

学位論文

「TGF- β regulates nerve growth factor expression in a mouse
intervertebral disc injury model(マウス椎間板損傷モデルにおける
TGF- β による神経成長因子発現の制御)」

DM19028 横関 雄司

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程

臨床医科学群 整形外科学

指導教授 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

背景

持続的な腰痛は一般的な慢性疾患であり、その主な原因は椎間板の変性である。近年、椎間板損傷モデル動物や椎間板ヘルニアを持つヒトの椎間板では神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) の濃度が上昇していることが報告されている。さらに、慢性腰痛患者に対する抗 NGF 療法は腰痛軽減に有用であることが示されている。しかし、NGF の調節機構は未だ明らかになっていない。

これまでの研究では、Tumor necrosis factor- α (TNF- α) と Transforming growth factor- β (TGF- β) が NGF の制御因子である可能性が示唆されている。TNF- α は強力な炎症性サイトカインであり、様々な炎症性メディエーターの分泌を促進する。TNF- α の発現は、変性していない椎間板に比べて変性した椎間板では上昇している。TNF- α は、*in vitro* において、マウスおよびヒトの椎間板細胞 (髄核 (Nucleus pulposus, NP) 細胞および線維輪 (Annulus fibrosus, AF) 細胞を含む) の NGF 産生を刺激することが示されている。一方、TGF- β は、マトリックスの合成を促進し、マトリックスの分解、細胞の損失、炎症反応を抑制することで、修復中の椎間板組織を保護していると考えられる。しかし、TGF- β の過剰な活性化は椎間板に有害であり、マウスやヒトの変性した椎間板では高レベルの TGF- β が観察される。我々は以前、*in vitro* において TGF- β がマウス椎間板細胞の NGF 産生を促進することを報告した。このように、*in vitro* の研究から得られた結果は、TNF- α と TGF- β が椎間板の変性に伴う NGF の制御に寄与していることを示唆している。しかし、TNF- α と TGF- β が生体内でも NGF の発現を制御しているかは不明のままである。

本研究では、生体内のマウス椎間板穿刺モデルを用いて、NGF の発現に関連する TNF- α と TGF- β の役割を検討した。

方法

9週齢の雄の C57BL/6J マウスおよび *Tnfa* ノックアウト(KO)マウス(C57B/6J バックグラウンド)を飼育した。北里大学医学部動物管理委員会の承認を得た (参照番号: 2020-089)。

椎間板損傷マウスモデルにおける *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現

40匹の C57BL/6J マウスを用いて、椎間板損傷後の *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現を検討した。10匹のマウスを無作為に選んでコントロール群とし、残りの30匹のマウスを椎間板損傷群とした。イソフルランによる麻酔後、ミダゾラム、ドミトール、ベトルファール混合液を筋肉内に注射した。その後、椎間板損傷群のマウスには、27ゲージの針で椎間板を10回穿刺した。対照マウスは、穿刺損傷以外のすべての処置を受けた。損傷後0日目 (PID0)、1日目 (PID1)、3日目 (PID3)、7日目 (PID7) の *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を用いて検討した。NP と AF の組織は分離せずに解析を行った。

qPCR

椎間板を採取し相補的 DNA (cDNA) を合成した。RT-PCR Detection System を用いて *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現を検討した。相対的な発現量は、対照サンプル (対照群の非損傷椎間板、または培養液のみで処理した *in vitro* の椎間板細胞) の平均値をもとに算出した。

椎間板損傷後の *Tnfa*、*Tgfb* および *Ngf* の発現

PID7 の椎間板から分離した CD11b(+)細胞 (マクロファージ) および CD11b(-)細胞 (椎間板細胞) における *Tnfa*、*Tgfb* および *Ngf* の発現を調べた。椎間板 (n=5)

をコラゲナーゼ処理し、ビオチン結合抗体、ストレプトアビジン結合磁性ビーズを用いて分離した。RNA 抽出、cDNA 作製後、前増幅試薬 (Perfecta Preamp SuperMix) を用いて cDNA を増幅した。分離した細胞における遺伝子発現解析には、qPCR を用いた。

椎間板損傷時の *Ngf* 発現に対する *Tnfa* 欠損の影響

40 匹の C57BL/6J マウスと *Tnfa*-KO マウスを用いて、NGF 発現における TNF- α の役割を調べた。10 匹のマウスを無作為に選んで対照群とし、残りの 30 匹を椎間板損傷群とした。*Ngf* の発現は、PID0、PID1、PID3、および PID7 において、qPCR (各時点につき n=10) を用いて測定した。

椎間板細胞培養における NGF 発現・産生に対する TGF- β 阻害剤 SB431542 の効果

5 匹のマウスから単離した椎間板細胞の TGF- β を介した *Ngf* 発現および NGF 産生に対する SB431542 の影響を調べた。椎間板細胞を培養し 1 週間後、 α -MEM、10ng/ml リコンビナント TGF- β 、または 10ng/ml リコンビナント TGF- β +1 μ M SB431542 で 6 時間および 24 時間刺激し、その後 RNA を抽出し、qPCR を用いて分析した。また、ELISA を用いて培養上清中の NGF 濃度を検討した。

椎間板損傷モデルマウスにおける TGF- β 阻害剤の効果

上述の椎間板損傷を受けた 60 匹のマウスを、溶媒対照群と治療群の 2 つの均等なグループに無作為に割り当てた。治療群の 30 匹のマウスには、椎間板を採取する 1 日前と 2 日前に、5% DMSO 溶液に溶解した 10mg/kg SB431542 を腹腔内注射した (SB43152 群)。残りの 30 匹には、同じ時点で 5% DMSO 溶液を腹腔内注射した (溶媒対照群)。PID1、PID3、PID7 で椎間板を採取し、qPCR 分析した。

統計解析

統計解析には SPSS を用いた。各群における遺伝子およびタンパク質の発現の差異は、一元的分散分析を行った後、多重比較検定 (Bonferroni 法) を用いて解析した。CD11b(+)分画と CD11b(-)分画における遺伝子発現の差異を比較するために、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った後、Wilcoxon 符号付き順位検定またはペア t 検定を用いた。さらに、Kolmogorov-Smirnov 検定後、t 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて、各時点における野生型マウスと *Tnfa*-KO マウス、または溶媒対照群と SB431542 群の違いを比較した。P < 0.05 を有意とした。

結果

椎間板損傷後の *Tnfa*, *Tgfb*, *Ngf* の発現

野生型マウスでは、*Tnfa* の発現が PID1、3、7 (PID1, P<0.001; PID3, P<0.001; PID7, P<0.001)、*Tgfb* の発現が PID3、7 (PID1, P=1.000; PID3, P<0.001; PID7, P<0.001) で有意に増加していた。同様に、*Ngf* の発現は、野生型マウスの PID1、3、7 (PID1, P<0.001; PID3, P=0.001; PID7, P<0.001) で有意に増加した。

椎間板細胞における *Tnfa*, *Tgfb* および *Ngf* の発現

CD11b(+)細胞と(-)細胞の間では、CD11b(+)細胞では *Cd11b*、*F4/80*、*Tnfa* が有意に発現していた (*F4/80*, P=0.018; *Cd11b*, P=0.018; *Tnfa*, P=0.026;)。一方、*Col2a1* と *Tgfb* は、CD11b(-)細胞に有意に発現していた (*Col2a1*, P=0.026; *Tgfb*, P=0.026)。一方、*Ngf* の発現は CD11b(+)細胞と CD11b(-)細胞の間で同等であった (P=0.459)。

椎間板損傷後の *Ngf* 発現に対する *Tnfa* 欠損の影響

Ngf の発現は、調べたすべての時点で、野生型マウスと *Tnfa*-KO マウスの間で同等

であった (PID1, P=0.842; PID3, P=0.578; PID7, P=0.053)。

椎間板細胞培養における TGF- β 阻害剤の効果

TGF- β 投与 6、24 時間後において *Ngf* の発現が有意に増加した (6 時間、P=0.013 ; 24 時間、P=0.038)、この増加は TGF- β 阻害剤 SB431542 の投与により抑制された (6 時間、P=0.025 ; 24 時間、P=0.040)。同様に、TGF- β 投与 6、24 時間後において、上清の NGF タンパク質レベルが溶媒対照群に比べて増加し (6 時間、P=0.049、24 時間、P=0.001)、この増加は SB431542 の投与で抑制された (6 時間、P=0.036、24 時間、P=0.002)。

椎間板損傷モデルにおける TGF- β 阻害剤の効果

PID1 における *Ngf* の発現は SB421542 群と溶媒対照群間に違いは見られなかった (P=0.354)。一方、PID3 と PID7 における *Ngf* の発現は溶媒対照群に比べ SB431542 群でと有意に低かった (PID3, P=0.0381; PID7, P=0.0001)。

考察

NGF の発現は、炎症部位で局所的に上昇することが多くの報告で示されている。TNF- α は椎間板の炎症の主要な因子であり、*in vitro* でマウス椎間板細胞やヒト AF および NP 細胞において NGF の発現および産生を促進することが示されている。したがって、TNF- α は椎間板損傷において NGF を制御していると考えられる。しかし、我々の研究では PID1 で野生型マウスの損傷した椎間板で *Tnfa* と *Ngf* の発現が直ちに上昇するが、*Tnfa* の欠損では損傷した椎間板での *Ngf* の発現は変化しなかった。我々の椎間板穿刺モデルでは、*Tnfa* は損傷した椎間板のマクロファージで主に発現していた。我々は以前、マウス椎間板損傷モデルにおいて、クロドロネートリポソームを用

