

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390351

研究課題名(和文) 脊髄障害性疼痛の分子生物学的病態解析とニューロイメージングを用いた脊髄機能評価

研究課題名(英文) The molecular biological analysis of spinal cord related pain and the assessment of spinal cord function using neuroimaging

研究代表者

内田 研造 (Uchida, Kenzo)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：60273009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間質細胞(BMSC)移植による疼痛抑制効果についてGFPキメラマウスを用いて検討した。損傷3日目にBMSCを移植し、運動機能や疼痛閾値の有意な改善がみられた。BMSC移植群では、後角ニューロンのpCREB、PKC発現低下、hematogenous macrophagesおよびresident microgliaにおけるMAPK signaling (p-38, ERK1/2)の低下、Albmin透過性低下・PDGFR-発現低下がみられた。脊髄損傷後慢性疼痛にMAPKが関与している可能性が示唆され、BSCB破綻がBMSC移植により抑制されたことが疼痛抑制の一因であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) transplantation on pain hypersensitivity in GFP-positive bone marrow-chimeric mice subjected to a contusion spinal cord injury (SCI). BMSC transplantation at day 3 post-SCI improved motor function and relieved SCI-induced hypersensitivities. The pain improvements were mediated by suppression of PKC- and p-CREB expression in dorsal horn neurons. BMSC transplants significantly reduced levels of mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling (p-p38 MAPK and p-ERK1/2) in both hematogenous macrophages and resident microglia. BMSC transplants prevented hematogenous macrophages recruitment by restoration of the blood-spinal cord barrier (BSCB); reduced leakage of albumin and PDGFR- immunoreactivity at day 7 post-SCI, which was associated with decreased levels of inflammatory cytokines. These changes is likely to play a major role in reducing pain hypersensitivity in the BMSC treated SCI animals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊髄損傷 神経障害性疼痛 遺伝子解析 画像解析 活性型ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷による重篤な神経症状を回復させる治療は非常に重要性が高く、近年は様々な基礎研究が報告されているが、未だに臨床応用には至っていないのが現実である。我々はこれまでに、関節リウマチなどの炎症性疾患に臨床使用されている TNF- $\alpha$  antagonist である etanercept や抗 IL-6 抗体である MR16-1 を脊髄損傷後に投与することで、急性期の過剰な炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 、IL-6) の発現抑制、neuron や oligodendrocyte のアポトーシス抑制や免疫担当細胞 (neutrophil、macrophage、microglia) の集積の変化などを報告している。また、損傷脊髄に対する非侵襲的な手法として、adenovirus vector を用いて、神経栄養因子 (BDNF、NT-3 など) 遺伝子を脊髄内に導入することで神経保護効果を示してきた。最近の研究として、ラット脊髄損傷モデルを用いて、ヒト骨髄間質細胞 (human Bone Marrow Stromal Cell : hBMSC) の損傷部への直接移植による、脊髄内 cavity の修復、運動機能改善、macrophage phenotype の変化などを報告している。最近の報告では、損傷脊髄における免疫担当細胞として、末梢由来の neutrophil、macrophage や脊髄由来の microglia の動態が、脊髄再生に大きく関与するとされており、特に脊髄損傷の2次損傷において、macrophage の phenotype や resident microglia の高い貪食能と脊髄保護効果を調節することが脊髄再生における一つの治療対象となりうる事が示唆されている。BMSC 移植による神経保護効果として、これらの炎症担当細胞の変化が関与していることは明確であるが、近年の報告では、損傷脊髄内の移植 BMSC は神経 glia 細胞などへの分化能はあまり示さず、BMSC 自体が有する神経保護効果や軸索再生誘導効果、血管新生効果、免疫抑制効果などが注目されており、間接的に炎症担当細胞に影響を与えるとされる。我々もラットおよびマウス実験モデルにおいて同様の報告を行ってきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス胸髄損傷モデルを作成し、移植 BMSC の損傷脊髄内での経時的動態を検討するとともに、脊髄損傷後慢性疼痛の評価および BMSC 移植による慢性疼痛への影響について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 移植マウス骨髄間質細胞の経時的な動態の評価

#### ①脊髄損傷モデルマウスの作成

実験動物には C57BL6/N マウス (8~12 週齢, 20-25g) を用いる。作製したマウスを用い、第 9 胸椎椎弓切除を行い、IH impactor (60Kdyn) を用いて硬膜上に圧迫を加えて脊髄圧挫損傷モデルを作成した。

#### ②マウス骨髄間質細胞の培養

マウス骨髄間質細胞を用い、培地には DMEM (GIBCO 社) を使用し、10% FBS、Penicillin-Streptomycin を添加する。第 4 世代まで培養した時点で細胞を回収し、 $1.0 \times 10^6$  個/ml の濃度で液体窒素内で冷凍保存する。また移植 BMSC の動態を検討する目的で CAG-EGFP transgenic マウス (日本 SLC 社) の BMSC も同様に培養を行った

