察可能な動物モデルを確立した。ストレスが腰痛の発症増悪に関連することが示されているが、そのメカニズムは不明である。確立したモデルに寒冷反復ストレスを加えることで痛みの増強が見られ、その機序の一部を証明した。運動や薬物療法の慢性腰痛に対する有用性をこの確立したモデルで検証可能である。このメカニズムの解明が、慢性腰痛患者に福音をもたらす可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Gait abnormalities appearing at 7 weeks after resection of the lumbar facet joint in the rat were similar to the pain behavior in the existing back pain model, and instability and disc degeneration of the affected vertebrae were observed. Gait abnormalities were exacerbated by repeated cold stress, but no abnormal gait was observed by cold cyclic stress or restraint stress on healthy rats. We showed that the expression of inflammatory cytokines in the degenerated intervertebral disc and inflammation and myelin damage in the dorsal root ganglia are associated with the development of pain, and that dysfunction of the descending inhibitory system might result in severe gait dysfunction. We established a new model of intervertebral disc degeneration capable of pain related behaviors seen in patients with low back pain. This model plays a role in elucidating the pain mechanism enhanced by stress.

研究分野：整形外科

キーワード：慢性腰痛 椎間板変性 歩行解析 痛覚過敏 反復寒冷ストレス 拘束ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰痛診断のためのMRIをはじめとした画像診断の発展のみならず腰痛に対する新しい薬物療法や手術療法の導入にもかかわらず、厚生労働省大臣官房統計情報部社会統計課国民生活基礎調査をみると、腰痛は男女ともに日本国民有訴者率の上位を占め、減少傾向になく、男性ではむしろ増加の傾向にある。腰痛による就労喪失が経済的、社会的問題を引き起こしていることがすでに指摘されている (Druss BG, et al. Health Aff. 2002;21:105-11) が、超高齢社会を迎えているわが国でも、今後、腰痛は医療費の高騰と共に就労困難による生産の低下、介護にかかるコストを含めた社会経済に与える損失の増大が危惧される。わが国の慢性疼痛保有率は13.4%であり、その内、慢性腰痛の占める割合は65.7%にも及び、高齢者ほど有病率が高い。(服部正治ほか. ペインクリニック. 2009;30:S3-S14.)。一方、ストレスが腰痛発症の危険因子であり、腰痛の発症、慢性化には心理社会的要因が関与することが示されている (Kikuchi S. Eur Spine J. 2008 ;17Suppl 4:421-7.)。したがって、腰痛に対する有効な治療法の確立が喫緊の課題ではあるが、ストレスそのものが腰痛発症に関係するのか、ストレスがどのような機序で腰痛の発症、増悪、慢性化するのか不明な点が多い。痛みとストレスの関係については多くの基礎的臨床的研究がなされているが、腰痛そのものとストレスの関係についての詳細な研究はなされていない。腰痛を引き起こす組織として椎間板が古くから注目され、変性椎間板による慢性腰痛に関する報告が多い。椎間板変性は加齢に伴い増加することから、高齢化社会を迎えた現在ではさらに椎間板変性を基盤とした腰痛発症が危惧される。椎間板変性動物モデルの報告は多くなされているが、椎間板の穿刺や圧迫など何らかの侵襲を加えて作成されたもので、直接侵襲を加えない椎間板変性モデルはなかった。また、変性椎間板と痛みの関連を示唆した報告は極めて少ない (Kawakami M, et al. Spine. 2005;30:1933-9.)。ラット腰椎椎間関節を切除することで、経時的に当該椎間板にすべりを伴わない不安定性と変性が発生し、処置後7週で疼痛関連行動がみられるモデルを確立した (Fukui D, Kawakami M, et al. Eur Spine J. 2015; 24:2085-94.)。このモデルの特徴は、椎間板変性が直接侵襲ではなく、経時的に出現し、運動麻痺はみられないものの、歩行解析で、歩幅・遊脚期速度・平均歩行速度・正常歩行割合の減少と開脚歩行がみられることである。これらの歩行異常は、傍脊柱筋の炎症モデル (Miyagi M, et al. Spine. 2011; 36:1760-4.) や椎間板穿刺モデル (Miyagi M, et al. Spine. 2013; 38:1459-65.) でみられる歩行異常と同一のものである。すなわち、われわれの開発したモデルは腰痛を評価し得るモデルである。特に、後肢接地時の光学輝度低下は神経損傷モデルで出現する (Vrinten DH, et al. Pain. 2003;102:203.) ことから、馬尾、脊髄神経根の機械的圧迫がみられないわれわれのモデルでの疼痛行動発現には椎間板変性による侵害性障害のみではなく、神経因性障害が混在する機序が関与している可能性がある。また、マイクロCTでの三次元形態計測では、椎間関節切除レベルの椎間板高が増大するのに反し、上下の隣接椎間高が減少することが判明し、組織学的な椎間板変性スコアと相関することを報告した (Fukui D, Kawakami M, et al. Eur Spine J. 2017;26:2014-20.)。したがって、このモデルを用いれば歩行解析による疼痛関連行動を指標に腰痛発症のメカニズムや治療法の開発が可能である。ストレスモデルとしては、反復寒冷ストレス、specific alternation of rhythm in temperature (SART)ストレス、拘束ストレスなどがある。ストレス反応の中心的役割を担うのが視床下部・下垂体・副腎軸であり (Antoni FA, et al. Endocr Rev. 1986;7:351-7.)、ストレスは中枢での α -エンドルフィン、アデノシンA1-受容体、オピオイド受容体、ドーパミン、ノルエピネフリン、セロトニンや下降性抑制系に影響する。腰髄神経根に髄核留置する神経根障害モデルでの拘束ストレスは下肢の痛覚過敏を慢性化させるという報告 (Uesugi K, et al.

