

令和元年6月7日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08994

研究課題名(和文)末梢感作-中枢感作連関を軸とした神経障害性疼痛の新規病態分子基盤

研究課題名(英文) Pathogenesis of neuropathic pain due to interaction between peripheral and central sensitization

研究代表者

木口 倫一 (Kiguchi, Norikazu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90433341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の分子基盤として、炎症性マクロファージが関与する末梢性感作が重要である。本研究では末梢マクロファージを阻害すると神経線維のみならず後根神経節における疼痛関連分子の発現が減少するとともに、中枢性感作を担うミクログリアの活性化も同時に抑制されることを明らかにした。さらにこのような末梢性感作は神経傷害のみならず、糖尿病性の神経障害性疼痛においても同様に観察されることを見出した。従って、末梢性感作と中枢性感作の機能的連関が神経障害性疼痛の普遍的分子基盤であることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系の傷害などによって生じる神経障害性疼痛は従来の鎮痛薬に抵抗性であり、その分子基盤に基づいた新しい治療戦略が必要とされている。これまでのげっ歯類を用いた検討では、末梢性感作と中枢性感作はそれぞれ独立して検討されていた。本研究では、末梢性感作が中枢性感作を直接的に制御することを明らかにした点、さらにそのような末梢性感作が異なる病態モデル間で共通して重要であることを明らかにした点に学術的意義がある。さらに新しい創薬標的を示唆していることから、社会的意義も大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Peripheral sensitization due to inflammatory macrophages play a key role in the pathogenesis of neuropathic pain. In this study, we found that inhibition of peripheral macrophages decreased in the expression of pain-related molecules in the dorsal root ganglion, and it prevented the activation of microglia in the spinal cord after nerve injury. Moreover, such peripheral sensitization caused by macrophages was observed in diabetes-associated neuropathic pain. Collectively, interaction between peripheral and central sensitization might be a common mechanism underlying different types of neuropathic pain.

研究分野：薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 アロディニア マクロファージ 神経炎症 ミクログリア サイトカイン 坐骨神経 脊髄後角

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における成人の慢性疼痛罹患率は20%に及ぶと推定される。難治性の痛覚過敏やアロディニアを特徴的徴候とする神経障害性疼痛には、病態の複雑さ故に通常の鎮痛薬が著効しない。その分子病態学的背景には疼痛伝達経路における慢性神経炎症が密接に関与すると考えられているが、詳細は依然として不明である。申請者らはこれまでに、傷害を受けた一次知覚神経に集積する好中球やマクロファージなどの免疫細胞が慢性神経炎症(末梢性感作)の重要な構成要素であることを示してきた。またケモカインであるマクロファージ炎症性タンパク質(MIP)が神経障害性疼痛の形成因子であることを世界で初めて報告しており、これらの報告は多くの文献で引用されている。これらのケモカインが担う末梢性感作を切り口とした発展的研究により、新しい概念に基づく神経障害性疼痛の総合的理解に繋がると考えられる。

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛の分子基盤として、グリア細胞の活性化を伴う中枢性(脊髄)感作の重要性は広く知られており、様々な調節因子の関与が報告されている。しかしながら、現状においてそれらを標的とした薬理的治療の可能性は限定的である。申請者らの予備実験において、中枢性感作の病態は末梢性感作と常時密接な関係にあることが示唆されている。すなわち、MIP抗体やマクロファージ抑制薬を傷害末梢神経に投与して末梢性感作を抑制すると、脊髄ミクログリアの活性化ならびに慢性疼痛が抑制される可能性が考えられる。さらに重要な点として、末梢性感作の抑制は病態の進行度に関わらず慢性疼痛を改善することも証明済みである。本研究では末梢性感作と中枢性感作の機能的連関を示すとともに、その制御因子の同定を目指す。これらの研究戦略は、神経障害性疼痛の病態基盤解明を解明する上で重要な要素であると言える。

### 3. 研究の方法

神経傷害モデル: ICR 雄性マウスを用い、坐骨神経部分結紮(Partial sciatic nerve ligation: PSL)による神経障害性疼痛モデルマウスを作製した。イソフルラン麻酔下にて大腿部の皮膚切開を行い、露出した坐骨神経の約1/3を縫合糸できつく結紮した。術後は切開部位を縫合し、必要に応じて消毒薬および抗菌薬を投与した。対照処置としては坐骨神経の露出のみを行った。糖尿病モデル: C57BL/6J 雄性マウスを用い、高脂肪含有飼料(60 kcal % fat; high fat diet: HFD)または通常飼料(control diet: CD)を32週間、自由に摂取させた。マウスをホルダーに固定し、尾から採取した血液(約5 µl)より随時血糖値を測定した。

