

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590727

研究課題名(和文)神経因性疼痛におけるミクログリアによる脱髄制御のメカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of the demyelination and regulation by the microglia in neuropathic pain

研究代表者

前田 光代(Maeda, Mitsuyo)

公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター研究所再生医療研究部・上席研究員

研究者番号：40122080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛モデルマウスの脊髄後角を中心に痛みと脱髄に関与する物質としてリゾホスファチジン酸(LPA)に着目し、そのレセプターであるLPA-1の局在、動態についてLPA-1抗体を作成し解析した。LPA-1は脊髄後角ではオリゴデンドロサイト、アストロサイトなどの細胞体および突起や後根神経節の神経節細胞の細胞膜、シュワン細胞、髄鞘に発現が見られ、手術側では陽性細胞数が増加した。ミクログリアにはLPA-1の局在は認められなかった。LPA-1の発現はLPAに相応し傷害早期に認められた。ミクログリアは傷害早期産生LPAによるATP遊離を介して活性化、痛みの増幅・慢性化を引き起こすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the change of the lysophosphatidic acid receptor-1 (LPA-1) in the posterior horn of spinal cord known as a substance which participates in the pain and demyelination at the time of a neuropathic pain. The onset of LPA-1 mRNA was within postoperative 6 hour. LPA-1 immunoreactivity was observed in the cytoplasm of the oligodendrocyte, astrocyte of a posterior horn of spinal cord, and also, the protoplasmic membrane of the ganglion cell of a dorsal root ganglion, Schwann-cell, and myelin sheath. In injured side, the number of LPA-1 immune-positive cells increased at 3, 7 days after injury. These LPA-1 immunopositive cells may be relevant to the onset of neuropathic pain. Microglia were considered to be induced in activation, amplification and chronic pain through the ATP release by produced LPA at injured side.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経因性疼痛 LPA1 ミクログリア 脊髄後角 脱髄

## 1. 研究開始当初の背景

一般に中枢神経系の種々の障害では神経細胞とそれらを取り巻くグリア細胞間にポジティブ、あるいはネガティブな反応動態が生じ、障害を受けた神経細胞に対して、各種グリア細胞の動態はレスキュー、あるいはさらなる増悪に働くことが知られている。神経因性疼痛モデルの脊髄後角に傷害応答性に浸潤遊走してくるミクログリアに関しては、そのミクログリアに発現してくる ATP イオンチャネル型受容体である P2X4 受容体の神経因性疼痛への関与が Tsuda らにより報告されて以来、各種 ATP 受容体とミクログリアの関与について研究が進んできている (Tsuda, Nat 185:778-783, 2003) が、脊髄後角での詳細な動態と機能についてはいまだ明らかではない。申請者は電子顕微鏡による形態観察中、この活性化ミクログリアが有髄神経の髄鞘に接着し取り囲み、続く髄鞘の崩壊、軸索の変性を引き起こす、すなわち貪食様の動態を示すことを見出した。さらに、傷害時ミクログリアに発現する P2Y12 受容体をインヒビターにより抑制すると、予想に反してミクログリアの遊走浸潤は抑制できないが、脱髄所見は顕著に消失し、同時に疼痛の症状は改善された。これらの結果から、ミクログリアによる脱髄所見と神経因性疼痛の関与が推定された (Maeda, Glia 2010)。

一般に多発性硬化症、ギラン・バレー症候群あるいはシャルコ・マリー・トゥース病などの多くの脱髄性疾患では神経因性疼痛を伴うことは周知の事実で、神経因性疼痛と脱髄現象の密接な関係は古くからよく知られていたが、そのメカニズムは長らく不明であった。これら脱髄性疾患のモデルとして汎用されるアレルギー性脳脊髄炎動物ではアストロサイトによる浮腫、多核白血球の浸潤、マクロファージやTリンパ球の浸潤が顕著で高度且つ広範囲な脱髄を引き起こす。しかしながら、神経因性疼痛モデルとして申請者の実験に供している脊髄神経結紮切断動物では痛覚過敏、アロディニア、自発痛の徴候は観察されるが、その脊髄後角ではマクロファージやTリンパ球の浸潤はみられず、代わりに多数の活性化ミクログリアの遊走浸潤が観察され、このミクログリアによる有髄神経の取り込み脱髄が示された。

