

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09037

研究課題名（和文）神経障害性疼痛における腸内細菌叢の関連と機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of relationship between neuropathic pain and gut microbiota

研究代表者

山元 拓哉（Yamamoto, Takuya）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40381157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛の原因のひとつとされている、損傷神経でのミクログリア増殖メカニズムの解析を行った。ミクログリアは TGF-beta1で増殖が亢進し、その阻害剤であるgalunisertibはミクログリアの増殖を抑制した。TGF-beta1のシグナルを制御することが、慢性疼痛の治療に応用できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛に悩まされている患者は多い。しかし、神経障害性疼痛の治療は困難で、その治療法の開発は社会的に有意義である。神経障害性疼痛の原因のひとつにミクログリアの異常増殖があることが知られている。我々はミクログリアは TGF-beta1で増殖が亢進し、TGF-beta1のシグナルを制御することが、慢性疼痛の治療に応用できることを示した。これらは新規治療法開発の一助となる研究成果である。

研究成果の概要（英文）：The activation and proliferation of microglia is characteristic of the early stages of brain pathologies. In this study, we aimed to identify a factor that promotes microglial activation and proliferation and examined the in vitro effects on these processes. The results showed that only transforming growth factor beta (TGF-) caused an increase in the in vitro proliferation of both microglial cell lines. In addition, a TGF- receptor 1 inhibitor, galunisertib, caused marked inhibition of proliferation in a dose-dependent manner, indicating that inhibition of TGF- signalling reduces the proliferation of microglia. Therefore, galunisertib may represent a promising therapeutic agent for the treatment of neurodegenerative diseases via inhibition of nerve injury-induced microglial proliferation, which may result in reduced inflammatory and neuropathic and cancer pain.

研究分野：脊椎外科

キーワード：神経障害性疼痛 TGF-beta ミクログリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は種々の原因によって、神経が異常興奮することで生じる痛みの総称である。原因として代表的なものには、坐骨神経痛や頸椎症、帯状疱疹後神経痛、糖尿病神経障害があり、患者数は年々増加し国内の患者数は2,000万人と推定されている。一方でヒトの大腸には多様な腸内細菌が生息し、生体の恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかとなりつつある。腸内微生物はヒトの健康に多大な影響を与えており、感染症、炎症性腸疾患だけでなく、肥満症、アレルギー、喘息、自閉症、免疫系疾患やガンなど大腸内環境と直接的に接していない全身疾患への関与も報告されている。

2. 研究の目的

本研究では神経障害性疼痛モデルマウスを用いて、腸内細菌叢と神経障害性疼痛発症や維持との関連について研究する。また神経障害性疼痛の際に増加するマイクログリアや活性化アストロサイトの機能を検討する。その後に腸内細菌叢の変化と脳・脊髄における代謝物の変化をメタボロミクスにて検討することで腸内細菌叢と中枢神経のクロストークを明らかとする。

3. 研究の方法

- (1) ミクログリア細胞培養系に様々な増殖因子などを加えて、細胞増殖に関与する因子を同定
- (2) それら因子の阻害剤を加えることで、増殖抑制が可能か検討
- (3) それら因子の阻害剤の細胞死に対する影響を検討
- (4) 阻害因子の *in vivo* での効果の評価

4. 研究成果

(1) TGF- β 1 によりミクログリアは増殖する

2種類のみクログリア培養細胞 (EOC 2, SIM-A9) を低血清培地で培養しつつ、TGF- β 1, CSF 1, PDGF-AA, PDGF-BB, CNTF, EGF, bFGF を加えて細胞数をカウントした。その結果、TGF- β 1 により、ミクログリア細胞は増殖することが示された。

