

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460728

研究課題名(和文) ヒト頸椎と腰椎由来椎間板における神経侵入と椎間板変性に対する薬剤応答の相違

研究課題名(英文) Differential response to a selective COX-2 inhibitor between human lumbar and cervical intervertebral disc cells on innervation and disc degeneration.

研究代表者

田中 英俊 (TANAKA, HIDETOSHI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90317876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板性腰痛の分子機構として、細胞外基質分解酵素(MMP)による椎間板変性に伴い、神経線維が神経成長因子(NGF)依存的に椎間板内に侵入し疼痛感作が生じるとされていたが、頸部痛においては不明であった。ヒト腰椎および頸椎由来椎間板細胞を用いて臨床で汎用される選択的COX-2阻害剤の効果を比較検討した。その結果、両細胞間で薬剤応答性に差異は認めなかったが、同薬剤がMMPおよびNGF発現をむしろ増強させ、逆にprostaglandinはEP4受容体を介し、当該遺伝子発現を抑制することを見出した。本研究成果は、腰痛、頸部痛に対する薬剤選択の際に考慮されるべき重要な基礎研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of developing low back pain is known as disc degeneration by MMP and following nerve innervation by NGF, however that of neck pain was unknown. The effect of selective COX-2 inhibitors, which is clinically used for both low back pain and neck pain, on NGF and MMP expressions were investigated and compared the effect between human lumbar and cervical intervertebral disc (IVD) cells. IL-1-induced NGF and MMP expression were enhanced by selective COX-2 inhibitors in both lumbar and cervical IVD cells, on the other hand, these expressions were suppressed by PGE2 and other prostanoids via EP4 receptor. Our findings would be of importance when choosing drugs for the treatment of low back pain and neck pain.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：頸部痛 椎間板性腰痛 神経成長因子 細胞外基質分解酵素 選択的COX-2阻害剤 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、国内外の基礎研究成果により解明されつつあった。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。しかしながら、同様に椎間板変性を背景とした頸部痛に関する研究報告は、ほとんどなされていなかった。一方で、腰痛症、頸部痛ともに選択的 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、頸部痛に対しては無効な例を多く経験することから、腰椎由来と頸椎由来の椎間板細胞では薬剤に対する応答性が異なるのではとの仮説をたて、選択的 COX-2 阻害剤および選択的 COX-2 阻害剤により産生抑制される PGE2 の細胞外基質分解酵素および NGF 発現に対する効果を指標とし、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ともに椎間板変性を背景とした慢性腰痛および頸部痛に対する選択的 COX-2 阻害剤に対する応答性の相違について、細胞外基質分解酵素および NGF 発現を指標に解析し、さらにその発現調節機構について、選択的 COX-2 阻害剤により産生抑制される prostaglandins に着目して解明を試み、慢性腰痛および頸部痛の予防およびこれら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) ヒト腰椎および頸椎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) ヒト頸椎および腰椎由来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 発現に対する COX-2 阻害剤 (MS-398 および celecoxib) の効果を遺伝子およびタンパク質レベルで検討する。また、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) Prostaglandins による NGF 発現調節機構の解明

COX-2 阻害剤により阻害される PGE2 およびその他の prostaglandins (PGI2, PGD2 および PGF2a) および PGE1 とその誘導体である limaprost の 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 agonist および antagonist を用いて PGE2 および PGE1 による NGF 発現抑制に関わる prostaglandins 受容体の同定を試みる。

