

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04766

研究課題名(和文) ダメージ関連分子パターン受容体の神経障害性痛における役割

研究課題名(英文) Roles of receptors for damage-associated molecular patterns on neuropathic pain

研究代表者

八坂 敏一 (YASAKA, Toshiharu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20568365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治性慢性疼痛である神経障害性疼痛は非ステロイド抗炎症薬やオピオイドが奏効せず、その原因解明と治療薬の開発が望まれている。この病態は神経障害に端を発する。ダメージを受けた細胞が放出する分子群は、ダメージ関連分子パターンと呼ばれ、パターン認識受容体(PRR)を刺激し病態形成のトリガーを引くと考えられる。本研究では、PRRの神経障害性疼痛発症における役割について調べた。ある種のPRR遺伝子欠損マウスでは、末梢神経損傷後の疼痛行動が減弱していた。また、そのPRRは損傷部位に浸潤してきた免疫細胞に発現していた。これらの結果から、このPRRが神経障害性疼痛発症に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain is a type of chronic pain that usually does not respond to non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids. Thus, better treatments for this condition are eagerly sought. Neuropathic pain result from damage to the nervous system. Molecules released from damaged cells are called damage-associated molecular patterns and are able to trigger pathogenesis of this disease through stimulating pattern recognition receptors (PRRs). In this study, we investigated roles of PRRs on the pathogenesis of neuropathic pain. Mice lacking a certain PRR showed impaired pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. Cells that expressed the receptor were identified as infiltrating leucocytes in injured nerve. These results suggest that the PRR investigated here contribute the pathogenesis of neuropathic pain.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経障害性疼痛 パターン認識受容体 神経免疫連関 疼痛学

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みは不快な感覚であるが、身体への有害刺激を感知し、その刺激から逃避するための警告系として、なくてはならない重要な働きをしている。しかし、慢性化した痛みには、そのような本来の役割はなく、ただ患者のQOLを著しく低下させるのみである。神経障害が原因となり難治性の慢性疼痛となってしまうケースがある。例えば、帯状疱疹後神経痛、糖尿病性神経障害による痛み、術後痛、抗がん剤による神経障害による痛み等が含まれる。患者は自発痛や痛覚過敏、さらに何かに触れただけで痛みが生じる異痛症(アロディニア)等の症状に苦しめられる。神経障害性疼痛は、非ステロイド性消炎鎮痛薬(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug、以下NSAIDs)やオピオイド等の既存の治療薬が奏効しないケースがあり、その原因解明と治療薬の開発が望まれている。

(2) 体内の組織で障害が起こった際、最初にそれを検知するのは自然免疫細胞であり、それらの細胞に発現しているパターン認識受容体(pattern recognition receptor、以下PRR)が重要な役割を担っている。これらのPRRは当初病原体特有の分子パターン(pathogen associated molecular patterns、以下PAMPs)を認識する受容体として研究されてきた。しかし、PAMPsだけでなくダメージを受けた細胞が放出する分子のパターン(damage associated molecular patterns、以下DAMPs)も認識することが分かり、病原体感染によらない体内の炎症やストレスによる組織障害・細胞へのダメージの際にも、それらを認識して免疫応答をトリガーする。DAMPsはPRRsの内因性リガンドである。これらのPRRsの内、最も研究が進んでいるのはトル様受容体(Toll-like receptor、以下TLR)である。この受容体10以上の分子からなるファミリーを形成しており、その内TLR4はもともと代表的なDAMPsの一つである細菌の細胞壁成分のリポポリサッカライド(Lipopolysaccharide、以下LPS)を認識する分子として盛んに研究されてきた。現在では内因性リガンドも発見され、生活習慣病や慢性疾患への関与も知られている。また、神経障害性疼痛との関与も報告されている。

(3) 近年TLR以外のPRRも研究が盛んに行われている。これらのPRRは細胞内のシグナル伝達にITAM(Immunoreceptor tyrosin-based activation motif)を有することからITAM関連受容体とも表現される。このモチーフはT細胞受容体やB細胞受容体に会合しているシグナル伝達分子に存在することが以前から知られており、研究の対象とされてきたが、それ以外にも多種多様なPRRと会合することが知られる様になった。TLRが10数種類であるのに対し、ITAM関連受