#### ③脊髄損傷マウスへの BMSC 移植および移植 BMSC の経時的評価

脊髄損傷後 3 日の時点で、約  $1.0 \times 10^5$  個 ( $3 \mu$ l) を microinjector を用いて、約 60 秒かけて移植する。移植後 1 日、3 日、1 週、2 週、4 週の時点で脊髄を 4% PFA で還流固定し摘出し、凍結標本を作成し、BMSC の生存率を経時的に評価した。

(2) 脊髄損傷後の血液由来細胞の経時的変化の検討

①GFP 陽性骨髄細胞移植キメラマウスの作成 C57BL6/N マウスへ 9Gy の放射線全身照射後、ほぼ同週齢の CAG-EGFP transgenic マウス (日本 SLC 社) の大腿骨および脛骨より採取した骨髄細胞 ( $5.0 \times 10^6$  個/ml) を尾静脈より移植し、3~4 週間の回復期を設けたマウスを GFP 陽性骨髄細胞移植キメラマウスとした

②脊髄損傷後の microglia の経時的変化の検討 キメラマウスの胸髄圧挫損傷モデルで、損傷 4 日、1, 2, 4 週後に還流固定を行い、損傷部脊髄および腰膨大部を中心に脊髄を摘出する。Microglia の各種抗体 (Iba-1、CD11b) を用いて、蛍光免疫染色により microglia を同定した。

③BMSC 移植後の microglia の経時的変化の検討 ②の胸髄損傷マウスに対して、損傷後 3 日に損傷脊髄部に BMSC を約  $1.0 \times 10^5$  個 ( $3 \mu$ l) 移植し、②と同様に microglia の蛍光免疫染色および FACS を行い、microglia の局在、定量化を比較検討した。

(3) 脊髄損傷後慢性疼痛評価および BMSC 移植による除痛メカニズムの検討

①神経因性疼痛の行動学的評価と経時的変化および BMSC 移植による変化の検討

疼痛評価は痛覚検査装置 (UGO BASILE 社製のデジタル式機器) を使用し von Frey filament test、Paw pressure test (機械的痛覚過敏)、Paw flick test (熱的痛覚過敏) を似て評価した。運動機能評価には Basso Mouse Scale (BMS) を用いた。laminectomy のみ行った sham 群、損傷群、治療群の 3 群に分けて比較検討を行った。

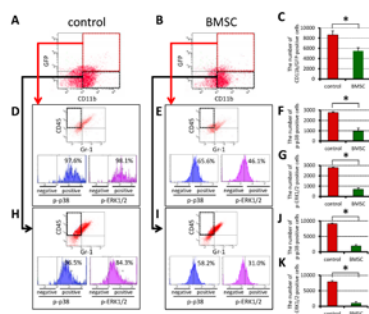
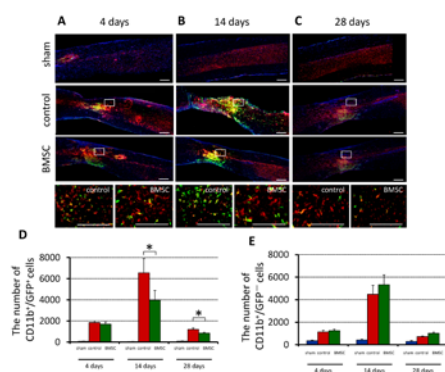
②脊髄内疼痛関連物質の分布と変化の組織学的検討

脊髄損傷後の疼痛関連物質として、PKC $\gamma$ 、pCREB、MAPK (p38、ERK1/2) などの既知の蛋白および、微小分子として、CCL2、CCL5、CCR2 などといった chemokine を用いて、損傷後 3~4 週のマウスを用いて、上記と同様の手法で脊髄連続切片で蛍光免疫染色および損傷

部脊髄を用いた Western Blotting を行い、脊髄内での物質の分布および治療介入による変化について検討を行った。

#### 4. 研究成果

BMSC 移植群では運動機能や疼痛閾値の有意な改善がみられた。組織学的に、pCREB、PKC $\gamma$  は脊髄ニューロン内に主に分布し、損傷群で著明な陽性細胞数の上昇を認めたが、治療群ではこれが有意に低下した。慢性期損傷後 2 週以降では p38 は主に microglia で、ERK、JNK は astrocyte で発現がみられ、BMSC 移植群ではこれらの蛋白の低下がみられた。BMSC 移植により、損傷脊髄内の GFP 陽性末梢血由来細胞は減少しており、同時に移植後 1 週の時点で Albmin の透過性低下、血管周囲の PDGFR- $\alpha$  の発現低下がみられ、BSCB 機能の修復が起きたと評価した。各種 cytokines、chemokines は BMSC 移植により低下していることが確認できた。免疫染色および FACS では microglia は移植後 4 日まで上昇がみられ、以降は漸減していった。治療群ではこの上昇が抑制され、有意な microglia の上昇を認めなかった。