これらの結果から申請者が用いている脊髄神経結紮動物での疼痛は上記のマクロファージやTリンパ球が関与する脱髄性疾患で生じる疼痛の発生機序とは異なったメカニズムの関与が考えられる。

この脱髄に類似する所見はおそらく節性脱髄のような軸索の一部であろうと考えられるが、伝導速度の変化やいわゆるエファプス (線維間の物理的接触) に関与している可能性があり、神経因性疼痛を引き起こす誘引となりうるのではないかと推察される。

近年 Ueda らにより LPA が神経因性疼痛誘発因子として確認され、LPA 及びその産生に

かかわるリゾホスファチジルコリン(LPC)やリゾホスホリパーゼ D (LPLD=Autotaxin; ATX)の抑制、あるいはそのレセプターのひとつである LPA-1 の抑制で神経因性疼痛の減少消失が報告され、治療方法の開発への期待がもたれている。ただしこれらの形態学的データは末梢の脊髄神経が主体で、中枢である脊髄後角での検索はなされておらず、ミクログリアの関与についても触れられていない。そこで、神経因性疼痛とミクログリア、脊髄後角での脱髄の関係をリゾホスファチジン酸を主体にそのレセプター、LPA 産生の経路にかかわる各種酵素や基質などを中心に形態学的、分子生物学的に検索する。

増加した LPA がミクログリアを活性化し、その結果 ATP 放出を引き起こし、更なる慢性化を導きうる可能性は示唆されており、脊髄内でも LPA の産生、及びそれによる細胞応答が生じている可能性は高い。これらの疑問を解消すべく本研究の遂行を計画した。

LPA1 を介した脱髄と神経因性疼痛の関連性を確認できれば、LPA 産生にかかわる因子を用いた疼痛コントロールができるようになる可能性があり、術後痛や種々の神経損傷に基づく進行性の神経因性疼痛に対して新たな治療戦略が得られると考えられる。自発痛、痛覚過敏反応及びアロディニアを伴う神経因性疼痛は難治性の疾患で、痛みに苦しむ患者数は多いが、非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬が奏効しがたく、いまだ、その分子メカニズムに関しては明らかでない。グリア環境改善に着目した神経因性疼痛治療法に関しての、新たな基礎データを得ることを目指した。

## 2. 研究の目的

Ueda らにより 2004 年に LPA が神経因性疼痛誘発因子として確認され、LPA 及びその産生にかかわるリゾホスファチジルコリン(LPC) や リゾホスホリパーゼ D(LPLD=Autotaxin;ATX)、レセプターのひとつである LPA-1 の抑制で神経因性疼痛の減少消失が報告されているが、末梢神経での報告が主体であり、脊髄レベルでの動態については検索が進んでいない。そこで、神経因性疼痛とミクログリアを含む各種グリア細胞の動態、脊髄後角での脱髄の関係をリゾホスファチジン酸のレセプター、LPA1 を中心に形態学的、分子生物学的に検索、神経因性疼痛発生のメカニズムを解明すべく本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体作成

マウス LPA1 配列情報を元にペプチドを合成し(H-CTILAGVHSNDHSHV-V-OH)、キャリア蛋白(ウシサイログロブリン)を架橋した。ウサギ 2羽を用い、作製した抗原をウサギ 1羽に最大 8 回背部皮膚皮内に注射した。途中 2 回、部分血清を採取し、EIA アッセイにより、力

価測定を実施した。投与終了後、採血し全血清を得、硫酸アンモニウム沈降、DEAE-sephadex による濾過、カラム精製を実施し、精製された抗体を得た。

(2) 神経因性疼痛モデルマウス (Allodynia モデルマウス) 作成  
8週令の C57black/6J 雄マウス(WT)を用い、抱水クロラル (35mg/kg) 腹腔内麻酔下に左側 L5 脊髄神経を腹腔神経節 (DRG) の末梢側で結紮切断し、疼痛モデル (allodynia モデル) を作成した。Allodynia の評価は von Frey filaments (0.02-2.0g) を後肢足底表面に適用した。