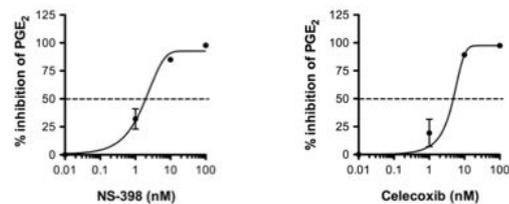
4. 研究成果

1) ヒト頸椎および腰椎椎間板細胞の培養法の確率

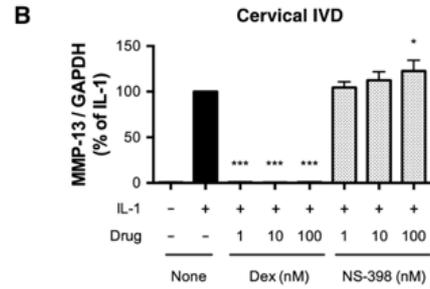
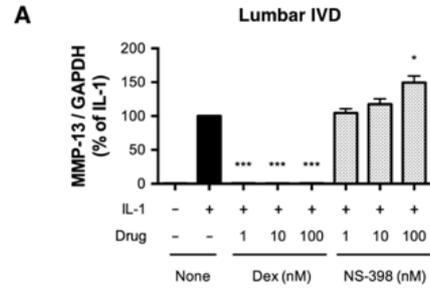
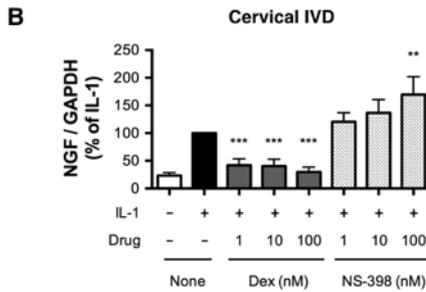
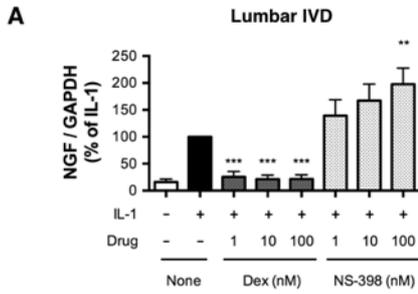
ヒト頸椎および腰椎由来の椎間板細胞を単層 (2 次元) または alginate beads 内 (3 次元) で培養し、IL-1 に対する応答性について MMP および NGF 発現を指標に検討した。その結果、MMPs および NGF 発現誘導に培養法の違いによる差異は認められなかった (結果省略)。そこで本研究は、より簡便な単層培養で行うこととした。

(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、腰椎由来椎間板細胞を用いて実験を行った。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)。

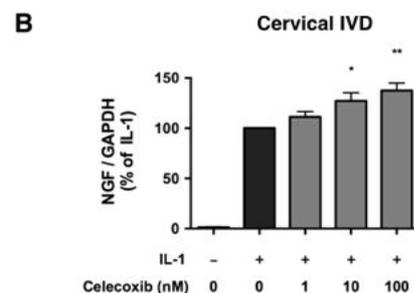
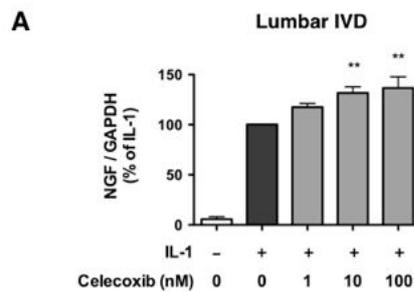
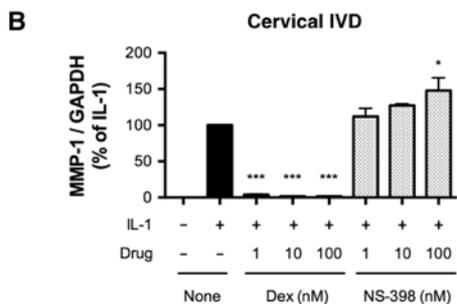
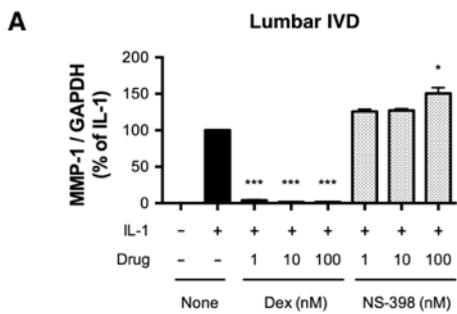


次に、IL-1 により誘導される NGF 発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果について、強力な抗炎症効果を持つステロイド (dexamethasone) と比較検討し、腰椎および頸椎由来椎間板細胞の薬剤応答性の相違の検討を行った。その結果、腰椎由来および頸椎由来椎間板細胞ともに、NGF 発現は IL-1 刺激により誘導され、ステロイドはその発現を強力に抑制したのに対し、選択的 COX-2 阻害剤である NS-398 はむしろ促進させた (次項, 左上図)。



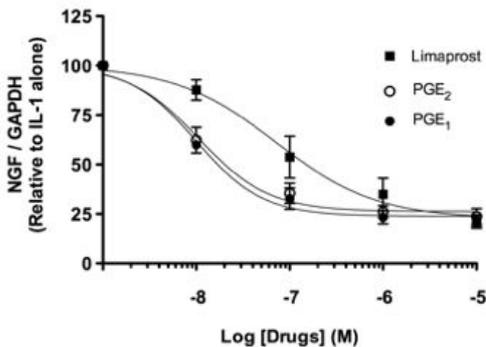
次に椎間板変性に関与する細胞外基質分解酵素である MMP-1 (下図) および MMP-13 (右上図) 発現についても同様に検討したところ、腰椎および頸椎由来椎間板細胞ともに IL-1 による誘導が観察され、ステロイドは強力に抑制したのに対し、選択的 COX-2 阻害剤はむしろ促進させる結果が得られた。いずれにおいても腰椎由来、頸椎由来椎間板細胞で、これら薬剤に対する応答性の差異は認められなかった。

