

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09609

研究課題名(和文) ヒト椎間板性疼痛病態形成における慢性微小炎症制御を目指した研究

研究課題名(英文) Control of the pathology of discogenic low back pain by regulating micro-inflammation

研究代表者

遠藤 健司 (Endo, Kenji)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90266479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板性疼痛発症過程は慢性的微小炎症状態であり、これが病態形成に関わる。IL-1 / は、慢性的微小炎症状態に関する炎症性サイトカインと考えられ、その生理活性は内因性阻害タンパク質IL-1Raにより制御される。しかしながらこれら3分子の発現調節機構は不明である。本研究では、椎間細胞由来IL-1が自身または近傍の椎間板細胞をautocrine様にpositive feedback機構により慢性微小炎症状態を形成する機序を解明し、さらにMAP kinaseおよびその脱リン酸化酵素であるDUSP1に着目しその制御の可能性を検討し、椎間板性疼痛保存治療の新たなアプローチを探ることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、椎間板性疼痛の病態形成過程に慢性的な微小炎症状態が継続することに着目し、微小炎症形成に炎症性サイトカインであるIL-1 / のautocrine様positive feedback機構が関与すること、またその制御に炎症刺激の細胞内情報伝達経路を担うMAP kinaseが関与すること、さらに同機構がMAP kinaseの脱リン酸化酵素であるDUSP-1により抑制できる可能性を明らかにした学術的意義の高い研究である。また本研究成果は、椎間板性疼痛のみならず他の慢性運動器疼痛疾患への応用も強く期待され、社会的意義も高いと言える。

研究成果の概要(英文)：The pathological process of intervertebral discogenic pain involves a chronic micro-inflammation. IL-1 / is a proinflammatory cytokine believed to play an important role in chronic microinflammatory conditions and its bioactivity is regulated by a balance with the endogenous inhibitory protein, IL-1Ra. However, the regulatory mechanisms of these three molecules are unknown.

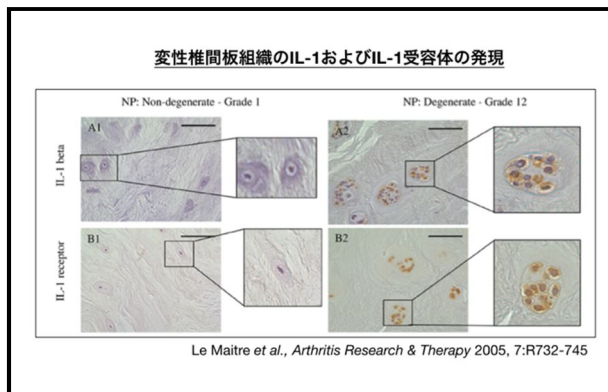
In this study, we aimed to elucidate the mechanism by which IVD forms a chronic micro-inflammatory condition through autocrine-like positive feedback mechanisms of IL-1 derived from IVD cells themselves or neighboring cells. Furthermore, we focused on MAP kinases and their dephosphorylating enzyme, DUSP1, investigating the possibility in the control of this process, with the goal of exploring new treatment of the disease.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板性疼痛 interleukin-1 autocrine MAP kinase DUSP1

1. 研究開始当初の背景

慢性腰痛は、社会医学的に大きな問題となっているが、その原因は様々であり、腰痛の約 85% は原因が特定できない非特異性腰痛とされている。その中で椎間板性疼痛は、椎間板の変性に伴い疼痛伝達を担う神経線維が椎間板内部に侵入し、さらに疼痛感作が行われることで慢性腰痛の病態が形成されると考えられている。椎間板変性には collagen や aggrecan を分解する細胞外基質分解酵素(matrix metalloproteinases: MMPs)が、また神経線維の活性化には神経成長因子(nerve growth factor: NGF)が関与するといった病態形成分子も同定されており、これらは炎症刺激により誘導されることは広く知られていた。一方、椎間板性疼痛を含む多くの慢性運動器疾患では、局所的に慢性的な微小炎症状態 (micro-inflammation)が継続的に存在すると考えられるようになったが、その詳細は不明であった。本研究では、椎間板性疼痛組織で発現が報告されている炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1(右図)に着目し、これまでに下記の報告を行ってきた。