容体は30種類以上に上り、より多くのPAMPsやDAMPsを認識できることが予想される。これらの受容体のうち、それ自体にITAMを持つものは一部であり、その多くはITAMを持たないが、ITAMを有するDNAX-activating protein of 12 kDa(以下DAP12)やFc受容体鎖(Fc Receptor chain、以下FcR)と会合することによりシグナルを伝えている。上述したようにTLRと神経障害性疼痛の関連は既に報告されているが、ITAM受容体とのこの病態との関連はごく限られた情報のみである。

2. 研究の目的

我々は、神経障害性疼痛発症におけるPRRの役割について研究を行っている。我々がPRRに注目した理由は、組織損傷から神経障害性疼痛の病態へと至る過程のトリガーとなるメカニズムを探るためである。上述したように、体内で組織損傷が起こった際に最初にそれを検知するのは自然免疫細胞であり、損傷によるDAMPsを認識するのは免疫細胞(のみではないが)上のPRRである。これまでの研究から、様々な分子が関与していることが知られているが、それらの報告を踏まえると、様々な分子が同時並行的にイベントを起こしていくようなカスケードが幾重にも存在している可能性がある。そして、それらをトリガーするにはPRRが必要となる。PRRの役割を明らかにすることで、神経障害性疼痛発症のメカニズムの一端を明らかにすること、また、それを基に新規治療法・治療薬開発の可能性を探ることが目的である。これまで我々は、ITAM受容体の会合分子であるDAP12やFcRの遺伝子欠損マウス(以下KOマウス)を用いて、それらの分子の神経障害性疼痛における役割を研究してきた。FcR KOマウスでは、神経障害性疼痛モデルにおいて疼痛様行動の出現が軽減した。今回は、FcRに会合することが知られているITAM関連受容体の一つMincle(macrophage-inducible C-type lectin)の神経障害性疼痛における役割を明らかにする。これまでに我々は、予備実験においてMincle KOマウスで神経障害性疼痛が減弱することを見出ししていた。神経障害処置後のMincleの経時的発現パターンを明らかにし、また、発現細胞を同定する。さらに、Mincle欠損が他の疼痛関連分子の発現に及ぼす影響を調べることで、Mincleの神経障害性疼痛における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Mincle KOマウスの神経障害性疼痛モデルにおける表現型。

本実験で用いた神経障害性モデルは、L4脊髄神経を切断することによって作製した。疼痛行動の評価にはvon-Freyフィラメントを用い、50%閾値の測定を行った。

(2) Mincle mRNA の時間的発現パターンと発現細胞の同定。

野生型マウスを用いて神経障害性疼痛モデルを作製し、様々な時間経過で組織を採取し、Mincle mRNA の発現を Real time PCR を用いて調べた。組織は脊髄と後根神経節 (Dorsal root ganglia、以下 DRG) を用いた。組織の採取に当たっては、麻酔下のマウスを開胸し、心臓から RNAlater® (RNA 安定化剤) を心臓から全身に灌流した後に行った。当初の DRG サンプルでは、切断された脊髄神経を含めていたが、後に DRG と脊髄神経を分けた解析を行った。

Mincle mRNA の発現や発現細胞を同定する目的で組織学的検討もおこなった。脊髄神経損傷部位及び DRG 組織をヘマトキシリン染色し、浸潤細胞の有無を観察した。また、*In situ* ハイブリダイゼーション法により Mincle mRNA 発現細胞を組織学的に同定した。また、Mincle mRNA 陽性細胞がどのような細胞かを同定するため、単球/マクロファージと好中球のマーカー分子に対する抗体 (それぞれ抗 F4/80 抗体、抗 Ly6G 抗体) を用いて免疫組織化学染色を行った。

(3) フローサイトメトリーによる浸潤細胞の定量と同定。

切断脊髄神経及び DRG に浸潤してくる細胞がどのような細胞であるかを同定するためにフローサイトメトリーを用いて解析した。抗 CD11b 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 Ly6G 抗体を用い、CD11b⁺/F4/80⁺細胞を単球/マクロファージ、CD11b⁺/Ly6G⁺細胞を好中球とした。

