

【要約】

Evaluation of the vascular endothelial growth factor in the
degenerative intervertebral discs of rats with injured
intervertebral discs of the caudal vertebrae

(ラット尾椎椎間板傷害モデルを用いた変性椎間板における VEG 発現の検討)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：高橋和久教授)

佐藤 淳

【背景】椎間板性腰痛の一因として、変性椎間板内で上昇する炎症性サイトカインと椎間板内への自由神経終末の異常伸長が考えられている。過去の臨床試験より、椎間板性腰痛に対する抗炎症性サイトカイン療法が TNF- α 阻害薬、IL-6 阻害薬を用いて検討されたが、その効果は約 2-4 週であり十分とは言えない。血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) は血管新生に関わるタンパクであるが、マクロファージ系細胞の遊走・活性化を促し、炎症の難治化・遷延化を起こすとの報告や、神経の軸索伸長を促すとの報告がある。つまり炎症と神経伸長の両面を促す働きがあり、椎間板性腰痛に対するより効果的なターゲットになりうると考え、基礎実験、臨床試験を実施した。

【対象と方法】

1. ラット尾椎椎間板傷害モデルにおける VEGF の発現 :

尾椎椎間板傷害モデルとして 8 週齢雄 Sprague-Dawley ラットを Co5/6, Co6/7, Co7/8 に 26G 針を 10 回穿刺して作成し (n=32)、無処置群 (n=16) と比較した。処置日から 1 日、7 日、14 日、28 日後に椎間板の Hematoxylin-eosin(HE)染色による組織評価、VEGF の局所発現部位を調べるため DAB 染色を用いた免疫組織学的評価、ELISA 法での椎間板内の VEGF 発現の定量評価を行った。

2. ラット腰椎椎間板傷害疼痛モデルに対する、抗 VEGF 抗体の効果 :

8 週齢雄 Sprague-Dawley ラットを用い、腰椎椎間板傷害モデルを L5/6 椎間板 26G 針 10 回穿刺にて作成 (n=48)。これを抗 VEGF 抗体であるペガプタニブを椎間板投与したペガプタニブ群(n=24)と生食を投与した生食群(n=24)に分けた。コントロールとして開腹手術のみの sham 群(n=24)を作成した。この 3 群について、それぞれの L5/6 椎間板に逆行性神経トレーサーの Fluoro-Gold: FG を留置した。処置後、1 日、7 日、14 日、28 日後にラットを灌流固定し、L2DRG を両側で摘出した。L2DRG において FG 陽性細胞中 (椎間板支配感覚神経) の CGRP 陽性細胞 (炎症性疼痛のマーカー) の割合を比較した。3. 基礎研究を基にトランスレーショナルリサーチとして椎間板性腰痛患者に対する抗 VEGF 抗体椎間板内投与の効果に関する前向き試験 (臨床試験番号 UMIN000015611) を実施した : 当院に通院中の患者で保存治療に 3 か月以上抵抗性の慢性腰痛があり、MRI T2 強調画像にて Pfirrmann 分類 Grade3 以上の椎間板変性を認め、椎間板造影で再現痛、椎間板ブロックにて除痛が得られたものを慢性椎間板性腰痛と診断した。20 症例が対象となった。0.5%ブピバカイン 2ml 単独投与をしたコントロール群(n=10)と、ペガプタニブ 0.3mg と 0.5%ブピバカイン 2ml を投与したペガプタニブ群 (n=10) について比較検討した。評価項目として腰痛 VAS 値を投与前、投与後 1 日、1,2,3,4,6 週で調査した。また、血清サイトカイン値 (TNF- α , IL-6, VEGF) を投与前と投与後 2 週の時点で測定した。

【結果】 1. 穿刺椎間板の HE 染色による組織評価では、穿刺後 7 日目で炎症反応のピーク認め、28 日目まで変性は持続を認めた。VEGF の局所発現では VEGF は線維輪と髄核の両方に認められたが、線維輪で穿刺後 7 日目と 14 日目において無処置群に比べ VEGF の発現が増加している傾向にあった。特に終板軟骨と線維輪の移行部に強陽性の細胞が多い傾向

が認められた。VEGF の定量評価では、傷害後 1 日目に椎間板内の VEGF は最高値を示し、傷害から 28 日目まで無処置群値と比較し有意に上昇を認めた($P<0.05$)。2. L2DRG において生食群では sham 群に比較し 1 日から 14 日目で有意に CGRP 陽性細胞率が増加した($P<0.05$)。一方で生食群と比べペガプタニブ群では有意に CGRP 陽性細胞率が減少した($P<0.05$)。つまり、穿刺により上昇した CGRP 陽性細胞率はペガプタニブ投与により有意に抑制された($P<0.05$)。3. 対象患者の組成についてはコントロール群とペガプタニブ投与群において年齢、椎間板変性度に有意な差は認めなかった。腰痛 VAS 値は、ペガプタニブ群がコントロール群と比較し、投与後 2,3,4 週で有意に腰痛 VAS 値が低値となった($P<0.05$)。血清サイトカイン値については投与前と投与後でいずれのサイトカインも有意差を認めなかった。また本臨床試験において、明らかな有害事象は認めなかった。

【考察】椎間板性腰痛の原因として炎症と神経発芽があり、この両方を抑制することを本研究の目的とした。本研究では 1. 椎間板穿刺により椎間板内の VEGF が増加し、2. 支配神経の後根神経節にて炎症性ペプチドの CGRP が増加しており、3. VEGF の阻害でその炎症を抑制した。椎間板内への神経発芽の抑制は直接には証明できていないが、椎間板を支配する感覚神経の存在を証明した点、椎間板を支配する感覚神経の内、CGRP 陽性細胞は Nerve growth factors dependent であると報告されており、椎間板穿刺による CGRP 活性上昇は、NGF 活性の上昇、それに伴う神経発芽の可能性が高い点、VEGF 阻害薬が CGRP を抑制できたことは、結果として NGF 抑制、神経発芽の抑制を促している可能性が示唆された。過去のサイトカイン療法との比較では、TNF- α 、IL-6 阻害薬を使用した腰痛、膝関節に対する治験では、2-8 週の効果が認められている。しかしながら効果は一過性であり十分とは言えない。VEGF と同様に成長因子をターゲットにした治験は NGF があるが、副作用の点から臨床試験が中止となっている。VEGF は神経伸長にも深くかかわり、また安全性の高い薬剤と報告されている。本研究での効果は短期間の効果であったが、その機序から投与量・複数回投与に関する検討でより効果的な薬剤となる可能性が期待される。

本研究の limitation については、基礎研究については椎間板穿刺モデルは急性期組織傷害モデルであり、持続負荷がかかるような臨床に即した慢性変性のモデルではない。椎間板内の神経の異常伸長まで検討するには、今後、椎間板圧迫モデルの様な持続負荷のかかるモデルを使用する必要がある。また、基礎、臨床ともにいえるが VEGF 阻害薬の投与が 1dose で単回投与のみである。最後に臨床試験では症例数が少なく、あくまでもプレリミナリーな研究となっている。今後研究検討を進め、症例を増やして行う必要があると考える。

【結語】ラット椎間板傷害モデルにおいて、VEGF は髄核、線維輪に発現を認め、穿刺後 28 日まで高値を示した。VEGF 阻害薬の椎間板内投与は疼痛ペプチド発現を穿刺後 14 日まで抑制した。また臨床試験では、VEGF 阻害群は投与後 2,3,4 週で腰痛 VAS 値を軽減した。これらから、VEGF 阻害薬が椎間板性腰痛に対する新たな治療となる可能性が示唆された。