

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04969

研究課題名(和文) インフラマソームによる神経炎症を標的とした慢性痛の新規治療戦略

研究課題名(英文) Inflammasome mediated neuroinflammation as a novel target of chronic pain

研究代表者

天谷 文昌 (Fumimasa, Amaya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60347466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一次知覚神経のインフラマソーム活性化が神経炎症を引き起こして慢性痛が成立するとの仮説を検証した。

マウス慢性炎症モデルにおいて、インフラマソームを構成するNLRP2、カスパーゼ1の後根神経節における発現を定量したところ、NLRP2とカスパーゼ1活性の有意な上昇を認めた。カスパーゼ1阻害剤およびNLRP2 siRNAの髄腔内投与により、慢性炎症時の痛覚過敏は緩和された。これらの所見より、後根神経節におけるインフラマソームの活性化が慢性炎症時の痛覚過敏成立に関与することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the hypothesis that activation of inflammasome in the DRG contributes to the development of chronic pain hypersensitivity. NLRP2 expression and caspase1 activity was measured in DRG of chronic inflammation model mouse. Both NLRP2 expression and caspase1 activity was increased by chronic inflammation. Caspase1 inhibitor and NLRP2 siRNA reduced pain hypersensitivity during chronic inflammation. These results demonstrated that NLRP2 inflammasome in the DRG contributes to the development of chronic inflammatory pain hypersensitivity.

研究分野：疼痛治療

キーワード：インフラマソーム 神経炎症 痛覚過敏 後根神経節

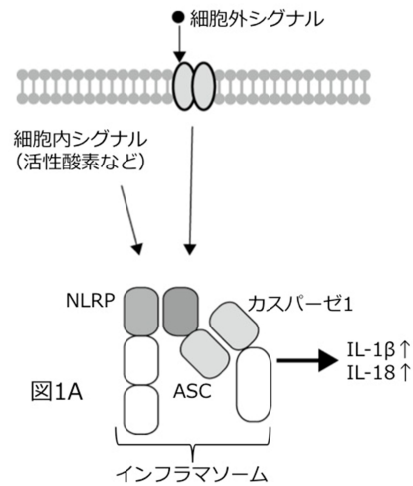
## 1. 研究開始当初の背景

慢性痛は患者のQOLを低下させ大きな社会的損失を引き起こす。その多くは難治性であり、有効な治療法を開発するには、様々な疾患に続発する慢性痛の病態を統一的に理解する必要がある。痛みの慢性化と神経組織の炎症反応には密接な関係がある。われわれは、一次知覚神経に炎症をおこすことで神経障害性痛が生じること、炎症性サイトカインであるIL-1が一次知覚神経に作用して痛覚過敏を惹起すること、一次知覚神経の損傷により後根神経節で合成される炎症惹起物質HMGB1が神経障害性痛の原因となること、TNF- $\alpha$ が転写因子C/EBP $\beta$ を制御して一次知覚神経の興奮性を亢進させることなど、一次知覚神経の炎症反応が慢性痛を誘発する事実を明らかにしてきた。一方で、神経損傷、糖尿病、手術、ガン化学療法など、慢性痛を引き起こす原因は様々であるにもかかわらず、知覚神経には炎症反応という共通した現象が生じることを統合的に説明しうるメカニズムは発見されていない。

炎症反応はToll like receptor (TLR)やNod Like receptor (NLR)などパターン認識受容体が病的シグナルを受容することを起点として生じる。NLRは細胞内に存在し、病的シグナルによりアダプタータンパクASCおよびカスパーゼ1とインフラマソームと呼ばれる複合体を形成し、IL-1やIL-18を活性化することで炎症反応を惹起する(図)。

近年、酸化ストレス環境下に活性酸素がインフラマソームを誘導し、炎症反応を惹起して慢性疾患の成立に関わることが明らかにされている。多くのNLRファミリーの中で、神経組織ではNLRP1、2、3によるインフラマソ