BMSC 移植後には BSCB 機能の変化や改善を認め、これにより脊損後 2 次損傷が抑制され運動機能、感覚機能の改善が得られたと考えられた。脊髄損傷後慢性疼痛に MAPK が関与している可能性が示唆された。BSCB 破綻を起こすと考えられる chemokines、さらにそれらを誘導する pro-inflammatory cytokines が

BMSC 移植により抑制されたことがその一因であると考えた。

#### 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 15 件)

① S Watanabe, K Uchida, H Nakajima, H Matsuo, D Sugita, A Yoshida, K Honjoh, Johnson WE, H Baba. Early Transplantation of Mesenchymal Stem Cells after Spinal Cord Injury Relieves Pain Hypersensitivity Through Suppression of Pain-Related Signaling Cascades and Reduced Inflammatory Cell Recruitment. *Stem Cells*. 査読有. 2015, in press. DOI: 10.1002/stem.2006.

② H Matsuo, K Uchida, H Nakajima, Alexander Guerrero, S Watanabe, N Takeura, D Sugita, S Shimada, T Nakatsuka, H Baba. Early transcutaneous electrical nerve stimulation reduces hyperalgesia and decreases activation of spinal glial cells in mice with neuropathic pain. *Pain*. 査読有. 2014, 155(9), 1888-1901. DOI: 10.1016/j.pain.2014.06.022.

③ K Uchida, H Nakajima, Alexander Guerrero, William EB Johnson, Wagih El Masri, H Baba. Gene therapy strategies for the treatment of spinal cord injury. *Ther Deliv*. 査読有. 2014, 5(5), 591-607. DOI: 10.4155/tde.14.20.

④ 中嶋秀明, 内田研造, 馬場久敏. FDG-PET による脊髄機能評価. *Bone Joint Nerve 特集「整形外科イメージングの進歩」*. 査読無. 2014, 4(2), 223-229.

⑤ 竹浦直人, 内田研造, 中嶋秀明, 渡邊修司, 吉田藍, 馬場久敏. 慢性圧迫脊髄における疼痛発現に関する基礎的研究—twy chimeric mouse を用いて—. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 平成 25 年度 総括・分担研究報告書. 査読無. 2014, 47-50.

⑥ K Uchida, H Nakajima, N Takeura, T Yayama, Alexander Guerrero, A Yoshida, T Sakamoto, K Honjoh, H Baba. Prognostic value of changes in spinal cord signal intensity on magnetic resonance imaging in patients with cervical compressive myelopathy. *Spine J*. 査読有. 2013, 1;14(8), 1601-1610.

DOI: 10.1016/j.spinee.2013.09.038.

⑦ Tan Ying, K Uchida, H Nakajima, Alexander Guerrero, S Watanabe, T Hirai, N Takeura, Lui Shao-Yu, Johnson William E B, H Baba. Blockade of interleukin 6 signaling improves the survival rate of transplanted bone marrow stromal cells and increases locomotor function in mice with spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 査読有. 2013, 72(10), 980-993. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182a79de9.

⑧ 竹浦直人, 内田研造, 中嶋秀明, 平井貴之, 渡邊修司, 馬場久敏. 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy mouse) を用いた脊髄後角における

MAPK pathway に関する免疫組織学的検討。中部整災誌。査読無。2013, 56(5), 1117-1118.

⑨T Hirai, K Uchida, H Nakajima, Alexander Guerrero, N Takeura, S Watanabe, D Sugita, A Yoshida, W E Johnson, H Baba. The prevalence and phenotype of activated microglia/macrophages within the spinal cord of the hyperostotic mouse (twy/twy) changes in response to chronic progressive spinal cord compression: Implications for human cervical compressive myelopathy. PLoS One. 査読有。2013, 8(5), e64528.

DOI: 10.1371/journal.pone.0064528.

⑩中嶋秀明, 内田研造, 平井貴之, Alexander Guerrero, 渡邊修司, 竹浦直人, 吉田藍, 馬場久敏. 慢性圧迫脊髄(twy/twy)における脊髄内 activated microglia/macrophage の極性変化と生理学的意義。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書。査読無。2013, 58-61.

⑪渡邊修司, 内田研造, 中嶋秀明, Alexander Guerrero, 平井貴之, 馬場久敏. 損傷脊髄における PK11195 を用いた activated microglia の組織学的検討。中部整災誌。査読無。2013, 56(1), 227-228.