いてマクロファージを枯渇させると、PID1 での *Ngf* の発現ではなく *Tnfa* が減少することを報告した。また、*in vitro* において TNF- α はヒト滑膜線維芽細胞とマクロファージにおける NGF 発現、NGF 産生を亢進させるが、NGF のレベルはヒト滑膜組織における TNF- α の発現レベルとは相関していなかった。このように、椎間板ではマクロファージの増加に伴い TNF- α レベルが上昇する可能性があるが、TNF- α レベルの上昇は椎間板損傷後の NGF 発現の制御には主要な役割を果たしていない可能性がある。これまでの研究では、変性した椎間板では TGF- β レベルが上昇すること、椎間板の線維芽細胞に比べて軟骨細胞様細胞で上昇することが報告されている。しかし、TGF- β は腎障害下ではマクロファージによっても産生される。腎障害モデルマウスの腎臓のマクロファージは、回復期に高いレベルの TGF- β を発現している。同様に、アドリアマイシン誘発腎症モデルマウスでは、マクロファージが TGF- β を発現している。我々は、椎間板細胞と椎間板から分離したマクロファージにおける TGF- β の発現を比較したところ、TGF- β は椎間板細胞で有意に発現していた。さらに、TGF- β 刺激は *in vitro* で椎間板細胞の NGF 産生を増加させ、TGF- β 阻害剤の投与は椎間板損傷マウスモデルの *in vivo* での NGF 発現を減少させた。これらの結果から、TGF- β は椎間板変性時の NGF を制御しており、*Ngf* 発現の変化は椎間板細胞由来の TGF- β のオートクライン/パラクライン活性の増加によるものであると考えられる。

結論

TGF- β 阻害剤は、椎間板損傷マウスモデルにおいて *Ngf* の発現を低下させたことから、TGF- β が生体内で NGF の発現を制御している可能性が示唆された。

目次

1. 序論	1
2. 方法	2
2-1. 動物	2
2-2. 椎間板損傷マウスモデルにおける <i>Tnfa</i> 、 <i>Tgfb</i> 、 <i>Ngf</i> の発現	2
2-3. qPCR	3
2-4. 椎間板損傷後の <i>Tnfa</i> 、 <i>Tgfb</i> および <i>Ngf</i> の発現	3
2-5. <i>Tnfa</i> KO マウスの作製	4
2-6. 遺伝子型判定	4
2-7. ELISA	5
2-8. 椎間板損傷時の <i>Ngf</i> 発現に対する <i>Tnfa</i> 欠損の影響	5
2-9. 椎間板細胞培養における NGF 発現・産生に対する TGF- β 阻害剤 SB431542 の効果	5
2-10. 椎間板損傷モデルマウスにおける TGF- β 阻害剤の効果	6
2-11. 統計解析	6
3. 結果	7
3-1. 椎間板損傷後の <i>Tnfa</i> 、 <i>Tgfb</i> 、 <i>Ngf</i> の発現	7
3-2. 椎間板細胞における <i>Tnfa</i> 、 <i>Tgfb</i> および <i>Ngf</i> の発現	7
3-3. 椎間板損傷後の <i>Ngf</i> 発現に対する <i>Tnfa</i> 欠損の影響	7
3-4. 椎間板細胞培養における TGF- β 阻害剤の効果	8
3-5. 椎間板損傷モデルにおける TGF- β 阻害剤の効果	8
4. 考察	8
5. 総括	10
6. 今後の課題	10
7. 謝辞	11
8. 引用文献	11
9. 業績目録	15

1. 序論

持続的な腰痛は一般的な慢性疾患であり^{1,2}、その主な原因は椎間板の変性である^{3,4}。近年、椎間板損傷モデル動物や椎間板ヘルニアを持つヒトの椎間板では神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) の濃度が上昇していることが報告されている^{5,6}。さらに、慢性腰痛患者に対する抗 NGF 療法は腰痛軽減に有用であることが示されている⁷⁻⁹。しかし、NGF の調節機構は未だ明らかになっていない。

これまでの研究では、Tumor necrosis factor- α (TNF- α) と Transforming growth factor- β (TGF- β) が NGF の制御因子である可能性が示唆されている。TNF- α は強力な炎症性サイトカインであり、様々な炎症性メディエーターの分泌を促進する。TNF- α の発現は、変性していない椎間板に比べて変性した椎間板では上昇している^{10,11}。TNF- α は、*in vitro* において、マウスおよびヒトの椎間板細胞 (髄核 (Nucleus pulposus, NP) 細胞および線維輪 (Annulus fibrosus, AF) 細胞を含む) の NGF 産生を刺激することが示されている^{6,12}。一方、TGF- β は、マトリックスの合成を促進し、マトリックスの分解、細胞の損失、炎症反応を抑制することで、修復中の椎間板組織を保護していると考えられる。しかし、TGF- β の過剰な活性化は椎間板に有害であり、マウスやヒトの変性した椎間板では高レベルの TGF- β が観察される^{6,13}。我々は以前、*in vitro* において TGF- β がマウス椎間板細胞の NGF 産生を促進することを報告した⁶。このように、*in vitro* の研究から得られた結果は、TNF- α と TGF- β が椎間板の変性に伴う NGF の制御に寄与していることを示唆している。しかし、TNF- α と TGF- β が生体内でも NGF の発現を制御しているかは不明のままである。

本研究では、生体内のマウス椎間板穿刺モデルを用いて、NGF の発現に関連する TNF- α と TGF- β の役割を検討した。

2. 方法

2-1. 動物

9週齢の雄の C57BL/6J マウスおよび *Tnfa* ノックアウト(KO)マウス(C57BL/6J バックグラウンド)を、12時間の明暗サイクルのもと 23°C±2°C、湿度 55%±10%に維持された動物飼育システムで、研究期間中飼育した。実験プロトコールは、北里大学医学部動物管理委員会の承認を得た(参照番号:2020-089)。本研究は、動物実験報告のための ARRIVE ガイドラインに沿って行われた。すべての方法は、日本学術会議の動物実験の適正な実施に関する指針に準拠した。

2-2. 椎間板損傷マウスモデルにおける *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現

40匹の C57BL/6J マウスを用いて、椎間板損傷後の *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現を調べた。10匹のマウスを無作為に選んでコントロール群とし、残りの30匹のマウスを椎間板損傷群とした。イソフルランによる麻酔後、ミダゾラム(製品番号 KB6762、サンド社、山形、日本)、ドミトール(メデトミジン塩酸塩、製品番号 005130、オリオン社、Espoo、Finland)、ベトルファレ(ブトルファノール酒石酸塩、製品番号 VETLI5、明治製菓、東京、日本)の1:3:1混合液を上肢に筋肉内注射(0.05ml/体重100g)した。その後椎間板損傷群のマウスには、27ゲージの針で尾骨椎間板6-7箇所を10回穿刺した。対照マウスは、穿刺損傷以外のすべての処置を受けた。穿刺していない群を損傷後0日目(PID0)とし、1日目(PID1)、3日目(PID3)、7日目(PID7)の *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)を用いて検討した。NPとAFの組織は分離せずに解析を行った。

2-3. qPCR

椎間板を採取し、氷上で直ちに TRIzol (製品番号 15596026, Invitrogen 社, Carlsbad, CA) を用いてホモジナイズした後, SuperScript™ III RT (製品番号 18080085, Invitrogen 社) を用いて相補的 DNA (cDNA) を合成した。PCR 反応 (25 μ l) は, 2 μ l の cDNA, 特定のプライマーセット (最終濃度 0.2 μ M), 12.5 μ l の SYBR Premix Ex Taq (製品番号 RR820, 京都, 日本) で行った。表 1 に本研究で使用したプライマーを示す。PCR 産物のサイズは, 損傷のない椎間板から抽出した cDNA を用いたゲル電気泳動で確認した (補足図 1)。RT-PCR Detection System (CFX-96 ; Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた qPCR は, 95°C で 1 分間, 続いて 95°C で 5 秒, 60°C で 30 秒のサイクルを 40 回繰り返して行った。相対的な発現量は, 対照サンプル (対照群の非損傷椎間板、または培養液のみで処理した *in vitro* の椎間板細胞) の平均値をもとに算出した。

2-4. 椎間板損傷後の *Tnfa*、*Tgfb* および *Ngf* の発現

以前、我々は野生型マウスの PID7 において、*Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現レベルの上昇を確認した⁶。また、PID7 において CD11b(+)細胞の 90%以上が F4/80(+)細胞(マクロファージ)であることを確認した(補足図 2)。そこで、PID7 の椎間板から分離した CD11b (+) 細胞 (椎間板マクロファージ) および CD11b(-)細胞 (椎間板細胞) における *Tnfa*、*Tgfb* および *Ngf* の発現を調べた。椎間板 (n=5) を 0.25mg/ml のコラゲナーゼを用いて 37°C で一晩静置した。その後細胞をセルストレーナーに通し、ビオチン標識抗 CD11b 抗体 (クローン M1/70, 製品番号 101204, BioLegend 社, CA, USA) と 4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、ストレプトアビジン結合磁性ビーズ (製品番号 557812、BD Biosciences 社, San Diego, CA, USA) を用いて 4°C で 30 分間インキュベートした。

