

慢性膝関節痛の疼痛メカニズム解明と

新しい薬物治療（抗 NGF 療法）に関する研究

代表研究者 千葉大学大学院医学研究院整形外科 医員 宮城正行

まとめ

本研究はマウス変形性膝関節症モデルの膝関節痛の行動評価と支配感覚神経の評価を行い、抗 NGF 療法を施行し、その効果について検討した。本モデルでは膝関節痛跛行を呈し、抗 NGF 療法にて跛行の改善を認めた。さらに、支配感覚神経において本モデルの後根神経節で炎症性疼痛ペプチドの発現上昇を認め、抗 NGF 療法にて発現上昇を抑制した。慢性膝関節痛の病態に NGF が深く関与し、今後有効な治療ターゲットとなりうる。

1、 研究の目的

1-1 マウス変形性膝関節症モデルの作成、病態の評価

本項での目的は、軟骨を選択的に破壊するモノヨードアセテート (MIA) を膝関節内に注射する事により、マウス変形性膝関節症モデルを作成すること、さらに本モデルの行動評価、支配感覚神経の評価等を行い、変形性膝関節症の膝関節痛に関する病態を調査することである。

1-2 マウス変形性膝関節症モデルの膝関節痛に対する抗 NGF 療法の効果の検討

本項での目的は、1-1 で作成した変形性

膝関節症モデルの膝関節痛に対して抗 NGF 療法を行い、その有効性について評価を行う事である。

2、 研究方法と経過

2-1 マウス変形性膝関節症モデルの作成、病態の評価

8 週齢雌性マウスの右膝関節に軟骨を分解するモノヨードアセテート (MIA) を注射し、右変形性膝関節症モデルを作成した。MIA 注射前と注射後 1、2、3 週時に CatWalk で歩行解析の各項目の後肢患健比を検討し、両膝滑膜切除し炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6、NGF) の定量評価を ELISA にて行い左右差を検討した。さらに MIA 注射後 3 週時に神経トレーサーの FluoroGold (FG) を両膝関節内に注射した。FG 注射後 1 週に L1-L6 後根神経節 (DRG) は CGRP (炎症性疼痛ペプチド) と ATF-3 (神経障害のマーカー)、GAP43 (神経再生のマーカー) にて、腰膨大部の脊髄は iba-1 (マクログリアのマーカー)、GFAP (アストロサイトのマーカー) にて免疫組織化学染色を行った。DRG は全 FG 陽性細胞中の CGRP、ATF-3、GAP43 で二重標識される細胞の割合と脊髄後角は単位面積当

たりのマイクログリアまたはアストロサイトの数を算出し左右差を検討した。

2-2 マウス変形性膝関節症モデルの膝関節痛に対する抗 NGF 療法の効果の検討

変形性膝関節症モデルは MIA を注射し作成 3 週後に神経トレーサーの

FluoroGold(FG)を両膝関節内に注射し、同時に抗 NGF 抗体を腹腔内投与した治療群と生食を投与した無治療群にわけた。そして、MIA 注射はせず FG のみ注射した群をコントロール群とした。FG 注射 1、2 週後に CatWalk による歩行解析と、右 L1-L6 までの後根神経節(DRG)を CGRP で免疫化学染色を行った。CatWalk 結果は実験 1 において有意差を認めた、後肢の Duty Cycle(歩行周期中の立脚時間の割合)、接地面積、Swing Speed(ストライド長/遊脚時間)の患健比を、DRG は全 FG 陽性細胞中の FG と CGRP で二重標識される細胞の割合を算出し検討した。

3、 研究の成果

3-1 マウス変形性膝関節症モデルの作成、病態の評価

歩行においては Duty Cycle(歩行周期中の立脚時間の割合)、接地面積、Swing Speed(ストライド長/遊脚時間)が MIA 注射前と比し注射後全期間で有意に低下した。(p<0.05) また、患側膝滑膜の炎症性サイトカインの発現量は健側と比べ有意に上昇していた。(p<0.05) さらに、DRG

の全 FG 陽性細胞中の CGRP で二重標識される細胞の割合は患側で健側に比し有意に高値を示した。(p<0.05) しかし、DRG の全 FG 陽性細胞中の ATF-3 または GAP43 で二重標識される細胞の割合や脊髄後角における単位面積あたりのマイクログリア、アストロサイトの発現量については明らかな左右差を認めなかった。(p>0.05)

以上より、変形性膝関節症に起因する歩行障害を CatWalk によってとらえる事に成功し、これらは過去の報告とも合致する。また、支配感覚神経における CGRP の発現上昇、患側膝関節滑膜における炎症性サイトカインの上昇が、変形性膝関節症の疼痛メカニズムに深く関与する事がわかり、変形性膝関節症の膝関節痛は炎症性疼痛が主体である可能性が示唆された。

一方、DRG における ATF-3、GAP43、脊髄後角におけるマイクログリア、アストロサイトの発現については有意な変化を今回とらえられず、神経傷害性疼痛の関与に関しては言及できなかった。

3-2 マウス変形性膝関節症モデルの膝関節痛に対する抗 NGF 療法の効果の検討

全期間で CatWalk の上述 3 項目の患健比はコントロール群に比し無治療群は有意に減少し、治療群では有意に回復した。同様に全期間で全 FG 陽性細胞中の CGRP で二重標識される細胞の割合はコントロール群に比し無治療群は有意に上

