

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08988

研究課題名(和文)末梢神経系グリア細胞を標的とした痛みの慢性化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of chronic pain by targeting glial cells in the peripheral nervous system

研究代表者

奥田 洋明 (Okuda, Hiroaki)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40453162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性痛のマウスモデルを用いて、末梢神経系グリア細胞と痛覚過敏の関連を解析した。感覚神経の損傷に反応して末梢グリア細胞にてSHHの発現増加がみられ、ヘッジホッグ(Hh)の受容体は感覚神経細胞に局在が認められた。また、慢性痛モデルにおいて、Hhシグナルを阻害すると痛覚過敏の減弱がみられ、逆に通常のマウスにてHhシグナルを活性化させると痛覚過敏が惹起された。Hhシグナルは末梢グリア細胞と感覚神経の相互作用に用いられ、痛覚過敏の発症に関与し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
神経障害時に末梢神経系グリア細胞が反応することが知られているが、痛みの慢性化に関与しているのかはいまだ不明な点が多く、その解明は慢性痛の治療に対して新たな視点を得られると考える。また、末梢神経系グリア細胞への介入は従来のオピオイドなど中枢神経系に作用する薬剤と異なり、副作用が少ない優れた治療薬開発の標的となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relationship between peripheral glial cells and hyperalgesia using a mouse model of chronic pain. In response to sensory nerve injury, expression of SHH increased in peripheral glial cells, while hedgehog (Hh) receptors were localized in sensory neurons. Furthermore, in a chronic pain model, inhibiting Hh signals attenuated hyperalgesia, and conversely, activating Hh signals induced hyperalgesia in normal mice. It was suggested that the Hh signal is related to the interaction between peripheral glial cells and sensory neurons and that the Hh signal is involved in developing hyperalgesia.

研究分野：神経科学

キーワード：慢性痛 末梢神経系 グリア ヘッジホッグ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疼痛の原因となる疾患が治癒した後でも、疼痛が長期間持続することがあり、その状態は慢性痛と呼ばれる。慢性痛はもはや体の異常を伝える警告系としての役割は無く、不安や抑うつ状態などを引き起こして患者の生活の質を低下させる。既存の治療薬では十分な緩和効果が認められないことも多く、これは慢性痛の発症機序に不明な点が多いことに起因すると考えられる。したがって、効果的な治療法の確立を目指した、新たな痛みの慢性化のメカニズムの解明が求められている。

様々な慢性痛の動物モデルを用いた解析から、痛みの慢性化には中枢神経系においてミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞の活性化が関与していることが注目されている。実際に薬剤や遺伝的手技などを用いてそれら中枢神経系グリア細胞の活性化を抑えると痛覚過敏が抑制されることから、神経細胞と中枢神経系グリア細胞との相互作用の変化が慢性痛への移行に重要であると考えられている。一方、末梢神経系には感覚神経の細胞体周囲を取り囲むサテライトグリア細胞と、軸索に付随するシュワン細胞が存在する。神経損傷時はこれら末梢神経系グリア細胞も反応し、マーカーの一つである GFAP の発現増強など遺伝子発現を変化させているが、痛みの慢性化に関与しているかは不明である。しかしながら、我々の慢性痛モデルを用いた研究から、痛みの慢性時に末梢神経系グリア細胞を薬理遺伝学的手法を用いて抑制すると、痛覚過敏などの痛み関連行動が減弱すること、また、逆に通常のマウスで末梢神経系グリア細胞を活性化すると痛み関連行動が惹起されることが認められた。これらの結果から、痛みの慢性化には中枢神経系グリア細胞だけではなく、末梢神経系グリア細胞の関与も大きいのではないかと考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的としては、慢性痛の動物モデルを用いて、神経障害時における末梢神経系グリア細胞の活動と疼痛関連行動の相関およびグリア細胞における遺伝子発現変化を解析することにより、慢性痛への移行の新たなメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 実験動物