(3) 光顕での免疫蛍光組織化学  
L5 神経結紮切断後 3, 7, あるいは 14 日目にマウスを 4%paraformaldehyde (PFA), 2.1%picric acid 混液にて灌流後、脊髄を摘出し、同液にて 5 時間後固定、20% サッカロースにて沈殿後、L5 レベルの脊髄、(一部の後根神経節、脊髄神経) を液体窒素にて凍結、16  $\mu$ m の厚さの連続凍結切片を作成し、Iba1 抗体 (Wako, japan, X500)、LPA1 抗体 (X250) 室温 24 時間反応後、二次抗体としてビオチン化 goat anti rabbit IgG を室温 5 時間反応し ABC 法にて DAB 標本を作製した。蛍光二重免疫染色では NeuN (millipore, Temeculla, CA, USA, x250)、GFAP (Dako, Japan, x250)、APC (Gene Tex, x20)、isolectin GS-IB4 from griffonia simplicifolia Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen, x20, MBP (Santa Cruz, x250) 各抗体と LPA1 抗体を一次抗体として室温 24 時間反応後、二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG を室温 3 時間反応し蛍光免疫染色標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV 1000) にて観察撮影を行った。

(4) 電子顕微鏡レベルでの免疫組織化学  
L5 神経結紮切断後 7, 14 日目マウスを 0.1% グルタルアルデヒド、4% パラフォルムアルデヒド混液にて灌流固定後 L5 脊髄摘出し浮遊切片 (50  $\mu$ m) 作成、LPA1 抗体を用い ABC 法にて免疫染色を行った。その後、オスミウムにて後固定、脱水、エポキシ樹脂包埋、超薄切片を作製し、ウランと鉛染色後、電子顕微鏡にて観察した。

(4) western blotting  
L5 神経結紮切断後 7, 14 日目マウスの脊髄 (L5) を摘出し液体窒素により凍結、蛋白抽出後、20  $\mu$ g を 12% SDS-polyacrylamide gel にて電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写、膜上で LPA1 抗体を用い免疫反応を行った。

(5) RT-PCR  
L5 神経結紮切断後 7, 14 日目マウスの脊髄 (L5) を摘出し、液体窒素により凍結、total RNA を分離、cDNA に変換後、オリゴヌクレオチド プ ラ イ マ ー (S-CAAAATGAGGCCTTACGACGCCA, AS-TCCCATTCTGAAGTCTGCGTTC, 621b) を用い

変性、アニーリング、伸長反応ののち、ゲル上で電気泳動を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗体作成

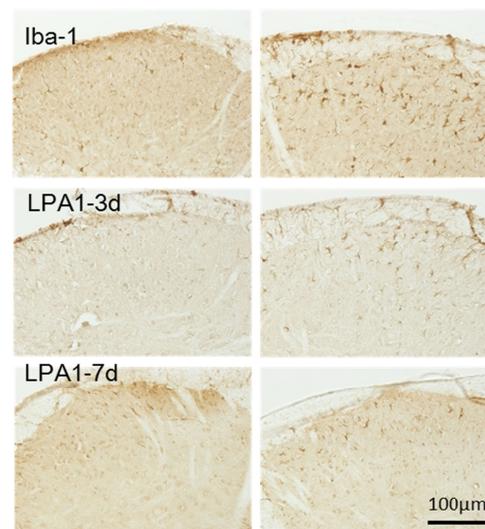
免疫染色や western blotting 実験のため当初、市販の LPA-1 抗体を実験に使用したが、いずれも染色性が一定せず、データの信頼性に欠けるため、新たにウサギ二羽を用い、合成ペプチドからポリクローナル抗体を作成しカラム精製まで実施した。この新たに作成した LPA-1 抗体はペプチドを用いた吸収試験の結果免疫染色は消失し特異性を確認した。

##### (2) 脊髄後角における光学顕微鏡レベルでの LPA1 の局在

1) DAB 反応による脊髄後角、後根神経節、脊髄神経での LPA1 陽性細胞の局在と経時的変化

神経因性疼痛モデル作製の確認は脊髄後角第 2 - 3 層へのミクログリアの遊走浸潤により行った。すなわち、術後 3 日目では脊髄後角 2 - 3 層にかけては Iba-1 陽性のミクログリアの増加が認められ、術後 7 日にかけて軽度増加が確認できたので、連続切片での LPA1 免疫反応を実施した。LPA1 陽性反応は術後 3 日目の脊髄後角では手術側、非手術側共に第 1-2 層にかけて類円形核と少ない突起を有する astrocyte と考えられる細胞に散在性に認められた。手術側では同様の様相を示す細胞の軽度の数の増加がみられた (図 1)。

図 1 対照側 手術側



術後 7 日目では脊髄後角 2 - 3 層のミクログリアの増加部位に 3 日と同様の astrocyte に LPA1 陽性反応が認められたが、数の増加はみられず、対照側とほぼ同様に少数が散在性に認められた (図 1)。