磁気ボード（製品番号 552311、BD Biosciences 社）に移し、室温で 6 分間インキュベートした。結合していない CD11b (-) 細胞（椎間板細胞）を回収した後、残りの細胞を磁気ボードから取り出し、結合している CD11b (+) 細胞（椎間板マクロファージ）を回収した。CD11b (-) 細胞および (+) 細胞を 300g で 5 分間遠心分離し、TRIzol に溶解した。上述のように cDNA を合成した後、Perfecta Preamp SuperMix（製品番号 95146-040、Quanta Biosciences 社、MA、USA）の試薬である SuperMix、5 μ l のプライマー（500nM のフォワードおよび 500nM のリバース）、および 35 μ l の cDNA を含む 10 μ l の反応混合物を調製し、95°C で 3 分間、続いて 95°C で 15 秒、60°C で 3 分間の 14 サイクルで PCR を行った。プレ増幅 PCR 産物を直ちに希釈し（1 : 16）、qPCR に用いた。CD11b 細胞の分離の評価は、各画分における *F4/80* および *Cd11b* mRNA の発現に基づいて判断した。

2-5. *Tnfa* KO マウスの作製

Tnfa 遺伝子のエクソン 1-4 を標的とした 2 つのガイド RNA (gRNA5、6) を設計し（5'-GGAGGGAGATGTGGCGCCTT-3、5'-GAGTCCGGGCAGGTCTACTT-3）、Thermo Fisher Scientific 社（Carlsbad, CA, USA）で合成されたものを入手した。この 2 種類の gRNA とともに、Cas9 タンパク質（Integrated DNA Technologies、Coralville, IA, USA）を、既に報告されている方法¹⁴に従って、C57BL/6J マウスの受精卵にエレクトロポレーション法により導入した。2 細胞期まで培養し、生存していた胚を偽妊娠雌の ICR マウスの卵管に移植し、産仔を得た。

2-6. 遺伝子型の判定

CRISPR/Cas9 による *Tnfa* 遺伝子の欠損を判別するために、*Tnfa* 遺伝子座に特異的なプライマーセット（ex1-F1 : 5-TTCCTTGATGCCTGGGTGTC-3、ex1-R2 : 5-TCCGAGGTCCTGACTCTGTCC-3、ex4-R1 5-GTTAGAAGGATACAGACTGGG-3）

および Ex-Taq DNA ポリメラーゼ（製品番号 RR01、タカラバイオ社、滋賀、日本）を用いて PCR を行った。欠損したアレルの PCR 産物のサイズは 0.3Kbp、野生型の PCR 産物のサイズは 0.7Kbp と 2.1Kbp であった(図 1A、B)。

2-7. ELISA

Tnfa-KO マウスに TNF- α タンパク質が存在しないことを ELISA で確認した。野生型マウスおよび *Tnfa*-KO マウスから骨髄マクロファージ (Bone marrow macrophage, BMM)を採取し、1 μ g/ml のリポポリサッカライド(LPS; 製品番号 ALX-581-017-L002, Enzo Life Sciences 社, NY)に 24 時間暴露した(n=6)。細胞上清中の TNF- α の濃度は、市販の TNF- α ELISA キット（製品番号 430907、BioLegend 社）を用いて測定した。

2-8. 椎間板損傷時の *Ngf* 発現に対する *Tnfa* 欠損の影響

40 匹の C57BL/6J マウスと *Tnfa*-KO マウスを用いて、NGF 発現における TNF- α の役割を調べた。10 匹のマウスを無作為に選んで対照群とし、残りの 30 匹を椎間板損傷群とした。椎間板損傷は上述のようにして行なった。*Ngf* の発現は、PID0、PID1、PID3、および PID7 において、qPCR（各時点につき n=10）を用いて測定した。

2-9. 椎間板細胞培養における NGF 発現・産生に対する TGF- β 阻害剤 SB431542 の効果

TGF- β 阻害剤である SB431542 が椎間板細胞の *Ngf* 発現および NGF 産生を阻害するかを調べるために、5 匹のマウスから単離した椎間板細胞の TGF- β を介した *Ngf* 発現および NGF 産生に対する SB431542 の影響を調べた。椎間板細胞は、上

述のようにコラゲナーゼ処理を用いて分離した。続いて、椎間板細胞を 6 穴 plate で 10%ウシ胎児血清を含む α -ミニマルエッセンシャルメディア (α -MEM) 中でインキュベートした。その 1 週間後、椎間板細胞を α -MEM、10ng/ml リコンビナント TGF- β (製品番号 7666-MB、R&D Systems 社, Minneapolis, MN, USA)、または 10ng/ml リコンビナント TGF- β +1 μ M SB431542 (製品番号 S4317、Sigma Aldrich 社, St Louis, MO, USA) で 6 時間および 24 時間刺激し、その後、mRNA を抽出し、qPCR を用いて分析した。細胞上清中の NGF 濃度は、市販の NGF ELISA キット (製品番号 DY556、R&D Systems 社) を用いて測定した。

2-10. 椎間板損傷モデルマウスにおける TGF- β 阻害剤の効果

上述の椎間板損傷を受けた 60 匹のマウスを、溶媒対照群と治療群の 2 つのグループに無作為に割り当てた。治療群の 30 匹のマウスには、椎間板を採取する 1 日前と 2 日前に、10mg/kg の SB431542 を 5% DMSO 溶液 (SB43152) で腹腔内注射し、溶媒対照群の残りの 30 匹には、同じ時点で 5% DMSO 溶液を腹腔内注射した (図 2)。投与量は、過去に報告されているように、最適な抑制効果として 10 mg/kg の腹腔内注射を選択した^{13,15}。PID1, PID3, PID7 で椎間板を採取し、qPCR を行なった (各時点で n = 10)。

2-11. 統計解析

統計解析には SPSS ソフトウェアバージョン 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いた。遺伝子およびタンパク質の発現は、一元的分散分析を行った後、多重比較検定 (Bonferroni 法) を用いて解析した。CD11b(+) 分画と CD11b(-)分画の違いを比較するために、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った後、Wilcoxon 符号付き順位検定またはペア t 検定を用いた。さらに、Kolmogorov-Smirnov 検定の後、t-test または

Mann-Whitney U 検定を用いて、各時点における野生型マウスと *Tnfa*-KO マウス、または DMSO 投与群と TGF- β 阻害剤投与群の違いを比較した。P < 0.05 を有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 椎間板損傷後の *Tnfa*, *Tgfb*, *Ngf* の発現

野生型マウスでは、*Tnfa* の発現が PID1、3、7 (PID1, P<0.001; PID3, P<0.001; PID7, P<0.001; 図 3A)、*Tgfb* の発現が PID3、7 (PID1, P=1.000; PID3, P<0.001; PID7, P<0.001; 図 3B) で有意に増加していた。同様に、*Ngf* の発現は、野生型マウスの PID1、3、7 (PID1, P<0.001 ; PID3, P=0.001 ; PID7, P<0.001; 図 3C) で有意に増加した。

3-2. 椎間板細胞における *Tnfa*, *Tgfb* および *Ngf* の発現

CD11b(+)細胞と(-)細胞の間では、CD11b(+)細胞では *Cd11b*, *F4/80*, *Tnfa* が優位に発現していた (*F4/80*, P=0.018; *Cd11b*, P=0.018; *Tnfa*, P=0.026; 図 4A-C)。一方、*Col2a1* と *Tgfb* は、CD11b(-)細胞に優位に発現していた (*Col2a1*, P=0.026; *Tgfb*, P=0.026; 図 4D-E)。一方、*Ngf* の発現は CD11b(+)細胞と CD11b(-)細胞の間で同等であった (P=0.459; 図 4F)。

3-3. 椎間板損傷後の *Ngf* 発現に対する *Tnfa* 欠損の影響

Tnfa 遺伝子をノックアウトするために、エクソン 1 およびエクソン 4 を標的とした 2 種類の gRNA を設計し(図 1A)、Cas9 タンパク質とともにマウス受精卵に導入した。これにより、3 匹の独立した欠損変異マウスを得た(図 1B)。これらを C57BL/6J マウスと交配して F1 を作出後、*Tnfa* 遺伝子座の塩基配列を解析し、エクソン 1~4

が欠損しているマウスを系統化した(図 1A,C)。野生型マウス由来の BMM を LPS で刺激すると、上清の TNF- α レベルが有意に上昇した (P<0.001;図 1D)。しかし、*Tnfa*-KO マウス由来の溶媒対照群および LPS 刺激 BMM における TNF- α タンパク質レベルは、検出限界以下 (<7.8pg/ml) にとどまった。*Tnfa* が *Ngf* の発現に及ぼす影響を評価するために、野生型マウスと *Tnfa*-KO マウスで椎間板損傷後の *Ngf* の発現を比較した。*Ngf* の発現は、調べたすべての時点で、野生型マウスと *Tnfa*-KO マウスの間で同等であった (PID1, P=0.842; PID3, P=0.578; PID7, P=0.053;図 5)。

3-4. 椎間板細胞培養における TGF- β 阻害剤の効果

椎間板細胞を TGF- β で 6 時間および 24 時間刺激すると、*Ngf* mRNA の発現が有意に増加し (6 時間、P=0.013 ; 24 時間、P=0.038;図 6A)、TGF- β 阻害剤 SB431542 の添加でこの効果が完全に逆転した (6 時間、P=0.025 ; 24 時間、P=0.040;図 6A)。同様に、TGF- β で 6 時間および 24 時間刺激すると、上清の NGF タンパク質レベルが溶媒対照群に比べて増加し (6 時間、P=0.049、24 時間、P=0.001;図 6B)、SB431542 の添加でこの効果が完全に逆転した (6 時間、P=0.036、24 時間、P=0.002;図 6B)。

