

学 位 論 文 要 旨

氏名 名倉 直重



論文題目

「ラット臍板断裂モデルにおいて神経成長因子の発現は持続している」

指 導 教 授 承 認 印

高 相 翔 士



ラット腱板断裂モデルにおいて神経成長因子の発現は持続している

氏名 名倉 直重

腱板断裂は中高年に多く認められる肩関節における有痛性の疾患であり、上肢挙上運動の制限や夜間痛をもたらす事が多く、患者の日常生活動作を著しく低下させる。そのため腱板断裂の疼痛管理は治療上重要であるが、臨床の場において頻用されている NSAIDs は疼痛を一時的に緩和するものの治療効果は疑問視されている。また NSAIDs を長期内服すると胃腸障害や腎機能障害といった合併症のリスクが増大するため、腱板断裂に対する保存加療に NSAIDs は推奨されていない。またステロイド剤は治療上の有効性は NSAIDs よりも高い。しかし、ステロイドは腱組織の脆弱性を惹起する事や感染のリスクや糖尿病や骨粗鬆症に影響する懸念があり疼痛管理の主役として使用する事は躊躇われる。従って、腱板断裂の疼痛機序の解明と疼痛治療薬の開発が望まれている。

現在、腱板断裂患者では肩峰下滑液包や肩甲上腕関節内滑膜から COX-2 や IL-1 β といった炎症性サイトカインの発現上昇が認められ、疼痛機序への関与が報告されている。しかし、腱板断裂における疼痛機序に関して様々な研究報告が散見されるが未だ不明な点が多い。

神経栄養因子の一つである神経成長因子 (Nerve growth factor, 以下 NGF) は変形性関節症や腰痛患者における疼痛に関与することが報告されており、現在抗 NGF 製剤の開発や臨床応用が進められている。そのため腱板断裂の疼痛においても NGF が関与している可能性が考えられたが、腱板断裂と NGF との関連性に関する報告はない。

変形性関節症の滑膜線維芽細胞において NGF は TNF- α や IL-1 β といった炎症性サイトカインによって産生されるという報告がある。また腱板断裂の断裂部において TNF- α の発現上昇を認めるといった報告がなされている事から、我々は断裂後の NGF の発現様式を解明する事は疼痛マネジメントへと繋がる可能性があると考えた。そこで今回ラット腱板断裂モデルを作成する事で、断裂後の NGF 発現機構について検討した。

<対象と方法>

本研究は9週齢Sprague-Dawley (SD) 雄性ラット63匹を用いた。筋肉注射にて麻酔をかけた後右肩の棘上筋と棘下筋を切離し、腱板断裂モデルを作製した (RCT群)。比較として左肩は三角筋のみを切離した上で皮膚縫合をし、これを偽手術群 (sham群) とした。術後1日、3日、7日、14日、21日、56日に肩峰下から腱板および滑液包組織を一塊に採取し、発現している *Tnfa*, *Ngf*, *Il1b*, *Cox2* の発現について検討を行った。

まず、採取した組織よりRNAを抽出後、Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction法 (RT-PCR法) を用いて *Tnfa*, *Ngf*, *I11b*, *Cox2* の発現量を経時的に比較検討した。更に、術後1日と14日で腱板組織からELISA法を用いてNGFの発現について検討した (n=5)。また、採取した腱組織を免疫化学組織染色によってNGFの局在について検討した (n=5)。今回検討したサイトカインの産生細胞の由来を調べるべく、フローサイトメトリーを用いて採取した組織における間葉系細胞マーカー (CD29, CD54, CD90) およびマクロファージマーカー (CD14) の陽性細胞の割合を検討した。最後にNGFとTNF- α との関連性を調べる為に、7日間培養した腱板由来細胞を0, 0.25, 2.5, 25 ng/mlのラット recombinant TNF- α で刺激し、*Ngf* 発現量を検討した (n=5)。統計学的検討は、RCT群とsham群間の遺伝子発現、タンパク発現の差異はPaired t検定を用いた。また、各評価時期における遺伝子発現の差異は一見配置分散分析を用いて検討し、有意差が認められた場合Tukeyの多重比較検定を実施した。有意水準は0.05未満とした。