ヒト椎間板細胞において、IL-1 は MMPs および NGF 発現を強力に誘導し、臨床で汎用される非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)や選択的 COX-2 阻害剤は、NGF 発現をむしろ促進させること、逆に当該薬剤で抑制される prostaglandin (PG)E₂ は、NGF 発現を抑制的に制御することを見出していた¹。さらに、腰部脊柱管狭窄症等で汎用される PGE₁ 誘導体および PGE₁ にも NGF 発現抑制効果があることを報告し²、さらにその分子機構についても報告した³。

本研究では、椎間板性疼痛の新たな治療戦略の試みとして、椎間板細胞が自ら産生する IL-1 の発現調節に着目した。IL-1 は、IL-1 α および IL-1 β の二つのサブタイプからなり、その生理活性は内因性の阻害タンパク質である IL-1 receptor antagonist (Ra)との量的なバランスにより調節される。そこで、椎間板性疼痛の病態形成過程で認められる慢性的な微小炎症状態の形成に、椎間板細胞が産生する IL-1 α/β が自身または近傍の椎間板細胞を刺激するといった autocrine 様の positive feedback 機構が存在するとの仮説をたてた。さらに、その制御に向け、IL-1 の細胞内情報伝達経路を担う mitogen-activated protein (MAP) kinases 経路およびその脱リン酸化酵素である dual-specificity phosphatase (DUSP)-1 に着目した本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、椎間板性疼痛の病態形成過程で認められる慢性的な微小炎症状態の形成に、IL-1 α および IL-1 β の autocrine 様 positive feedback 機構が関与するか否かを解明し、さらにその制御を目指すことを目的とし、以下の項目について検討した。

- (1) ヒト椎間板細胞における IL-1 α/β および IL-1Ra の発現様式の確認
- (2) MAP kinases (p38, ERK, and JNK)による IL-1 α/β および IL-1Ra の発現調節の解明
- (3) DUSP-1 による IL-1 α/β autocrine 様 positive feedback 制御の解明

3. 研究の方法

- (1) ヒト椎間板細胞における IL-1 α/β および IL-1Ra の発現様式の確認
ヒト椎間板細胞を無血清条件下、外因性に IL-1 α または IL-1 β (0.5, 1, 5, 10 ng/mL) で刺激し、誘導される IL-1 α/β および IL-1Ra の発現調節を realtime-PCR 法により検討した。
- (2) MAP kinases (p38, ERK, and JNK)による IL-1 α/β および IL-1Ra の発現調節の解明
p38 阻害剤 (SB203580), ERK 阻害剤 (U0126)または JNK 阻害剤 (SB600125)で 30 分前処理したヒト椎間板細胞を IL-1 β 刺激し、誘導される IL-1 α/β および IL-1Ra 発現を realtime PCR 法により解析した。
- (3) DUSP-1 による IL-1 α/β autocrine 様 positive feedback 制御の解明
DUSP-1 siRNA (sense: 5'-CCACCACCGUGUUCAACUUt-3' and antisense: 5'-AAGUUGAACACGGUGGUGGtg-3') をヒト椎間板細胞に Lipofectamine RNAiMAX を用いて遺伝子導入し、DUSP-1 knockdown 細胞を作成した。
DUSP-1 knockdown 細胞を IL-1 β 刺激し、誘導される IL-1 α/β および IL-1Ra 発現を realtime PCR 法により解析し、非 knockdown 細胞と比較検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト椎間板細胞における IL-1 α / β および IL-1Ra の発現様式の確認

まず、ヒト椎間板細胞において、外因性に添加した IL-1 α または IL-1 β が、内因性の IL-1 α , IL-1 β および IL-1Ra 発現を誘導するか否かについて realtime PCR 法により検討した。内因性 IL-1 α (Figure 1A), IL-1 β (Figure 1B)および IL-1Ra (Figure 1C)発現は、外因性 IL-1 α および IL-1 β により濃度依存的に誘導され、その誘導活性は IL-1 α と IL-1 β は同程度であった。

