

令和元年6月20日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16736

研究課題名(和文) 神経因性疼痛モデル脊髄前角と後角で異なるマイクログリアの反応：神経保護性と傷害性

研究課題名(英文) Activation of microglia after sciatic nerve injury

研究代表者

西原 佑 (Nishihara, Tasuku)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50568912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：マイクログリア(MG)の脊髄前角と後角MGの働きの違いを比較検討した。免疫組織化学では、前角の活性化MGは神経を取り巻くsynaptic strippingを認め、ファゴソーム内にはSynaptophysinが認められた。一方、後角の活性化MGはCD68を発現し、神経ではなくミエリンに接し、そのファゴソーム内にはMBPが認められた。RT-PCRによる解析では、ミエリンマーカーでの発現は後角で減少傾向であったが、前角・後角ともに神経シナプスのマーカーには有意な変化を認めなかった。以上より、神経傷害時の活性化MGは、前角より後角で貪食性であり、貪食ターゲットが異な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、脊髄後角でのマイクログリアの活性化に注目が集まり、痛みとの関連が広く研究されてきた。これにより、疼痛管理における治療戦略が今後大きく変わる可能性が出てきている。疼痛との関連を研究するにあたり、脊髄後角は特に感覚神経の通り道であるため、非常に重要な部位である。一方、脊髄前角は運動神経の通り道の一つである。強い末梢神経傷害では運動麻痺が見られるが、末梢神経傷害部位以降の麻痺は簡単に観察されるが、脊髄でのマイクログリアの反応に注目した研究は無かった。この研究により、末梢神経傷害時の疼痛だけではなく、運動神経麻痺つまり運動神経機能にも着目が集まる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Activation of microglia in the posterior horn of the lumbar cord has been well investigated as one of the critical causes for the neuropathic pain after peripheral nerve injury. However, activation of microglia is observed also in the anterior horn. In this study, we report the differential activation modes of microglia in anterior horn and posterior horn. Microglia in the anterior horn tightly surrounded motoneurons, however reduction of synaptic proteins was not evident, suggesting engagement in synaptic stripping. On the other hand, microglia in the posterior horn showed amoeboid morphology and attached to myelin sheaths rather than neurons. Immunoreactivity of myelin basic protein was found in phagosomes of activated microglia in the posterior horn, indicating that the phagocytic removal of myelin. These data may clarify the pathogenesis of the different symptoms in motor and sensory functions after peripheral nerve injuries.

研究分野：神経免疫

キーワード：マイクログリア シナプティックストリッピング ミエリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛において、マイクログリア(MG)の脊髄後角における活性化が関与している。これまでの我々の先行研究では、坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルにおいて、MG は後角のみならず前角でも活性化していた。前角での活性化様式は後角のものとは異なっており、後角のMG はアメーバ状の活性化を示すのに対し、前角のMG は神経細胞周囲を取り囲むような活性化を起こしていた。

これまで末梢神経傷害における脊髄後角のMGの活性化は、神経因性疼痛の発症や持続と関係しているとして研究の対象となってきた。多くの研究によって、疼痛時のMGの働きやメカニズムが徐々に解明されてきた。しかしながら、前角におけるMGはこれまで取り上げられることは無かった。

2. 研究の目的

前角と後角のMGの活性化の違いに着目し、前角と後角での免疫反応性の違いを解明する。それぞれの部位におけるMGの働きにどのような違いがあるのかを調べ、それらの病態生理学的意義から、新たな分子標的薬開発の可能性を模索する。

3. 研究の方法

生後8週雄性Wisterラットを用い、慢性神経因性疼痛のモデルとしてすでに確立されている、坐骨神経におけるchronic constriction injury (CCI) モデルを作成した。CCIでは術後3日頃から顕著に疼痛刺激に対する回避行動が認められ始めるが、同様にMGの形態学的活性化も48時間以降に認められ始める。このMGの活性化は坐骨神経が脊髄へと入った、ある一定の分節(腰髄)のみでしか観察されない。そこで、MGの活性化および疼痛に対する回避行動が認められる術後7日目で脊髄を取り出し、坐骨神経の入る腰髄レベルの脊髄分節を健常側前角(Right anterior horn=RAH)、健常側後角(Right posterior horn=RPH)、傷害側前角(Left anterior horn=LAH)、傷害側後角(Left posterior horn=LPH)の4分画に分割し、それぞれをreal time RT-PCRおよびWestern blottingのサンプルとした。また、術後7日目にパラホルムアルデヒドで組織を還流固定し、腰髄を摘出し、Immunohistochemistryのサンプルとした。

