

令和元年6月13日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09003

研究課題名(和文) 損傷末梢神経支配髄節に特異的な脊髄血管変化が関与する疼痛形成機序の解明

研究課題名(英文) Peripheral nerve injury induced changes of neuro-glia-vascular unit in the spinal cord

研究代表者

小林 希実子 (KOBAYASHI, KIMIKO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：70418961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経を損傷すると神経障害性疼痛が発生するが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。脊髄後角では直接的な傷害が無いにもかかわらず損傷された末梢神経の支配髄節特異的な血管内皮細胞においていくつかの分子発現変化を発見した。この発現変化には活性化マクログリアや損傷されたDRG由来の分子が関与していることがわかった。また血管内皮細胞の変化は疼痛発生機序の一因となっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで報告されてきた、neuron-neuron、glia-neuronによる神経障害性疼痛の発生機序以外に、マクログリア-血管-neuronの相互連関が神経障害性疼痛発生メカニズムの存在について提唱する。神経系以外の細胞である血管の細胞から放出される疼痛物質について着目し、研究を進めることが特色である。細胞相互の複雑な連関を解明することで神経障害性疼痛の新たなメカニズムを明らかにできる可能性がある。そのため予想されるこれらの結果は、難治性疼痛の発生を予防する新たな治療ターゲット分子の発見につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve injury may induce neuropathic pain with intense allodynia and hyperalgesia. We found the novel mechanism of neuropathic pain, especially interaction between spinal microglia - vascular endothelial cell - neuron. DRG-derived and activated microglia-derived molecules affected vascular endothelial cells. It has been suggested that changes in vascular endothelial cells contribute to the development of neuropathic pain.

研究分野：神経解剖学 疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛 後根神経節(DRG) 脊髄後角 血管内皮細胞 マクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は末梢神経系、あるいは中枢神経系の障害によって発症し、自発痛・熱痛覚過敏・触刺激によって激痛を生ずる異痛症を主症状とする。古くから神経因性疼痛の発症メカニズムは神経切断による損傷発火に代表される末梢神経系の感作や、それに伴う中枢神経系ニューロンの可塑的变化が主な要因であると考えられてきた。

近年、末梢神経損傷による脊髄マイクログリアの活性化が神経障害後に様々な変化をおこすことが明らかとなってきた(Milligan ED et. al. Nat Rev Neurosci. 2009, 10.)。我々もマイクログリアが神経障害性疼痛を引き起こす一因となっていることを多数報告している。その一部として、末梢神経損傷後にマイクログリアで増加する P2Y 受容体や脂質メディエーターであるロイコトリエンやプロスタグランジンの合成酵素、PAF の増加が神経障害性疼痛発生に関わること (Kobayashi et. al. J.Neurosci 2008; Kobayashi et. al. Glia, 2012; Okubo et. al. Glia, 2010; Okubo et. al. Mol. Pain, 2012; Kanda et. al, Glia 2013)を報告し、microglia の変化が脊髄ニューロンの興奮性に与える事を明らかにしてきた。

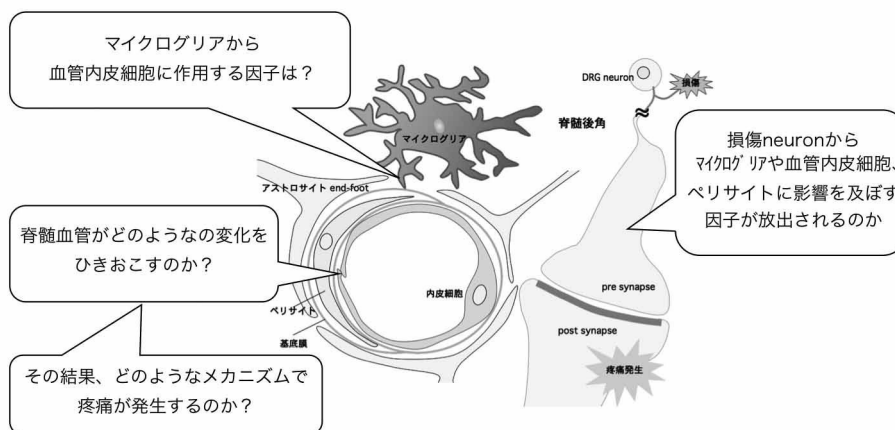
マイクログリアが脊髄後角 neuron に作用し、neuron の興奮性が上昇することで神経障害性疼痛の発症機序となりうることに以外に、我々はマイクログリアが血管に作用することでも疼痛発生に関与する可能性があることをプレリミナリーな実験結果より導き出した。それは末梢神経損傷後に炎症性サイトカインのひとつである TNF alpha が損傷後 24 時間をピークにマイクログリアで発現増加することで、脊髄血管内皮細胞に発現している TNF $\alpha$  受容体の TNFR1、R2 に作用しそのシグナルを介して Cox2 や PGI 合成酵素が増加した結果、脊髄後角に発現する PGI2 受容体である IP 受容体をもつ neuron が疼痛発生機序にかかわっているのではないかとこの仮説である。これらのことから、活性化マイクログリアは神経障害後に多様な反応を示す (Neuron-glia interaction) のみならず、neurovascular unit を介したメカニズムが神経障害性疼痛発生に関与する可能性があるため、マイクログリア-血管-neuron の連関メカニズムが神経障害性疼痛を発生させているのではないかと考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は末梢神経損傷後の脊髄後角におけるグリア-血管-neuron の連関による神経障害性疼痛増悪メカニズムを解明することである。

