

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16700

研究課題名(和文) CGRPシグナルを介した慢性椎間板性腰痛メカニズムの解明

研究課題名(英文) The pathomechanism of chronic low back pain through CGRP signaling

研究代表者

宮城 正行 (Miyagi, Masayuki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90627556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CGRPやNGFは種々の疾患において痛みに関与することが報告されている。本研究ではCGRP、NGFの腰痛への関与を検討した。マウス椎間板傷害モデルを用いて検討した結果、傷害後にNGFの発現が認められ、その発現上昇は傷害後28日においても持続していた。NGFの発現上昇メカニズムを検討した結果、M1、M2マクロファージが産生するTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ がNGF産生に関与している可能性が示唆された。また、ヒト椎間板細胞を用いた検討においてもマウスと同様にTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ での制御が認められた。このことから椎間板性腰痛機構にはマクロファージを介したNGF産生制御機構が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰痛の生涯罹患率は85%と報告され、超高齢者社会を迎えた我が国における腰痛患者は2,800万人にもものぼる。本邦の厚生労働省の報告では腰痛は男性1位、女性2位にランクされる重大な国民愁訴である。多大な医療費がこの腰痛疼痛治療に費やされているのが現状であり、腰痛による経済損失は年間7,000億円と推定されている。本研究成果に基づいた更なる腰痛機序の解明と治療法の開発は社会・医療経済的にも重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：CGRP and NGF could contribute to pain in several musculoskeletal disorders. We examined M1 and M2 macrophage markers, CGRP and NGF and cytokine expression in IVD-derived cells from control and IVD-injured mice for 28 days following injury. Ngf mRNA expression was increased 1 day after injury in injured compared to control mice, and persisted for up to 28 days. Flow cytometric analysis demonstrated that the proportion of F4/80+CD11b+ cells was significantly increased from 1 day after injury for up to 28 days. TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  stimulated Ngf mRNA and NGF protein expression in IVD cells. Our results suggest that TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  may stimulate NGF production under inflammatory and non-inflammatory conditions following IVD injury. As TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  are produced by M1 and M2 macrophages, further investigations are needed to reveal the role of macrophages in NGF expression following IVD injury. Our results may aid in developing treatments for IVD-related LBP pathology.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板性腰痛 カルシトニン遺伝子関連ペプチド 神経成長因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腰痛の生涯罹患率は 85%と報告され、本邦の厚生労働省の報告では腰痛は男性 1 位、女性 2 位にランクされる重大な国民愁訴である。多大な医療費がこの腰痛疼痛治療に費やされているのが現状であり、超高齢化が進む現代において、医療行政の悪化が懸念される。腰痛の治療上問題となるのは慢性疼痛としての腰痛であり、既存の薬物治療には抵抗性であることも少なくない。その原因として、腰痛には病因を確定できない非特異的腰痛が 85%を占めることが報告されている。非特異的腰痛の原因として椎間板由来、椎間関節由来、筋膜由来、神経根由来、椎骨由来などの可能性が考えられる。その中で、特に椎間板由来の腰痛が注目されており、申請者は椎間板性腰痛の機序を解明し、新規薬物治療確立すべく、臨床的、基礎的研究を行ってきた。申請者が行ってきた臨床、基礎的研究から、新たな椎間板性腰痛に対する治療ターゲットとして、炎症性サイトカイン、COX、PGE2 といった疼痛関連物質が制御しうる物質として、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、神経成長因子 (NGF) に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では CGRP, NGF を介した椎間板性腰痛発症機序の経路の詳細を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス椎間板傷害モデルにおける CGRP, NGF の発現

マウス椎間板傷害モデルにおける CGRP, NGF の発現動態と制御機構について検討した。9 週齢マウスの尾椎椎間板を 27G 針で傷害し、椎間板損傷モデルとした。損傷後 1 日、2 日、3 日、7 日、14 日、28 日に損傷した椎間板を採取し、CGRP、NGF の発現を Real time PCR を用いて検討した。