薬物投与: 薬物は滅菌 PBS または生理食塩水に溶解した。神経周囲投与では、イソフルラン麻酔下にて30Gの注射針を接続したカニューレをマウスの坐骨神経周囲に挿入し、液量10 µlを1日1回4日間投与した。また全身投与では、1日1回4日間背部皮下に投与した。

von Frey テスト: マウスを網目5 mm×5 mmの金網上で約2時間馴化させた。屈曲圧0.02–2.0 g (0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0 g)のvon Frey フィラメントを用いてマウス後肢の足底中央を刺激した。up-down法により50%逃避機械刺激閾値を算出した。

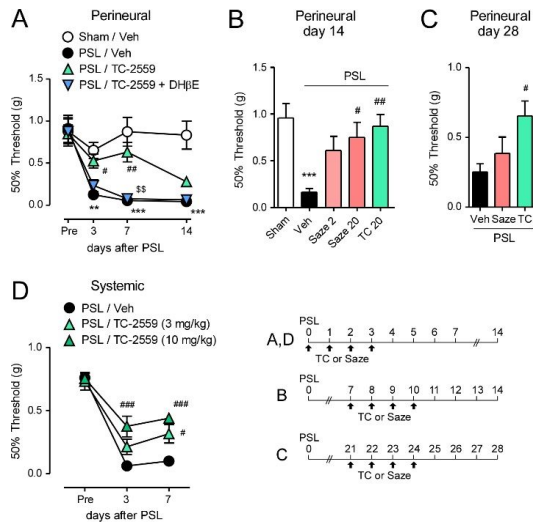
免疫組織化学: 4%パラホルムアルデヒドにて固定した脊髄の凍結切片を作成し、浮遊法にて抗Iba1抗体ならびに蛍光標識二次抗体を反応させた。組織をスライドグラスにマウントし、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。データ解析にはImageJソフトウェアを用いた。

RT-qPCR: 坐骨神経、後根神経節または脊髄後角より抽出した総RNAよりcDNAを作成した。SYBR® Premix Ex Taq™ II および AriaMx Realtime PCR System を使用し、各遺伝子のmRNA発現レベルを評価した。

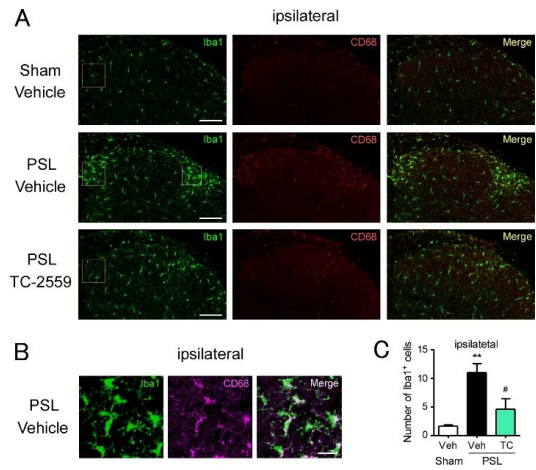
統計解析: データはいずれも平均値±標準誤差で示した。統計処理は一元配置分散分析または二元配置分散分析を行った後、多重比較検定にて解析した。P<0.05にて有意差ありとした。

### 4. 研究成果

マウスにPSLを施すと、傷害坐骨神経における炎症性マクロファージの集積が認められ、それと並行して機械的アロディニアが惹起された。マクロファージ抑制薬であるリポソーム化クロドロン酸またはニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)α4β2サブタイプ特異的リガンド(TC-2559, sazetidine A)をPSL直後より傷害坐骨神経周囲に局所投与すると、PSL誘発性機械的アロディニアが抑制された。さらにTC-2559をPSL21日後より局所投与しても、既に形成された機械的アロディニアに対する改善効果が認められた。加えてTC-2559は全身投与においても、PSL誘発性機械的アロディニアを改善した(図1)。PSL7日後の脊髄後角において、Iba1陽性ミクログリアの形態学的活性化が認められ、さらに炎症性マーカー分子であるCD68の発現もミクログリアにおいて増加していた。TC-2559をPSL直後より傷害坐骨神経周囲に局所投与すると、PSLによる脊髄ミクログリアの活性化が抑制された(図2)。PSL7日後におけるミクログリアの活性化に伴い、ミクログリア関連因子であるCD68、interferon regulatory factor 5 (IRF5) およびIL-1βのmRNA発現がPSL同側の脊髄後角において増加し、これらはいずれもTC-2559の局所投与により抑制された。それと同時に、後根神経節における疼痛関連分子の発現もまた、TC-2559の局所投与により減少することが示された。これらの結果により、末梢性感作は中枢性感作と密接な機能的連関があり、神経障害性疼痛の病態において炎症性マクロファージによる末梢性感作が重要な役割を果たすことが示唆される。