3-5. 椎間板損傷モデルにおける TGF- β 阻害剤の効果

TGF- β 阻害剤 SB431542 を PID1 の時点でマウスに注射すると、溶媒対照群と比較して *Ngf* の発現に違いは見られなかった (P=0.354;図 7)。一方、PID3 と PID7 のマウスに SB431542 を投与すると、溶媒対照群と比較して *Ngf* の発現が有意に減少した (それぞれ P=0.038、P=0.0001)。

4. 考察

過去の研究では、様々な条件でマウス尾部の穿刺を行うことにより、椎間板の損

傷モデルを作成している^{6,16-22}。31ゲージの針で穿刺したモデルでは、穿刺後6週間と12週間で椎間板の変性スコアが徐々に上昇し、グリコサミノグリカンレベルが低下していた²²。また、26ゲージの針で穿刺したモデルでは、穿刺後8週目の椎間板の高さが対照群に比べて低く、29ゲージの針で作製したモデルでは椎間板の高さが同等であった¹⁷。27ゲージ針で10回の穿刺を行い、椎間板損傷モデルを作成したところ、このモデルは1日から28日の短期間で炎症性サイトカインや成長因子の増加、マクロファージの動員を評価するのに有用であることが分かった^{6,16,18,19}。その為我々はこのモデルを用いて、NGFの発現に対するTNF- α とTGF- β の影響を評価した。

NGFは炎症部位で局所的に上昇することが多くの報告で示されている²³⁻²⁶。TNF- α は椎間板の炎症の主要な因子であり¹¹、*in vitro*でマウス椎間板細胞⁶やヒトAFおよびNP¹²においてNGFの発現および産生を促進することが示されている。したがって、TNF- α は椎間板損傷においてNGFを制御していると考えられる。しかし、我々はPID1で野生型マウスの損傷した椎間板で*Tnfa*と*Ngf*の発現が直ちに上昇するが、*Tnfa*の欠損では損傷した椎間板での*Ngf*の発現は変化しないことを発見した。我々の椎間板穿刺モデルでは、*Tnfa*は損傷した椎間板のマクロファージで主に発現していた。我々は以前、27ゲージの針で10回穿刺したマウス椎間板損傷モデルにおいて、クロドロネートリポソームを用いてマクロファージを枯渇させると、PID1での*Ngf*の発現ではなく*Tnfa*が減少することを報告した¹⁸。また、ヒト滑膜線維芽細胞とマクロファージをリコンビナントTNF- α に曝すと、*in vitro*でNGFの発現が上昇し、NGFが産生されることも判明したが、NGFのレベルはヒト滑膜組織におけるTNF- α の発現レベルとは相関していなかった²⁷。このように、椎間板ではマクロファージの増加に伴いTNF- α レベルが上昇する可能性があるが、TNF- α レベルの上昇は椎間板損傷後のNGF発現の制御には主要な役割を果たしていない可能性が

ある。

これまでの研究では、変性した椎間板では TGF- β レベルが上昇し、椎間板の線維芽細胞に比べて軟骨細胞様細胞で上昇することが報告されている^{6,28}。しかし、TGF- β は傷害を受けた状況下ではマクロファージによっても産生される^{29,30}。腎障害マウスモデルの腎臓のマクロファージは、回復期に高いレベルの TGF- β を発現している²⁹。同様に、アドリマイシン誘発腎症モデルマウスでは、マクロファージが TGF- β を発現している³⁰。我々は、椎間板から分離した椎間板細胞とマクロファージにおける TGF- β の発現を比較したところ、TGF- β は椎間板細胞で優位に発現していた。さらに、TGF- β 刺激は *in vitro* で椎間板細胞の NGF 産生を増加させ、TGF- β 阻害剤の投与は椎間板損傷マウスモデルの *in vivo* での NGF 発現を減少させた。これらの結果から、TGF- β は椎間板変性時の NGF を制御しており、*Ngf* 発現の変化は椎間板細胞由来の TGF- β のオートクライン/パラクライン活性の増加によるものであると考えられる。

5. 総括

TGF- β 阻害剤は、椎間板損傷マウスモデルにおいて *Ngf* の発現を低下させたことから、TGF- β が生体内で NGF の発現を制御している可能性が示唆された。

6. 今後の課題

TGF- β 阻害剤も *Tnfa* 欠損も PID1 の *Ngf* 発現上昇を抑制しなかったことから、急性期には NGF の他の調節因子が存在する可能性が示唆された。このような他の NGF 制御因子を特定するには、さらなる調査が必要である。また、これまでの研究で、KO マウスは、機能的 *redundancy*³¹ や遺伝子ネットワークの再配線³² により明らかな表現型を示さないことが報告されている。TNF- α を介した *in vivo* での *Ngf* 発現制御

の正確なメカニズムを明らかにするには、さらなる調査が必要である。第三に、大規模な損傷を誘発するために10回の針穿刺を行ったので、マクロファージ以外の他の細胞（内皮細胞など）が周辺組織から椎間板に移動し、観察された効果に影響を及ぼした可能性がある。最後に、10回の針刺しにより大きな傷害が生じたため、NP細胞とAF細胞を分離することができなかった。

7. 謝辞

本研究を終えるにあたり、御指導いただきました北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄診療教授、内田健太郎講師、技術員の大貫裕子さんに深謝いたします。また、動物実験をする際には、動物実験センターの皆様方に大変お世話になりました。

8. 引用文献

1. Simon CB, Hicks GE. Paradigm Shift in Geriatric Low Back Pain Management: Integrating Influences, Experiences, and Consequences. *Phys Ther.* 2018;98(5):434–446.
2. Wong AY, Karppinen J, Samartzis D. Low back pain in older adults: risk factors, management options and future directions. *Scoliosis Spinal Disord.* 2017;12:14.
3. Manchikanti L, Hirsch JA. An update on the management of chronic lumbar discogenic pain. *Pain Manag.* 2015;5(5):373–386.
4. Simon J, McAuliffe M, Shamim F, Vuong N, Tahaei A. Discogenic low back pain. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2014;25(2):305–317.
5. Aoki Y, Nakajima A, Ohtori S, Takahashi H, Watanabe F, Sonobe M, et al. Increase of nerve growth factor levels in the human herniated intervertebral disc: can annular rupture trigger discogenic back pain? *Arthritis Res Ther.* 2014;16(4):R159.

6. Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Satoh M, et al. Changes in Nerve Growth Factor Expression and Macrophage Phenotype Following Intervertebral Disc Injury in Mice. *J Orthop Res.* 2019;37(8):1798–1804.
7. Patel F, Hess DK, Maher DP. Anti-nerve growth factor antibodies for the treatment of low back pain. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020;13(6):631–639.
8. Schmelz M, Mantyh P, Malfait AM, Farrar J, Yaksh T, Tive L, et al. Nerve growth factor antibody for the treatment of osteoarthritis pain and chronic low-back pain: mechanism of action in the context of efficacy and safety. *Pain.* 2019;160(10):2210–2220.
9. Wise BL, Seidel MF, Lane NE. The evolution of nerve growth factor inhibition in clinical medicine. *Nat Rev Rheumatol.* 2021;17(1):34–46.
10. Hiyama A, Hiraishi S, Sakai D, Mochida J. CCAAT/enhancer binding protein beta regulates the expression of tumor necrosis factor-alpha in the nucleus pulposus cells. *J Orthop Res.* 2016;34(5):865–875.
11. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNFalpha expression profile. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):R77.
12. Abe Y, Akeda K, An HS, Aoki Y, Pichika R, Muehleman C, et al. Proinflammatory cytokines stimulate the expression of nerve growth factor by human intervertebral disc cells. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32(6):635–642.
13. Chen S, Liu S, Ma K, Zhao L, Lin H, Shao Z. TGF-beta signaling in intervertebral disc health and disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27(8):1109–1117.
14. Okubo T, Hara K, Azuma S, Takada S. Effect of retinoic acid signaling on Ripply3 expression and pharyngeal arch morphogenesis in mouse embryos. *Dev Dyn.* 2021;250(7):1036–50.

15. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med.* 2015;21(7):786–794.
16. Kawakubo A, Uchida K, Miyagi M, Nakawaki M, Satoh M, Sekiguchi H, et al. Investigation of resident and recruited macrophages following disc injury in mice. *J Orthop Res.* 2020;38(8):1703–1709.
17. Martin JT, Gorth DJ, Beattie EE, Harfe BD, Smith LJ, Elliott DM. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res.* 2013;31(8):1276–1282.
18. Miyagi M, Uchida K, Takano S, Fujimaki H, Aikawa J, Sekiguchi H, et al. Macrophage-derived inflammatory cytokines regulate growth factors and pain-related molecules in mice with intervertebral disc injury. *J Orthop Res.* 2018;36(8):2274-79.
19. Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Kuroda A, et al. Sequential CCL2 Expression Profile After Disc Injury in Mice. *J Orthop Res.* 2020;38(4):895–901.
20. Ohnishi T, Sudo H, Iwasaki K, Tsujimoto T, Ito YM, Iwasaki N. In Vivo Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model Based on a New Histological Classification. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160486.
21. Tian Z, Ma X, Yasen M, Mauck RL, Qin L, Shofer FS, et al. Intervertebral Disc Degeneration in a Percutaneous Mouse Tail Injury Model. *Am J Phys Med Rehabil.* 2018;97(3):170–177.
22. Yang F, Leung VY, Luk KD, Chan D, Cheung KM. Injury-induced sequential transformation of notochordal nucleus pulposus to chondrogenic and fibrocartilaginous phenotype in the mouse. *J Pathol.* 2009;218(1):113–121.
23. Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, Pelkonen P, Lindholm D. Nerve growth factor in

- serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine*. 2002;20(3):136–139.
24. Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992;35(3):351–355.
25. Manni L, Aloe L. Role of IL-1 beta and TNF-alpha in the regulation of NGF in experimentally induced arthritis in mice. *Rheumatol Int*. 1998;18(3):97–102.
26. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. 1995;115(7):1265–1275.
27. Takano S, Uchida K, Itakura M, Iwase D, Aikawa J, Inoue G, et al. Transforming growth factor-beta stimulates nerve growth factor production in osteoarthritic synovium. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019;20(1):204.
28. Tolonen J, Gronblad M, Vanharanta H, Virri J, Guyer RD, Rytomaa T, et al. Growth factor expression in degenerated intervertebral disc tissue. An immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta, fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *Eur Spine J*. 2006;15(5):588–596.
29. Kim MG, Kim SC, Ko YS, Lee HY, Jo SK, Cho W. The Role of M2 Macrophages in the Progression of Chronic Kidney Disease following Acute Kidney Injury. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143961.
30. Lu J, Cao Q, Zheng D, Sun Y, Wang C, Yu X, et al. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;84(4):745–755.
31. Tautz D. Redundancies, development and the flow of information. *BioEssays*.