#### (2) ヒト椎間板組織における CGRP, NGF の発現

当院で脊椎手術を行った腰椎すべり症、腰部脊柱管狭窄症、脊柱後弯症、腰椎椎間板ヘルニア患者から椎間板を採取した。ヒト椎間板組織における CGRP, NGF の発現を real time PCR を用いて検討した。

#### (3) NGF の発現制御機構の検討

ヒト検体を用いた検討からマウスとヒトで CGRP の発現機構が異なること、ヒト椎間板組織では CGRP の発現が低いことが明らかになった。そこで NGF の制御機構の解明に着手した。9 週齢マウスの尾椎椎間板を 27G 針で傷害し、椎間板損傷モデルとした。損傷後 1 日、2 日、3 日、7 日、14 日、28 日に損傷した椎間板を採取し、NGF、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  の発現を Real time PCR, ELISA を用いて検討した。次に TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  による NGF の制御の可能性を検討するため、マウスの椎間板を細胞培養し、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  刺激後の NGF の発現を検討した。

#### (4) ヒト椎間板細胞における NGF 制御機構の検討

酵素処理によりヒト椎間板組織から細胞を採取、培養後、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  に刺激を行い、NGF の発現を検討した。また、TGF- $\beta$  添加と同時に ALK5 阻害剤 (SB505124)、TAK1 阻害剤 5Z-oxozeanol、p38 阻害剤 (SB203580) を添加し、NGF mRNA およびタンパク発現に及ぼす影響を検討した。

#### (5) マクロファージを介した NGF 制御の可能性の検討

マクロファージには M1 と M2 が存在し、それぞれ TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  を産生することが報告されている。そこで NGF 制御における NGF の関与の可能性を検討した。マウス椎間板傷害後、椎間板内のマクロファージ変化を、フローサイトメトリー・リアルタイム PCR を用いて経時的に評価した。また、マクロファージ遊走に關与する CCL2、CCR2 の発現を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス椎間板傷害モデルにおける CGRP, NGF の発現

椎間板損傷モデルマウスにおいて CGRP、NGF は損傷後 1 日より 28 日まで有意に上昇した。

#### (2) ヒト椎間板組織における CGRP, NGF の発現

ヒト椎間板組織において NGF の発現は認められたが、CGRP の発現はわずかであった。また、in vitro における CGRP 制御はマウスとヒトで異なった。このことから椎間板性腰痛における CGRP の関与は少ないものと考えられた。

#### (3) NGF の発現制御機構の検討

椎間板損傷モデルマウスにおいて NGF は損傷後 1 日より 28 日まで有意に上昇していたが、特に 1 日、28 日後において高い発現を認めた (図 1)。TNF- $\alpha$  は損傷後 1 日より有意に上昇し、損傷後 14 日より徐々に低下した。TGF- $\beta$  は損傷後 3 日より徐々に上昇し、損傷後 28 日において最も高い発現を示した。TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  の発現ピークと NGF の発現ピークは一致していた。マウスの椎間板細胞において TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  の刺激で NGF の mRNA 発現、上清中の NGF 濃度の上昇が認め

られた(図2)。In vitroにおいてTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ はNGFを誘導したことから、椎間板傷害後早期に上昇するTNF- $\alpha$ がNGFを誘導しており、椎間板傷害後に遷延するNGFの上昇はTGF- $\beta$ が誘導している可能性が示唆された。本機構は椎間板由来の疼痛メカニズムの解明に重要な役割を果たしているものと考えられた。

