



# Capability of Non-degenerated and Degenerated Discs in Producing Inflammatory Agents with or without Macrophage Interaction

濱本, 秀樹

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-08-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3164

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003164>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Capability of Non-degenerated and Degenerated Discs in Producing Inflammatory Agents with or without Macrophage Interaction

ラット尻尾圧迫モデルを用いて作成した変性椎間板における炎症メディエータの産能  
(正常椎間板との比較およびマクロファージとの共培養)

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

整形外科学

(指導教員：黒坂昌弘教授)

濱本秀樹

【目的】椎間板変性や腰椎変性疾患における疼痛誘導の病理は、疼痛が炎症に起因していると考えられているにも関わらず別々に研究されてきた。

我々は髄核と線維輪由来の細胞に周期性に機械的ストレスをかけ変性過程を強いることで炎症物質が産生されることを報告し、このことから椎間板の変性過程と炎症は共存していることを示唆していると考えた。

最近の研究では椎間板性腰痛の病態として、維輪の断裂とそれに続く血管新生を伴った肉芽組織の形成が外側線維輪から髄核へ進展することによって生じると報告されている。それに加え、加齢や正常椎間板では認めないが、徴候のある椎間板においてマクロファージの遊走が認められていることより、椎間板性腰痛の発現においてマクロファージが重要役割をしていることが示唆されている。しかし過去の研究では変性程度の違う椎間板とマクロファージとの相互作用について報告されたものはない。

今回の実験の目的は正常椎間板や変性椎間板とマクロファージとの共培養のあるなしにおいて椎間板性腰痛を引き起こす候補と考えられているPGE2、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ などの炎症物質産生能を調査することである。

変性椎間板の作成にはラット尾椎機械的圧迫モデルを用いて作成した。

【方法】12週齢のSDラット雄の尾椎にイリザロフタイプの創外固定器を改良したものを装着し、スプリングを用いて2箇所の椎間板に体重と同程度の圧迫を加えた。10日後(2週圧迫モデル)、24日後(4週圧迫モデル)または52日後(8週圧迫モデル)に、5mlのチオグリコネートを腹腔内に注入し、その4日後に安楽死させ後腹腔内よりマクロファージを採取した。圧迫を加えられた2箇所の椎間板を変性椎間板として採取、さらに圧迫部分より2椎体離れた椎間板を2箇所ずつ正常椎間板として、各々軟骨終板をつけずに採取した。各椎間板を採取したマクロファージ( $1.0 \times 10^6$ 個/ml)と共培養する群としない群に分け48時間共培養を行った。細胞上清中のPGE2をRIA法を用いて、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ をELISA法を用いて各々測定した。正常椎間板単独、変性椎間板(2週間圧迫群、4週間圧迫群、8週間圧迫群)単独、マクロファージ単独あるいは各々の椎間板とマクロファージの共培養群にわけて、各群間での炎症メディエータの産生について比較・検討を行った。検定にはstudent t-testを用いた。

組織：ラットの4週間圧迫群の椎間板を用いて免疫染色をおこなった。染色には抗COX-2、抗IL-6抗体を使用した。

【結果】PGE2についてマクロファージ非共培養群ではいずれの群も低値(正常  $238.2 \pm 90.4$  pg/ml、2週間圧迫群  $100.7 \pm 22.6$  pg/ml、4週間圧迫群  $39.5 \pm 13.2$  pg/ml、8週間圧迫群  $24.6 \pm 8.0$  pg/ml)であった。マクロファージ共培養群においては非共培養群と比較して明らかに高値を示した。共培養群の中では8週間圧迫群( $239.6 \pm 79.1$  pg/ml)が他の正常群( $875.5 \pm 202.3$  pg/ml)、2週間圧迫群( $885.2 \pm 391.3$  pg/ml)、4週間圧迫群( $945.7 \pm 203.9$  pg/ml)に比べて明らかに低値を示した。

IL-1 $\beta$  および TNF $\alpha$  : 各群すべてにおいて、IL-1 $\beta$  および TNF $\alpha$  の有意な産生は認められなかった。

IL-6 についてマクロファージ非共培養群ではいずれの群も低値(正常  $87.0 \pm 25.7$  pg/ml、2週間圧迫群  $46.5 \pm 9.8$  pg/ml、4週間圧迫群  $35.0 \pm 10.8$  pg/ml、8週間圧迫群  $23.5 \pm$