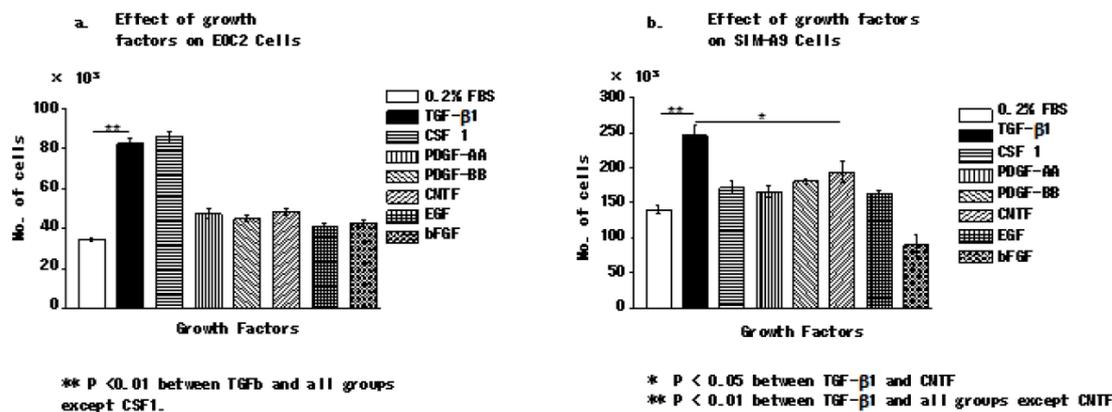
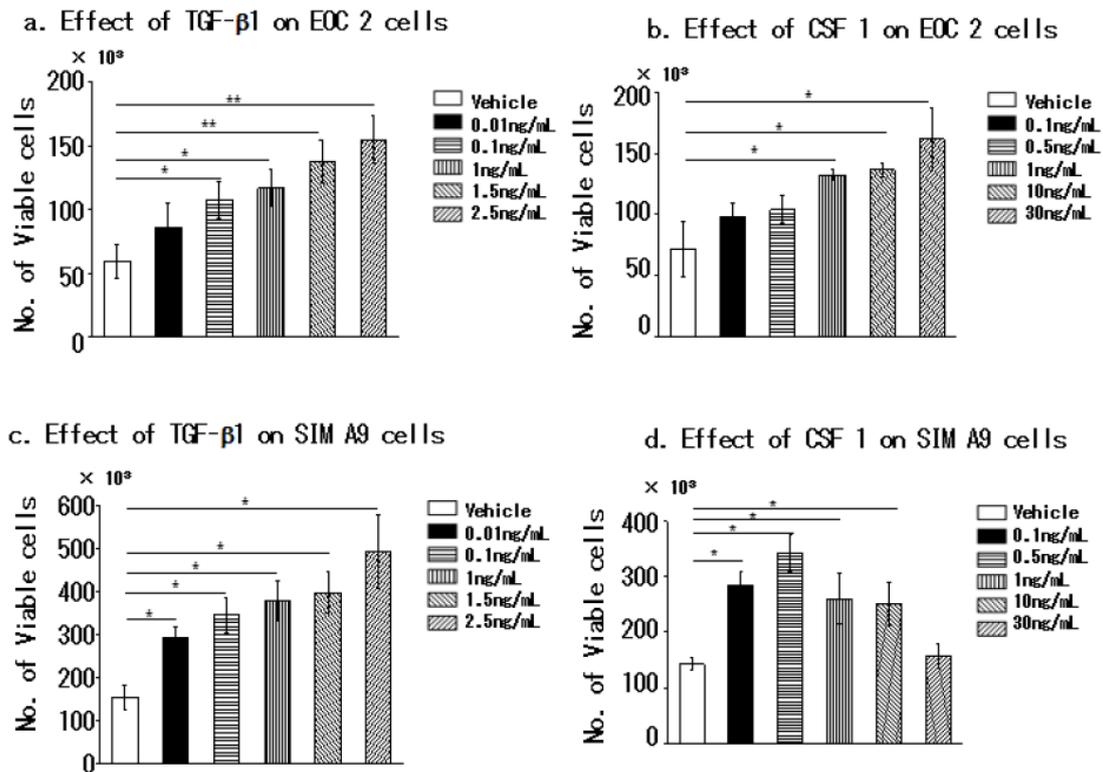


Figure 1. TGF- β promotes the proliferation of microglia.