さらに臨床で汎用される celecoxib の NGF 発現に対する効果について、腰椎由来および頸椎由来椎間板細胞を用いて比較検討を行った。両細胞において celecoxib は NS-398 同様、IL-1 処理により誘導される NGF 発現を濃度依存的に促進させ、両細胞間に顕著な応答性の違いは認めなかった (下図)。また、celecoxib の MMP-1 および MMP-13 発現に対する効果においても、NS-398 同様の発現促進効果が認められたものの、腰椎由来と頸椎由来椎間板細胞の間に、応答性の差異は認められなかった (結果省略)。

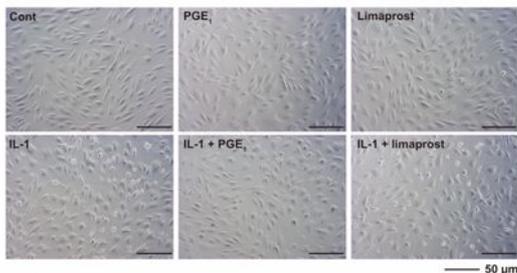


(3) Prostaglandin による NGF および細胞外基質分解酵素発現調節機構

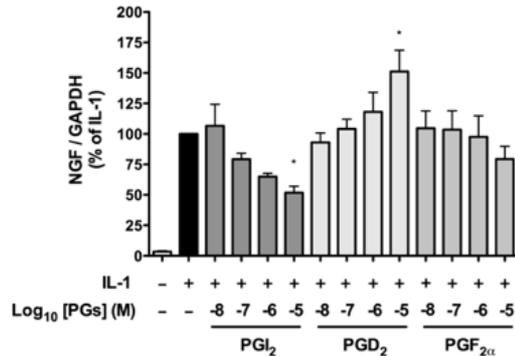
上記結果より、腰椎由来と頸椎由来の椎間板細胞の間にステロイドおよび選択的 COX-2 阻害剤に対する薬剤応答性の差異はないことが明らかとなった。そこで、頸椎椎間板細胞よりも検体の採取および培養が比較的容易な腰椎椎間板細胞を用いて、選択的 COX-2 阻害剤による NGF 発現促進効果の分子機構の解明を試みた。選択的 COX-2 阻害剤は、炎症刺激で誘導される COX-2 の酵素活性を選択的に阻害し、主に炎症のメディエーターである PGE2 の産生を抑制することが作用機序である。すなわち選択的 COX-2 阻害剤により抑制される PGE2 に NGF 発現を制御する生理活性があると考えられた。そこで外因性に PGE2 を添加することで PGE2 の NGF 発現に対する直接的な効果について検討した。一方で、PGE1 の構造類似化合物である limaprost は、腰部脊柱管狭窄症に汎用され、腰痛緩和効果も報告されている。そこで、PGE1 および limaprost の NGF 発現に対する効果についても合わせて検討した。その結果、PGE2 は濃度依存的に NGF 発現を抑制することが明らかとなった(下図)。また、この抑制効果は、PGE1 および limaprost においても認められた。PGE1, PGE2 および limaprost の NGF 発現に対する IC50 はそれぞれ、9.9 nM, 10.6 nM および 70.9 nM であった(下図)。



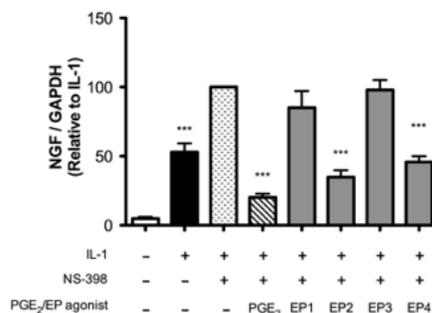
さらに、上記 PGE1 および limaprost による NGF 発現抑制効果が、細胞毒性によるものか否かについて、光学顕微鏡下で観察したところ、明らかな細胞毒性は認められなかった(下図)。



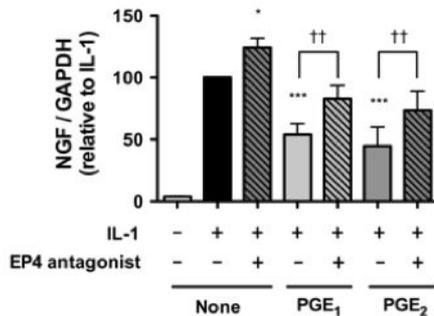
選択的 COX-2 阻害剤は、PGE2 のみならず、アラキドン酸カスケードにおける COX-2 下流に位置する他の prostaglandin 群も同様に抑制することが知られている。そこで他の prostaglandin として、PGI₂, PGD₂ および PGF_{2α} についても同様に検討した。その結果、PGI₂ は NGF 発現に対して抑制的に作用したのに対し、PGD₂ は促進的に作用し、PGF_{2α} は影響を与えないことが判明し、prostaglandin による NGF 発現調節に対する効果は、prostaglandin の種類により異なることが明らかとなった(下図)。