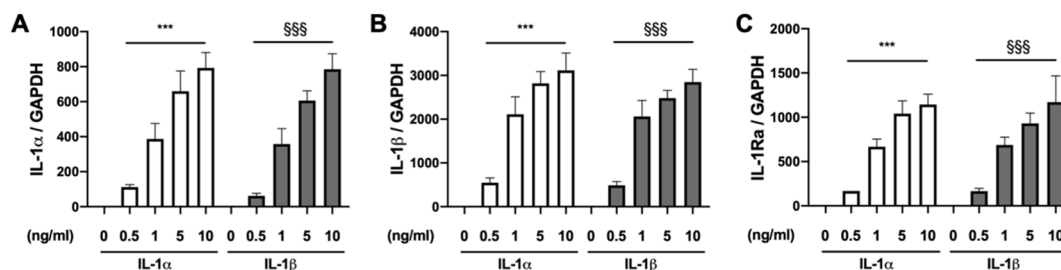
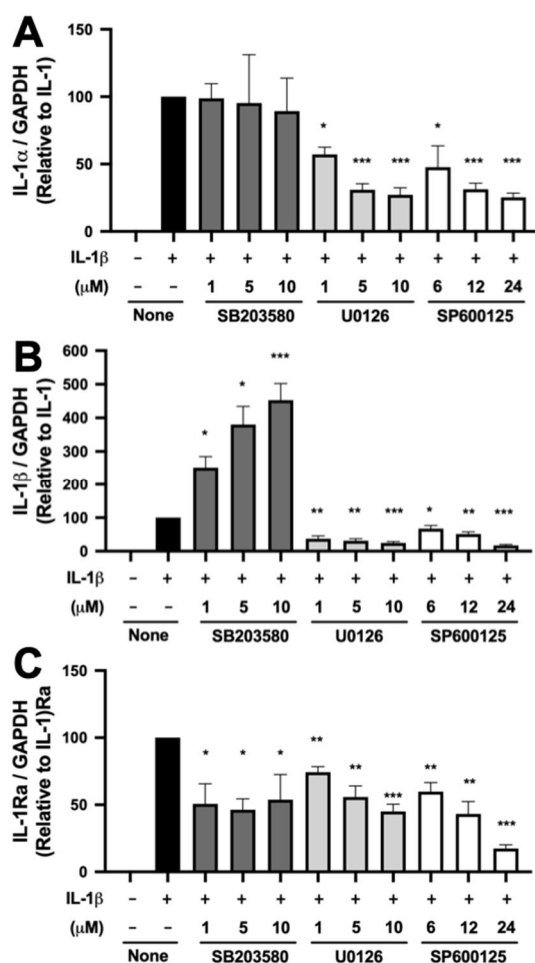


Figure 1. Regulation of IL-1 α / β and IL-1Ra by exogenous IL-1 α or IL-1 β in human IVD cells. Confluent human IVD cells were serum starved and then stimulated with the indicated concentrations of IL-1 α or IL-1 β for 24 h. Relative expression levels of IL-1 α (A), IL-1 β (B) and IL-1Ra (C) were quantified by realtime PCR. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 4 individuals) after normalization to GAPDH, and expressed as a relative value to that of unstimulated cells. *** and §§§, $P < 0.001$ between untreated cells.

(2) MAP kinases (p38, ERK, and JNK)による IL-1 α / β および IL-1Ra の発現調節の解明

次に、IL-1 β により誘導される IL-1 α , IL-1 β および IL-1Ra 発現に MAP kinase 経路が関与するか否かについて、MAP kinase のサブタイプである p38, ERK, JNK に対する阻害剤を用いて検討した。



IL-1 β により誘導される IL-1 α 発現は、p38 阻害剤では影響されなかったが、ERK および JNK 阻害剤により有意に抑制された (Figure 2A)。IL-1 β 発現は、p38 阻害剤により有意に増強され、ERK および JNK 阻害剤により強力に抑制された (Figure 2B)。IL-1Ra 発現は p38, ERK および JNK 阻害剤により、それぞれ有意に抑制された (Figure 2C)。これらの結果から、IL-1 により誘導される IL-1 α / β および IL-1Ra 発現に MAP kinase 経路、特に ERK および JNK 経路が関与することが示唆された。

