

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11058

研究課題名(和文)炎症性疼痛に対する三叉神経節内CCL2/CCL2受容体シグナル伝達系の役割

研究課題名(英文)Role of CCL2/CCL2 receptor signaling within trigeminal ganglia on the inflammatory pain

研究代表者

武田 守 (Takeda, Mamoru)

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：20227036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は三叉神経支配領域の炎症時に生じる痛覚過敏に三叉神経節内CCL2/CCL2受容体シグナル伝達系の果たす病態生理的役割をin-vitroおよびin-vivoの両面より、行動学・免疫組織化学・電気生理学的手法を用いて系統的に解析した。その結果、組織炎症時に生じる炎症性痛覚過敏に三叉神経節内小型三叉神経節ニューロンにおけるCCL2/CCL2受容体シグナル伝達系のup-regulationが重要な役割を演ずる可能性が示唆された。したがって、CCL2/CCL2受容体シグナル伝達系が三叉神経系支配領域の炎症性疼痛治療のための新たな分子標的として有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the functional significance of hyperalgesia in the CCL2/CCL2 receptor signaling system in trigeminal ganglion (TG) neurons following inflammation, using behavioral, immunohistochemical and electrophysiological analysis. The present study provides evidence that CCL2 enhances the excitability of small-diameter TG neurons following facial skin inflammation via the upregulation of CCL2/CCL2 receptor signaling. These findings suggest that ganglionic CCL2/CCL2 receptor signaling is a therapeutic molecular target for the treatment of trigeminal inflammatory hyperalgesia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：三叉神経節 ケモカイン 炎症 痛覚過敏 パッチクランプ 免疫組織化学 逃避反射 CCL2

## 1. 研究開始当初の背景

Chemokine[C-C motif] ligand 2 (CCL2)は Monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)の名称で呼ばれ、損傷組織の細胞やニューロン、グリア細胞、白血球などより分泌される化学物質で炎症部位において重要な役割を果たすサイトカインの一種である。CCL2はGタンパク質共役受容体である **CCL2 受容体**(Chemokine C-C motif receptor 2: **CCR2**)と結合して生理作用を発現することが判明している。最近になり、CCL2/CCL2受容体シグナル伝達は炎症性・神経因性疼痛の発現に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。実際にCCR2のノックアウトマウスにおいて座骨神経障害後のアロデニア発現が消失すること、またCCR2の不活化が痛覚過敏を抑制する事実が報告されている。これまでに、慢性的に脊髄神経節を圧迫した動物モデルにおいて、CCL2/CCL2受容体シグナル伝達のup-regulationが生じて、CCL2が侵害受容性脊髄後根神経節ニューロンのKチャンネル電流を減少させる効果を紹介してニューロン興奮性を増大させる事実が報告されている。これらの所見より、CCL2/CCL2受容体シグナル伝達は炎症性・神経因性疼痛におけるアロデニアや痛覚過敏の発現に関与することが示唆される。

これまでの研究により、感覚神経節内において細胞体及びグリア細胞から傍分泌(パラクリン)されたATP, Substance P, Glial derived neurotrophic factor (GDNF)などの様々な生理活性物質が近傍ニューロンに作用してその機能を修飾することが判明してきた。例えば、三叉神経支配領域における炎症時の異常疼痛(痛覚過敏、アロデニア)の発現と維持に神経節内で分泌される神経ペプチド、サイトカインによるニューロン-ニューロン間/ニューロン-グリア細胞間のクロストークが重要な役割を演ずる可能性が明らかとなってきた。したがって、感覚神経節内におけるニューロン間のクロストークが中枢性感作を予防に関与することが推察される。実験的歯の移動による歯根膜の炎症に起因した小型三叉神経節ニューロンの細胞体において、CCL2/CCL2受容体シグナル伝達のup-regulationが生じることが報告された。さらに、最近になり、三叉神経脊髄路核レベルにおけるニューロンとアストログリア細胞間のCCL2/CCL2受容体シグナル伝達系が口腔顔面領域の痛覚過敏の発現に貢献する事実も判明してきた。脊髄後根神経節のニューロンにおけるCCL2/CCL2受容体シグナル伝達のup-regulationが炎症性痛覚過敏の維持と緩和に関与することも最近になり、指摘されている。以上の知見は、三叉神経支配領域の炎症時に生じる痛覚過敏に三叉神経節内CCL2/CCL2受容体シグナル伝達系が強く関与することを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は炎症性痛覚過敏に関わる三叉神経節ニューロンの興奮性に対するCCL2/CCL2受容体シグナル伝達系”の病態生

理的役割を明らかとするために、行動学的、蛍光標識・免疫組織化学的、電気生理学的手法を用いて解析することである。

## 3. 研究の方法

本研究は、麻布大学動物実験委員会によって認可され、国際疼痛学会の倫理指針(Zimmermann 1983)に従って行った。実験を行うにあたり、使用する動物数を最小限とした。

