

学位論文要旨

氏名 中脇 充章



論文題目

「マウスにおける椎間板損傷後の神経成長因子発現とマクロファージ表現型の変化」

指導教授承認印

高相 剛士



<背景>

腰痛の生涯罹患率は85%と報告されており、男性女性ともに多い愁訴である。慢性腰痛は患者のADLを低下させ健康寿命に影響を及ぼすと考えるが、非特異的腰痛も多く治療に難渋する。また既存の薬物治療には抵抗性であり新たな治療ターゲットになる原因物質を見つけることは極めて重要である。

慢性腰痛の主な原因として椎間板 (intervertebral disc, IVD) の変性が報告され、近年動物モデルで損傷後の IVD において痛みに関与する神経栄養因子の一つである神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) が増加することが報告されている。さらに、抗 NGF 療法は、慢性腰痛患者で鎮痛効果があるという報告もあるが、損傷後の IVD で NGF の発現がどのように調節されているかは不明である。

疼痛の原因の一つとして、近年マクロファージが関与しているという報告がある。いくつかの報告ではマクロファージが変性の IVD に存在することを示し、マクロファージが IVD の病理において重要な役割を果たす可能性があることを示唆している。マクロファージには M1 または M2 表現型があり、それぞれが炎症作用、抗炎症作用、またはリモデリング作用などの異なる機能を持つ異なるサイトカインを産生する。最近の研究では、変性ヒト IVD で M1 および M2c マクロファージの両方が増加していることが報告されている。しかし、IVD 損傷後のマクロファージ表現型の変化は未だ十分に研究されていない。

インターロイキン (IL) -1 β や腫瘍壊死因子 (TNF) - α などの炎症性サイトカインが NGF の発現を調節することが報告されている。TNF- α および IL-1 β は、in vitro でヒトおよびマウス IVD 細胞の NGF mRNA 発現とタンパク質産生を誘導する。また、TGF- β などの抗炎症性サイトカインも、ヒト変形性関節症の軟骨細胞で NGF 発現を誘導する。M1 マクロファージは TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生し、M2 マクロファージは IL-10 や TGF- β などの抗炎症性サイトカインを産生する。

今回我々は、マウスの IVD 損傷後の NGF 発現とマクロファージ表現型、および M1 および M2 マクロファージによって産生されるサイトカインである TNF- α と TGF- β の、IVD 細胞における NGF 発現への影響を検討した。

<対象と方法>

10 週齢の雄の C57BL/6J マウス 100 匹を用いた。筋肉注射にて麻酔をかけた後、尾骨 (Co) 5-6 および Co 6-7 IVD を 27 ゲージの針で 10 回穿刺し、IVD 損傷モデルを作成した。比較として尾椎 IVD を損傷しない群を用い、これを control 群 (0 日) とした。損傷後 0、1、7、14、および 28 日目に、IVD 組織を採取し、発現している *Ngf* 及

びマクロファージマーカー、産生サイトカインである *Tnfa*、*Il1b*、*Nos2*、*Yml*、*Cd206*、*Tgfb* 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 *Ngf*、*Tnfa*、*Il1b*、*Nos2*、*Yml*、*Cd206*、*Tgfb* の発現量を経時的に比較検討した (n=10)。また、損傷後 0、1 日と 28 日で IVD から ELISA 法を用いて NGF の発現について検討した (n=5)。更に、IVD 内のマクロファージの割合の検討を、損傷後 0、1、7、14、および 28 日目にフローサイトメトリーを用いて分析した (n=5)。

NGF と TNF- α 、TGF- β との関連性を調べる為に、7 日間培養した IVD 細胞を 0,2.5,25 ng/ml のマウス recombinant TNF- α と 0,1,10 ng/ml のマウス recombinant TGF- β で刺激し、*Ngf* 発現量を qPCR、NGF レベルを ELISA 法を用いて検討した (n=5)。

統計学的検討は、遺伝子およびタンパク質の発現は、一元配置分散分析とボンフェローニの事後多重比較検定を使用して比較した。有意水準は 0.05 未満とした。

<結果>

IVD 損傷後の *Ngf* mRNA 及び NGF タンパク質の発現は、Control 群と比較して増加した。*Ngf* mRNA 発現は損傷後 1 日目から増加し ($p < 0.0001$)、観測期間である 28 日後でも増加していた ($p < 0.0001$)。NGF タンパク質レベルは、Control 群に対し IVD 損傷後 28 日では有意に増加していた ($p = 0.001$)。

IVD 損傷後のマクロファージにおける F4/80+CD11b+ 細胞の割合は、対照マウスと比較して損傷 1 日後から 28 日後まで有意に増加した (1 日目、 $p = 0.036$; 7 日目、 $p < 0.0001$; 14 日目、 $p < 0.0001$; 28 日目、 $p = 0.001$)。