1992;14(4):263–266.

32. Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet.* 2004;5(2):101–113.

9. 業績目録

1. Miyagi M, Inoue G, Murata K, Koyama T, Kuroda A, Kawakubo A, Yokozeiki Y, Mimura Y, Nanri Y, Inage K, Akazawa T, Ohtori S, Uchida K, Takaso M. Factors associated with pain-related disorders and gait disturbance scores from the Japanese orthopedic association back pain evaluation questionnaire and Oswestry Disability Index in patients with osteoporosis *Arch Osteoporos.* 2021 Dec 4;17(1):1.

2. Inoue G, Saito W, Miyagi M, Imura T, Shirasawa E, Ikeda S, Mimura Y, Kuroda A, Yokozeiki Y, Inoue S, Akazawa T, Nakazawa T, Uchida K, Takaso M. Prevalence and location of endplate fracture and subsidence after oblique lumbar interbody fusion for adult spinal deformity *BMC Musculoskelet Disord.* 2021 Oct 14;22(1):880.

3. Yokozeiki Y, Kawakubo A, Miyagi M, Kuroda A, Sekiguchi H, Inoue G, Takaso M, Uchida K. Reduced TGF- β Expression and CD206-Positive Resident Macrophages in the Intervertebral Discs of Aged Mice *Biomed Res Int.* 2021 Jul 12;2021:7988320.

4. Yokozeiki Y, Uchida K, Kawakubo A, Nakawaki M, Okubo T, Miyagi M, Inoue G, Itakura M, Sekiguchi H, Takaso M TGF- β regulates nerve growth factor expression in a mouse intervertebral disc injury model *BMC Musculoskelet Disord.* 2021 Jul 23;22(1):634.

5. Takata K, Nakazawa T, Miyagi M, Saito W, Imura T, Shirasawa E, Kuroda A, Kawakubo A, Mimura Y, Yokozeiki Y, Takaso M, Inoue G. Chylous retroperitoneum following 720 degree anteroposterior-combined corrective surgery for adult spinal deformity with split vertebral fracture subluxation: a case report *Spine Deform.* 2021 Jul;9(4):1183-1189.

6. Matsunaga T, Miyagi M, Nakazawa T, Murata K, Kawakubo A, Fujimaki H, Koyama T, Kuroda A, Yokozeiki Y, Mimura Y, Shirasawa E, Saito W, Imura T, Uchida K, Nanri Y, Inage K, Akazawa T, Ohtori S, Takaso M, Inoue G. Prevalence and Characteristics of Spinal Sagittal Malalignment in Patients with Osteoporosis J Clin Med. 2021 Jun 26;10(13):2827.
7. Okamura M, Saito W, Miyagi M, Shirasawa E, Imura T, Nakazawa T, Mimura Y, Yokozeiki Y, Kuroda A, Kawakubo A, Uchida K, Akazawa T, Takaso M, Inoue G. Incidence of Unintentional Intraoperative Hypothermia in Pediatric Scoliosis Surgery and Associated Preoperative Risk Factors Spine Surg Relat Res. 2020 Nov 20;5(3):154-159.
8. Shoji S, Uchida K, Satio W, Sekiguchi H, Inoue G, Miyagi M, Takata K, Yokozeiki Y, Takaso M Acceleration of bone union by in situ-formed hydrogel containing bone morphogenetic protein-2 in a mouse refractory fracture model J Orthop Surg Res. 2020 Sep 18;15(1):426.
9. Yokozeiki Y, Uchida K, Miyagi M, Murata K, Koyama T, Kuroda A, Kawakubo A, Nanri Y, Inoue G, Takaso M Short-Term Impact of Staying Home on Bone Health in Patients With Osteoporosis During a State of Emergency Declaration Due to COVID-19 in Kanagawa, Japan Cureus. 2020 Sep 6;12(9):e10278.2021 Jul 12.
10. Machida S, Miyagi M, Saito W, Matsui A, Imura T, Inoue G, Nakazawa T, Shirasawa E, Ikeda S, Kawakubo A, Kuroda A, Yokozeiki Y, Mimura Y, Uchida K, Akazawa T, Takaso M. Posterior Spinal Correction and Fusion Surgery in Patients with Spinal Muscular Atrophy-Associated Scoliosis for Whom Treatment with Nusinersen Was Planned Spine Surg Relat Res. 2020 Aug 31;5(2):109-113.
11. Kawakubo A, Uchida K, Miyagi M, Nakawaki M, Satoh M, Sekiguchi H, Yokozeiki Y, Inoue G, Takaso M Investigation of resident and recruited macrophages following disc

injury in mice J Orthop Res. 2020 Aug;38(8):1703-1709.

12. Yokozeki Y, Sukegawa K, Onuma K, Otake Y, Wada T, Takaso M. Flexor Tenosynovitis Caused by Mycobacterium arupense: A Case Report and Review of the Literature JBJS Case Connect. Jul-Sep 2020;10(3):e2000033.

13. Uchida K, Sekiguchi H, Higashiyama R, Endo T, Yokozeki Y, Inoue G, Miyagi M, Fujino S, Yoshida N, Takaso M Loop-Mediated Isothermal Amplification Screening for COVID-19 in Asymptomatic Preoperative Orthopedic Patients in a General Hospital in Kanagawa, Japan Cureus. 2020 Jul 22;12(7):e9331.

14. Metoki Y, Sukegawa K, Onuma K, Otake Y, Yokozeki Y, Miyata T, Kenmoku T, Takaso M. Bilateral Solitary Osteochondroma of the Bicipital Tuberosity Accompanied with Painful Clicking: A Case Report and Literature Review J Hand Surg Asian Pac Vol. 2020 Jun;25(2):245-250.

15. Murata K, Uchida K, Takano S, Shoji S, Iwase D, Inoue G, Aikawa J, Yokozeki Y, Sekiguchi H, Takaso M Osteoarthritis patients with high haemoglobin A1c have increased Toll-like receptor 4 and matrix metalloprotease-13 expression in the synovium Diabetes Metab Syndr Obes. 2019 Jul 16;12:1151-1159.