(4) 疼痛関連分子遺伝子発現の検討。

Real time PCR 法により、Mincle KO マウスにおいてこれまでに報告されている疼痛関連遺伝子の発現に変化がないかを調べた。調べた組織はこれまでの報告から脊髄神経、DRG、脊髄後角を選択した。インターロイキン (Interleukin、以下 IL) -1、IL-6、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor、以下 TNF) - α 、マクロファージコロニー刺激因子 (Colony-Stimulating Factor、以下 CSF) -1、CCL (CC Chemokine Ligand) 2 等のサイトカインやケモカイン、ミクログリアのマーカーとして知られている ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (以下 Iba1) やその活性化や機能に関与すると考えられている P2X4 受容体、P2Y12 受容体、interferon regulatory factor-5 (以下 IRF5)、Brain derived neurotrophic factor (以下 BDNF) についてその発現を調べた。その際、内部標準には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 Gapdh) を用いた。

(5) 内因性リガンドの検索。

神経障害性疼痛モデルにおける Mincle の

内因性リガンドを検索するため、受容体への刺激を GFP の発現として検出できるレポーター細胞を用いた実験を行った。上述したように、この疼痛モデルは脊髄神経を切断して作製する。神経切断後に遊離されると思われる内因性リガンドの産生部位を脊髄神経と脊髄後角について調べた。

4. 研究成果

(1) Mincle KO マウスの神経障害性疼痛モデルにおける表現型。

von-Frey フィラメントを用いた機械刺激による Mincle KO マウス逃避行動の 50% 閾値を調べたところ、何も処置をしていない状態では、野生型マウスと差は見られなかった。従って、Mincle の遺伝子欠損は通常の痛みの感覚には影響を及ぼさないことが明らかとなった。野生型マウスと KO マウスの L4 脊髄神経を切断し、神経障害性疼痛を誘導したところ、野生型マウスでは 50% 閾値の著しい低下 (アロディニア) が観察されたが、KO マウスでは閾値の低下が有意に減弱していた (図 1)。従って、Mincle は神経障害性疼痛発症に関与することが明らかとなった。

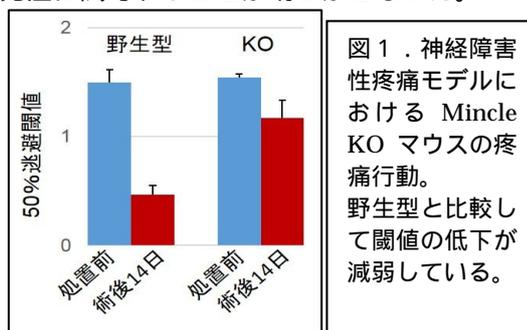


図 1. 神経障害性疼痛モデルにおける Mincle KO マウスの疼痛行動。野生型と比較して閾値の低下が減弱している。

(2) Mincle mRNA の時間的発現パターンと発現細胞の同定。

研究開始当初、我々は脊髄後角のミクログリアに Mincle が発現するのではないかと予想していた。その理由は、ミクログリアがこの疼痛モデルにおいて増殖・活性化して疼痛発生に寄与することが知られていたこと、また、Mincle を発現するマクロファージと性質が近く、脳内のマクロファージと呼ばれてことであった。その予想を基に脊髄後角の mRNA を抽出し Real time PCR 法で測定した結果、予想に反して脊髄後角では Mincle mRNA 上昇は検出感度以下であり、神経損傷後においても、上昇は見られなかった。その結果を受け、DRG での発現を検討した。その結果、神経損傷 3 時間後から上昇が確認され、6-12 時間でピークに達し、3 日後にはかなり収束することが明らかとなった (図 2)。この段階では DRG と脊髄神経を分けていなかったため、それらを分けて測定した結果、主な産生部位は切断された脊髄神経であることが明らかとなった。

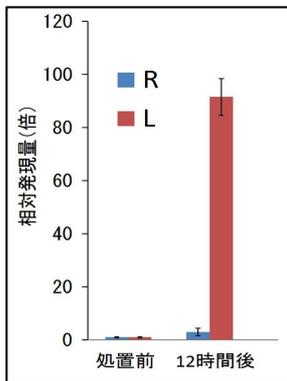


図2 . DRG (切断脊髄神経を含む)における *Mincl* mRNA の発現誘導。処置前の発現量を基準として、L4 脊髄神経切断後の発現量がおおよそ 100 倍弱まで増加する。