M1 マクロファージマーカーである *Tnfa*、*Il1b*、および *Nos2* は、コントロールマウスと比較して、IVD 損傷後 1 日で有意に増加し ($p < 0.0001$)、その後発現が徐々に減少していき 28 日目には Control 群との間に有意な差はなくなった。M2a マクロファージマーカーである *Yml* は、Control 群と比較して、IVD 損傷後 1 日後にのみ有意に増加し ($p < 0.0001$)、その後は Control 群まで減少した。一方、M2a および M2c マクロファージマーカーである *Cd206* 及び M2a および M2c マクロファージ由来サイトカインである *Tgfb* は、Control 群と比較して、IVD 損傷後 7、14、28 日で有意に増加していた ($p < 0.0001$)。

Ngf mRNA 発現は、溶媒処理細胞と比較して 2.5 または 25 ng/ml での TNF- α および、1 または 10 ng/ml での TGF- β で 6 時間刺激した群は有意に高かった ($p = 0.004$ 、 0.004 、 0.007 、 $p < 0.0001$)。また 24 時間の刺激に関しては *Ngf* mRNA 発現は、溶媒処理細胞と比較して 25 ng/ml での TNF- α 刺激、または 10 ng/ml での TGF- β による刺激後に有意に増加した ($p < 0.0001$ 、 $p = 0.008$)。NGF タンパク質レベルにおいても、媒体処理細

胞と比較して、TNF- α またはTGF- β による6時間および24時間の刺激後も有意に高かった。

<考察>

IVD 損傷後の *Ngf* mRNA 発現は、損傷の1日後に増加し、損傷後28日まで持続していた。マクロファージの割合も IVD 損傷後に増加し、M1 および M2 マクロファージマーカーの発現は、それぞれ損傷の早期と後期で増加していた。さらに、TNF- α と TGF- β の両方が *Ngf* mRNA と NGF タンパクの発現を刺激していた。以上の結果から、NGF が IVD の炎症状態と非炎症状態の両方で増加していることが示唆された。

NGF レベルの増加は、関節リウマチ、脊椎関節炎、変形性関節症などの炎症状態で報告されている。我々は以前、IVD 損傷の急性期において *Ngf* mRNA の発現が増加していることを明らかにした。今回の研究においても損傷後急性期において *Ngf* の発現は増加していたが、新たに *Ngf* を調節すると考えられている炎症性サイトカインである *Tnfa* および *Il1b* の発現が低下している損傷後28日においても *Ngf* が増加していることを観察した。さらに、NGF タンパク質は損傷の28日後に増加していた。我々の結果は、NGF が早期に起きていると考えられる炎症性因子だけでなく慢性期に起こる IVD の抗炎症性因子によっても調節されていることを示唆している。

マクロファージが IVD の炎症性因子に関与しているという報告がある。本研究では、IVD 損傷後のマクロファージの割合に有意な増加が見られたが、損傷後の M1 および M2 マクロファージマーカーの発現に特定の時間的変化が観察された。M1 マクロファージは炎症に重要な役割を果たしており、変性 IVD、変形性関節症、関節リウマチで M1 マクロファージ数の増加が観察される。最近の研究では、M1 マクロファージが健常対照者と比較して変性ヒト IVD で増加したことが示された。M1 マクロファージは TNF- α を生成する。また TNF- α 刺激により、マウスおよびヒトの IVD 細胞の NGF 産生が増加する。本研究では、マクロファージと TNF- α 発現の割合は、IVD 損傷後すぐに増加した。さらに、TNF- α 刺激により、*Ngf* mRNA および NGF タンパク質の産生が誘導された。以上より、M1 マクロファージが IVD 損傷後の炎症期の NGF 産生を刺激する可能性があることを示唆している。M2 マクロファージのサブタイプは、治癒過程で観察されるように、抗炎症性サイトカインの産生とその貪食機能を介して炎症を抑制する。M2c マクロファージもまたヒトの変性 IVD で観察されている。CD206 および TGF- β はマウスの M2a および M2c マクロファージの両方のマーカーであり、M2c マクロファージはマウスにおいて TGF- β を産生する。今回 *Tgfb* 発現の増加は、M2a および M2c マーカー Cd206 の増加と一致し、慢性期に増加していた。一方 M2a マーカーである *Ym1* の増加は急性期に限られ、一致しなかった。以上より M2c マクロファージが損傷後の慢性期に TGF- β 産生を介して NGF 産生を刺激する可能性

が示唆された。

本研究において、IVD 損傷後 M1 および M2 マーカーは、それぞれ傷害の早期および慢性期に増加していた。NGF 発現は IVD 損傷後の炎症状態と非炎症状態の両方で増加し、早期では TNF- α 、慢性期では TGF- β のそれぞれによって調節されている可能性が示唆された。今回の研究結果は、IVD 変性およびマクロファージをターゲットとした NGF コントロールに関連する腰痛の治療法の開発に寄与すると考えられる。