- (1) 末梢神経損傷後の損傷 DRG ニューロンや脊髄マイクログリアが Neurovascular unit に作用しうるか。
- (2) 血管内皮細胞が脊髄後角 neuron へ影響する因子の同定、
- (3) 血管内皮 tight junction 構成分子発現低下による血漿成分漏出による神経系への干渉の可能性

を示す事で、神経障害性疼痛の形成には Neurovascular unit の変調という多種類の細胞の連関を明らかにすることを目的とした。



## 3. 研究の方法

本研究では、損傷 DRG と脊髄後角のマイクログリア-血管-脊髄 neuron に着目し神経障害性疼痛発生過程を時間的・空間的に解析するため主に in vivo の系で実験を行った。神経障害性疼痛モデルはラットを使用し、坐骨神経の枝である総腓骨神経と脛骨神経を結紮し切断した Spared nerve injury(SNI)モデルを用いた。各タイムコースで後根神経節(DRG)と坐骨神経の節である脊髄 L4-5 を取り出した。mRNA の発現変化を調べるときには取り出したサンプルを -80 で保存後、ISOGEN を使用してそれぞれの組織の total RNA を抽出し、cDNA を作製した。この cDNA を元に、様々な合成酵素、受容体、血管内皮細胞に存在すると思われる分子のクローニングを行い in situ hybridization

histochemistry (ISHH)に使用する plasmid を作製した。sequence 配列を確認後、この plasmid 作製に用いた primer を半定量的 RT-PCR 法に使用したため、得られたバンドは非特異的な遺伝子の増幅ではないことを証明できると考える。作製した plasmid を制限酵素切断し、逆転写酵素を用いて放射線同位体(RI)ラベルされた 35S-UTP を用いて cDNA を作製し、ISHH に使用した。RI-ISHH 法は DIG ISH 法などの non-RI 法と比較しても高感度で検出できるという特性があるため、これまで発現細胞が同定できていなかった分子も検出が可能であった。また、RI-ISHH と免疫組織化学法にて二重染色を行い発現細胞の種類を同定した。さらに、タンパク質の局在を検討するため灌流固定サンプルを用いて免疫組織化学法を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 損傷 DRG neuron や活性化マイクログリアから内皮細胞に作用する因子の探索。

我々は末梢神経損傷後に TNF alpha が損傷後 24 時間をピークにマイクログリアで発現増加することで、脊髄血管内皮細胞に発現している TNF $\alpha$  受容体の TNFR1、R2 に作用しそのシグナルを介して Cox2 や PGI 合成酵素が増加した結果、脊髄後角に発現する PGI2 受容体である IP 受容体をもつ neuron が疼痛発生機序にかかわっていることを明らかにした。末梢神経損傷後では血管内皮細胞において PGI 合成酵素によりプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)が合成され、neuron に発現する IP 受容体に対して作用することが考えられたため、Cox2 阻害薬や IP 受容体拮抗薬を髄腔内投与すると疼痛行動が抑制された(Kanda et. al, 2017 eNeuro)。

また、TNF の他にも血管に作用しうる因子として血管透過性を亢進させる因子として有名な因子(VEGF、PDGF、サイトカイン、ケモカイン)を中心に、半定量的 RT-PCR 法により発現変化を詳細に検討した。その結果、末梢神経損傷後の DRG や脊髄後角で増加するリガンドを複数検出することができた。発現変化のあった分子を RI-ISHH 法にて DRG と脊髄で検出し、発現細胞の同定を行った。

##### (2) 血管内皮細胞が脊髄後角 neuron へ影響する因子の同定。

末梢神経損傷後 24 時間から 48 時間にかけて脊髄の損傷側の血管内皮細胞で COX2、PGIS 共に有意に増加が見られたことやまた PGIS の代謝産物である PGI<sub>2</sub> の受容体の IP 受容体は naive rat では脊髄後角 neuron に発現が見られるという結果から、PGI<sub>2</sub> 以外の脂質メディエーターの関与も考えられたため他のプロスタグランジン合成酵素についても検討を行った。すでにトロンボキサン A<sub>2</sub> や PGD<sub>2</sub> 合成酵素の発現については報告しているが、これらは血管内皮細胞には発現が見られなかった。PGE<sub>2</sub> 合成酵素である mPGES1、mPGES2、cPGES について検討を行ったところ、この中の 1 分子が血管内皮細胞において Cox2 と同様の発現変化を示していた。また Cox2 の受容体である EP 受容体ファミリーについても発現細胞を同定したところ、neuron においても発現が見られたため PGI<sub>2</sub> 以外で PGE<sub>2</sub> も内皮細胞-neuron の作用があると考えられる。PGI<sub>2</sub> や PGE<sub>2</sub> に関連する分子の発現変化は損傷後 1 週間以内のイベントであり、損傷後 1 週間以上後では naive レベルに戻るため、損傷初期には NSAIDs が有効であるが、持続する神経障害性疼痛に NSAIDs が効かない理由も説明できると考える。また、これら分子の他に内皮細胞で発現変化する受容体も明らかにしており、現在論文執筆中である。