(2) TGF- β 1 は CSF-1 と同等以上のミクログリア増殖作用を示す

過去に論文で CSF-1 はミクログリアを増殖させることが示されている。TGF- β 1 と CSF-1 に着目して比較検討した。TGF- β 1 は濃度依存性に、CSF-1 と比較しても同等以上にミクログリア増殖亢進作用を示した。



(3) ミクログリア細胞は TGF-β1 受容体を高発現していた。RT-PCR で各種サイトカインの受容体発現を比較検討した。ミクログリア細胞は TGF-β1 受容体を高発現していた。

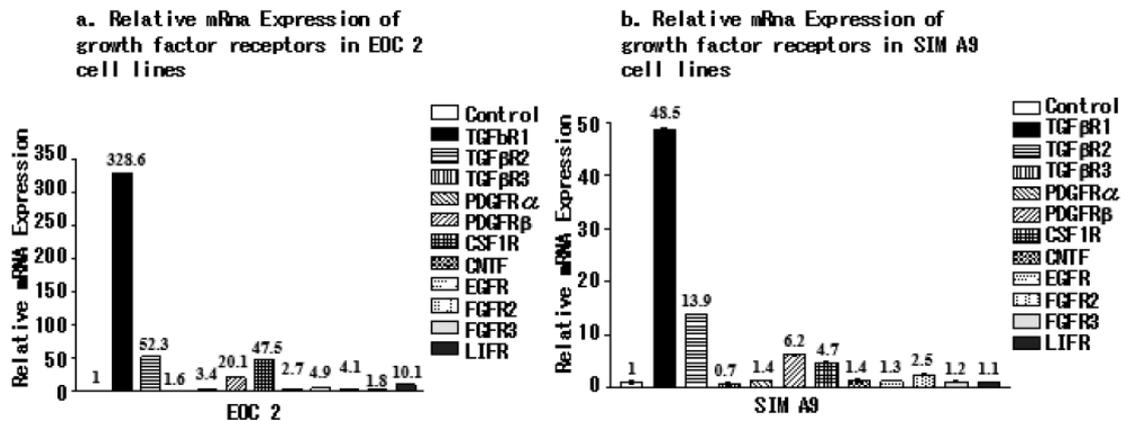


Figure 3. TGFβR2, TGFβR3, PDGFRα, PDGFRβ, CSF1R, CNTFR, EGFR, FGFR2, FGFR3, and LIFR are expressed by both EOC 2 and SIM A9 cell lines. TGFβR1, TGFβR2, PDGFRβ, and CSF1R were highly expressed in both cell lines compared with the other growth factors.

(4) TGF-β1 は細胞増殖を亢進させ、細胞死は抑制する。Cell proliferation assay と cell death assay で評価したところ、ミクログリアは TGF-β1 によって細胞増殖は亢進し、細胞死は抑制されていた。