4. 研究成果

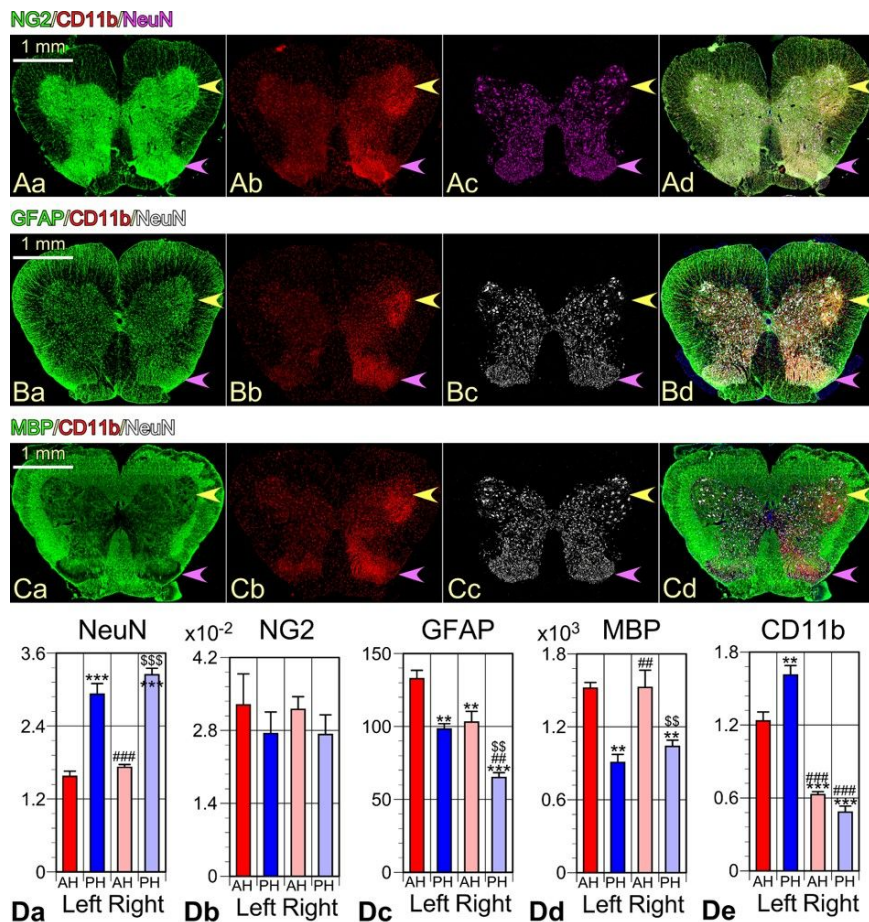


図1：腰髄レベルでのCCI7日後の各グリアの反応

NG2 グリア (オリゴデンドロサイト前駆細胞)(NG2)、アストロサイト (GFAP)、オリゴデンドロサイト (ミエリン)(MBP)、マイクログリア (CD11b) の反応。マイクログリアおよびアストロサイトは、その他のグリアに比べ、CCIにより活性化を認めた。

Immunohistochemistry、real time RT-PCR といった方法を用い、神経傷害時における脊髄において各グリアの反応を観察したところ、アストロサイト (GFAP) とマイクログリア (CD11b) で顕著に活性化している様子が観察された (図 1)。