切断された脊髄神経で *Mincl* mRNA がどのように分布し、そのような細胞に発現しているのかを調べるため、*In situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Mincl* mRNA のシグナルは切断部位付近に集中し、そこへ浸潤してきた免疫細胞に発現している可能性が高いことが示唆された。これを確認するため、*In situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学染色を組み合わせた染色を行った。先行研究により、これらの浸潤細胞は好中球やマクロファージであることが知られていたため、それぞれ抗 Ly6G 抗体と抗 F4/80 抗体を用いた。その結果、12 時間後の損傷脊髄神経の切片では好中球、3 日後の同切片にはマクロファージの浸潤が確認された。これらの細胞が *Mincl* mRNA のシグナルと共存していることが観察され、好中球とマクロファージが *Mincl* を発現していることが明らかとなった。

(3) フローサイトメトリーによる浸潤細胞の定量と同定。

組織学的検討により好中球とマクロファージが *Mincl* を発現している浸潤細胞であることが明らかとなったことを受け、これらの定量を試みた。当初、組織切片で細胞数のカウントを試みた。ヘマトキシリン染色により分葉化した核を持つ典型的な好中球の像を観察することが出来た(図3)。しかし非

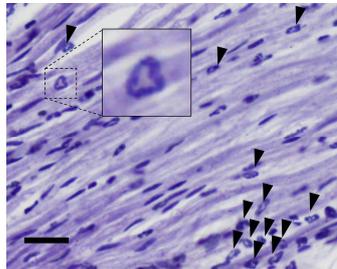


図3 . 切断脊髄神経のヘマトキシリン染色像。分葉化した核を持つ好中球の浸潤(矢頭)。

常に小さいマウスの脊髄神経の均質な切片を作製することはかなり難易度が高かった。そのためフローサイトメトリーを用いた浸潤細胞の定量を行った。神経を切断した脊髄神経と DRG について浸潤細胞を測定した結果、24 時間後の脊髄神経において $CD11b^+/Ly6G^+$ の好中球の有意な増加が、また、3 日後の DRG において $CD11b^+/F4/80^+$ の単球/マクロファージの有意な増加が検出された。

(4) 疼痛関連分子遺伝子発現の検討。

Mincl は好中球やマクロファージの浸潤には影響しないと考えられたことから、*Mincl* 下流の遺伝子発現や、その後続くイベントでの遺伝子発現が変化すると考えられた。そのため、これまで報告されている疼痛関連遺伝子について Real time PCR 法により測定を行った。予想に反して、切断部位(脊髄神経)における IL-1、IL-6、TNF- α 及び CCL2 の発現上昇には野生型と KO マウス間に差が見られなかった。一方 DRG では、調べた多くの遺伝子について発現上昇に差は見られなかったものの、ある種サイトカインについて *Mincl* KO マウスでの発現上昇が有意に減弱していたことが明らかとなった。さらに、脊髄においては、ミクログリアのマーカーである *Iba1* の発現は野生型と KO マウスの間に差は見られなかった。このデータは免疫組織化学染色でのミクログリアの増殖を調べた結果と一致していた。また、炎症性サイトカイン等の遺伝子にも野生型と KO マウス間における差は検出されなかった。しかし、ミクログリアの活性化に関わるとされるある種の遺伝子について発現上昇が KO マウスにおいて有意に減弱していたことが明らかとなった。

(5) 内因性リガンドの検索。

上述したように、当初我々は脊髄ミクログリアに *Mincl* が発現すると予想していた。その予想に基づいて脊髄の抽出物を用いて *Mincl* レポーター細胞を刺激したが、陽性の応答は検出できなかった。その後 *Mincl* の発現部位や発現細胞が明らかになったことを受け、末梢神経の抽出物を用いてレポーター細胞の刺激を行った。弱いながら GFP 陽性細胞を検出したケースもあったが、未だ結論に至らず、結果としてリガンドの同定には至らなかった。近年 *Mincl* の内因性リガンドとして α -glucosylceramide (以下 α -GlcCer) という糖脂質が同定された。 α -GlcCer を含む糖脂質は脳などの神経系に豊富に存在することが知られており、その代謝異常はゴーシェ病の原因となる。神経障害性疼痛モデルの切断脊髄神経における内因性リガンドが α -GlcCer である可能性も高いと考えられる。

(6) まとめ(図4)。

パターン認識受容体の一つである *Mincl* は、その KO マウスにおいて末梢神経損傷による神経障害性疼痛の表現型が減弱していたことから、この病態発症に関与していると考えられた。*Mincl* は損傷した神経に浸潤してくる好中球やマクロファージに発現しており、(おそらく損傷部位にある)内因性リガンドにより刺激を受け、これらの浸潤細胞を活性化させる。それがある種の連鎖反応をトリガーし、浸潤細胞の *Mincl* 依存性活性化の結果による因子は、DRG でのある種のサイトカインの発現に、脊髄ではある種のミクログリア活