ームが神経炎症を引き起こし、アルツハイマー病や脊髄損傷後の神経細胞死の原因となることが示されている。



## 2. 研究の目的

本研究では、一次知覚神経に生じたインフラマソームの活性化が神経炎症を引き起こして慢性痛が成立するとの仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 一次知覚神経におけるインフラマソームの発現を明らかにする。

マウス後根神経節を採取して免疫組織化学法によりNLRP2陽性細胞の発現を明らかにする。同様にASCとカスパーゼ1の発現も明らかにする。

### (2) 慢性痛モデルにおいてインフラマソームが形成されることを確認する。

マウス足底にcomplete Freund's Adjuvant (CFA)を投与し炎症を作成、後根神経節におけるNLRP2の発現を免疫組織化学法、リアルタイムPCR、ウェスタンブロッティングにより定量する。ASCやカスパーゼ1についても同様の検討を行う。キットを用いてカスパーゼ1活性を測定する。また、IL-1の発現をウェスタンブロッティングや免疫組織化学

法により定量化する。CFA 以外の炎症モデルにおいても同様の解析を行う。

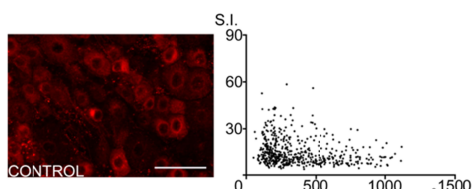
(3)インフラマソームを阻害することで痛覚過敏が抑制されるか明らかにする。

マウスに髄腔内カテーテルを留置し、NLRP2 siRNA を投与、遺伝子干渉法により NLRP2 の発現を減弱させることでインフラマソームを阻害し、CFA モデルにおける痛覚過敏が抑制されるか明らかにする。カスパーゼ1 阻害剤についても同様の検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1)一次知覚神経におけるインフラマソームの発現を明らかにする。

マウス後根神経節における NLRP2 の発現を免疫組織化学法を用いて同定した。NLRP2 は知覚神経の細胞体に限局して発現が認められた。シグナル強度と細胞体の大きさの関係を解析すると、NLRP2 は痛覚伝達に働くといわ

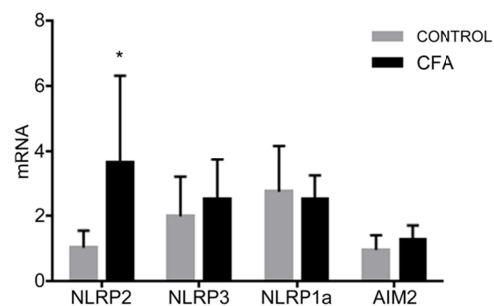


れる小型細胞に発現が多く認められた(図)。同様に、後根神経節における ASC 及びカスパーゼ1 の発現を解析した。ASC およびカスパーゼ1 も知覚神経に認められた。これらの所見から、一次知覚神経にはインフラマソームを構成するために必要なタンパクが発現していることが明らかにされた。

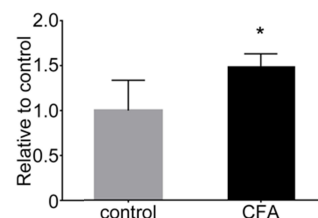
(2)慢性痛モデルにおいてインフラマソームが形成されることを確認する。

マウス足底に CFA を投与し慢性炎症モデルを作成した。後根神経節を採取して NLRP2 を含む種々の Nod like receptor の発現をリアル

タイム PCR を用いて定量化した。その結果、NLRP2 の発現が慢性炎症モデルにおいて有意



に増加していることが明らかとなった(図)。また、後根神経節におけるカスパーゼ1 の活性化型であるプロカスパーゼ1 の発現量やカスパーゼ1 活性を測定したところ、いずれも



CFA モデルで有意な上昇が認められた(図)。次に、脂質メディエーターであるセラミドの足底投与により炎症を惹起させたマウス後根神経節における NLRP2 の発現とカスパーゼ1 活性を測定した。その結果、セラミド炎症モデルにおいても、NLRP2 の発現増加とカスパーゼ1 活性の上昇が生じていることが明らかとなった。