PGE2 による NGF 発現抑制の機序を解明すべく、PGE2 の受容体である EP1~EP4 受容体に対する agonist を用い検討を行った。その結果、NS-398 により増強される NGF 発現は、EP2 および EP4 agonist により PGE2 同様抑制されることが明らかとなった。すなわち PGE2 による NGF 発現抑制は EP2 および EP4 受容体を介することが判明した(下図)。



さらに、PGE1 による NGF 発現抑制の機序に EP4 受容体が関与するか否かについて EP4 antagonist を添加することにより解明を試みた。その結果、EP4 antagonist である L-161,982 は PGE2 および PGE1 による NGF 発現抑制を部分的に回復させた(下図)。このことから PGE1 による NGF 発現抑制に一部 EP4 受容体が関与することが明らかとなった。



本研究結果により、腰椎由来と頸椎由来の椎間板細胞の間で、ステロイドおよび選択的 COX-2 阻害剤に対する薬剤応答性の差異は細胞レベルでは認められなかった。しかしながら、元来、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 PGE₂ が、組織変性に関わる MMP-1 や MMP-13 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生理活性を有することを見出したことは意義があると考えられる。また、腰部脊柱管狭窄症で汎用される PGE₁ 製剤である limaprost および PGE₁ においても NGF 発現抑制効果が認められ、これは既知の薬理作用に加え、同薬剤による腰痛緩和効果の作用機序の一端を担うと推察される。一方で、PGI₂ には NGF 抑制効果が認められたものの、PGD₂ は促進させ、PGF_{2a} は影響を及ぼさないといった prostaglandin の種類により NGF 発現調節様式が異なることも明らかとなり、さらに、PGE₂、PGE₁ による NGF 発現調節は、EP4 受容体を介することも判明した。

本研究は、腰痛症および頸部痛治療の第一選択薬として推奨されている選択的 COX-2 阻害剤の漫然的な使用は、椎間板変性および神経侵入を促進させる可能性を示唆するものであり、同薬剤の使用法を再考させるものであると考えられる。また、limaprost による腰痛緩和効果の機序として EP4 受容体を介した NGF 発現抑制が関与すること考えられ、頸部痛に対する同薬剤の効果も期待される。さらに、選択的 COX-2 阻害剤と PGE₁ 製剤を併用することで、椎間板変性および神経侵入の両者に対する抑制効果が期待され、今後、椎間板変性を背景とする腰痛症や頸部痛に対する新たな薬剤選択としての可能性を提唱するものであると考えられる。

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)

Kazuma Murata, Yasunobu Sawaji, Wuqikun Alimasi, Hidekazu Suzuki,

Kenji Endo, Hidetoshi Tanaka, Makiko Yorifuji, Taiichi Kosaka, Takaaki Shishido, Kengo Yamamoto. "PGE₁ attenuates IL-1b-induced NGF expression in human intervertebral disc cells" *Spine*, 2016, vol. 41(12), pp. E710-E716, DOI: 10.1097/BRS.0000000000001379, 査読有

[学会発表](計12件)

澤地恭昇, 村田寿馬, 鈴木秀和, 遠藤健司, 田中英俊, 山本謙吾 "PGE₁ による MMP-1/-13 と TIMP-3 発現の相対的調節による椎間板変性保護効果" 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016 年 10 月 13 日~2016 年 10 月 14 日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)。

Yasunobu Sawaji, Hidekazu Suzuki, Kenji Endo, Hidetoshi Tanaka, Hirotsuke Nishimura, Taiichi Kosaka, Kengo Yamamoto. "Protective role of prostaglandin E₁ for disc degeneration by reciprocally regulating collagenases and their endogenous inhibitor TIMP-3 in human intervertebral disc cells." *The International Society for the Study of Lumbar Spine*, 2016 年 5 月 16 日~2016 年 5 月 20 日, Singapore.

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 "プロスタグランジンによる椎間板変性制御機構の検討 ~ヒト椎間板細胞における MMP-1/-13 発現に着目して~" 第 45 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 2016 年 4 月 14 日~2016 年 4 月 16 日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)。

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.)。

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.).

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回日本脊椎脊髄病学会, 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).

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).

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).

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).

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).

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, ホテル八マツ郡山(福島県郡山市).

Yasunobu Sawaji, Wujikun 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.).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中英俊 (TANAKA, Hidetoshi)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90317876

(2) 研究分担者

澤地 恭昇 (SAWAJI, Yasunobu)
東京医科大学・医学部・助教(特任)
研究者番号: 20571152

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