9.7pg/ml)であった。マクロファージ共培養群においては非共培養群と比較して明らかに高値を示した。椎間板の変性度とは逆に圧迫週数が増えるに従い IL-6 は逆に低値(正常 294.2±56.2pg/ml、2 週間圧迫群 133.0±34.2pg/ml、4 週間圧迫群 117.3±29.3pg/ml、8 週間圧迫群 90.6±28.1pg/ml)を示した。

免疫学的染色では4週間圧迫ラット椎間板器質内の軟骨細胞中に染色が認められた。

【考察】実験ではマクロファージと正常椎間板、各変性椎間板との相互作用で劇的な PGE2 IL-6 の高値を認めた。対照的に正常椎間板、各変性椎間板、マクロファージ単独では低値であった。2、4 週間圧迫群はマクロファージとの共培養において正常群と同様の高値 PGE2 の産生を認めた。一方8週間圧迫群が低値を示したのはアポトーシスによるためと考えた。IL-6 については共培養群で正常群が各変性群より高値を示したが値は椎間板の変性度とは逆相関であった。脱出椎間板などの腰椎椎間板疾患の病因で重要な役割を持つといわれている TNFa、IL-1b の値は正常群、各変性群ともに共培養群でも低値を示した。これらの結果より二つの仮説を考えた。

1) サイトカインの発現上昇の段階が最近の研究でみている段階と異なる。(今回は相互作用後48時間で測定)

2) 腰椎椎間板ヘルニアでの役割と違い椎間板性腰痛においてはキーマディエーターではない。

IL-1b および TNFa は椎間板細胞においてマクロファージの出現より前に発現すると報告されている。Kim らは線維輪由来の細胞がマクロファージ様の THP-1 細胞と相互作用したときの両サイトカインの分泌量は IL-6 や IL-8 などのサイトカインより少ないと報告している。これは椎間板性腰痛の誘導において IL-6 や IL-8 は TNFa や IL-1b より重要であることを示している。

我々は今回の研究では疼痛と変性を引き起こす特定の化学伝達物質を特定できなかったが PGE-2 と IL-6 はその候補であると考えている。PGE-2 はブラジキニンの様に疼痛誘発物質の感度を高める能力を持っており、腰椎疾患の発生において重要な役割を演じていると報告されている。IL-6 もまた腰椎椎間板疾患における神経学的徴候と IL-6 産生の間に相関関係がある重要なサイトカインであると報告されている。

椎間板性腰痛の病理におけるマクロファージの役割として Peng らは組織学的研究からマクロファージは細胞増殖や分化、肉芽組織の形成促進や新生血管形成を導入する成長因子やサイトカインを放出することにより、線維輪損傷部での損傷を受けた細胞や壊死組織の除去において重要な役目を果たしていると報告している。近年の研究では椎間板とマクロファージの相互作用は PGE2、IL-6 などの椎間板性腰痛の病理における疼痛誘導や椎間板変性に関係するメディエーターの分泌に重要な役割を演じていると示される。高田らは椎間板疾患において IL-6 を産生する大部分の細胞はマクロファージであると報告している。しかしわれわれの組織化学的研究では椎間板組織内の軟骨細胞がマクロファージとの相互作用の結果 PGE2、IL-6 を分泌している可能性が示唆された。

ラット尾椎圧迫モデルは変性椎間板を必要とする動物実験において広く用いられている。この方法は穿刺モデルなどの変性椎間板モデルと比べ二次的に生じる炎症細胞の浸潤、免疫反応や血管新生などの生物学的影響を排除した「純粋な変性」が得られる優れ

た方法であると考えられる。

最近の研究では OP-1 や遺伝子導入を用いて変性椎間板の再生を目指している。しかし椎間板変性が腰椎椎間板疾患の痛みの直接原因であるのかという疑問の答えには至っておらず、今回の我々の研究でも明らかにすることができなかった。さらに、再生椎間板が外部に暴露したときにはこの研究が示すような強い兆候がおこるのであるのかという疑問もある。