##### (3) 血管内皮 tight junction 構成分子発現低下による血漿成分の神経系への干渉の可能性。

血液脳関門を構成する血管内皮細胞では tight junction が形成され、この tight junction は claudin や VE-cadherin などが発現し、機能することで血管からの漏出を抑制している。末梢神経損傷モデルにおいて直接障害されていない脊髄後角でこの tight junction が機能できなくなる可能性がある。そのため、末梢神経損傷後の claudin、ZO1、VE-cadherin などの発現変化を検討した。まずは半定量的 RT-PCR を脊髄後角のみのサンプルで行い、発現変化をみたところ、いくつかの分子の減少が見られた。そのため、抗体を購入し、タンパク質の発現細胞の同定と局在について検討を行った。しかしながら通常我々の研究室で行っている方法ではこれらの抗体で染色できず、その染色条件検討に時間を要した。また各種血管マーカーと二重免疫組織化学法を行い共焦点レーザー顕微鏡を用いてスタック画像を撮影し、3D 構築を行い詳細な血管内皮細胞での発現変化を観察したところ、これら tight junction 分子の一部は血管内皮細胞で発現しているのみならず、脊髄後角の他の部位での発現変化がみられたものがあった。

##### (4) 末梢神経損傷後の脊髄における血管透過性亢進。

tight junction 分子の発現変化を受けて、末梢神経損傷後のラット脊髄後角において、血管からの漏出が起こるかを検討するため、ビオチン化 anti rat IgG を使用して免疫組織化学法を行った。その結果、脊髄において陽性像の増加が見られたことから、rat IgG 以外にも何らかの分子が漏出している可能性が示唆された。

以上の結果から、末梢神経損傷により損傷 DRG neuron や脊髄後角マイクログリア由来の物質が増加し、それらが血管に存在する細胞に影響を与え、さらにその細胞群から様々なタンパク質が発現変化し、その結果神経障害性疼痛発症の一因になっていることが示唆された。これらの結果を基に現在論文作成を行っている。

< 引用文献 >

- Kanda, H., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Okubo, M., & Noguchi, K. (2017). Microglial TNFalpha Induces COX2 and PGI2 Synthase Expression in Spinal Endothelial Cells during Neuropathic Pain. *eNeuro*, 4(2). doi:10.1523/ENEURO.0064-17.2017
- Kanda, H., Kobayashi, K., Yamanaka, H., & Noguchi, K. (2013). COX-1-dependent prostaglandin D2 in microglia contributes to neuropathic pain via DP2 receptor in spinal neurons. *Glia*, 61(6), 943-956.
- Okubo, M., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Kanda, H., Dai, Y., & Noguchi, K. (2012). Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Mol Pain*, 8, 8. doi:10.1186/1744-8069-8-8
- Kobayashi, K., Yamanaka, H., Yanamoto, F., Okubo, M., & Noguchi, K. (2012). Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*, 60(10), 1529-1539. doi:10.1002/glia.22373
- Okubo, M., Yamanaka, H., Kobayashi, K., & Noguchi, K. (2010). Leukotriene synthases and the receptors induced by peripheral nerve injury in the spinal cord contribute to the generation of neuropathic pain. *Glia*, 58(5), 599-610. doi:10.1002/glia.20948
- Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K., & Noguchi, K. (2008). P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J Neurosci*, 28(11), 2892-2902.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- Kanda, H., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Okubo, M., & Noguchi, K. (2017). Microglial TNFalpha Induces COX2 and PGI2 Synthase Expression in Spinal Endothelial Cells during Neuropathic Pain. *eNeuro*, 4(2). doi:10.1523/ENEURO.0064-17.2017

〔学会発表〕(計 2 件)

- Kobayashi Kimiko, Kanda Hirosato, Yamanaka Hiroki, Okubo Masamichi, Noguchi Koichi. Expression of the PGE2 synthases and receptors in spinal cord following peripheral nerve injury. (General Lecture) 16th World Congress on Pain 2016.9 Yokohama

小林 希実子、神田 浩里、山中 博樹、大久保 正道、野口 光一、末梢神経損傷後のラット脊髄における PGE2 合成酵素と EP 受容体の発現変化、(一般)、第 39 回日本神経科学大会 2016.7 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。