雄の C57BL/6JmsSlc マウス (8 ~ 9 週齢, 22 ~ 27 g) を三共実験動物から購入して使用した。マウスは標準的な条件 (23 ± 1 °C、相対湿度 55% ± 5%、および 12/12 時間の明暗サイクル) で、水道水と食物を自由に摂取できるように集団飼育した。すべての実験は、金沢大学動物実験委員会によって事前に登録および承認されている (参照番号: AP-183913 および AP-184016)。慢性痛モデルマウスの体重が 20% 以上減少した場合、またはマウスが麻痺して餌や水を摂取できない場合は実験より除外した。

2) 慢性痛モデルの作製

慢性痛のモデルとして、神経因性疼痛モデルの一つである L4 脊髄神経切断 (SNT) モデルを使用した。マウスを麻酔下 (メドトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 4.0 mg/kg、ブトルファノール 5.0 mg/kg) にて L4 脊髄神経を露出し、神経を 1.0 mm 切除した。

3) 足底皮膚の痛覚過敏の評価

皮膚の機械的刺激に対する感受性は von Frey フィラメントを用いて測定した。50% 閾値は、アップダウン法により求めた (Chaplan et al., 1994)。

4) リアルタイム RT-PCR

マウス脊髄および DRG (SNT 手術後 0 日目、7 日目、または 21 日目) から NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel) を用いて全 RNA を調製後、ランダムプライマーと QuantiTect 逆転写キット (QIAGEN) を使用して、逆転写を行った。リアルタイム PCR は、ViiA7 (Thermo Fisher) と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて行った。PCR には以下のプライマーを用いた。Shh (NCBI 参照配列: NM_009170) 5'-CAAGAACTCCGAACGATTTAAGG-3'; 5'-GCATTTAACTTGCTTTTTGCACC-3'、Pth1 (NM_008957.2) 5'-CAGCTAATCTCGAGACCAACGTG-3'; 5'-GAGTCTGTATCATGAGTTGAGG-3'; Gli1 (NM_010296.2) 5'-ATAGTGAGCCATGCTGTCTCC-3'; 5'-TCTCTCTGGCTGCTCCATAACC-3'。

5) 髄腔内薬物投与

麻酔下で、環椎後頭膜に穴をあけて MRE010 カテーテルを髄膜腔内に挿入した。カテーテルの先端は L4 レベルに設置した。カニューレ挿入から 7 日後、マウスを実験に使用した。SAG (Sigma-Aldrich) (100 μ M または 1,000 μ M) もしくはビスモデギブ (Seleck Chemicals) (100 μ M または 1,000 μ M) は 2 μ L、髄腔内投与した。クロドロン酸 (東京化成工業株式会社) は SAG 投与後の 30 分後に 100 または 500 mg/kg で腹腔内投与した。

6) 免疫組織化学

マウスを麻酔下にて 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行い、脊髄および L4DRG を採取した。一晩後固定を行い、パラフィン包埋をした後に 4 μ m の厚さで切片を作製した。染色前にパラフィンを除去した後、0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて抗原賦活化した。5% 正常口爪血清を使用してブロックを行い、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。洗浄後、二次抗体は室温で 1 時間反応させた。画像は、BZ-X700 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影した。一次抗体は以下のものを使用した。SHH (RRID:AB_2188292)、PTCH1 (RRID:AB_2174045)、GFAP (RRID:AB_561049)、S100beta (RRID:AB_882426)、Iba1 (RRID:AB_839504)。二次抗体は、ImmPRESS™ ペルオキシダーゼ ポリマー試薬 (Vector Laboratories) および ImmPRESS™ アルカリホスファターゼ ポリマー試薬を用いた。基質は ImmPACT DAB (Vector Laboratories) または BCIP/NBT (Vector Laboratories) を用いた。

7) DRG 初代培養

雄 C57BL/6JmsSlc マウス (4 ~ 6 週齢、13 ~ 17 g) より DRG を採取し、酵素 (パパイン およびコラゲナーゼ、ディスパーゼ II、デオキシリボヌクレアーゼ I) で処理後、パスツールピペットを用いてピペッティングにより分離した。10% ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) を含む D-MEM/Ham's F-12 培養液中で 4 日間、培養した。