昇し、治療群では有意に上昇が抑制された。(p<0.05)

以上より、抗 NGF 療法が変形性膝関節症に伴う膝関節痛に大して、鎮痛効果を期待できる事が示唆された。

4、 今後の課題

歩行解析結果に関して、今回、CatWalk によって確認し、本モデルにおける歩行の特徴を詳細に確認する事が出来た。しかし、この変化が膝関節痛に起因する変化なのか、変形性膝関節症による膝関節機能障害による物なのかを特定する事が最初の病態に関する研究では、困難であった。NGF 療法の研究では、変化の合った CatWalk の各パラメータは NGF 療法により改善を認め、これらの変化が膝関節痛に起因する物である可能性が高いと考えられるが、今後更なる検討が必要である。

病態の解明に関して、変形性膝関節症の膝関節痛には炎症性疼痛の要素の他に、神経因性疼痛の要素が混在している可能性がある事が近年の基礎研究で言及されている。本研究では支配感覚神経の評価では炎症性疼痛に関する分子の発現については、有意な発現上昇を認めたが、神経因性疼痛に関する分子の発現については、有意な変化をとらえられなかった。この一因として、評価数や評価方法など実験デザインに問題があった可能性も考えられるため、今後追試を含み、十分に調査をしていきたい。

抗 NGF 療法に関して、本研究では十分に抗 NGF 療法の効果を証明できたと考えているが、副作用の評価が不十分であった。今後、その点についても十分に評価をしていく必要性を感じている。

5、 研究成果の公表方法

現在、論文は英文にて執筆中であり、誌に提出予定である。

また、本研究の最終結果は運動器疼痛学会に演題提出予定である。

図1 歩行解析装置 (CatWalk)

ラットやマウスをガラスプレート上で自由歩行させ、ガラスプレート下部のカメラで観察し、様々なパラメータを解析する装置であり、従来運動機能評価のために使用されていたが、昨今疼痛に対する跛行を評価する目的でも使用されるようになってきている。

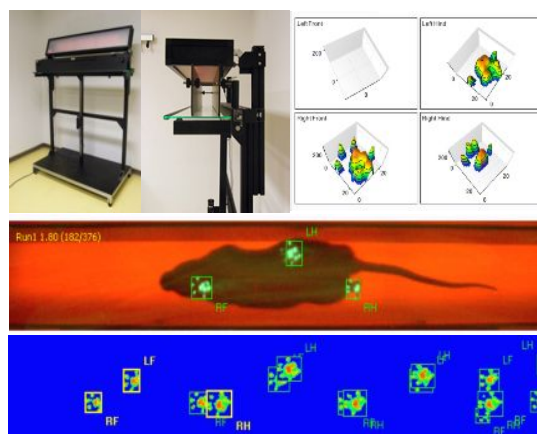


図2 マウス膝関節支配感覚神経 (DRG) における CGRP (炎症性疼痛ペプチド) の発現

上写真で黄色に蛍光する細胞が FG 陽性細胞であり、マウス膝関節を支配する DRG 細胞である。下写真で緑色に染色される細胞が CGRP 陽性細胞である。矢印は FG と CGRP で二重標識される細胞であり、マウス膝関節を支配し、CGRP を発現する細胞を意味する。

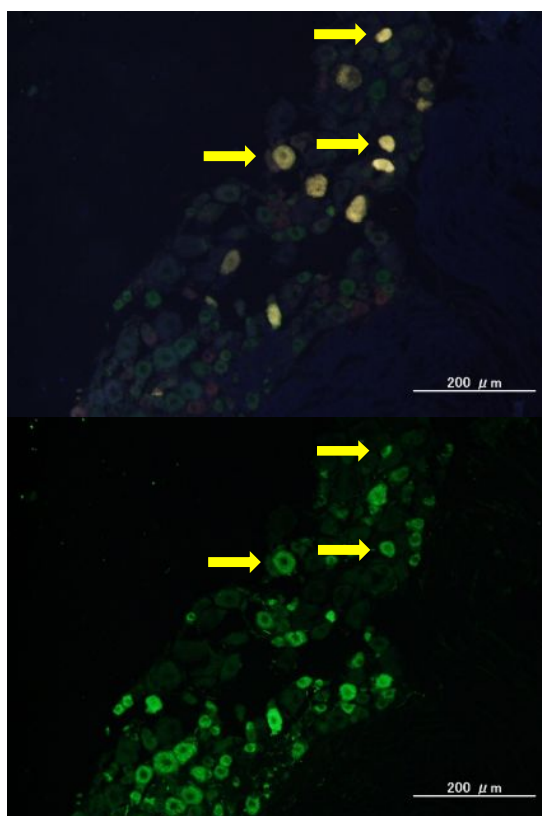


図3 マウス膝関節支配感覚神経 (DRG) における CGRP (炎症性疼痛ペプチド) の発現

上写真で黄色に蛍光する細胞が FG 陽性細胞であり、マウス膝関節を支配する DRG 細胞である。下写真で緑色に染色される細胞が CGRP 陽性細胞である。矢印は FG と CGRP で二重標識される細胞であり、マウス膝関節を支配し、CGRP を発現する細胞を意味する。