Eur Spine J.2011;20:1885-91.)があるが、腰痛モデルでの報告はない。また、反復寒冷や拘束など異なるストレスに対する腰痛モデルへの影響についての検討はなされていない。慢性腰痛に対する治療法として、抗うつ薬、筋弛緩薬、非ステロイド性消炎鎮痛薬、オピオイドなどの薬物療法、運動療法、認知行動療法が推奨されている（腰痛診療ガイドライン2012）。また、下肢神経症状を伴う慢性腰痛にはプレガバリンが有効であるが、伴わない慢性腰痛ではオピオイドの方が有効とされている（Sakai Y, et al. Eur Spine J. 2015;24:1309-17）。慢性腰痛に対する抗うつ薬の有効性に関して十分なエビデンスがない（Urquhart DM, et al. The Cochrane Library 2008）。これらの報告は慢性腰痛に対する薬物療法の困難さを示唆している。ストレス負荷による慢性腰痛モデルをもちいることで薬物療法を含めた有用な治療法の解明につながる。

2．研究の目的

われわれの作成した椎間板変性モデルを用いて、痛覚過敏と歩行解析による疼痛関連行動を指標に、各種ストレスの影響を観察する。血中の副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、コルチコステロンを計測し、疼痛関連行動とストレスの関係を検討し、ストレスによる中枢機序を解明する。アセトアミノフェン、非ステロイド性消炎鎮痛薬、ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液、抗うつ薬、プレガバリンを用いた薬物療法を行い、どの薬物が椎間板変性モデルに有効で、各種ストレス負荷時の疼痛関連行動に有用であるかを検証する。われわれが開発した椎間板変性モデルを用いてストレスの影響を検討することで、腰痛の増悪、慢性化の機序解明の一助になり、ストレスに関連する慢性腰痛に対する的確な治療法を確立する。

3．研究の方法

ラット腰椎椎間関節切除術による椎間板変性モデルを用いて、CatWalk 法で自然歩行下での行動解析を行い、拘束ストレスあるいは反復寒冷ストレスを負荷し、腰痛に関連した歩行パターンの増悪がみられるか、痛覚過敏がどう変化するか、慢性化するかどうかを検討する。視床下部・下垂体・副腎軸の反応性や後根神経節での遺伝子発現とストレスによる腰痛増強、慢性化の関係を検討し、腰痛発現機序を解明する。各種薬物投与が、ストレスにより増悪、慢性化した腰痛の改善に有用かどうかどうか検討する。さらにストレス下の変性椎間板の組織学的・免疫組織学的検討を行い、椎間板そのものへの形態学的変化を検証する。

方法（1）腰椎椎間板変性モデルの作成

Sprague-Dawley ラット（250g、雄）を用いて、サイオペンタール腹腔内投与による全身麻酔下に、L4/L5両側椎間関節全切除を行い、腰椎椎間板変性モデルを作成した。椎間関節を展開するのみのsham 群をもうけ、無処置ラットを対照群として、3 群を作成した。