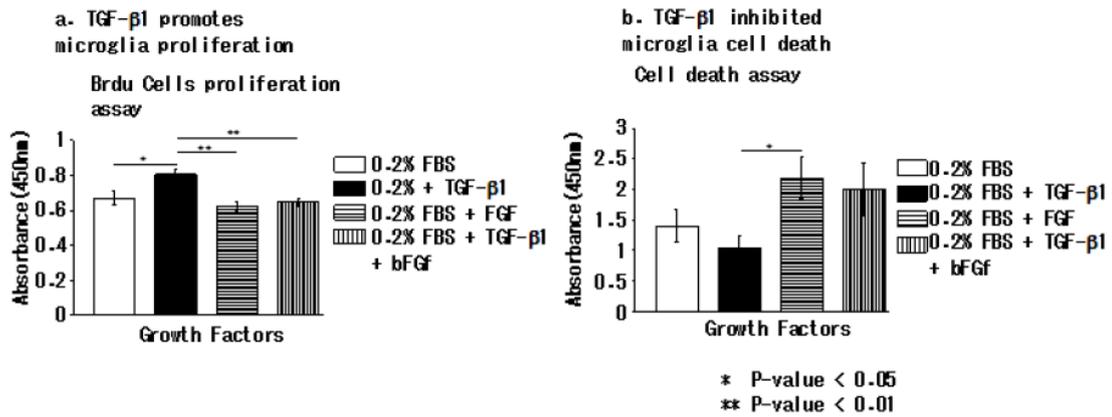
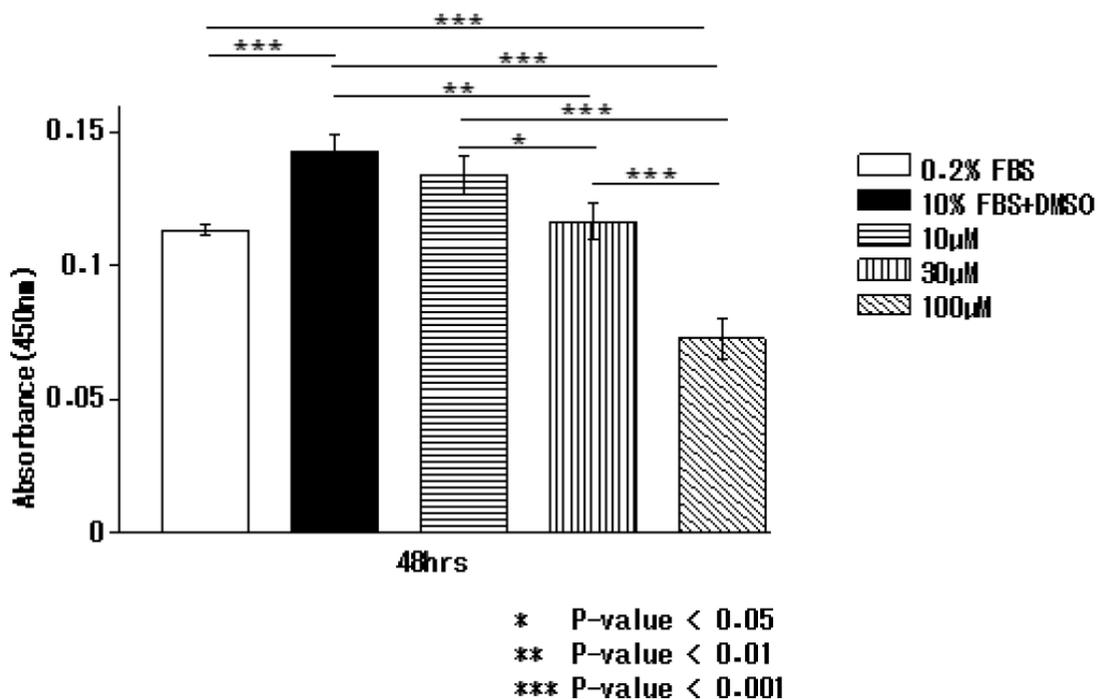


Figure 4. TGF-β promotes proliferation and inhibits cell death in microglia. (a) The bromodeoxyuridine cell proliferation assay revealed that TGF-β in 0.2% fetal bovine serum promoted the proliferation of microglial cells. (b) The cell-death assay showed that TGF-β in 0.2% fetal bovine serum inhibited microglial cell death. $P < 0.05$, was considered significant (Kruskal-Wallis test) Data are presented as the mean of triplicate experiments; error bars represent the standard deviation.

(5) TGFβ receptor Iの阻害薬である galunisertibはミクログリアの増殖を *in vitro* で抑制した。ミクログリア細胞株を様々な濃度の血清存在下で培養しつつ、TGFβ receptor Iの阻害薬である galunisertibを添加したところ、galunisertibはミクログリアの増殖を *in vitro* で抑制した。

The effect of galunisertib on EOC2 cells



結論：慢性疼痛の原因のひとつとされている、損傷神経でのミクログリア増殖メカニズムの解析を行った。ミクログリアは $\text{TGF-}\beta 1$ で増殖が亢進し、その阻害剤である galunisertib はミクログリアの増殖を抑制した。 $\text{TGF-}\beta 1$ のシグナルを制御することが、慢性疼痛の治療に応用できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bureta C, Setoguchi T, Saitoh Y, Tominaga H, Maeda S, Nagano S, Komiya S, Yamamoto T, Taniguchi N.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 TGF- Promotes the Proliferation of Microglia In Vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain sciences	6. 最初と最後の頁 E20.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci10010020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	廣津 匡隆 (Hirotzu Masataka) (00444901)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	瀬戸口 啓夫 (Setoguchi Takao) (40423727)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------