10. 図表

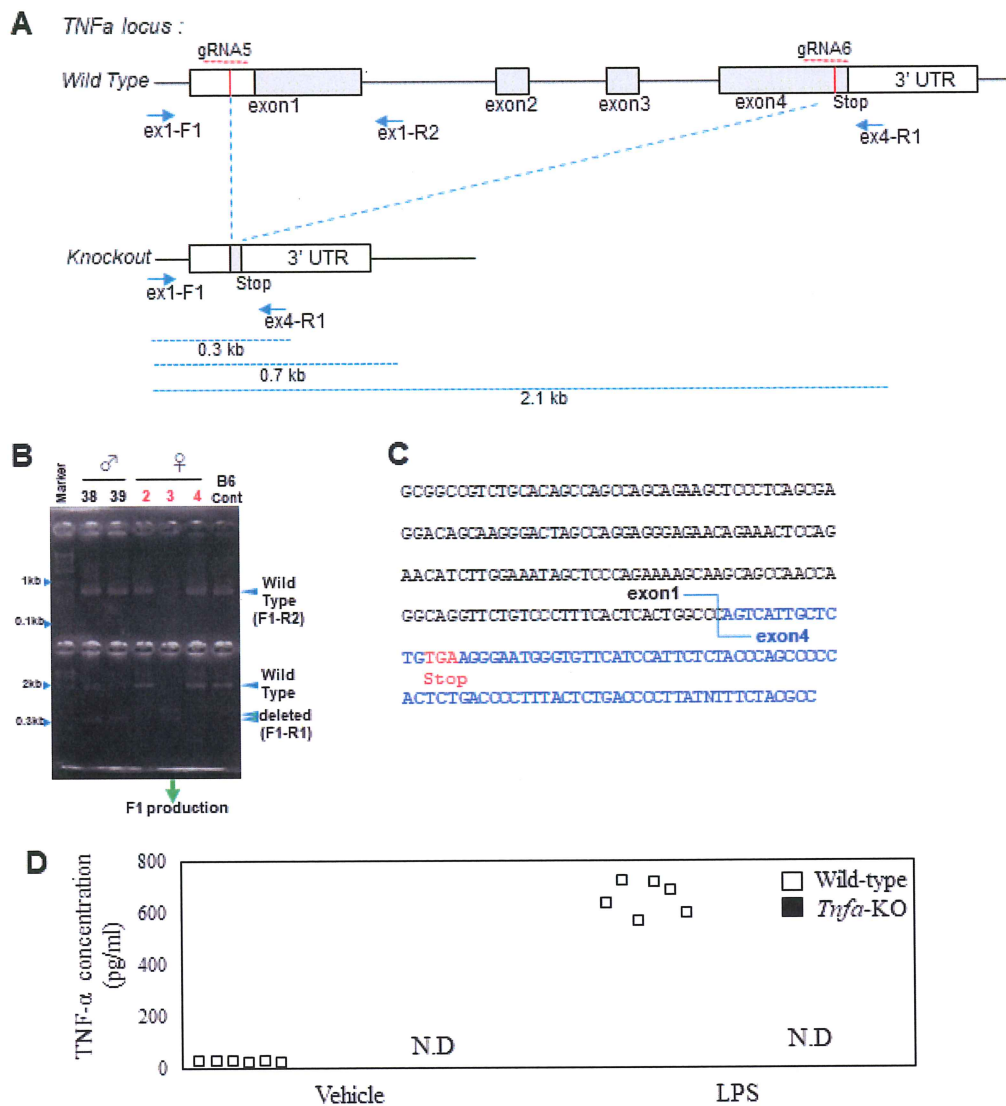


図1: *Tnfa* ノックアウトマウスの作製

A: マウス *Tnfa* 遺伝子の構造と配列を示す模式図。2つの gRNA の位置とポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用のプライマー配列、B: PCR による *Tnfa* ノックアウトマウスのスクリーニング、C: 欠損が起きた *Tnfa* 遺伝子座のエクソン1とエクソン4の連結部の塩基配列、D: ELISA による TNF- α タンパク質の消失の確認(n=6)。

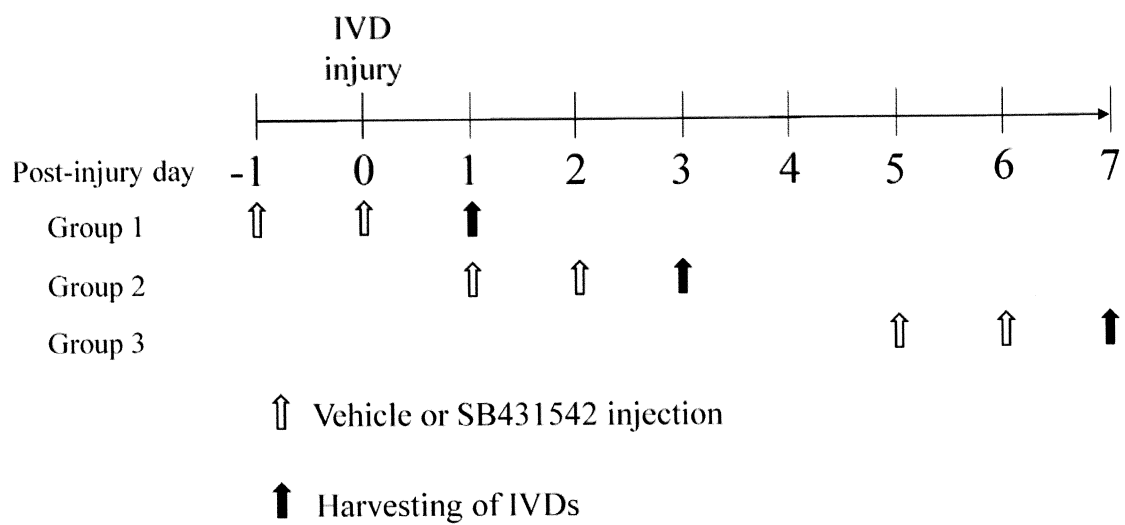


図 2 : TGF- β 阻害剤の投与方法

椎間板を損傷したマウスに、椎間板を採取(損傷後 1 日目、3 日目、7 日目)する 1 日前および 2 日前に、SB431542 または DMSO を腹腔内注射した。

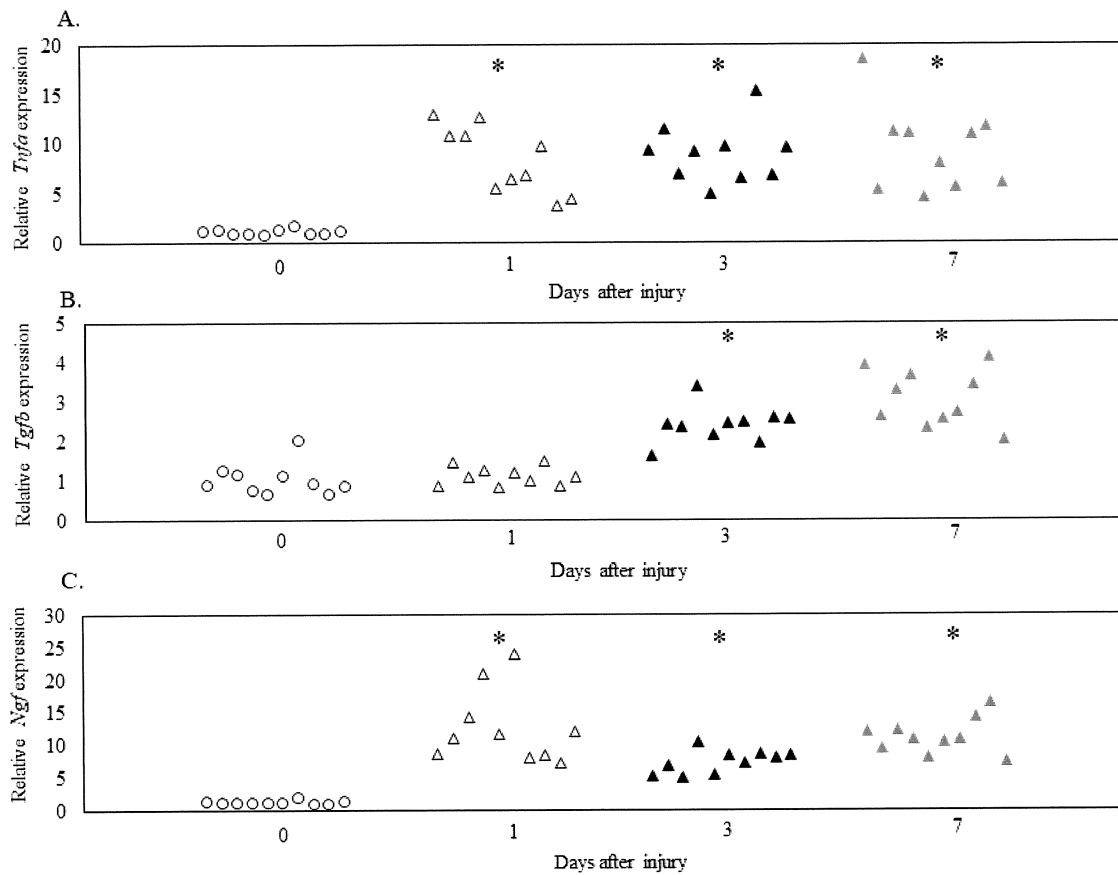


図 3 : 椎間板損傷後の *Tnfa*、*Tgfb*、*Ngf* の発現

損傷後 0 日目、1 日目、3 日目、7 日目における *Tnfa* (A)、*Tgfb* (B)、*Ngf* (C) の発現 (各時点で n = 10) を示す。0 日目 (コントロール) と比較して、*は有意差を示す (p < 0.05)

CD11b分離後PCR

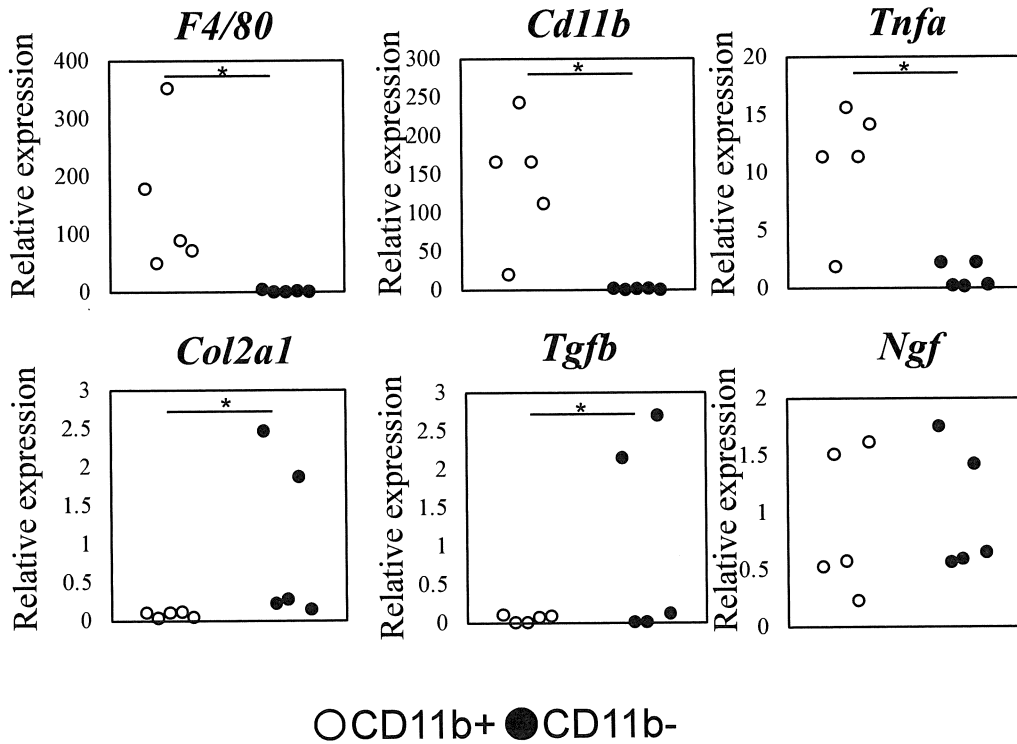


図4：椎間板損傷後のCD11b陽性細胞(○)および陰性細胞(●)における遺伝子発現
椎間板損傷後7日目のCD11b(+)およびCD11b(-)細胞分画における*F4/80*