#### (4) ヒト椎間板細胞におけるNGF制御

TNF- $\alpha$ 刺激によりNGF mRNA発現およびタンパク発現は上昇し、その上昇はTAK1、p38阻害剤で抑制された。また、TGF- $\beta$ によってもNGF mRNAおよびタンパク発現は上昇し、その上昇はALK5阻害剤によって完全に抑制され、p38によって部分的に阻害された。ヒトにおいてもTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ が椎間板細胞におけるNGFの発現を制御していた。また、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 共にp38を介したMAPKシグナルによってNGFを制御している可能性が示唆された。ヒトにおいてもTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ がNGFを制御している可能性が示唆された。

#### (5) マクロファージを介したNGF制御の可能性の検討

損傷後1日からマクロファージ(F4/80+CD11b+)の増加が認められ、その増加は傷害後28日まで持続した(図3)。ケモカインリガンドCCL2の発現はマクロファージの増加時期に一致して上昇が認められた(図4)。M1マクロファージマーカー(Tnfa, I11b, Nos2)は損傷後1日目から増加していたが、損傷後28日目にはコントロール群と比べ、有意差がなくなった。M2aマクロファージマーカー(Ym1, Cd206,)は損傷後1日に増加したが、その後コントロールレベルまで減少した。M2a・M2cマクロファージマーカーおよび産生サイトカイン(Cd206, Tgfb)は損傷後7日から28日まで増加した。このことから、損傷後にケモカインリガンドを介してマクロファージが遊走され、急性期にはM1マクロファージが、慢性期にはM2cマクロファージが産生するサイトカインがNGFの産生を制御している可能性が示唆された。