<結果>

RT-PCR法による評価では、RCT群における *Tnfa* と *Ngf* の発現レベルは処置後1日でSham群と比較し有意に上昇を認めた (*Tnfa*, $P < .001$; *Ngf*, $P = .004$)。全経過において *Tnfa* と *Ngf* の発現は有意差なく持続していた (*Tnfa*, $P = .359$; *Ngf*, $P = .186$)。 *I11b* と *Cox2* も処置後1日から全評価時期において有意差が認められた (*I11b*, $P = .046$; *Cox2*, $P = .008$)。しかし、*I11b* は処置後1日と比べ、処置後3日 ($P = .030$)、7日 ($P = .027$)、28日 ($P = .029$) で有意な低下が認められた。また *Cox2* の発現は処置後14日 ($P = .0015$)、28日 ($P = .0016$)、56日 ($P = .0016$) で処置後1日より有意な低下が認められた。

ELISA法の結果では、RCT群における処置後1日と14日の *Ngf* のタンパク発現はSham群と比較し有意に上昇していた ($P < 0.001$)。

組織学的検討において、処置後1日、14日ともに腱組織にNGF陽性の炎症性細胞を認めたが、Sham側の腱組織には認められなかった。

フローサイトメトリーの結果、培養腱板由来細胞中の約88.3%は間葉系細胞マーカー (CD29, CD54, CD90) 陽性であった。また、マクロファージマーカーCD14+陽性細胞が7.4%存在した。

そして、2.5 ng/mL、25 ng/mLによるTNF- α 刺激後、培養腱板由来細胞における *Ngf* の発現は各々4.5倍 ($P = 0.038$) と4.9倍 ($P = 0.041$) 上昇した。

<考察>

本研究では *Tnfa*, *I11b*, *Ngf*, *Cox2* は Sham と比較しいずれも断裂処置後1日で有意に

発現上昇を認めた。更には *Tnfa* と *Ngf* は処置後 56 日まで発現の上昇が維持されたが、*I11b* と *Cox2* の発現は経時的に低下した事であった。特に *Cox2* は 14 日以降有意に減少し続けており、持続的な発現は認められなかった。我々はさらに ELISA と免疫組織染色で NGF の有意な上昇を確認した。また腱板由来細胞に対して TNF- α 刺激を加えると *Ngf* 発現は有意に上昇した。これらの結果から、腱板組織で TNF- α に誘導された NGF は腱板断裂の疼痛に関与している可能性が示された。

NGF は末梢組織損傷時に発現の上昇を認め、急性期と慢性期の疼痛に関与する事が報告されている。動物実験や臨床研究においても NGF と疼痛の関連性が報告されており、変形性関節症の疼痛や腰痛に対して抗 NGF 抗体の有効性が確立されつつある。NGF は TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 receptor) を介して末梢感作に関与している。また、末梢組織において TrkA と結合し、post-translational な蛋白修飾による疼痛受容体の過敏化を引き起こす。肩峰下滑液包では侵害受容器が発現しているという報告もあり、NGF による末梢感作は腱板断裂患者の疼痛に関与している可能性がある。本研究において処置後 1 日で *Ngf* は有意な上昇を認め、56 日まで発現が維持されていた事より、NGF は腱板断裂の急性期の疼痛のみならず慢性期における疼痛にも関与している可能性が示唆された。

一方、*Cox2* は処置後 1 日には有意に発現の上昇を認めたが 14 日には低下した。高齢者の腱板断裂の多くは変性断裂であり、急性期の断裂は少ない。そのため本研究の結果は臨床において NSAIDs が腱板断裂の疼痛緩和に十分な効果を示さない理由であるかもしれない。また、*Tnfa* が持続的に発現している事は NSAIDs と比べステロイドの有効性が高い理由の一つと考えられた。

NGF と共に、TNF- α の発現も腱板断裂作成後 1 日から上昇し、56 日まで維持された。さらに滑膜様細胞やマクロファージが含まれた腱板由来細胞を TNF- α で刺激すると NGF の発現が誘導された。過去の報告では TNF- α の阻害が疼痛緩和や筋腱付着部の組織修復を促進し、局所運動機能の改善をもたらすとされている。本研究の結果と合わせると、断裂部において NGF の発現は主に TNF- α によって制御され、腱板断裂の疼痛に寄与している可能性が示唆された。