8) 免疫細胞化学

細胞を 4% パラホルムアルデヒドを用いて 15 分間固定し、その後一次抗体を 4°C で一晩反応させた。洗浄後、二次抗体は室温で 1 時間反応させた。細胞核は DAPI で染色した。画像は、VECTASHIELD Mobility Medium (Vector Laboratories) で封入後、BZ-X700 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影した。一次抗体は以下のものを使用した。SHH (RRID:AB_2188292)、PTCH1 (RRID:AB_2174045)、GFAP (RRID:AB_561049)、S100beta (RRID:AB_882426)、Iba1 (RRID:AB_839504)、Tuj1 (RRID:AB_)。二次抗体は、Alexa Fluor 488 標識抗ラット IgG (RRID:AB_2340684) および Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG (RRID:AB_2340621)、Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG (RRID:AB_2340855) を用いた。

9) ATP アッセイ

培養 DRG 細胞を SAG (0.1 ~ 1.0 μ M) およびビスモデギブ (1 ~ 10 μ M) で 37°C、10 分間処置した後、培養上清を回収した。上清中の ATP 濃度は、CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay kit を用いて測定した。発光は、GloMax ルミノメーター (Promega) を使用して測定した。

10) カルシウムイメージング

培養 DRG 細胞を 5 μ M fluo-4 AM で処置した後、タイムラプス画像を撮影した。蛍光シグナルの振幅は、 $\Delta F/F_0$ ($\Delta F = F - F_0$) として計算し、蛍光強度がシグナルの標準偏差の 3 を超えて変化したときをイベントとして定義した。データは ImageJ を使用して分析した。

11) データ分析

統計分析は GraphPad PRISM 9 を使用して行った。両側一元配置分散分析または二元配置分散分析を行い、続いて Tukey の多重比較を用いて統計処理を行った。この研究では、データの正規性の評価や外れ値の統計分析は行わなかった。

4. 研究成果

1) 神経損傷時における末梢神経系グリア細胞の活性化についての検討

本研究では、慢性痛のモデルとして神経因性疼痛のモデルの一つである SNT モデルを用いた。SNT モデルでは 2 か月以上にわたり、損傷側の足底において、痛覚閾値の低下、すなわち痛覚過敏の状態が観察された。

痛みの慢性化の原因の一つとして、脊髄におけるミクログリアの活性化の関与が報告されている。脊髄後角における IBA1 の染色像を見てみると、SNT 術後 7 日目において Iba1 陽性のミクログリアの増加が認められたが、21 日目では対照群のレベルまで減少がみられた。一方、末梢神経系におけるグリア細胞の変化を見てみると、末梢グリア細胞のマーカーである GFAP や S100 beta の陽性細胞は DRG や脊髄神経において 7 日目よりは 21 日目で強く染色された (Fig. 1)。

また、DRG において免疫系の細胞であるマクロファージは、脊髄のミクログリアと同様に、SNT 術後 7 日目に細胞数の増加が認められたが、21 日目では減少していた。

従って、痛覚過敏形成時では、脊髄や DRG においてミクログリアやマクロファージの活性化が認められるが、その後、活性化がおさまり、その代わりに末梢グリア細胞が活性化していることが推察される。

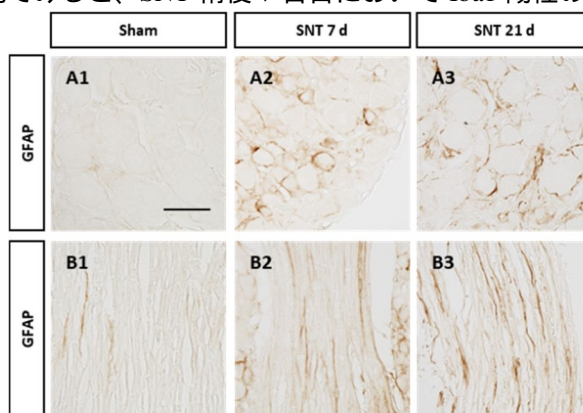


Fig.1 神経損傷後における末梢グリア細胞の活性化。感覚神経損傷後7日目および21日目での DRG (A) および神経線維 (B) における GFAP の発現。