加えて、LPA1 陽性反応は術後 3 日目の後根神経節 (DRG) の非手術側では後根神経節細胞

の細胞膜は陰性か一部弱い陽性反応を認めたが、手術側の DRG では多くの神経節細胞の細胞膜が非手術側に比し強い LPA1 陽性反応を示した。後角への入力脊髄神経部では手術側、非手術側共に Schwann cell と考えられる小型紡錘形核と細く長い突起を有する細胞

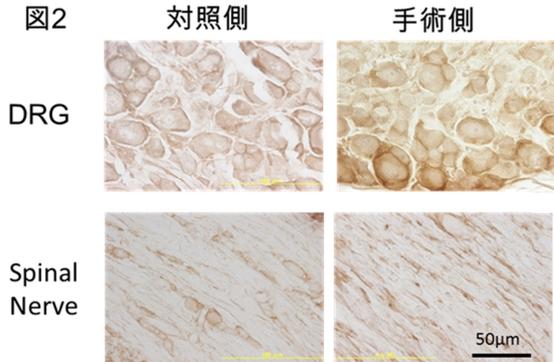


図2 胞、および髄鞘に LPA1 陽性反応が示された (図2)。

(2) 二重免疫蛍光抗体法による LPA1 と共存する細胞種の同定  
二重免疫蛍光抗体法により iba-1 抗体(ミクログリア)、GFAP 抗体(アストロサイト)、AP1、あるいは MBP 抗体(オリゴデンドロサイト)との蛍光二重免疫染色の結果、LPA-1 抗体は AP1 抗体、MBP 抗体、一部の GFAP 抗体に陽性反応を示し、脊髄後角ではオリゴデンドロサイト、アストロサイトの細胞質あるいは細胞膜および突起に陽性反応が認められ、術後3、7日目には非手術側に比し、陽性細胞数が軽度増加傾向を示した。LPA1 陽性細胞と共存するこれらの細胞はすべての細胞でなく部分的であった。Microglia マーカーである lectin と LPA1 の共存は見られなかった。また neuron マーカーである NeuN と LPA1 の共存は認められなかった (図3)。

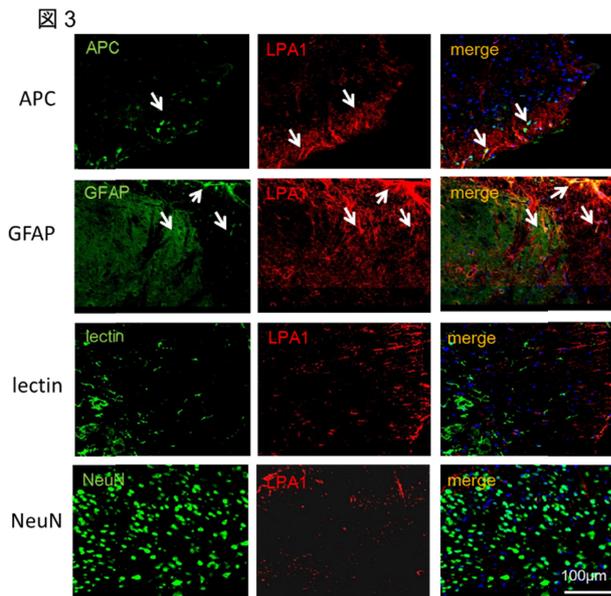
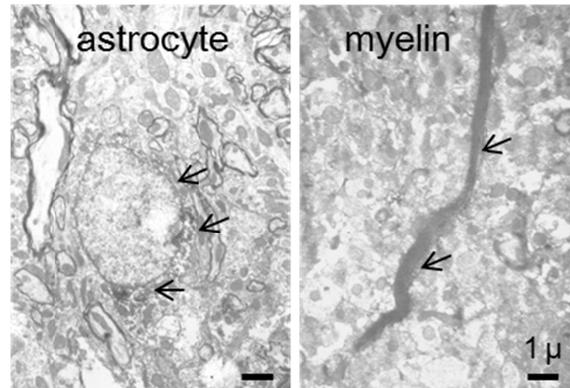