(3)インフラマソームを阻害することで痛覚過敏が抑制されるか明らかにする。

##### カスパーゼ1 阻害剤の効果

マウスにカスパーゼ1 阻害剤を髄腔内投与し、CFA 炎症モデルを作成、行動解析により痛覚過敏の程度を調査した。機械的刺激に対する逃避閾値は CFA 投与により低下したが、カスパーゼ1 阻害剤を投与したマウスでは対照群に比べて逃避閾値は高く、痛覚過敏が减弱していることが示された。

遺伝子干渉法による NLRP2 阻害の効果  
マウスに NLRP2 siRNA を髄腔内投与し、CFA 炎症モデル作成、行動解析を行い、痛覚過敏の程度をスクランブル配列の siRNA を投与したマウスと比較した。機械刺激に対する逃避閾値は CFA 投与後に低下したが、その値はスクランブル配列の siRNA を投与したマウスよりも有意に NLRP2 siRNA を投与したマウスで高く、痛覚過敏が緩和されていることが示された。

セラミド投与モデルでも同様に、NLRP2 siRNA 投与マウスの痛覚閾値はスクランブル siRNA 投与マウスよりも高かった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Yamakita S, Horii Y, Takemura H, Matsuoka Y, Yamashita A, Yamaguchi Y, Matsuda M, Sawa T, Amaya F. Synergistic activation of ERK1/2 between A-fiber neurons and glial cells in the DRG contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. Mol Pain. 2018 in press. (査読有)

(2) Oh-Hashi K, Sugiura N, Amaya F, Isobe KI, Hirata Y. Functional validation of ATF4 and GADD34 in Neuro2a cells by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Mol Cell Biochem. 440: 65-75, 2018 (査読有)

(3) Yamakita S, Matsuda M, Yamaguchi Y, Sawa T, Amaya F. Dexmedetomidine prolongs levobupivacaine analgesia via inhibition

of inflammation and p38 MAPK phosphorylation in rat dorsal root ganglion. Neuroscience. 361: 58-68, 2017.

(査読有)

(4) Matsuda M, Oh-Hashi K, Yokota I, Sawa T, Amaya F. Acquired Exchange Protein Directly Activated by Cyclic Adenosine Monophosphate Activity Induced by p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Primary Afferent Neurons Contributes to Sustaining Postincisional Nociception. Anesthesiology. 126: 150-162, 2017. (査読有)

(5) Norisada J, Hirata Y, Amaya F, Kiuchi K and Oh-hashii K. A Comparative Analysis of the Molecular Features of MANF and CDFN. PLoS One. 11: e0146923, 2016. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

(1) Takemura H, Matsuda M, Amaya F. Endogenous cannabinoids contribute to the resolution of incisional pain. Annual meeting of Society for Neuroscience 2017. 2017 November 11-15; Washington DC, USA

(2) Matsuoka Y, Amaya F. Expression of NLRP2 in the DRG and its regulation during inflammatory hyperalgesia. Annual meeting of Society for Neuroscience 2017. 2017 November 11-15; Washington DC, USA

(3) Matsuoka Y, Oh-Hashi K, Amaya F. Increased caspase1 activity in the DRG during inflammatory hyperalgesia. Annual meeting of Society for Neuroscience 2016. 2016 November 12-16; San Diego, USA

(4) Matsuda M, Amaya F. EPAC is responsive

for the exacerbation of the injury-induced pain hypersensitivity after the second surgery. Annual meeting of Society for Neuroscience 2016. 2016 November 12-16; San Diego, USA

## **6 . 研究組織**

### (1)研究代表者

天谷 文昌 (Amaya Fumimasa)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60347466

### (2)研究分担者

大橋 憲太郎 (Oh-hashii Kentaro)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50332953

佐和 貞治 (Sawa Teiji)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10206013