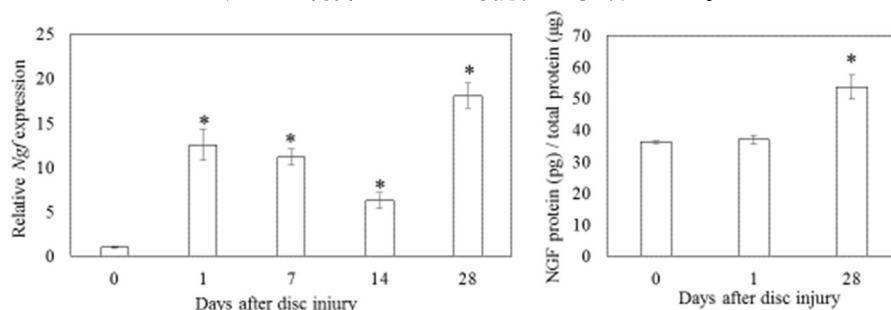


図1. マウス椎間板傷害後のNGFの発現変化

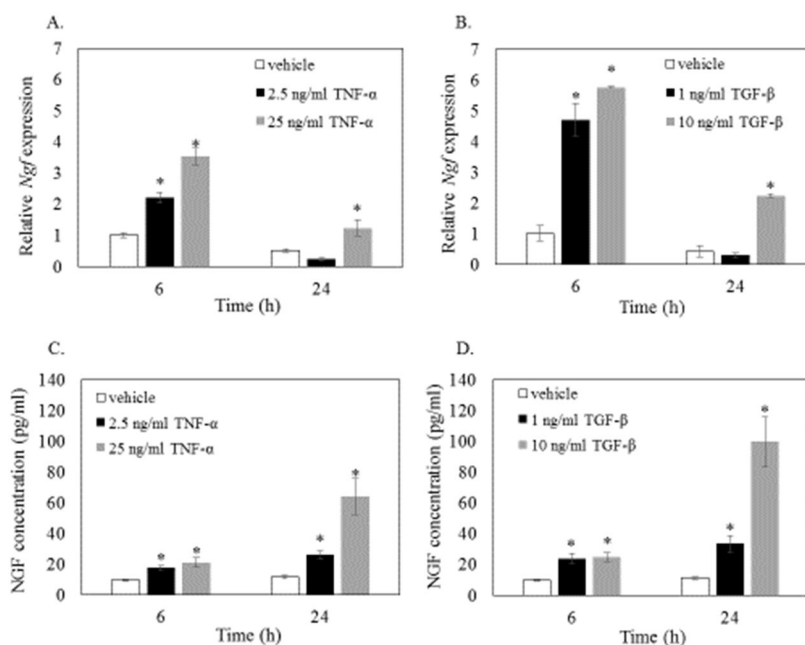


図2. TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ によるNGF発現、産生制御

- A. TNF- $\alpha$ 刺激後のNGF mRNAの発現, B. TGF- $\beta$ 刺激後のNGF mRNAの発現  
 C. TNF- $\alpha$ 刺激後の上清中のNGF濃度, B. TGF- $\beta$ 刺激後の上清中のNGF濃度

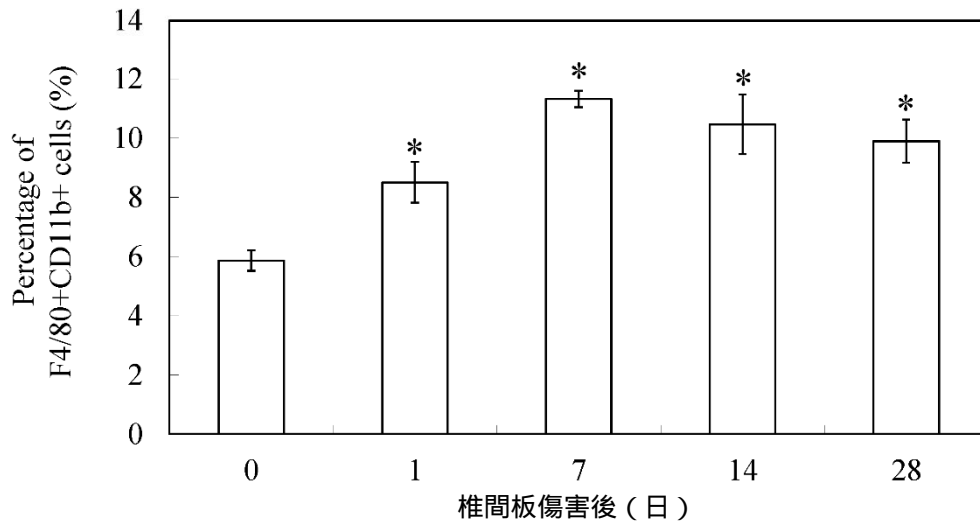
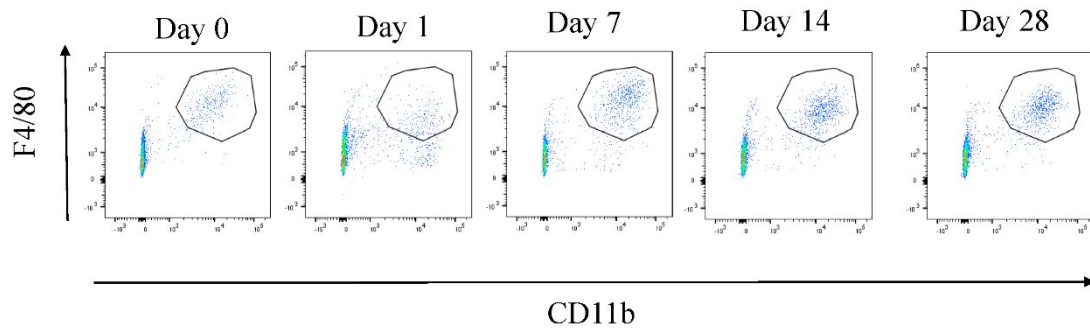