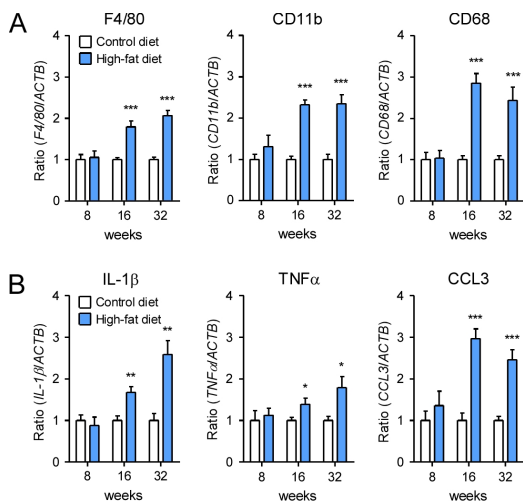


**図 1. nAChR アゴニストによる神経障害性疼痛改善効果.**  
 (A) TC-2559 の神経周囲投与によるアロディニア抑制効果.  
 (B) TC-2559 または sazetidine A によるアロディニア改善効果.  
 (C) 傷害後期における TC-2559 のアロディニア改善効果.  
 (D) TC-2559 の全身皮下投与によるアロディニア抑制効果.

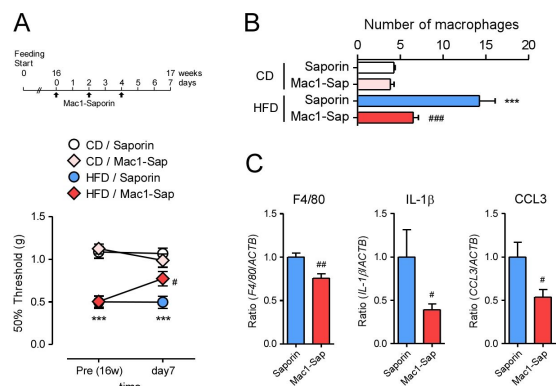


**図 2. TC-2559 の末梢投与による脊髄ミクログリア抑制作用.**  
 (A) TC-2559 の神経周囲投与によるミクログリア抑制効果.  
 (B) Iba1 陽性活性化ミクログリアにおける CD68 の局在.  
 (C) 脊髄後角内側部における Iba1 陽性細胞数の変化.  
 TC-2559 を神経周囲投与し (days 0-3) PSL7 日後の脊髄後角における免疫染色を行った。スケール=100 (A), 20 (B) μm.

HFD を与えたマウスは CD と比較して明らかな体重増加および肥満を呈するとともに、給餌 4 週以降より随時血糖値の上昇が観察され、2 型糖尿病 (T2DM) 様の症状が認められた。さらに HFD 群では給餌 8 週以降において機械的刺激に対する閾値が減少しており、機械的アロディニアが惹起された。HFD 群の坐骨神経における神経炎症を RT-qPCR にて評価したところ、マクロファージマーカー (F4/80、CD11b、CD68) および炎症性サイトカイン (IL-1β、TNFα)・ケモカイン (CCL3) の発現増加が認められた。これらの増加はいずれも、給餌 16 週より 32 週以降まで長期間持続していた (図 3)。HFD 誘発性機械的アロディニアにおける炎症性マクロファージの関与を検討するため、Saporin 標識抗 Mac1 抗体 (Mac1-Sap) を HFD 給餌 16 週より坐骨神経周囲に反復局所投与すると、集積したマクロファージ数が減少し、HFD 給餌 17 週における機械的アロディニアが改善した。HFD による炎症性メディエーターの産生増加もまた、Mac1-Sap 処置により抑制された (図 4)。TC-2559 を HFD 給餌マウスの坐骨神経周囲に局所投与すると HFD 誘発アロディニアが改善し、この効果は α4β2 サブタイプ特異的アンタゴニストである DHβE の併用により消失した。さらに TC-2559 は全身投与においても HFD 誘発アロディニアの改善効果を示した。従って、神経傷害モデルのみならず T2DM モデルにおいても炎症性マクロファージを介した末梢性感作が重要であり、これらが異なる神経障害性疼痛に共通の分子基盤であることが明らかになった。



**図 3. 2 型糖尿病マウスの坐骨神経における炎症性因子の発現.**  
 (A) マクロファージマーカー分子の mRNA 発現変化。  
 (B) サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現変化。