Figure 2. Involvement of various mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in IL-1 β -induced IL-1 α (A), IL-1 β (B) and IL-1Ra (C) expression in human IVD cells. Confluent human IVD cells were serum starved, preincubated with the indicated concentrations of a p38 inhibitor (SB203580), an ERK inhibitor (U0126), or a JNK inhibitor (SP600125) for 30 min, and then stimulated with IL-1 β (10 ng/mL) for 24 h. Relative expression levels of IL-1 α / β and IL-1Ra were quantified by realtime PCR. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 4 individuals) after normalization to GAPDH, and expressed as a relative value to that of IL-1 β alone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. IL-1 β alone

(3) DUSP-1 による IL-1 α/β autocrine 様 positive feedback 制御の解明

上記結果より IL-1 β により誘導される IL-1 α/β および IL-1Ra 発現に，MAP kinase 経路が関与することが明らかとなったため，MAP kinase のサブタイプを脱リン酸化する DUSP-1 により IL-1 α/β および IL-1Ra の発現が制御できる可能性が考えられた．そこで DUSP-1 を siRNA により knockdown することで，その解明を試みた．

DUSP-1 siRNA は効率良くヒト椎間板細胞に導入され (Figure 3A)，内因性 DUSP-1 発現は約 75%程度，有意に抑制された (Figure 3B) ．

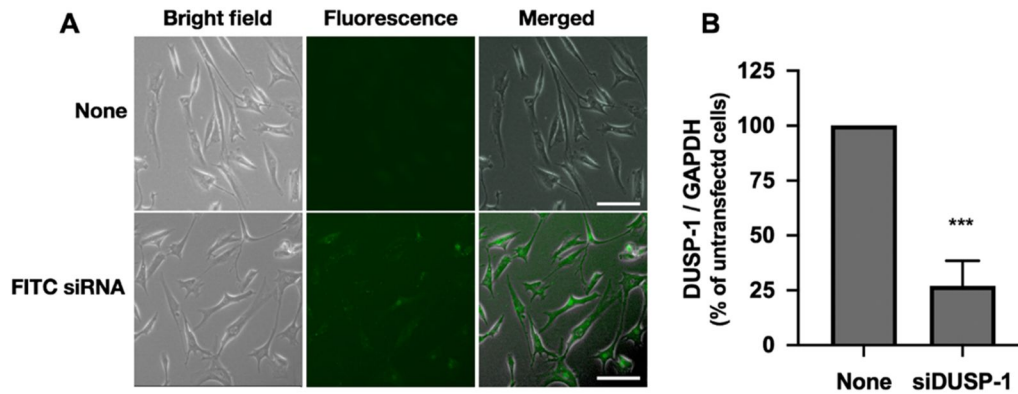


Figure 3. DUSP-1 knockdown by the transfection of small interfering RNA (siRNA) into human IVD cells. **(A)** Transfection efficiency of siRNA in human IVD cells. Semiconfluent human IVD cells were transfected with FITC-labeled siRNA oligonucleotides and cultured for 24 h. Cell images were captured by a digital fluorescence microscope. Transfection efficiency was more than 75% in three independent experiments (n = 3 individuals). Scale bar: 100 μ m **(B)** DUSP-1 siRNA was transfected into semiconfluent human IVD cells to attenuate DUSP-1 expression. The relative amount of DUSP-1 expression was quantified by realtime PCR. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3 individuals) of DUSP-1 after normalization to that of GAPDH, and expressed as a relative value to that of untransfected cells. DUSP-1 expression was significantly suppressed by more than 70%. *** $P < 0.001$ vs. untransfected cells

DUSP-1 knockdown 細胞においては，IL-1 β により一過性に誘導される MAP kinase のリン酸化が亢進・遷延化することが観察された．この結果より，siRNA による DUSP-1 knockdown が機能的にも抑制されていることが確認された (Figure 4) ．