### (1)炎症動物と逃避反射閾値測定

Wistar雄ラット(BW:120-160g)を2群に分ける。ネブタール麻酔(45mg/Kg, i.p)した後、片側顔面皮膚(口髭部分)に、炎症群には起炎物質CFA(Complete Freund's Adjuvant)を0.05ml投与して、対照群には生理食塩水を同量投与した。起炎物質投与1-2日後、痛覚閾値は顔面皮膚に加えたvon Frey filamentsによる機械刺激による逃避反射閾値測定により痛覚過敏の有無を判定した。

### (2)顔面皮膚支配のTGニューロンの蛍光標識

ネブタール麻酔(45mg/Kg, i.p)した後、左側顔面皮膚(口髭部分)には蛍光色素0.5% Furuologold(FG)を10 $\mu$ lを31Gのハミルトンシリンジを用いて注入した。

### (3)免疫組織化学的解析(in vitro)

#### CCL2及びCCR2の免疫組織化学

凍結切片作成と免疫染色: 炎症誘導および蛍光標識2-3日後のラットをホルマリン灌流固定後、片側TGを取り出し、固定後、厚さ10 $\mu$ mの凍結切片を作成した。TG切片をスライドガラス上に付着させCCL2抗体(1:100)とCCR2抗体(希釈倍率1:1000)に24時間インキュベーション後、二次抗体として励起波長の異なる2種の蛍光抗体(Alexa488/568/1:1000)を反応させた。

CCL2, CCR2免疫陽性細胞の解析: 共焦点レーザー顕微鏡を用いてFGで標識されたTGニューロンの細胞体の大きさ(<30 $\mu$ m:A<sup>-</sup>、C-ニューロンに相当;31-40 $\mu$ m:A<sup>-</sup>、A<sup>-</sup>-ニューロンに相当;>41 $\mu$ m:A<sup>-</sup>-ニューロンに相当)とCCL2及びCCR2の発現関係を解析した。

### (4)TGニューロンのパッチクランプ法による

#### 解析(in vitro)

ニューロンの急性分離: 蛍光標識2-3日後、ラットを断頭処置後、FG注入側のTGsを摘出した。組織は細切後、15-25分、37 $^{\circ}$ C、Hank's balanced salt solution, pH 7.3)にてインキュベート、コラゲナーゼ type XI and type II (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)で酵素処理した。パスツールパイペットを用いて細胞を機械的に分離した。

#### ホールセルパッチクランプ法

蛍光励起装置を用いてFGに標識されたニューロンを同定した。アンホテリシンB(60mg/ml)を電極内液(120 mM potassium methanesulphonate, 20 mM KCl, 7.5 mM HEPES

and 2 mM EGTA (ethylene glycol-bis-minoethyl ether N,N,N', N'-tetraacetic acid), pH 7.3 に入れ、ホールセルモードにて実験した(抵抗: <20M )。

通常の細胞外液を用いて CCL2(10ng/ml) 投与より TG ニューロンに膜電位変化が誘発されるか否かを検討した(過分極パルスにより膜抵抗の変化をモニター)。また、ステップパルス(10-500pA/300ms)により誘発されるスパイク発火頻度、持続時間、発火閾膜電位の変化の有無を解析し、最後に CCL2 による変化が CCR2 阻害薬(CBC-227016; 10ng/ml)によりブロックされるか否かを調べ CCR2 特異的な変化か否かを検討した。

### (5) TG ニューロンの細胞外ユニット記録法による解析 (in vivo)

**TG 単一ニューロン活動の記録:** ネブタール麻酔(45mg/Kg, i.p.)したラットを脳定位固定装置に固定後、吸引処置後、三叉神経組織を露出する。TGs にマルチパレルのガラス微小電極を刺入してユニット放電を AC アンプ及びデータ解析装置を用いて記録した。咬筋に刺入したステンレススチールの双極刺激電極を用いて電気刺激(0.1-3ms, 0.1-5mA, 1Hz)して応答するニューロンの神経伝導速度をその反応潜時と刺激記録部位の距離より算定しニューロンタイプ(A -線維>2m/s; C-線維 2m/s)を同定した。

### 三叉神経節 CCL2 電気泳動的投与の効果

顔面皮膚支配 TG ニューロンの自発放電の変化: 伝導速度を算定したユニットに対して自発放電の有無を確かめた後、マルチパレルの他の電極より微細電気泳動装置を用いて電気泳動的に CCL2(10ng/ml, 20-40s)を記録電極近傍に投与し、自発放電が誘発されるか否かを確かめた。もし、投与電流依存性に放電頻度が変化が誘発されたら、この反応が CCR2 特異的か否かを判定するた CCR2 阻害薬の同時投与において効果の消失を検討した。