これまで腰椎椎間板疾患において変性と疼痛誘導の病理は別々に研究されてきたが、我々の研究結果からも椎間板変性と疼痛誘導は複雑に関係しており将来的には共に研究するべきであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2101号	氏 名	濱本 秀樹
論文題目 Title of Dissertation	<p>Capability of Non-degenerated and Degenerated Discs in Producing Inflammatory Agents with or without Macrophage Interaction</p> <p>ラット尻尾圧迫モデルを用いて作成した変性椎間板における炎症メディエータの産生能 (正常椎間板との比較およびマクロファージとの共培養)</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 甲村 英二 Chief Examiner</p> <p>副 査 横 崎 宏 Vice-examiner</p> <p>副 査 平井 みどり Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

腰椎変性疾患における疼痛の発現は、炎症に起因していると考えられているにも関わらず、変性と疼痛発現の機序はいままで別々に研究されてきた。椎間板性腰痛においてマクロファージが重要な役割をしていることが示唆されているが、変性程度の違う椎間板とマクロファージとの相互作用について報告されたものはない。本研究の目的は、正常椎間板や変性椎間板をマクロファージと共培養した際に、椎間板性腰痛を引き起こす要因と考えられているPGE2, IL-6, TNF alpha, IL-1 betaなどの炎症物質がいかに産生されるかを調査し、腰椎疾患における変性と疼痛発現の関連を検討することである。

#### 対象と方法

12週齢のSDラットの尾椎にイリザロフタイプの創外固定器を装着し、椎間板に圧迫を加えた。10日後（2週圧迫モデル）、24日後（4週圧迫モデル）または52日後（8週圧迫モデル）にチオグリコネートを腹腔内に注入し、マクロファージを採取した。圧迫を加えられた椎間板を変性椎間板とし、2椎体離れた椎間板を正常椎間板として各々採取した。採取した各椎間板とマクロファージとを共培養する群としない群に分け、48時間共培養を行った。細胞上清中のPGE2をRIA法を用いて、IL-1 beta, IL-6, TNF alphaはELISA法を用いて測定した。正常椎間板単独、各変性椎間板単独、マクロファージ単独、あるいは各椎間板とマクロファージとの共培養群にわけて、各群間での炎症物質の産生について比較・検討を行った。

組織: ラットの4週間圧迫群の椎間板を用いて免疫染色(cyclooxygenase-2 (COX-2)とIL-6)をおこなった。

#### 結果

PGE2について、マクロファージ非共培養群では正常、2週、4週、8週圧迫椎間板のいずれにおいても低値であった。しかしマクロファージ共培養群においては非共培養群と比較していずれの群も有意な高値を示した。IL-6についても、マクロファージ非共培養群では正常、2週、4週、8週圧迫椎間板のいずれにおいても低値であった。しかしマクロファージ共培養群においては、非共培養群と比較して有意な高値を示した。IL-1betaおよびTNF alphaについては各群すべてにおいて有意な産生は認められなかった。

免疫学的染色では4週間圧迫ラット椎間板基質内の軟骨細胞中にCOX-2とIL-6の染色が認

められた。

#### 考察ならびに結論

本実験結果より、椎間板組織は正常または変性の程度にかかわらずマクロファージと共存する際にはじめて劇的に PGE2 および IL-6 を産生し得ることが分かった。腰椎椎間板疾患の病因で重要な役割を持つといわれている TNF alpha、IL-1beta の値は、どの条件においても低値を示していた。これらの結果は、TNF alpha、IL-1beta といった炎症物質の発現上昇は、最近の研究で注目されているものとは異なった段階で生じている可能性があること、あるいは腰椎椎間板ヘルニアにおける炎症物質の役割と違い、椎間板性腰痛においては重要ではないという仮説を考えた。また組織研究より、椎間板組織の軟骨細胞がマクロファージとの相互作用の結果 PGE2、IL-6 を産生している可能性があることが示唆された。今回の研究では疼痛と変性を引き起こす特定の化学伝達物質を特定できなかったが、PGE-2 と IL-6 はその候補でありプロセスの一部が明らかになったと考えられた。

本研究は、椎間板性腰痛の発現において椎間板の変性と炎症との関連について研究したものである。従来ほとんど注目されなかった、マクロファージと変性度の異なる椎間板の相互作用による炎症物質産生の関係について重要な知見を得た。さらに、ラット変性椎間板モデルが、今後の椎間板変性疾患に関する研究の新たな材料となりうる点においても価値ある業績である。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。