

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17808

研究課題名（和文）炎症性疼痛におけるマクロファージのオートファジー 機構の役割

研究課題名（英文）Role of macrophage autophagy in inflammatory pain

研究代表者

古藤田 眞和 (Kotoda, Masakazu)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：30530133

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）：炎症性疼痛および炎症におけるマクロファージのオートファジーの役割を検証するため、まずマクロファージにおいてオートファジーを欠損した条件付きノックアウトマウスを作製した。次に腹腔マクロファージを誘導採取し、オートファジー不全を確認した。術後疼痛モデル、感染性炎症モデルを作製し、マクロファージのオートファジーを欠損したマウスではマクロファージの集積や炎症性メディエータの発現亢進が生じ、疼痛や炎症の増強・遷延が起こることを確認した。このことは組織障害や感染による炎症および炎症性疼痛においてマクロファージのオートファジーが保護的役割を有していることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症は多彩な疾患の基盤となり、種々の疼痛の原因となる一方で、生体防御機構・免疫反応としての重要な役割も担う。そのため単に炎症を抑制するのではなく炎症調節機構の制御が重要となるが、そのようなメカニズムやターゲットとなる機構は十分に解明されていない。本研究では、マクロファージのオートファジーを欠損したマウスではマクロファージの集積や炎症性メディエータの発現亢進が生じ、疼痛や炎症の増強・遷延が起こることを確認した。このことは組織障害や感染による炎症および炎症性疼痛においてマクロファージのオートファジーが保護的役割を有していることを示しており、新規の治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Atg5 f/f mice were bred with LysMCre mice to generate mice with autophagy-deficient macrophages. Peritoneal macrophages were elicited and harvested. Autophagy deficiency in these mice macrophages were confirmed using western blotting and immunofluorescence analysis. Plantar incision and zymosan-induced inflammation models were used to generate postoperative and inflammatory pain conditions. Mice with autophagy-deficient macrophages showed augmented pain and inflammation, which were accompanied by enhanced pro-inflammatory cytokine secretion and surgical site macrophage infiltration. These results suggest that macrophage autophagy plays a protective role in postoperative pain and inflammation and can be a novel therapeutic target.

研究分野：疼痛

キーワード：マクロファージ オートファジー

1. 研究開始当初の背景

炎症性疼痛は炎症により組織の侵害受容器が刺激されて発生する疼痛であり、外傷や手術・感染・運動器疾患・悪性腫瘍など様々な病態に随伴する。過大な炎症が組織障害や疼痛を増悪させる一方で、炎症は侵襲に対する生体防御機構でもある。現在、非ステロイド性消炎鎮痛薬・局所麻酔薬・オピオイドなどが鎮痛目的で広く使用されているが、これらは抗炎症・免疫抑制作用を有すものが多く、創傷治癒の遷延や疼痛の慢性化を引き起こす可能性が示唆されている。炎症性疼痛の治療においては、生体防御に必要な反応を阻害せずに過度の炎症を抑制し収束させる、炎症調節機構の制御が重要となるが、そのメカニズムおよびターゲットとなる機構は未だ解明されていない。一方で、近年の研究により細胞内自食機構であるオートファジーの、炎症調節作用への関与が示唆されている。マクロファージにおけるオートファジーは、血管炎症や感染性・虚血性組織障害において、炎症メディエーター産生や細胞の貪食作用を調節して過大な炎症を抑制し、組織障害を収束させる作用を有することが報告されている。炎症性疼痛はマクロファージを始めとした炎症性細胞の浸潤・活性化を基盤として発生する疼痛であるため、上記の学術的背景を考慮すると、マクロファージのオートファジーは炎症性疼痛の病態生理においても重要な役割を担っている可能性が示唆される。しかし、これまでに炎症性疼痛におけるマクロファージのオートファジーの役割は検証されておらず、炎症性疼痛のメカニズムへの関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性疼痛におけるマクロファージのオートファジーの役割を検証し、さらにはどのような機序で炎症性疼痛の発生と慢性化を抑制するのかを明らかにすることである。新規薬物ターゲットとなり得るマクロファージのオートファジー機構に焦点を当て、将来的な薬物治療や慢性化予防法の確立のための基盤を構築する。