図3 電子顕微鏡観察による LPA1 陽性細胞の微細形態について

免疫電顕による LPA1 陽性細胞の観察を行ったところ、LPA1 免疫陽性反応が顆粒状に認められた免疫反応陽性細胞は均質なクロマチン分布の明るい円形核を有する細胞で、細胞質にはグリアフィラメントと考えられる中間系フィラメントが認められ、これら細胞はアストロサイトと考えられ細胞であった。

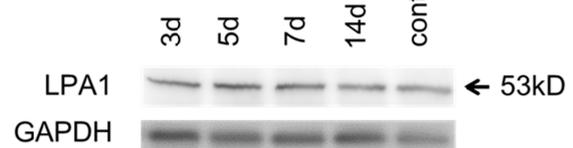
図4



加えて細長く伸びる髄鞘と考えられる構造物に顆粒状の免疫反応産物が確認された (図4)。

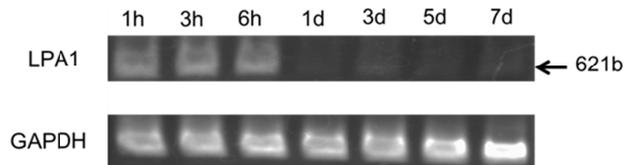
(4) western blotting による蛋白の経時的変化  
蛋白の変動に関してみる目的で western blotting を実施した。術後 3, 5, 7, 14 日共にコントロールとした非手術脊髄と変化は認められなかった (図5)。

図5



(6) RT-PCR による mRNA の経時的変化  
(7) PCR 産物は 621 bp のバンドが確認された。反応産物は術後 1, 3, 6 時間後に認められたが、その後の 1, 3, 5, 7 日ではバンドはほとんど確認できなかった。反応産物によるバンドは 1 時間後から認められ、3 - 6 時間で最も濃く、観察されたが、その後は消失した (図6)。

図6



これまで LPA の産生は神経傷害後数時間以内に生じることが報告されており、今回の

我々のモデルでの早期のLPA-1の発現動態もそれを支持している。予想に反してミクログリアにはLPA-1の局在がみられず、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに認められ、今回の実験ではミクログリアと脱髄との関連性は確認できなかったが、このLPAの早期の発現動態によりATPを介した脊髄ミクログリアの形態変化や遺伝子変化、アストロサイトにより産生された分子による神経細胞への作用などが連動して生じ、以後の慢性的な神経傷害性疼痛へと発展するものと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Maeda M, Takemura A, Toda I.  
Expression of single-stranded DNA and p53 in delayed neuronal death after transient ischemia in the gerbil hippocampus. *J Osaka Dent Univ*, 47: 31-40, 2013【査読有】

Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, and Kiyama H: Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuro-muscular junctions. *J of Neuroscience*, 30:6954-6962, 2011【査読有】

Maeda M, Tsusda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Kiyama H. Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y12 signaling-dependent manner in the dorsal horn. *Glia*, in press, 2010【査読有】

〔学会発表〕(計3件)

第54回歯科基礎医学会学術大会・総会  
奥羽大学 2012年09月14~16日  
前田光代、武村明道、戸田伊紀ほか  
脳虚血モデルにおける変性神経細胞のサイクリンG1の局在とp53非依存性核内移行について

The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society  
京都国際会館 2012年09月18~19日  
Momota Y, Nakagomi T, Doi A, Maeda M, Shibata H, Taguchi A, Tsukamoto Y, Suwa F, Kotani J, Matsuyama T. Pericyte-derived neural stem/progenitor cells induced by transient cerebral ischemia.

第53回歯科基礎医学会学術大会・総会  
岐阜県長良川国際会議場 2011年10

月1~2日 前田光代、武村明道、戸田伊紀ほか 運動神経切断後の再生軸索の形態学的マーカーとしての Vesicular acetylcholine transporter

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

前田 光代 (MAEDA Mitsuyo)  
公益財団法人先端医療振興財団  
先端医療センター再生医療研究部脳神経機能再生研究グループ 上席研究員  
研究者番号: 40122080

##### (2) 研究分担者

諏訪 文彦 (SUWA Fumihiko)  
大阪歯科大学・歯学部 教授  
研究者番号: 30067178

上村 守 (UEMURA Mamoru)  
大阪歯科大学・歯学部 助教  
研究者番号: 30351472

竹村 明道 (TAKEMURA Akimichi)  
大阪歯科大学・歯学部 准教授  
研究者番号: 00155045

戸田 伊紀 (TODA Isumi)  
大阪歯科大学・歯学部 講師  
研究者番号: 20197891