方法（2）ストレス負荷

上記の処置後に連日以下の2種類のストレス負荷を行った。

1. 拘束ストレス：拘束ストレス用ビニールサック（DecapiCone BRAIN-TREE SCIENTIFIC INC., MA, USA.）を用いて雄ラットに日中1日120分間の拘束ストレスを負荷した。
2. 反復寒冷ストレス（specific alternation of rhythm in temperature (SART)ストレス）：1時間ごとに室温（24℃）と低温（-3℃）に変化させ、夜間は低温で飼育し、SARTストレスを負荷した。

方法（3）痛覚過敏の計測

腰椎椎間板変性モデル、sham 群、対照群に上記ストレス負荷を加え、痛覚過敏を定量的に観察し、ストレス負荷を加えないラットの反応と比較した。前後足部に von Frey anesthesiometer による圧刺激を加え、逃避するまでの重量を求め、侵害刺激閾値とし、経時的処置後12 週まで計測した。

方法(4) 自然歩行下での行動解析

上記の各群のラットを用いて、自然歩行下にフットプリントから前後趾のプリント面積、歩行幅、前後趾の荷重分布、床への設置時間、前後趾の協調性を解析可能なCatWalk (Noldus, Wageningen, Netherlands)を用いて、行動解析 (CatWalk 法) (Gabriel AF, et al. J Neurosci Methods. 2007;163: 9-16, Angeby-Moller K, et al. J Neurosci Methods. 2008;174:1-9.) を行った。歩幅・後肢接地時の光学輝度・遊脚期速度・平均歩行速度・正常歩行割合の減少と開脚歩行が観察されるが、疼痛に関連した行動として、歩行速度の減少、協調性歩行障害、脊髄中枢感作による感覚障害による後肢接地時の光学輝度低下が指摘されている。この歩行解析で観察されるような変化がそれぞれのストレスによりどのように変化するか3 群間で経時的に比較検討した。

方法(5) 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) およびコルチコステロンの測定

作成した椎間板変性モデルを含む3 群を用いてストレス負荷8 週で血中ACTH およびコルチコステロン濃度を測定した。

方法(6) 腰髄後根神経節のDNA array

腰椎椎間関節切除後に出現する椎間板変性と反復寒冷ストレスが後根神経節の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすか、痛み、ストレスに関連する系を明確にする目的で、DNA arrayを用いて網羅的に検討した。

方法(7) 薬物療法の有用性の検討

椎間板変性モデル並びに反復寒冷ストレスを加えたモデルに、アセトアミノフェン100mg/kg、ロキソプロフェン5mg/kg、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) のデュロキセチン15mg/kg、ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液200NU/kg、プレガバリン10mg/kg を歩行障害出現後から1 週間連続経口投与した。痛覚過敏の変化、歩行解析を投与後経時的に観察した。さらにL4-5椎間関節切除ラットにSARTストレスを負荷すると同時にワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液 (NTP)の100、200又は300 NU/kgを経口投与した。痛覚過敏の変化、歩行解析を投与後経時的に観察した。

方法(8) 椎間板の組織学的・免疫組織学的検討

処置後、腰椎を摘出し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋の後、矢状面での切片を作成し、組織学的にヘマトキシリンエオジン染色、Alcian Blue 染色を行い、組織学的変性スコア (Pfeiffer M, et al. Eur Spine J. 1994;3:8-16.)を比較観察した。椎間板のTNF- α 、NGF、CGRPとマクロファージ (M ϕ) の発現を免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

ラット腰椎椎間関節切除を行い、椎間板組織に直接侵襲を加えない、椎間板変性モデルを作成し、寒冷反復ストレスを加え、経時的に痛覚過敏、疼痛関連行動を定量的に計測した。処置後、7 - 8 週で、痛覚過敏ならびに腰痛関連の歩行異常が認められた。さらに反復寒冷 (SART) ストレスの負荷は、腰痛関連歩行異常を増強した (Fukui D, Kawakami M, et al. Eur Spine J. 2018;27:205013.) ストレスの違いによる反応性を検討した結果、SARTストレスは椎間関節切除13日後以降、拘束ストレスは椎間関節切除41日後以降より、それぞれストレス負荷による