図3 椎間板傷害後のマクロファージの割合の時系列変化

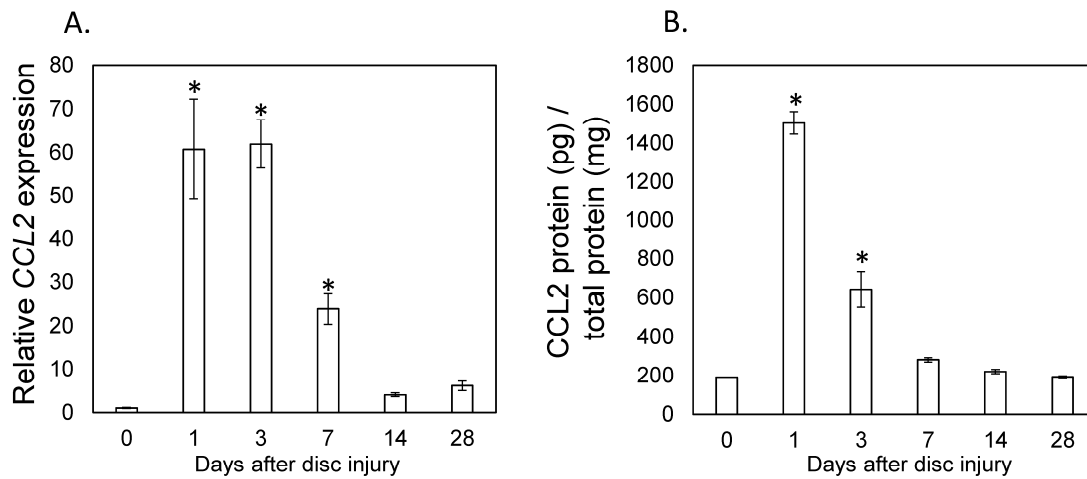


図4 椎間板傷害後のケモカインリガンド CCL2 の発現  
A. CCL2 mRNA の発現 B. CCL2 protein 濃度

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Sato M, Takaso M	4. 巻 37
2. 論文標題 Changes in NGF expression and macrophage phenotype following intervertebral disc injury in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 1798-1804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24308	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 -
1. 著者名 Maiygi M, Uchida K, Takano S, Fujimaki H, Aikawa J, Sekiguchi H, Nagura N, Ohtroi S, Inoue G, Takaso M.	4. 巻 36
2. 論文標題 Macrophage-derived inflammatory cytokines regulate growth factors and pain-related molecules in mice with intervertebral disc injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2274-2279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.23888.	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 -
1. 著者名 Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Kuroda A, Satoh M, Takaso M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Sequential CCL2 Expression Profile After Disc Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 895-901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24522	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 -
1. 著者名 Kawakubo A, Uchida K, Miyagi M, Nakawaki M, Sekiguchi H, Yokozeki Y, Inoue G, Takaso M	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Investigation of Resident and Recruited Macrophages Following Disc Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24590.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中脇充章、内田健太郎、宮城正行、中澤俊之、井村貴之、齋藤 亘、白澤栄樹、川久保 歩、大貫裕子、井上 玄、高相晶士
2. 発表標題 マウス椎間板傷害モデルにおいてTNF- $\alpha$ はCCL2/CCR2を介して椎間板内にマクロファージを動員する。
3. 学会等名 第33回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 中脇充章、内田健太郎、宮城正行、中澤俊之、井村貴之、齋藤亘、白澤栄樹、川久保歩、大貫裕子、井上玄、高相晶士
2. 発表標題 マウス椎間板損傷モデルにおいて nerve growth factorは急性期と慢性期では異なる機構で制御されている
3. 学会等名 第33回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 宮城正行、中脇充章、内田健太郎、高野昇太郎、井上 玄、中澤俊之、井村貴之、齋藤 亘、白澤 栄樹、大貫裕子、高相晶士
2. 発表標題 ヒト椎間板への過重負荷が疼痛関連物質の発現上昇を誘導する
3. 学会等名 第33回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 宮城正行、井上玄、内田健太郎、石川哲大、鴨田博人、佐久間詳浩、西能健、川上守、高橋和久、大鳥精司、高相晶士
2. 発表標題 椎間板の痛み
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----