

学 位 論 文 要 旨

氏 名

横関 雄司



論文題目

「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)」

指 導 教 授 承 認 印

高 桐 勲 士



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)

氏名 横関 雄司

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 (NP) 細胞および線維輪筋 (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

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 *TNFA* 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。