性化因子の発現を促進し、疼痛の発現に寄与していると推察される。この結果は、DRGにおけるこのサイトカインのブロックにより神経障害性疼痛が抑制されるという報告と一致する。また、脊髄神経における Mincle の発現・活性化は DRG を介して脊髄に影響を及ぼしている可能性が高いと考えられる。このサイトカインは DRG ニューロンで発現しているという報告もあるので、脊髄へ投射している軸索末端からこのサイトカインが放出される可能性もある。その場合、このサイトカインがミクログリア活性化因子の発現を調節している可能性もあるが、それを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。また、脊髄神経における Mincle の発現・活性化が何らかの方法で直接脊髄に影響を及ぼしている可能性を完全に否定することは出来ない。さらに、今回調べた遺伝子以外の関与を否定することは出来ないため、それぞれの部位で、同定することができなかった他の因子も関与する可能性は多分に残っており、その全貌を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

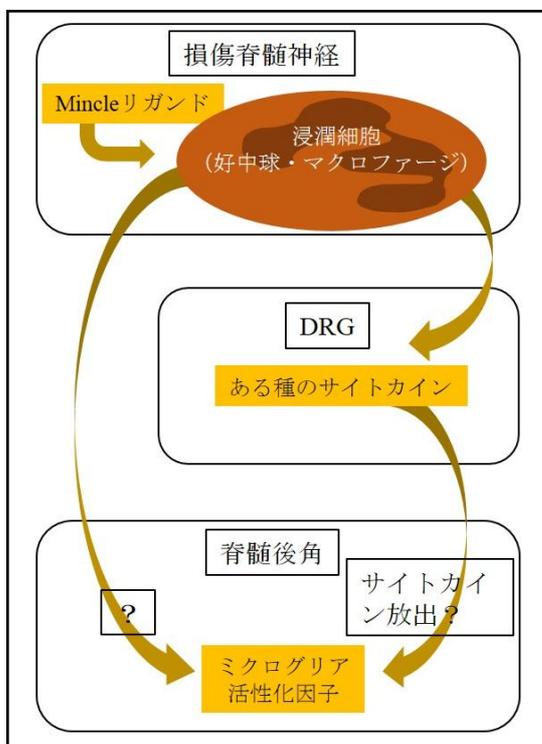


図4 .Mincle の神経障害性疼痛における役割。損傷脊髄神経において Mincle を発現する浸潤細胞がリガンドで刺激され、Mincle 依存性の因子が、DRG におけるある種のサイトカイン発現を上昇させる。また、脊髄においてはある種のグリア活性化因子の発現を上昇させると考えられる。脊髄への影響は、恐らく DRG での遺伝子発現を介したものと考えられるが、何らかの直接的な作用もある可能性は否定できない。詳しくは本文参照。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

八坂 敏一、脊髄後角局所回路におけるインターニューロンの多様性と役割、Pain Research、査読無、vol. 33、No. 1、2018、pp. 10-17

Murata Y, Yasaka T, Takano M, Ishihara K. Neuronal and glial expression of inward rectifier potassium channel subunits Kir2.x in rat dorsal root ganglion and spinal cord. Neuroscience Letters 査読有、vol 617、2016、pp. 59-65、DOI:10.1016/j.neulet.2016.02.007.

〔学会発表〕(計 17 件)

Yasaka T, Todd AJ, Graham BA, Hughes DI, Neuronal circuitry for pain processing in the spinal dorsal horn、The 7th Asian Pain Symposium (アジア疼痛シンポジウム)、2017 年

八坂 敏一、笹栗 智子、平川 奈緒美、村田 祐造、原 博満、吉田 裕樹、インターロイキン 27 の感覚閾値調節における役割、平成 29 年度生理学研究所研究会「第 1 回感覚免疫学研究会」、2017 年

石川 亜佐子、平川 奈緒美、三宅 靖延、原 博満、吉田 裕樹、八坂 敏一、C-type lectin の神経障害性疼痛における役割、日本麻酔科学会第 64 回学術集会、2017 年