顔面皮膚の機械刺激に対する TG ニューロンのユニット放電: 皮膚領域の機械刺激に対して応答性に対して、電気泳動的 CCL2 投与により興奮性増大が誘発されるか否かを調べた。さらに侵害機械刺激(ピンセット, 4 N)に対する応答性についても検討した。CCL2 投与により、変化が得られたなら、CCR2 阻害薬の同時投与において効果の消失を確かめる。

**炎症群ラットの TG ニューロンの興奮性に対する CCR2 阻害薬の効果:** ラットの顔面皮膚に起炎物質(CFA; Complete Freund's Adjuvant)を注入した炎症群ラットにおける、増強した自発放電、皮膚への機械刺激に対する放電頻度に対する CCR2 阻害薬の効果を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 行動学的解析

起炎物質投与 1-2 日後 von Frey filaments

による顔面皮膚(口髭部分)への機械刺激による逃避反射閾値は炎症群 (Inflamed) は正常群 (naïve) に比較して有意に低下し、痛覚過敏を示した(図 1)。

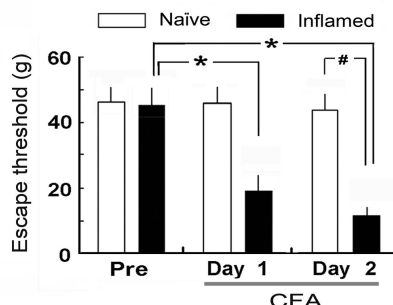


図 1: 炎症誘導後の逃避反射の閾値の変化

### (2) 免疫組織化学的解析

同側の顔面皮膚(口髭部)に Fluorogold 注入し、この部位を支配する TG ニューロンを FG により蛍光標識した。FG 標識された小型(<30 μm) 中型(<40 μm) CCL2 陽性 TG ニューロンは正常群 30.2%(38/126) に対して炎症群は 77.0%(114/148) 増加していた(図 2)。FG 標識された小型(<30 μm) 中型(<40 μm) CCR2 陽性 TG ニューロンは正常群 30.3%(96/316) に対して炎症群は 70.5%(218/309) 増加していた(図 2)。一方、CCL2 陽性細胞のうち大多数(正常 vs 炎症群; 85% vs 88%)は CCR2 陽性であった。炎症群の CCL2 および CCR2 陽性細胞は正常群に比べて有意に増加していた(図 2)。

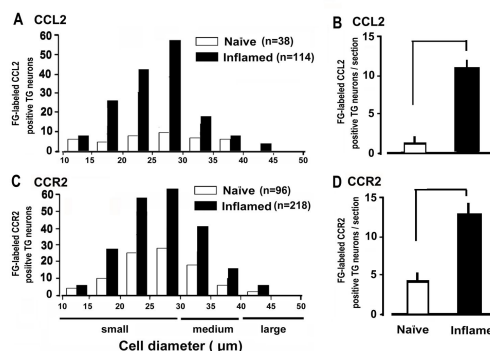


図 2: 正常群と炎症群における CCL2 および CCR2 免疫活性陽性 FG 標識 TG ニューロンの発現

### (3) パッチクランプ法による解析

免疫組織学的解析により得られた結果をもとに、顔面皮膚炎症時、炎症性痛覚過敏に関わる TG ニューロンの興奮性に対するの病態生理的役割を明らかとするために、FG で逆向性標識された小型、中型 TG ニューロンの興奮性が CCL2 投与により、どのように変調するかについて穿孔ホールセルパッチクランプ法を用いてイオンチャネルレベルで電気生理学的に炎症物と比較検討した。

図 3A に急性分離した FG 陽性細胞の典型例を示す。CCL2 の効果を調べた TG ニューロンの細胞体径に対するヒストグラムを図 3B に示す。

炎症群および正常群の両者において、CCL2 及び CCR2 の発現は炎症時において小型 TG ニューロンで有意に増加したので(図2)、小型 TG ニューロンに焦点を当てて CCL2 の効果を検討した。図 3C は脱分極パルスで誘導された両者の TG ニューロンの応答の典型例を示した。急性分離した TG ニューロン正常対象群の TG ニューロンは自発放電を持つ細胞は少数であったが、炎症群のニューロンは多くの細胞で自発放電発火を示し、その発火頻度も高い値を示した。図3に CCL2 による興奮性応答の正常群と炎症群の典型例を示す。CCL2 (10ng/ml) 投与より正常対照群および炎症群ラットの TG ニューロンはスパイク誘発の閾値も正常対照群に比べて炎症群ラットで低い値を示し、誘発スパイク頻度も高い値を示した(図 4)。炎症群は、正常に比べて脱分極性ステップパルス(10-250pA/200ms)により誘発されるスパイク閾膜電位は低く、発火頻度が有意に高い値を示した(図4)。炎症群は、正常に比べて脱分極性ステップパルスにより誘発されるスパイク閾膜電位は低く、発火頻度が有意に高い値を示し、これらの変化は CCR2 阻害薬により抑制された(図4)。