⑫K Uchida, H Nakajima, T Hirai, T Yayama, Chen Ke-bing, Alexander Guerrero, William E Johnson, H Baba. The retrograde delivery of adenovirus vector carrying the gene for brain-derived neurotrophic factor protects neurons and oligodendrocytes from apoptosis in the chronically compressed spinal cord of twy/twy mice. Spine. 査読有。2012, 37(26), 2125-2135.

DOI: 10.1097/BRS.0b013e3182600ef7.

⑬K Uchida, H Nakajima, H Okazawa, H Kimura, T Kudo, S Watanabe, A Yoshida, H Baba. Clinical significance of MRI/18F-FDG PET fusion imaging of the spinal cord in patients with cervical compressive myelopathy. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 査読有。2012, 39(10), 1528-1537.

⑭内田研造, 中嶋秀明, 渡邊修司, 馬場久敏, 牛田享宏. 脊髄障害性疼痛。査読無。整形外科, 特集「運動器の慢性疼痛—治療新戦略」2012,63(8),797-801.

⑮平井貴之, 内田研造, 中嶋秀明, Alexander Guerrero, 馬場久敏. 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy) における macrophage の動態と意義。査読無。中部整災誌。2012,55(3),579-580.

〔学会発表〕(計7件)

①内田研造, 中嶋秀明, 馬場久敏. 脊髄障害性疼痛におけるミクログリア/マクロファージの活性化分子メカニズム。第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会。2014.10.9-10. 城山観光ホテル(鹿児島市)。

②竹浦直人, 内田研造, 中嶋秀明, 渡邊修司, 吉田藍, 本定和也, 馬場久敏. GFP マウス骨

髄を移植した twy キメラマウスを用いた慢性疼痛に関する免疫組織学的検討。第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会。2014.10.9-10. 城山観光ホテル(鹿児島市)。

③馬場久敏, 中嶋秀明, 竹浦直人, 吉田藍, 渡邊修司, 犬飼智雄, William E B Johnson, 内田研造. 脊髄圧迫・損傷における神経生物学的可塑性と再生医学的応答。第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会。2014.10.9-10. 城山観光ホテル(鹿児島市)。

④H Nakajima, K Uchida, N Takeura, K Honjoh, T Sakamoto, H Baba. Quantitative analysis and prognostic value of changes in spinal cord signal intensity on magnetic resonance imaging in patients with cervical compressive myelopathy. Euro Spine 2014. 2014.10.1-3. Lyon (France)。

⑤T Hirai, K Uchida, H Nakajima, T Inukai, N Takeura, S Watanabe, H Baba. Chronic progressive compression induces the phenotype changes of the activated microglia/macrophages in the spinal cord of spinal hyperostotic twy/twy mouse: Implications in human cervical compressive myelopathy. Euro Spine 2014. 2014.10.1-3. Lyon (France)。

⑥K Uchida, H Nakajima, S Watanabe, K Honjoh, William EB Johnson, H Baba. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. The 16th Spinal Research Network Meeting. 2014.9.5-6. London (United Kingdom)。

⑦S Watanabe, K Uchida, H Nakajima, T Hirai, H Baba. Dynamic state and localization of microglia in injured spinal cord by the peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195. Euro Spine 2013. 2013.10.2-4. Liverpool(United Kingdom).

〔図書〕(計5件)

①中嶋秀明, 内田研造, 馬場久敏. 株式会社メディカルレビュー社. Case Library Series 痛みの診療 ベストプラクティス. 第 6 章 末梢性・中枢性神経障害性疼痛; 6. 脊髄損傷後の慢性疼痛; 経時的に増悪した脊髄損傷後疼痛に対する薬物療法. 2014. 116-117.

②K Uchida, H Nakajima, T Hirai, Sally Roberts, William E B Johnson, H Baba. Springer. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. Microarray analysis of expression of cell death-associated genes in spinal cord cells with cyclic tensile strain. 2014. 119-127.

③H Nakajima, K Uchida, Alexander Guerrero, S Watanabe, D Sugita, N Takeura, A Yoshida, H Baba. Springer. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. Transplantation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow in the injured spinal cord. 2014. 283-293.

④K Uchida, H Nakajima, H Okazawa, H Kimura, A Yoshida, H Baba. Springer. Neuroprotection

and Regeneration of the Spinal Cord. Clinical significance of 3D-MRI/18F-FDG PET fusion imaging of patients with cervical compressive myelopathy. 2014. 367-376.

⑤中嶋秀明, 内田研造, 馬場久敏, 牛田享宏. 真興交易 (株) 医書出版部. ペインクリニックのための新キーワード 135. 第II章 病態, 疼痛性疾患; 脊髄障害性疼痛. 2014. 147-149.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

内田 研造(UCHIDA, KENZO)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：60273009

### (2)研究分担者

馬場 久敏(BABA, HISATOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：00165060

中嶋 秀明(NAKAJIMA, HIDEAKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：10397276

牛田 享宏(USHIDA, TAKAHIRO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60304680