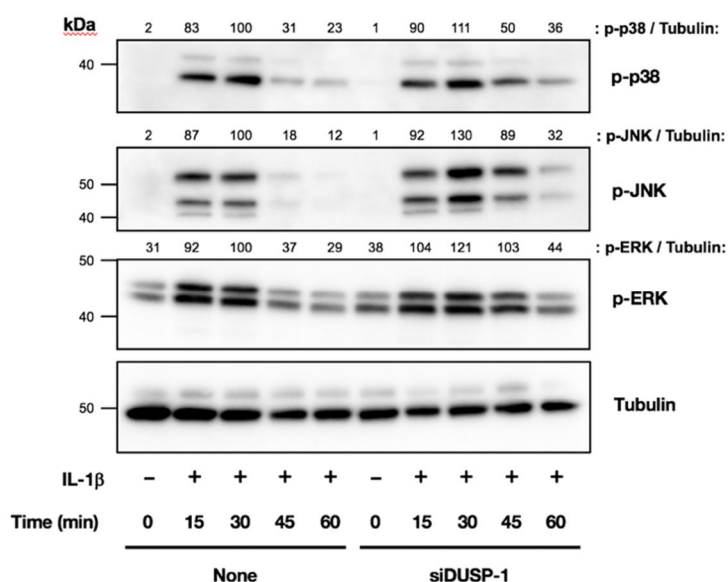


Figure 4. Effects of DUSP-1 knockdown on IL-1 β -induced MAP kinase phosphorylation in human IVD cells. DUSP-1 knockdown and untransfected cells were serum starved and then stimulated with IL-1 β (10 ng/mL) for 15, 30, 45, and 60 min. The phosphorylation of MAP kinases was analyzed by Western blotting. IL-1 β -induced MAP kinases phosphorylation was increased and prolonged in DUSP-1 knockdown cells compared with untransfected cells. Results were reproducible among three individuals and representative blots are shown.

上記で確認した DUSP-1 knockdown 細胞を用いて、IL-1 β により誘導される IL-1 α/β および IL-1Ra 発現に、DUSP-1 が関与するかどうか検討した。IL-1 β により誘導される IL-1 α (Figure 5A), IL-1 β (Figure 5B)および IL-1Ra (Figure 5C)は、いずれも DUSP-1 knockdown 細胞において有意な発現増強が認められた。すなわち、DUSP-1 は IL-1 α/β および IL-1Ra のいずれの発現誘導に対しても抑制的に調節する機能を有していることが明らかとなった。

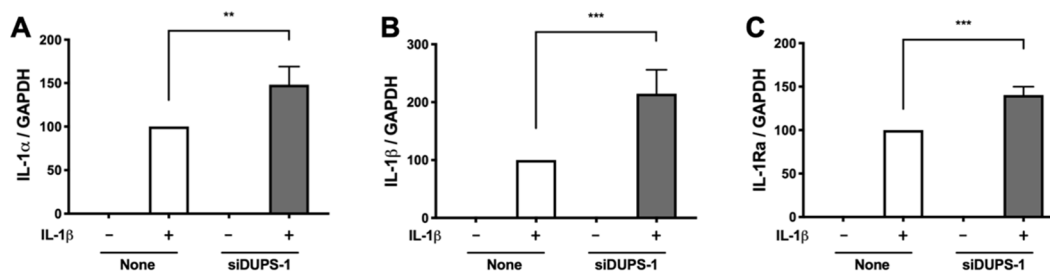


Figure 5. Effects of DUSP-1 knockdown on IL-1 β -induced expression of IL-1 α/β and IL-1Ra in human IVD cells. Untransfected and DUSP-1 knockdown human IVD cells were serum-starved and stimulated with IL-1 β (10 ng/mL) for 24 h. Expression levels of IL-1 α/β and IL-1Ra were quantified by realtime PCR. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 4 individuals) after normalization to GAPDH, and are shown as relative values to that of untransfected cells stimulated with IL-1 β . IL-1 β -induced expression of IL-1 α/β and IL-1Ra was significantly enhanced in DUSP-1 knockdown cells. ** P < 0.01 and *** P < 0.001 vs. untransfected cells stimulated with IL-1 β