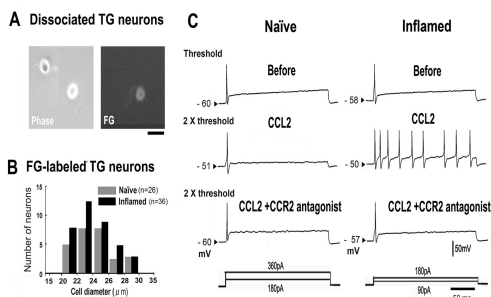


図3 正常群と炎症群の小型 FG 標識 TG ニューロンの放電頻度と閾値に対する CCL2 の効果の典型例

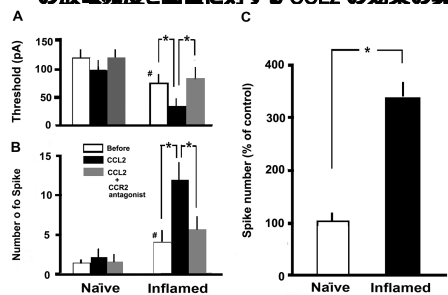


図4 正常群と炎症群の小型 FG 標識 TG ニューロンの放電頻度と閾値に対する CCL2 の効果の比較

#### (4) 細胞外記録による TG ニューロン活動に対する CCL2 電気泳動的投与による解析

正常および炎症群のネブタール麻酔したラットの三叉神経節にマルチパレルのガラス微小電極を刺入して、ユニット放電を顔面皮膚電気刺激に応答する A<sub>δ</sub>-TG ニューロンより細胞外スパイクを同定した。正常対照群に比較して炎症群では自発放電を持つユニットが有意に増加していた。炎症群においては微小電気泳動的に投与した CCL2 (10ng/ml) により自発放電頻度の増加が誘発され、電流依存性に放電頻度は有意に増加した。また皮膚への侵害刺激 (von

Frey hair) で誘発される放電頻度は電気泳動的に投与した CCL2 (10ng/ml) により増加し、機械刺激に対する閾値も有意に低下していた。これらの効果は CCR2 (10ng/ml) の同時投与により抑制された。

#### 本研究のまとめ

顔面皮膚の炎症により生じる痛覚過敏発現には三叉神経節内に分布する小型 TG ニューロンの CCL2/CCR2 受容体の up-regulation により CCL2 のパラクリン分泌(傍分泌)機構による活性化を介するシグナル伝達系を変調させ小型三叉神経節ニューロンの興奮性を修飾する可能性が強く示唆された。

したがって、三叉神経系支配領域の炎症性疼痛に”CCL2/CCR2 受容体シグナル伝達系”が治療のための新たな分子標的として有効である可能性が示唆された。(図5)

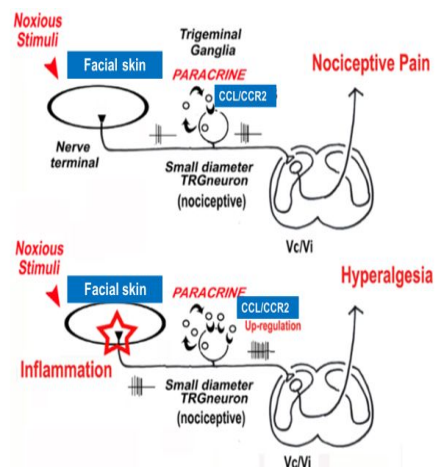


図5: 炎症における痛覚過敏に関わる CCL2/CCR2 シグナル伝達系の関与を示す模式図(仮説): 炎症時、三叉神経節内の小型侵害受容性三叉神経節ニューロンにおける CCL2/CCR2 の up-regulation によりシグナル伝達系の活性化が炎症部位からの中枢へ伝導するスパイク発火頻度が増幅し、2次ニューロンにおける伝達が増大して、痛覚過敏が誘導される。

#### 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 1件)

Takeda M, Nasu M, Kanazawa T, Takahashi M, Shimazu Y, Chemokine ligand 2/chemokine receptor 2 signaling in the trigeminal ganglia contributes to inflammatory hyperalgesia in rats. *Neuroscience Research* 2018, **128**:25-32

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武田 守 (TAKEDA MAMORU )  
麻布大学 生命・環境科学部 教授  
研究者番号：20227036

##### (2) 研究分担者

( 0 )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( 0 )

研究者番号：