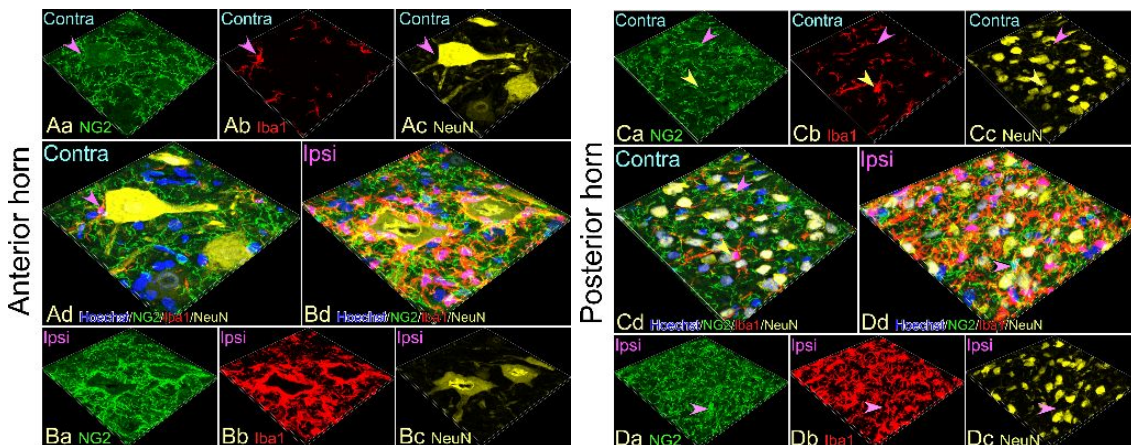


図 2：腰髄レベルにおける前角・後角のマイクログリアの活性化

前角における活性化マイクログリア (Iba1) は **Immunoreactivity** の低い (薄い黄色) 神経 (NeuN) の周囲を囲むような形態を示しており、その細胞膜表面には **NG2** の発現を認めている。一方で、後角におけるマイクログリアはアメーバ状の活性化を示しており、**NG2** の発現は認められない。

次に前角と後角におけるmMGの活性化を Immunohistochemistry により、強拡大で顕微鏡観察を行った。前角の活性化型 MG は神経細胞周囲を取り囲むような形で活性化しており、Synaptic stripping を起こしていた。また NG2 プロテオグリカン (NG2) を発現していた。一方後角では、活性化 MG はアメーバ状に活性化しており、Synaptic stripping は認められなかった。さらに、後角の活性化 MG には NG2 の発現がごく一部にのみしか認められず、ほとんどの活性化 MG に NG2 の発現は認められなかった (図 2)。

さらに詳しく前角と後角の MG の観察を行った。前角の MG はその細胞質に貪食のマーカ (ライソソーム) である CD68 の発現が認められた。MG は貪食を行った物質をそのライソソームで分解するが、この CD68 とシナプス蛋白マーカの一つであるシナプトフィジンが共発現しており、MG がシナプスを取り込んでいることが示唆された (図 3)。

一方、後角における MG についても同様の観察を行った。前角の MG と比較し、CD68 の発現は同様に観察されるものの、シナプス蛋白の取り込みは観察されなかった。しかしながら、ミエリン蛋白マーカの一つである MBP が CD68 と共発現しており、後角の MG は神経よりもミエリンを貪食のターゲットとしていることが示唆された (図 4)。

それぞれ、前述した 4 分画に分け、それらを real time RT-PCR および Western Blotting のサンプルとし、それぞれの分画での MG の活性化や貪食能、シナプス蛋白の