(A)、*Cd11b* (B)、*Tnfa* (C) *Col21a* (D)、*Tgfb* (E)、および*Ngf* (F)の発現を示す (n=5)。*は有意差を示す (p < 0.05)

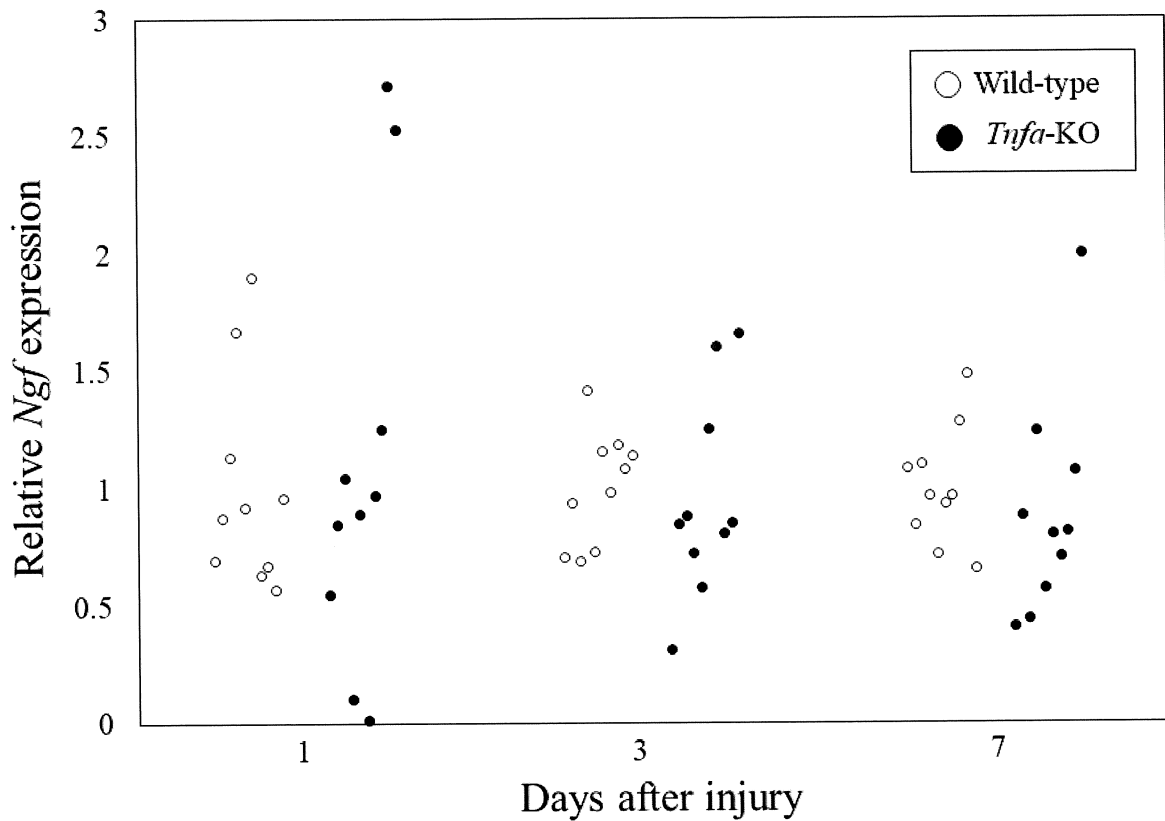


図 5 : *Tnfa* 欠損が *in vivo* での *Ngf* 発現に及ぼす影響

野生型マウス (C57BL/6J) および *Tnfa*-KO マウスにおける椎間板損傷の 1 日後、3 日後、7 日後の *Ngf* の発現を示す (各時点で $n = 10$)。数値は平均値 ± 標準誤差を示した。相対的な *Ngf* 発現量は、各時点での野生型マウスの *Ngf* 発現量に基づいて算出した。同時期の野生型と比較した。いずれの時点でも両群間に有意な差は認められなかった。

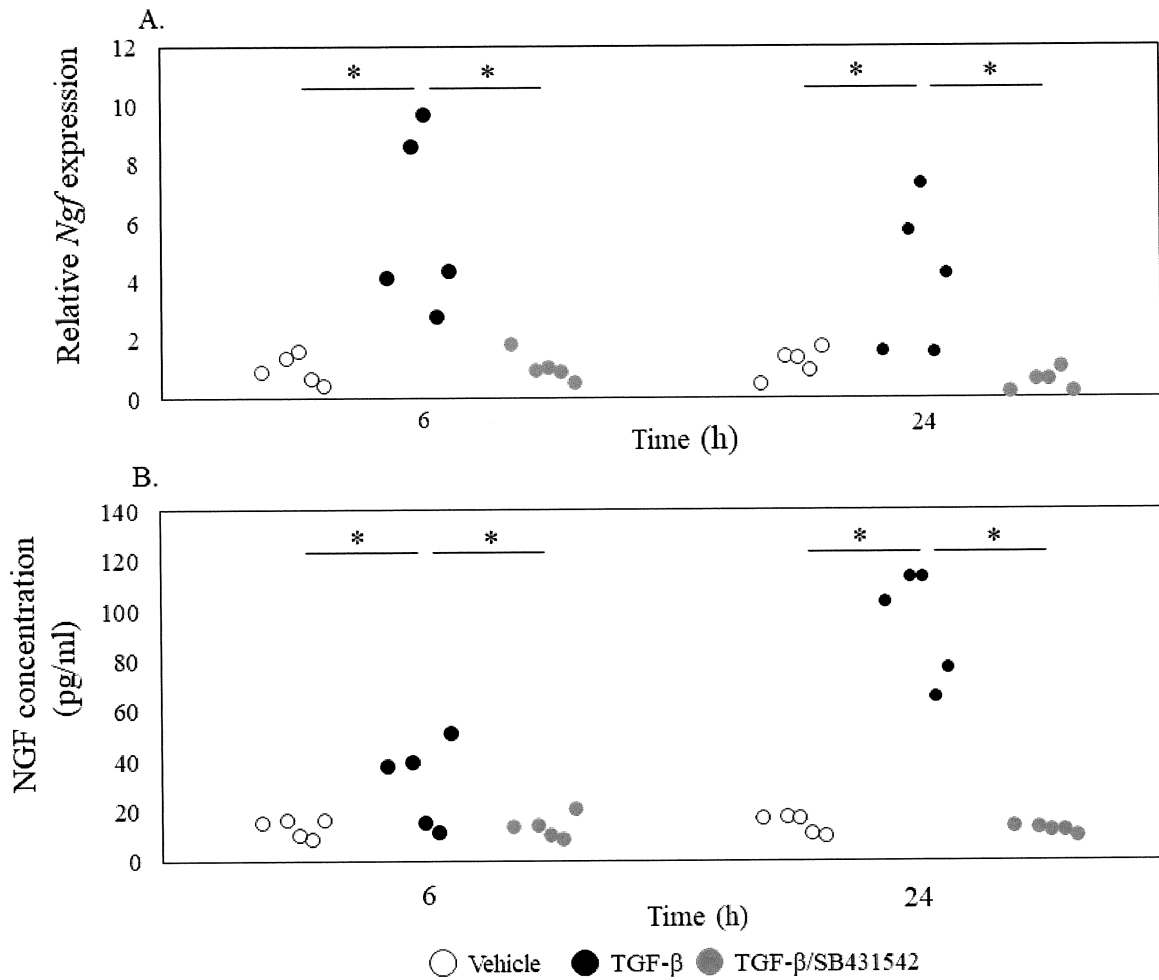


図 6 : TGF-β および TGF-β 阻害剤が *in vitro* での *Ngf* 発現および NGF 産生に及ぼす影響

A : *Ngf* の RT-PCR 椎間板細胞をコントロールとして Vehicle、TGF-β、TGF-β/SB431542 で 6 時間および 24 時間刺激し、コントロールサンプルでの発現をもとに相対的な発現を算出した。B : NGF の ELISA 椎間板細胞をコントロールとして α-MEM、TGF-β、または TGF-β/SB431542 で 6 および 24 時間刺激したコントロールサンプルでの発現をもとに相対的な発現を算出した。*は有意差を示す (p < 0.05)