3. 研究の方法

Atg5f/f LysMCre マウスおよび Atg5f/f マウスを交雑して遺伝子型判定を行い、実験に使用する Atg5f/f LysMCre マウスおよびコントロール同胞マウス (Atg5f/f マウス) を得る。Atg5f/f LysMCre マウスはマクロファージを始めとしたミエロイド系細胞においてオートファジーが障害されているマウスである。まず両群のマウスの腹腔にチオグリコレート培地を投与し、マクロファージを誘導採取する。これらを飢餓条件で培養し、Western blot (オートファジーの必須蛋白質 ATG5・オートファジーマーカー LC3・p62 など) や蛍光免疫染色法などにより Atg5f/f LysMCre マウス由来のマクロファージにおいてオートファジーが欠損していることを確認する。次に、術後疼痛モデルおよび炎症性疼痛モデルを作製する。術後疼痛モデルは全身麻酔下に無菌的に足底に 5-6mm の切開を行い、縫合閉鎖する。炎症性疼痛モデルは完全フロイントアジュバンド・ゼイモサンなどを足底皮下に投与して組織炎症を誘発する。これらのモデルにおいて、各種行動観察法 (von Frey 法、Hargreaves 法、後肢荷重バランス、自発的運動量など) 組織学的評価 (ヘマトキシリンエオジン染色・免疫染色・蛍光免疫染色など)・定量 PCR 法や ELISA 法など各種炎症性メディエーター (サイトカイン・ケモカイン) やカルシトニン遺伝子関連ペプチドなどの発現量や産生量を評価し、マクロファージのオートファジー欠損の影響を調査する。また、オートファジー促進薬を使用して、術後疼痛や炎症性疼痛に対する作用を検証する。

4. 研究成果

Atg5f/f LysMCre マウスから誘導採取したマクロファージは、コントロールマウス由来のマクロファージと比較して、有意に飢餓条件培養後の ATG5 および LC3 の産生が少なかった。また、オートファジー障害時に蓄積する p62 の産生量が有意に多かった。蛍光免疫染色においても、LC3 の発現・凝集が障害されていた。術後疼痛モデルにおいて、マクロファージのオートファジー障害を有すマウスでは、術後 1~3 日間における足底切開後の機械刺激閾値・温熱刺激閾値および後肢荷重比の有意な低下、組織炎症の遷延が認められた。自発活動量・体重の術後推移には両群で有意差はなかった。また手術部位へマクロファージ/単球総数および M1 型マクロファージの浸潤が亢進していた。一方で M2 型マクロファージの浸潤には両群に置いて有意差はなかった。また、マクロファージのオートファジー障害を有すマウスでは炎症性サイトカイン (インターロイキン 1、TNF) の発現が有意に上昇していたが、抗炎症性サイトカインの発現量は両群で有意な差はなかった。術後 7 日目には両群においていずれの評価項目も術前値まで回復していた。野生型マウスの術後疼痛モデルにおいて、オートファジー促進薬であるウルソール酸は術後の炎症や疼痛反応を改善しなかった。投与炎症性疼痛モデルでは、ゼイモサンの足底皮下投与後、両群とも 4 時間後に機械刺激閾値・温熱刺激閾値・後肢荷重比の有意な低下、および足底炎症が生じ、群間における統計学的有意差は認めなかった。コントロールマウスではゼイモサン投与後 24 時間後には炎症および疼痛反応の回復が認められたのに対し、マクロファージのオートファジー障害を有すマウスでは遷延性の炎症と疼痛反応を認めた。炎症性疼痛モデルにおいても自発活動量・体重の術後推移には両群で有意差はなかった。蛍光免疫染色の結果、ゼイモサ

ンの投与後 4 時間で好中球浸潤はピークを迎え、以後漸減しており、両群で浸潤細胞数に有意差はなかった。マクロファージの浸潤はザイモサン投与後 24 時間でピークを迎え、Atg5f/fLysMCre マウスにおいて有意に浸潤細胞数が多かった。定量 PCR の結果、ザイモサン投与後 24 ~ 72 時間でマクロファージのオートファジー障害を有すマウスにおいてインターロイキン 1 の mRNA 発現量が有意に亢進していたが、抗炎症性サイトカインやカルシトニン遺伝子関連ペプチドの発現量に群間差はなかった。なお、炎症性メディエータがザイモサン投与 3 日目以降減少傾向を示したのに対し、カルシトニン遺伝子関連ペプチドはザイモサン投与後 7 日間においてわずかな上昇傾向を示した。以上の結果は、マクロファージにおけるオートファジーが炎症および炎症性疼痛の発生過程において保護的役割を有すことを示している。オートファジーを欠損したマクロファージは組織障害型 (M1 型) 優位になることが報告されており、本研究の結果と一致する。炎症部位においてカルシトニン遺伝子関連ペプチドの発現には両群で差はなく、急性炎症・急性疼痛においては、神経終末応答にはマクロファージのオートファジー不全による有意な影響はないと考えられた。

好中球の浸潤亢進は認めなかった。また、抗炎症性メディエータやカルシトニン遺伝子関連ペプチドの発現は亢進していなかった。これらの結果は、マクロファージにおけるオートファジーは組織障害に対して保護的な作用を有し、炎症・抗炎症のバランスや組織浸潤の調節を介して組織障害後の過剰な炎症を抑制し、正常な創傷治癒や疼痛改善に寄与していることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuha Mitsui, Sohei Hishiyama, Aakanksha Jain, Yumi Kotoda, Masako Abe, Takashi Matsukawa and Masakazu Kotoda	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of macrophage autophagy in postoperative pain and inflammation in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mitsui et al. Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-023-02795-w	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古藤田 真和
2. 発表標題 神経免疫機構におけるミエロイド系細胞のオートファジー機構の役割
3. 学会等名 日本神経麻酔集中治療学会第27回学術集会
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------