八坂 敏一、脊髄後角局所神経回路におけるインターニューロンの多様性と役割、第 39 回日本疼痛学会、2017 年

八坂 敏一、脊髄後角インターニューロンの多様性と局所神経回路における役割、平成 28 年度生理学研究所研究会「痛みを理解を目指した先端的アプローチ」、2017

八坂 敏一、David I Hughes、園畑素樹、Andrew J Todd、原博満、脊髄後角局所神経回路の抑制性調節に関する研究、第 9 回日本運動器疼痛学会、2016 年

Ishikawa A, Yasaka T, Miyake Y, Murata Y, Sasaguri T, Yamasaki S, Hara H, Yoshida H, Hirakawa N, Possible contribution of the C-type lectin receptor, Mincle, to induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury in mice、The 16th World Congress on Pain (国際疼痛学会)、2016 年

Sasaguri T, Yasaka T, Ishikawa A, Murata Y, Hara H, Yoshida H, Hirakawa N, Constitutive control of pain sensitivity in physiological and pathological condition by interleukin-27 in mice、The 16th World Congress on Pain (国際疼痛学

会) 2016年

Yasaka T, Boyle K, Graham B, Hughes D, Parvalbumin-Expressing Interneurons In The Mouse Spinal Dorsal Horn Gate Low Threshold Mechanoreceptive Input To Lamina I, The 16th World Congress on Pain (国際疼痛学会) 2016年

石川 亜佐子、八坂 敏一、平川 奈緒美、村田 祐造、原 博満、吉田 裕樹、Mincle (macrophage inducible C-type lectin) ノックアウトマウスの疼痛行動解析、日本麻酔科学会第63回学術集会、2016年

石川 亜佐子、八坂 敏一、笹栗 智子、平川 奈緒美、村田 祐造、三宅 靖延、山崎 晶、原 博満、吉田 裕樹、脊髄疼痛誘導サイトカインにはC型レクチンが必要である、第81回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2016年

笹栗 智子、八坂 敏一、石川 亜佐子、村田 祐造、原 博満、平川 奈緒美、吉田 裕樹、痛み行動におけるIL-27の役割、第81回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2016年

八坂 敏一、マウス脊髄後角II層 vertical cell への抑制性入力への解析、第93回日本生理学会大会、2016年

八坂 敏一、Hughes DI、藤田 亜美、熊本 栄一、Todd AJ、脊髄後角II層 vertical cell への抑制性入力に関する研究、平成27年度生理学研究所研究会「痛みの理解を目指した先端的アプローチ」、2015年

八坂 敏一、Boyle AK、Shehab AS、Scott TD、Riddell SJ、藤田 亜美、熊本 栄一、Callister JR、Graham AB、Hughes ID、脊髄後角への有髄一次求心性線維入力はパルプアルブミン発現インターニューロンによるシナプス前抑制を受ける、第38回日本神経科学大会、2015年

八坂 敏一、Boyle K、Shehab S、Scott D、Riddell J、藤田 亜美、熊本 栄一、Callister R、Graham B、Hughes D、ラット脊髄後角において有髄線維終末をシナプス前抑制する細胞の同定、第37回日本疼痛学会、2015年

笹栗 智子、八坂 敏一、石川 亜佐子、村田 祐造、吉田 裕樹、平川 奈緒美、インターロイキン(IL)-27 ノックアウト(KO)マウスの痛み行動解析、日本麻酔科学会第62回学術集会、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

八坂 敏一 (YASAKA, Toshiharu)
鹿児島大学・歯学域医学系・准教授
研究者番号：20568365

(2)研究分担者

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：40260715

原 博満 (HARA, Hiromitsu)
鹿児島大学・歯学域医学系・教授
研究者番号：20392079

山崎 晶 (YAMASAKI, Sho)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：40312946

村田 祐造 (MURATA, Yuzo)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：20128143

(3)連携研究者

津田 誠 (TSUDA, Makoto)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：40373394

河合 太郎 (KAWAI, Taro)
奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授
研究者番号：50456935

平川 奈緒美 (HIRAKAWA, Naomi)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：20173221

園畑 素樹 (SONOHATA, Motoki)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：50304895

(4)研究協力者

飯笹 英一 (IZASA, Ei'ichi)
鹿児島大学・歯学域医学系・助教
研究者番号：20631998

笹栗 智子 (SASAGURI, Tomoko)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：00380767

石川 亜佐子 (ISHIKAWA, Asako)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：90404128