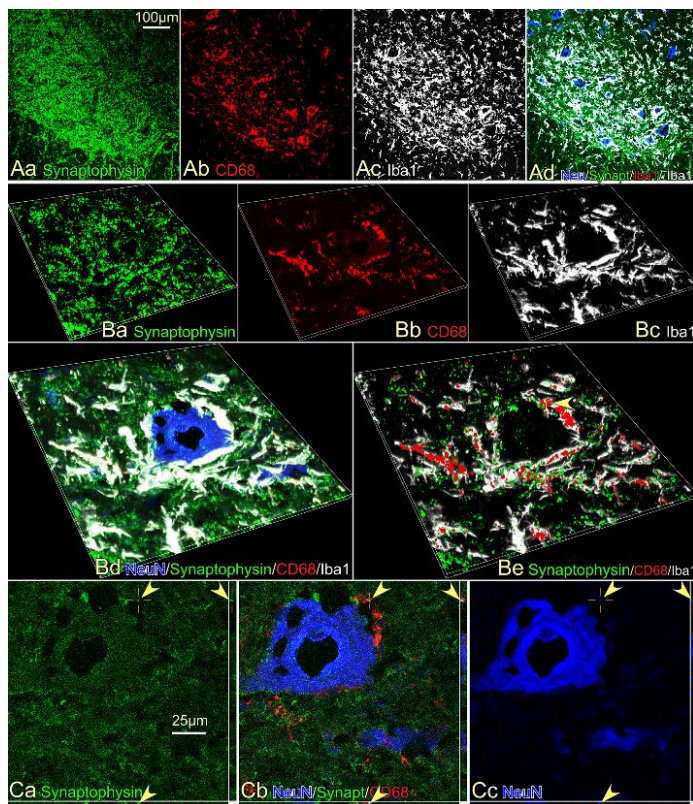


図 3：前角におけるマイクログリアの働き

前角における活性化マイクログリアは神経の周囲を取り囲み、その細胞質には貪食マーカ (ライソソーム) である **CD68** を発現している。その発現には、シナプスのタンパクであるシナプトフィジンの発現が認められており、シナプスタンパクの取り込みが示唆される。

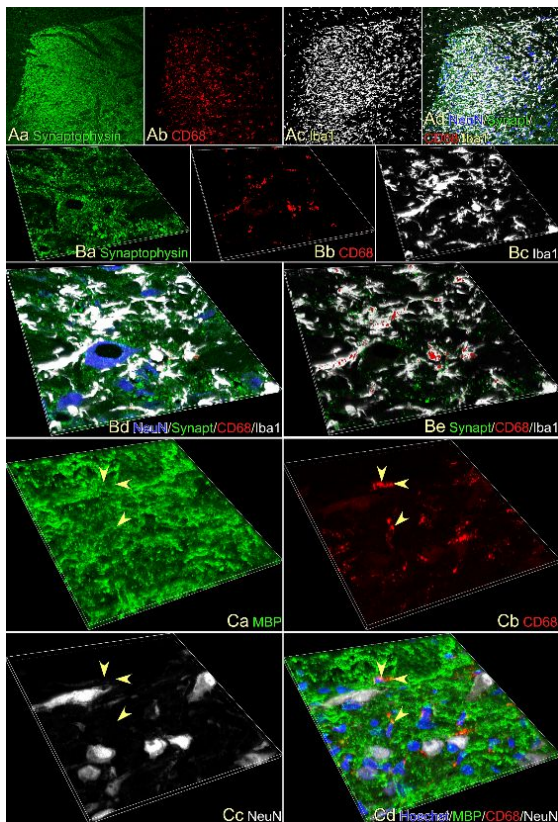


図 4 : 後角におけるマイクログリアの働き
 後角の MG は、CD68 の発現は確認されるものの、シナプス蛋白の取り込みは観察されなかった。しかしながら、ミエリン蛋白マーカーの一つである MBP が CD68 と共発現しており、神経よりもミエリンを貪食のターゲットとしていることが示唆された。