2) ヘッジホッグシグナルの疼痛への関与についての検討

次に、活性化した末梢グリア細胞においてどのような因子が疼痛に関与しているのかを検討した。無脊椎動物であるショウジョウバエではヘッジホッグ (Hh) シグナルが疼痛に関与することが報告されているが、脊椎動物では関与は不明な点が多い。そこでモデルマウスにおいて Hh シグナルが疼痛に関与しているのかを検討した。

SNT 術後における Hh 関連遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR で見てみると、DRG では術後 21 日目にリガンドである *Shh* と標的遺伝子である *Gli1* の発現増加が認められた。また、タンパク質の発現を免疫組織染色で見てみると SHH は神経周囲の細胞に (Fig. 2A)、受容体である PTCH1 は神経細胞に局在が認められた (Fig. 2B)。二重染色を用いて、SHH の発現細胞を確認したところ、GFAP や S100b 陽性細胞で SHH の発現が認められた (Fig. 2C)。以上の結果より、SHH はサテライトグリア細胞およびシュワン細胞から SHH が分泌され、受容体を持つ感覚神経細胞において HH シグナルが何らかの機能を持つと考えられる。

次に、Hh シグナルが痛覚過敏に関与しているか、慢性痛モデルマウスに Hh シグナルの阻害剤であるビスモデギブを用いて検討した。Hh シグナルが活性化していると考えられる SNT 術後 21 日目に、ビスモデギブを L4 の DRG 周辺に髄腔内投与したところ、濃度依存的に痛覚過敏の抑制が認められた (Fig. 3A)。一方、Naïve マウスに Hh シグナルの活性化剤である SAG を髄腔内投与したところ、濃度依存的に痛覚過敏の誘発が認められた (Fig.3B)。

従って、Hh シグナルはマウスにおいても疼痛に関与していると考えられる。

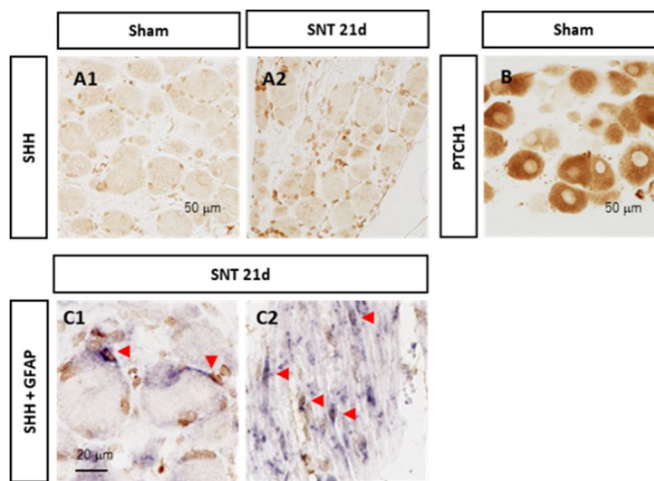


Fig. 2 神経損傷後の Hh シグナル因子の発現。神経損傷後 21 日目での DRG における SHH (A) および PTCH1 (B) の発現。C, SHH と GFAP の二重染色。

3) ヘッジホッグシグナルによる感覚神経の活動への関与についての検討

SAG 投与により誘発される痛みは、どのような因子が関与しているのか検討を行った。

以前の論文で、感覚神経より放出される ATP が疼痛を誘発し、ATP 放出を阻害するクロドロン酸投与により疼痛が抑制されることが報告されていることから、SAG を投与したマウスに ATP 放出の阻害剤であるクロドロン酸を投与したところ、SAG 誘発性の痛覚過敏が改善された (Fig. 3C)。