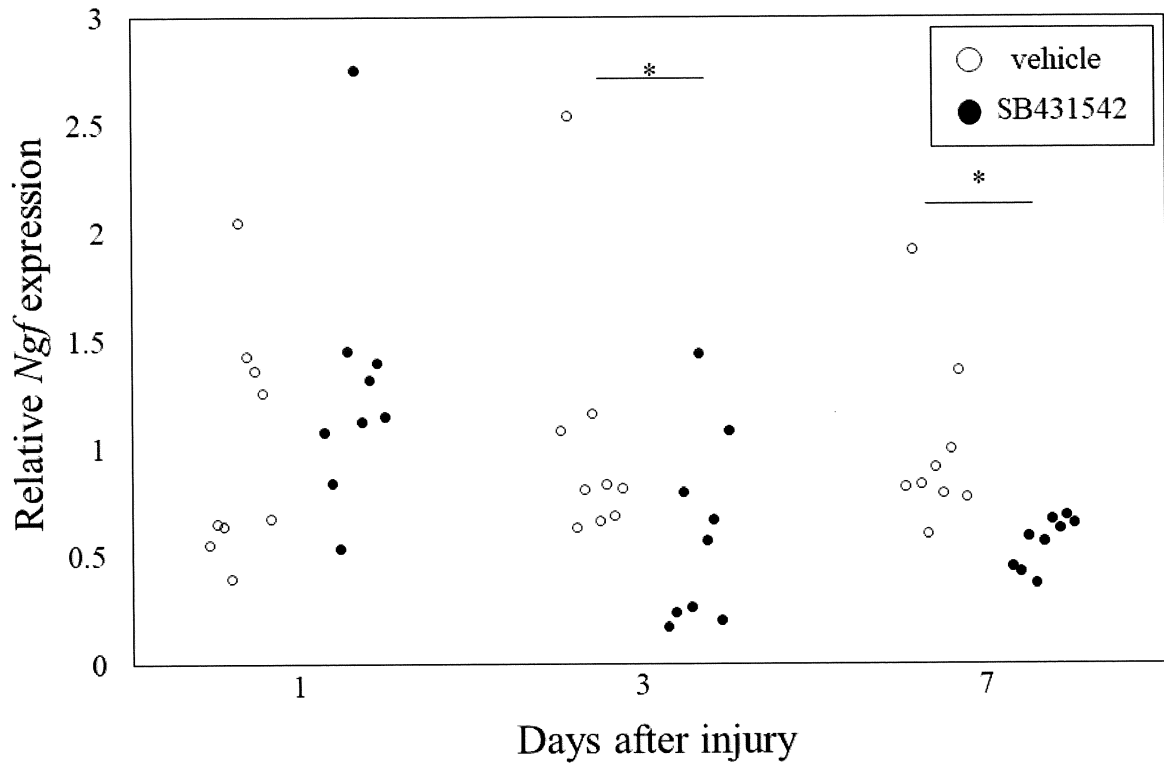
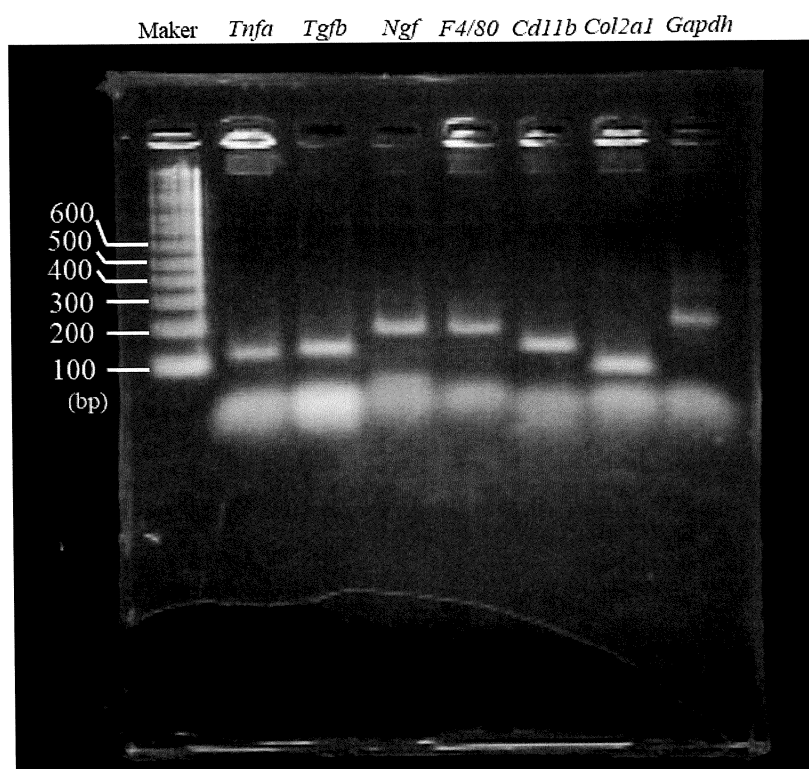


図 7 : in vivo での *Ngf* 発現に対する TGF- β 阻害剤の効果

SB431542 または DMSO を椎間板損傷マウスに、損傷後 1 日目、3 日目、7 日目に椎間板を採取する 1 日前および 2 日前に腹腔内注射した (各時点で $n = 10$)。相対的な *Ngf* 発現量は、各時点における溶媒対照群の *Ngf* 発現量を基に算出した。溶媒対照群と比較して、*は有意差を示す ($p < 0.05$)

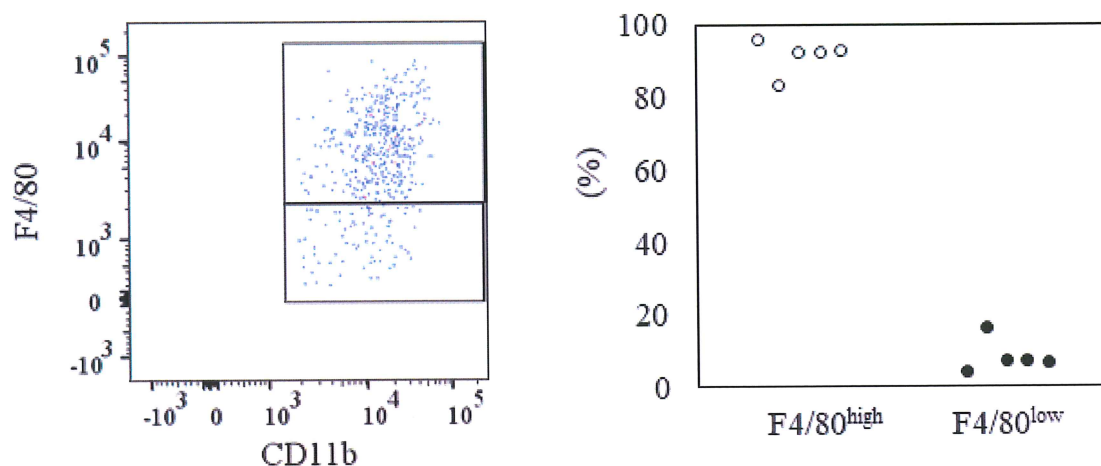
Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>Tnfa</i> -F	TGGCAATTCAGGAGAGGCAG	109
<i>Tnfa</i> -R	AGTGGTTGGAGAAACAGGCA	
<i>Tgfb</i> -F	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	133
<i>Tgfb</i> -R	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG	
<i>Ngf</i> -F	ATGGTGGAGTTTTGGCCTGT	192
<i>Ngf</i> -R	GTACGCCGATCAAAAACGCA	
<i>F4/80</i> -F	TGGGATGTACAGATGGGGGA	189
<i>F4/80</i> -R	CCTGGGCCTTGAAAGTTGGT	
<i>Cd11b</i> -F	CTGGCTTTAGACCCTGTCCG	138
<i>Cd11b</i> -R	GTCCACGCAGTCCGGTAAAA	
<i>Col2a1</i> -F	GGAGAGACCATGAACGGTGG	78
<i>Col2a1</i> -R	CATCTGGACGTTAGCGGTGT	
<i>Gapdh</i> -F	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	223
<i>Gapdh</i> -R	ACACATTGGGGGTAGGAACA	

表 1.プライマー配列



補足図 1 : qPCR 産物のアガロースゲル電気泳動

定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）が正常に増幅されたことを確認するために、正常椎間板の cDNA サンプルを PCR 後、3%アガロースゲルで電気泳動を行った。エチジウムブロマイドで染色後、FAS-IV (Nippon Genetics 社, 東京, 日本) を用いてプロダクトサイズを確認した。分子量マーカータには 100bp DNA ラダー（製品番号 3407A、タカラバイオ、滋賀県）を使用した。予測されるプロダクトサイズにシングルバンドが認められた。



補足図 2：椎間板障害後 7 日目の椎間板内 CD11b 陽性細胞における F4/80high 細胞と F4/80low 細胞のフローサイトメトリー解析

(A) ドットプロットは、椎間板内 CD11b (+) 細胞中の F4/80high 細胞と F4/80low 細胞を示す。x 軸：CD11b、y 軸：F4/80

(B) CD11b (+) 細胞中の F4/80 high と F4/80 low の割合の比較を示す(n=5)。

損傷した椎間板におけるマクロファージのマーカータを同定するために、損傷後 7 日目の椎間板における椎間板細胞の解析を行った。椎間板を抽出し (n=5)、2

mg/ml の I 型コラゲナーゼで 37°C、18 時間処理した。100µm のセルストレーナーに通し、単細胞懸濁液を得た。椎間板由来の細胞を Brilliant violet 421 標識抗 F4/80 (製品番号 123132、クローン BM8, BioLegend, San Diego, CA) とインキュベートし、PE/Cy7 標識抗 CD11b (製品番号 101216、クローン、M1/70, BioLegend 社製) 抗体を 4°C で 45 分間反応させた。リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した後、FACSVerse™ (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いてデータを取得した。データ解析には Flow Jo 10.0 (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。