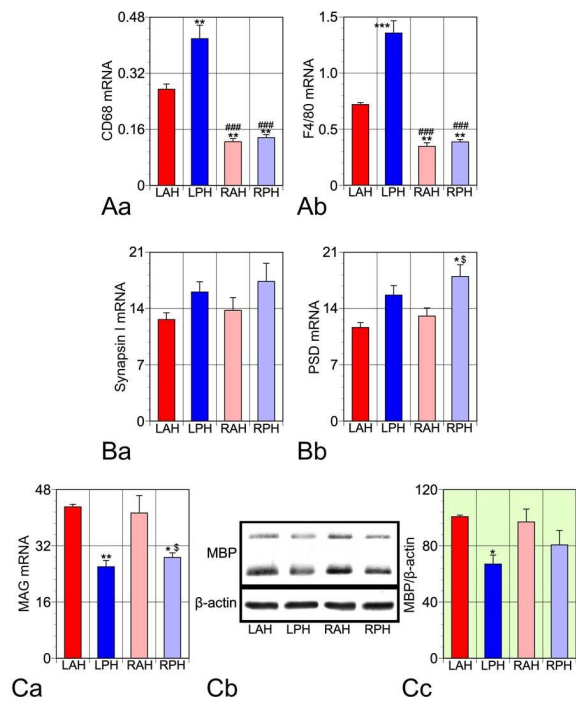


図 5 : 前角および後角におけるシナプス蛋白、ミエリン蛋白の発現の違い

傷害側では、健常側に比べ **CD68** の発現や **F4/80** の発現が有意に高く、特に後角で顕著であった。シナプス蛋白の一つであるシナプシン **I** や **PSD** の mRNA の発現は **CCI** による変化は認めなかった。**MBP** は、傷害側後角で有意に減少していた。前角の **MG** よりも後角の **MG** の方がより貪食性であることが示唆された。

発現変化、ミエリン蛋白の発現変化を調べた。傷害側では、健常側に比べ **CD68** の発現や **F4/80** の mRNA 発現が有意に高く、特に後角で顕著であった (図 5Aa, Ab)。シナプス蛋白の一つであるシナプシン **I** や **PSD** の mRNA の発現は **CCI** による変化は認めなかった (図 5Ba, Bb)。**MBP** は、傷害側後角で有意に減少していた (図 5Ca, Cb, Cc)。前角の **MG** よりも後角の **MG** の方がより貪食性であることが示唆された。

これらのデータから、前角と後角では MG の活性化様式が異なり、その働きが異なることが示唆された。前角では Immunoreactivity の低い弱った神経の周囲を取り囲み、Synaptic stripping を呈していることから、神経の保護に働く可能性がある。一方で後角では前角に比べより貪食性であり、そのターゲットは神経やシナプスよりもミエリンであることが示唆された。脊髄後角では主に感覚神経が走行しているのに対し、前角では主に運動神経が走行している。MG のこれらの活性化や働きの違いは、末梢神経傷害時の異なる症状を反映するのかもしれない。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Carbon monoxide poisoning-induced delayed encephalopathy accompanies decreased microglial cell numbers: Distinctive pathophysiological features from hypoxemia-induced brain damage

Sekiya K, Nishihara T*, Abe N, Konishi A, Nandate H, Hamada T, Ikemune K, Takasaki Y, Tanaka J, Asano M, Yorozuya T

Brain Research 2019 May 1;1710:22-32. 査読有

Comparison of the detrimental features of microglia and infiltrated macrophages in traumatic brain injury: a study using a hypnotic bromovalerylurea

Abe N, Choudhury ME, Watanabe M, Kawasaki S, Nishihara T, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Yoshiaki Kumon Y, Yorozuya T, Tanaka J*

Glia. 2018 Oct;66(10):2158-2173. 査読有

Effect of dexmedetomidine on intraocular pressure in patients undergoing robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy under total intravenous anesthesia: A randomized, double blinded placebo

controlled clinical trial

Kitamura S, Takechi K*, Nishihara T, Konishi A, Takasaki Y, Yorozyua T
Journal of Clinical Anesthesia 2018 Jun 5;49:30-35. 査読有

Development of a Postoperative Occlusive Thrombus at the Site of an Implanted Inferior Vena Cava Filter: A case report

Kukida A, Takasaki Y*, Nakata M, Nishihara T, Kitamura S, Fujii S, Watanabe Y, Yorozyua T
Medicine. 2018 Jan;97(3):e9675. 査読有

Perioperative management of a patient with Coffin–Lowry syndrome complicated by severe obesity: A case report and literature review

Hirakawa M, Nishihara T*, Nakanishi K, Kitamura S, Fujii S, Ikemune K, Dote K, Takasaki Y, Yorozyua T
Medicine. 2017 Dec;96(49):e9026. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

西原 佑、萬家 俊博

末梢神経傷害時の脊髄前角と後角における活性化マイクログリアの貪食ターゲットの違い
日本神経麻酔集中治療学会 2019年3月14～16日 奈良

Tasuku Nishihara, Junya Tanaka, Toshihiro Yorozyua

Microglial activation in spinal anterior horn after peripheral nerve injury: is the activation detrimental or neuroprotective?

Society for Neuroscience Annual Meeting, November 3-7, 2018, San Diego, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔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。