以上、本研究結果よりヒト椎間板細胞は、IL-1 α および IL-1 β による外因性炎症刺激により、自ら内因性に IL-1 α および IL-1 β 発現を誘導するといった autocrine 様の positive feedback 機構を有すること明らかとなった。すなわちこの機構により、椎間板における慢性的な微小炎症状態が継続し、椎間板性疼痛の病態形成に繋がると推察された。また、この機構に MAP kinase 経路が関与することが明らかとなり、その脱リン酸酵素である DUSP-1 は同機構を抑制的に調節する役割を持つことが明らかとなった。

本研究成果は、慢性的な微小炎症を契機とする椎間板性疼痛に対し、DUSP-1 を用いた新たな薬剤開発に繋がるものと考えられる。

<引用文献>

1. Alimasi, W., Sawaji, Y., Endo, K., Yorifuji, M., Suzuki, H., Kosaka, T., Shishido, T., and Yamamoto, K. (2013). 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. *Spine (Phila Pa 1976)* **38**, 1466-1472. 10.1097/BRS.0b013e318294edb1.
2. Murata, K., Sawaji, Y., Alimasi, W., Suzuki, H., Endo, K., Tanaka, H., Yorifuji, M., Kosaka, T., Shishido, T., and Yamamoto, K. (2016). PGE₁ attenuates IL-1beta-induced NGF expression in human intervertebral disc cells. *Spine (Phila Pa 1976)* **41**, E710-716. 10.1097/BRS.0000000000001379.
3. Kusakabe, T., Sawaji, Y., Endo, K., Suzuki, H., Konishi, T., Maekawa, A., Murata, K., and Yamamoto, K. (2021). DUSP-1 induced by PGE₂ and PGE₁ attenuates IL-1beta-activated MAPK signaling, leading to suppression of NGF expression in human intervertebral disc cells. *Int J Mol Sci* **23**. 10.3390/ijms23010371.

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 1件）

1. 著者名 Kusakabe Takuya, Sawaji Yasunobu, Endo Kenji, Suzuki Hidekazu, Konishi Takamitsu, Maekawa Asato, Murata Kazuma, Yamamoto Kengo	4. 巻 23
2. 論文標題 DUSP-1 Induced by PGE2 and PGE1 Attenuates IL-1 -Activated MAPK Signaling, Leading to Suppression of NGF Expression in Human Intervertebral Disc Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 371 ~ 371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23010371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日下部拓哉, 澤地恭昇
2. 発表標題 DUSP-1による椎間板性腰痛制御の可能性
3. 学会等名 第2回BioSpine Japan研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西隆允, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 前川麻人, 松岡佑嗣, 高松太一郎, 村田寿馬, 鈴木秀和, 栗飯原孝人, 山本謙吾
2. 発表標題 MAP kinase/DUSP1経路によるヒト椎間板細胞のIL-1a/b autocrineおよびIL-1Ra発現制御
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日下部拓哉, 澤地恭昇, 遠藤健司, 栗飯原孝人, 鈴木秀和, 松岡佑嗣, 高松太一郎, 村田寿馬, 小西隆允, 前川麻人, 山本謙吾
2. 発表標題 ヒト椎間板細胞におけるステロイドによるMMPsおよびNGF発現制御におけるDUSP-1の関与
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西隆允, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 前川麻人, 松岡佑嗣, 高松太一郎, 村田寿馬, 鈴木秀和, 粟飯原孝人, 山本謙吾
2. 発表標題 MAP kinases経路によるヒト椎間板細胞のIL-1 autocrineとIL-1 receptor antagonist発現制御
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamitsu Konishi, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Hidekazu Suzuki, Takuya Kusakabe, Yuji Matsuoka, Kazuma Murata, Takato Aihara, Kengo Yamamoto
2. 発表標題 DUSP1 regulates autocrine positive feedback loop of interleukin (IL)-1 in human intervertebral disc
3. 学会等名 The international society for the study of the lumbar spine (国際学会)
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
研究分担者	山本 謙吾 (Yamamoto Kengo) (10246316)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	澤地 恭昇 (Sawaji Yasunobu) (20571152)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	鈴木 秀和 (Suzuki Hidekazu) (40317871)	東京医科大学・医学部・兼任講師 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	高松 太一郎 (Takamatsu Taichiro) (90459561)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関