**図 4. 2 型糖尿病マウスのアロディニアに及ぼすマクロファージの影響.**  
 (A) マクロファージ除去薬物 (Mac1-Sap) 処置によるアロディニア改善効果。  
 (B) Mac1-Sap 処置による神経周囲マクロファージの減少。  
 (C) Mac1-Sap 処置による炎症性因子の発現減少。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kiguchi N, Sakaguchi H, Kadowaki Y, Saika F, Fukazawa Y, Matsuzaki S, Kishioka S. Peripheral administration of interleukin-13 reverses inflammatory macrophage and tactile allodynia in mice with partial sciatic nerve ligation. *J Pharmacol Sci* 2017 Jan;133(1):53-56. doi:10.1016/j.jphs.2016.11.005.
2. Kiguchi N, Ding H, Peters CM, Kock ND, Kishioka S, Cline JM, Wagner JD, Ko MC. Altered expression of glial markers, chemokines, and opioid receptors in the spinal cord of type 2 diabetic monkeys. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017 Jan;1863(1):274-283. doi:10.1016/j.bbadis.2016.10.007.
3. Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S. Pharmacological Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages. *Int J Mol Sci* 2017 Nov 1;18(11). pii: E2296. doi:10.3390/ijms18112296.
4. Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S. Inhibition of peripheral macrophages by nicotinic acetylcholine receptor agonists suppresses spinal microglial activation and neuropathic pain in mice with peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 2018 Mar 27;15(1):96. doi:10.1186/s12974-018-1133-5.
5. Ding H, Kiguchi N, Kishioka S, Ma T, Peters CM, Ko MC. Differential mRNA expression of neuroinflammatory modulators in the spinal cord and thalamus of type 2 diabetic monkeys. *J Diabetes* 2018 Nov;10(11):886-895. doi:10.1111/1753-0407.12780.
6. Ding H, Kiguchi N, Yasuda D, Daga PR, Polgar WE, Lu JJ, Czoty PW, Kishioka S, Zaveri NT, Ko MC. A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic without opioid side effects in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 2018 Aug 29;10(456). pii: eaar3483. doi: 10.1126/scitranslmed.aar3483.
7. Saika F, Kiguchi N, Matsuzaki S, Kobayashi D, Kishioka S. Inflammatory Macrophages in the Sciatic Nerves Facilitate Neuropathic Pain Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Pharmacol Exp Ther* 2019 Mar;368(3):535-544. doi:10.1124/jpet.118.252668.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 木口倫一, 雑賀史浩, 松崎伸介, 岸岡史郎: ニコチン性アセチルコリン受容体リガンドの末梢投与は神経障害性疼痛を改善する. 第 5 回ニューロカンファレンス和歌山. 2017 年 1 月, 和歌山.
2. 木口倫一, Huiping Ding, 雑賀史浩, 松崎伸介, 岸岡史郎, Mei-Chuan Ko: 2 型糖尿病発症カニクイザルの脊髄後角におけるケモカイン発現変動. 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」. 2017 年 1 月, 岡崎.
3. 木口倫一, 雑賀史浩, 小林大地, 松崎伸介, 岸岡史郎: 傷害神経に浸潤するマクロファージは脊髄ミクログリアの活性化を調節する. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会. 2017 年 9 月, 札幌.
4. 木口倫一, 小林大地, 雑賀史浩, 松崎伸介, 岸岡史郎: 神経傷害後の末梢マクロファージによる脊髄ミクログリア調節作用. 第 131 回日本薬理学会近畿部会. 2017 年 11 月, 大阪.
5. Kiguchi N, Saika F, Kobayashi D, Matsuzaki S, Kishioka S. Inflammatory macrophages mediate neuropathic pain caused by type 2 diabetes mellitus. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, July 2018, Kyoto.
6. Kiguchi N, Saika F, Kobayashi D, Matsuzaki S, Kishioka S. Inflammatory macrophages in the injured nerves facilitate spinal microglial activation and neuropathic pain in mice. 17th World Congress of Pain. September 2018, Boston.
7. 木口倫一, 雑賀史浩, 小林大地, 松崎伸介, 岸岡史郎: 炎症性マクロファージは神経傷害後のミクログリア活性化および機械的アロディニアを調節する. 第 40 回日本疼痛学会. 2018 年 6 月, 長崎.
8. 木口倫一, 岸岡史郎, Mei-Chuan Ko: 非ヒト霊長類における疼痛制御因子の発現と機能解析. 第 38 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム. 2018 年 8 月

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：岸岡 史郎  
ローマ字氏名：( KISHIOKA, Shiroh )  
所属研究機関名：和歌山県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：60137255

研究分担者氏名：雑賀 史浩  
ローマ字氏名：( SAIKA, Fumihiro )  
所属研究機関名：和歌山県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：10644099

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松崎 伸介  
ローマ字氏名：( MATSUZAKI, Shinsuke )

研究協力者氏名：小林 大地  
ローマ字氏名：( KOBAYASHI, Daichi )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。