影響（体重増加抑制）が認められたが、ラット椎間関節切除11週間後に検討した結果、拘束ストレスによる更なる歩行異常の悪化は認められなかった。

視床下部・下垂体・副腎軸の反応性を副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびコルチコステロンの分泌パターンをみるとこのモデルでは血中副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびコルチコステロンは低値であった。

このモデルの腰髄後根神経節のDNA arrayの結果ではInflammatory response, G-protein coupled receptor, 6 4 Integrin signalのパスウェイに特異的な遺伝子が多く含まれていた。GaIR1, 5-HT7, 5-HT4, GPR44は発現量が減少し、GPR84は増加していた。GaIR1や5HT-7の投与はそれぞれ坐骨神経損傷やorofacial painに対し鎮痛効果を示し、5HT-4はノルアドレナリン系の下降性疼痛抑制系を賦活化させる報告がある。本モデルの疼痛発現には炎症とミエリン障害が関与し、GaIR1, 5-HT7, 5HT-4の遺伝子発現の低下により、その程度や増幅が寄与している可能性を示した（Fukui D, Kawakami M, et al. ORS 2018）。

椎間板変性モデル並びに反復寒冷ストレスを加えたモデルに、アセトアミノフェン、ロキソプロフェン、デュロキセチン、ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液（NTP）200NU/kg、プレガバリンを単剤1週間連続経口投与し、歩行解析を行った。デュロキセチン投与で一部の歩行異常の改善が、プレガバリン投与で腰痛関連歩行障害の有意な改善が他の薬剤に比較して認められた（Fukui D, Kawakami M. ORS 2017.）。

傍脊柱筋を剥離したSham群、SARTストレス負荷したS群、L4-5椎間関節を切除したF群、L4-5椎間関節切除にSARTストレスを負荷したFS群とした。L4-5椎間関節切除ラットにSARTストレスを負荷すると同時にNTPの100、200又は300 NU/kgを経口投与した群を作成し、切除の10週後に痛覚過敏と歩行解析を行った。FS群と比較して、NTP-300群の腰痛関連歩行異常及び痛覚過敏は有意に改善した。

上記のSham群、S群、F群、FS群で、処置後11週後に腰椎を摘出し、L4-5椎間板切片の病理組織及びTNF- α 、NGF、CGRP、M β 1の発現を評価した。Sham群と比べ、F群とFS群は線維輪の腹側外側で不規則な組織増生と線維の肥厚と層間の拡大、断裂が認められ、その強度はSham群 < S群 < F群 < FS群の順であった。組織学的変性スコアに有意差を認めた。TNF- α 、NGF、CGRP発現は、Sham群とS群は同程度で、Sham群と比べF群とFS群は共に線維輪外側部に増生した細胞で染色強度が有意に増強した。NTP-100、200又は300群のTNF- α 、NGF、CGRP染色強度は有意に減弱し、特にCGRPの明瞭な陽性細胞は認められなかった（福井大輔、川上 守他. 日整会誌. 2019;93:S1779.）。M β 1減少とM β 2増加の傾向が見られた。M β 1はNTP容量依存的に増加する傾向が認められた。

新しい椎間板変性モデルを確立し、ストレスによる痛みの増強機序を解明するための一助を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Daisuke Fukui, Mamoru Kawakami, Tomonori Matsumoto, Mitsuru Naiki | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Stress enhances gait disturbance induced by lumbar disc degeneration in the rat | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 European Spine Journal | 6. 最初と最後の頁 205-213 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 福井大輔、川上 守、岡田智行、澤田和好、内木 充、山田 宏 |
| 2. 発表標題 反復寒冷ストレスを負荷した椎間関節切除誘発椎間板変性モデルの神経組織における遺伝子 発現量の検討 |
| 3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daisuke Fukui, Mamoru Kawakami, Tomoyuki Okada, Kazuyoshi Sawada, Mitsuru Naiki, Hiroshi Yamada |
| 2. 発表標題 Changes in Gene Expression in the Dorsal Root Ganglion after Lumbar Facetectomy and Repeated Cold Stress Loading in the Rat |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 福井大輔、川上 守、松元智規、沼澤拓身、岡田智行、内木 充、山田 宏 |
| 2. 発表標題 反復寒冷ストレスを負荷した腰椎椎間板変性モデルに対するノイロトロピンの効果 |
| 3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|