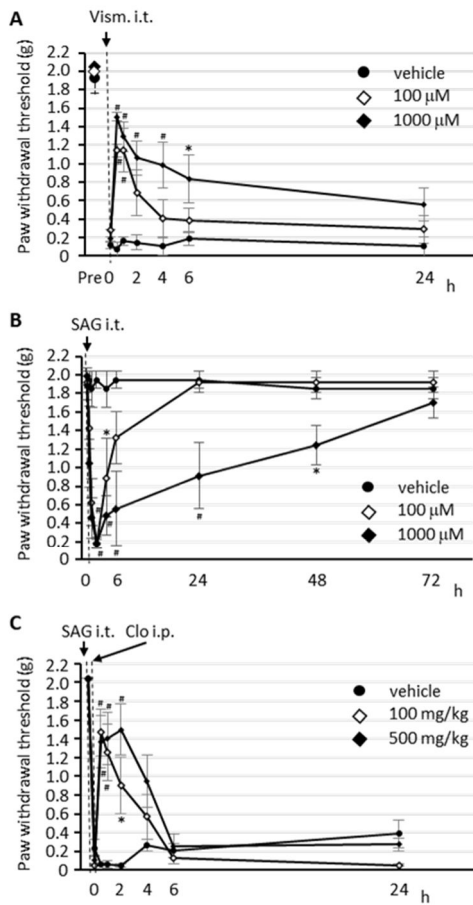


Fig. 3 Hhシグナルの痛覚過敏への関与。

A, 慢性痛モデルマウスへのビスモデギブの効果。B, 通常マウスへのSAG投与の効果。C, SAG誘発性疼痛へのクロドロン酸の効果。

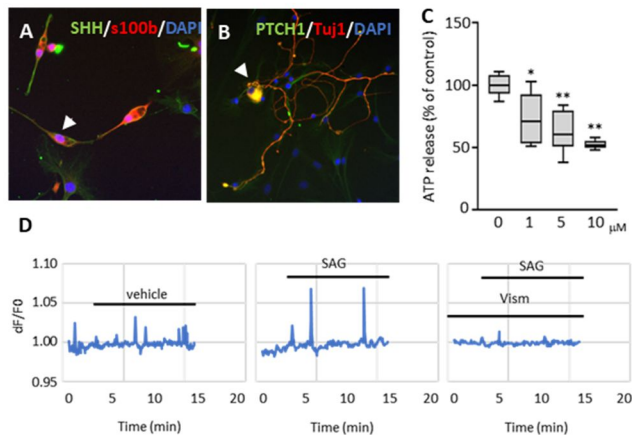


Fig. 4 培養DRG細胞におけるHhシグナルの作用。

A, B, 培養DRG細胞におけるHh因子の発現。C, ビスモデギブのATP放出への作用。D, 感覚神経細胞の自発活動への作用。

従って、マウスにおけるHhシグナルの活性化による痛覚過敏の誘発はATPの放出を介していることが示唆される。

次に、感覚神経細胞においてHhシグナルの活性化がATPの放出を促すのか、DRGの初代培養細胞を用いて検討した。培養細胞におけるHh関連遺伝子の発現を免疫染色により調べたところ、*In-vivo*と同様に、SHHがS100b陽性のグリア細胞、受容体のPTCH1がTuj1陽性の神経細胞にて発現が認められた (Fig. 4A, B)。

この初代培養細胞を用いて培地中へのATPの放出量の変化を検討したところ、Hhシグナルの阻害剤であるビスモデギブの処置により、濃度依存的にATPの放出が抑制された (Fig. 4C)。

また、Hhシグナルの感覚神経細胞の活動への影響をカルシウムイメージを用いて測定したところ、ビスモデギブの処置により、自発活動の頻度の減少が認められた (Fig. 4D)。

従って、Hhシグナルは感覚神経細胞の活動を制御し、ATPの放出に関与していることが示唆された。

以上の結果より、感覚神経の損傷に伴い、末梢神経系のグリア細胞が長期に渡り活性化し、モルフォゲンのSHHの分泌を介して感覚神経を興奮させ、痛覚を持続させていることが推察される。

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 0件）

1. 著者名 Okuda Hiroaki, Ishikawa Tatsuya, Hori Kiyomi, Kwankaew Nichakarn, Ozaki Noriyuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Hedgehog signaling plays a crucial role in hyperalgesia associated with neuropathic pain in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 207 ~ 220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.15613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 奥田洋明、石川達也、堀紀代美、尾崎紀之
2. 発表標題 慢性痛の発症メカニズムの解明と治療を目指して：中枢と末梢の観点から
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2024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
---------	---------