

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19736

研究課題名(和文)慢性痛治療戦略としての脊髄活性化マイクログリアのスイッチング制御の試み

研究課題名(英文)Regulation of activation switching in spinal microglia as a tool of treatment of chronic pain

研究代表者

野口 光一(Noguchi, Koichi)

兵庫医科大学・医学部・学長・教授

研究者番号：10212127

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):最終的に得られた結果は、末梢神経傷害後にラット脊髄において、IL-4受容体の増加を確認出来た。そして組織学的確認実験により、その増加は活性化したマイクログリアで生じていることを証明出来た。疼痛行動測定実験により、IL-4投与は神経損傷誘発性機械的異痛症を軽減することが明らかとなり、さらに細胞内シグナル伝達因子であるSTAT6のリン酸化フォームと共存していることが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの結果は、末梢神経障害後の活性化マイクログリアには、これまで報告されてきた炎症促進性の作用のみならず、炎症抑制性の受容体増加という側面があり、外来性の治療の新しい可能性を示唆したと言える。これらの結果は、グリア関係のトップ雑誌であるGLIAに発表することが出来た。炎症性要素の強い活性化マイクログリアが抗炎症型のM2マイクログリアの機能を示すことが出来たという点に意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文):Activated microglia in the spinal cord facilitate the hyper-excitability of dorsal horn neurons after peripheral nerve injury via pro-inflammatory molecules. Here, we investigated the possible involvement of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-4 (IL-4), in neuropathic pain. We found that nerve injury induced the expression of IL-4R mRNA in the spinal cord. A histological analysis revealed that nerve injury induced IL-4R mRNA in activated spinal microglia ipsilateral to the injury site. The increases in IL-4R alpha were coincident with the increased expression of phosphorylated STAT6 in spinal microglia. It administration of recombinant IL-4 suppressed mechanical hypersensitivity in neuropathic rats, and the analgesic effect of IL-4 was accompanied by enhancement of pSTAT6 expression in spinal microglia. These results suggest that the adaptive responses of microglia to nerve injury involve both inflammatory and anti-inflammatory signaling, including IL-4R alpha and pSTAT6.

研究分野：疼痛基礎医学

キーワード：脊髄マイクログリア 神経障害性疼痛 IL-4

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛を特徴として慢性化した激しい痛みについて、現在著効する薬剤はないとされている。オピオイド系、プレガバリン、抗うつ薬などのそれぞれの効果についても報告によって異なるものの、多くて30%の患者に対しての効果とされており、薬剤を中心とした慢性痛治療戦略は現在袋小路に入っている状態である。現段階でこの治療で提唱されているのは Multimodal pain management と呼ばれる、患者に対して多種・多様なアプローチを行う治療である。例えば運動や認知行動療法、これに加えて上記の薬剤の組み合わせ投与という方向が現在最も有効とされている。しかしながら、創薬サイドの問題としてプレガバリンの登場以来著効する薬剤が見いだされていない。昨今、神経障害性疼痛モデル動物に抑制性ニューロンを移植する実験が成功し、鎮痛に奏効している報告がなされている。一見単純な発想に基づいた実験であるが、著者らは iPS 細胞のような自己移植に近い形での抑制性ニューロンの移植の展開を意図しており、これは難治性疼痛を症候・症状を姑息的に「治療」するのではなく「破綻・破壊されたものを修理する」というパラダイムシフトから生まれた対処である。実際、慢性痛の脊髄後角は回路的にもグリア細胞の空間的配置にしても、正常からはかけ離れた変化をしており、「破綻・破壊」とも捉えられる変化をしている。本研究では脊髄後角での正常機能・構造を破壊させる因子として活性化マイクログリアをターゲットとしている。これまで、多くの報告がマイクログリアやアストロサイト由来の分子の疼痛に対する詳細な役割を解明してきた。しかし、グリア細胞は多種の因子を放出・受容しているため各々の分子に単独にアプローチする戦略は分子メカニズムの解明には有用であるが、実際の疼痛に対しては応用の難しい面がある。そこで本研究課題において我々はマイクログリアの性質を根本的に変質させる研究に挑戦する。すなわち、炎症性要素の強い活性化マイクログリアを抗炎症型の M2 マイクログリアへの転換を試みるつもりである。この挑戦はマイクログリアが関わる脊髄での破綻要素を除外し「Fixation」を行う事を指向しており、先に述べた細胞移植による治療同様のパラダイムシフトを起こすべく着想したものである。

## 2. 研究の目的

難治性で慢性の痛みの代表である神経障害性疼痛モデル動物において抑制性ニューロンの細胞移植を行うトライアルが成功している。このようなアプローチは末梢神経障害後の重篤な疼痛をもたらす疼痛伝達系の機能が「破綻または破壊」されているという前提に立つものである。本研究の目的はそのようなマイクログリア由来の個々の因子に着目するのではなく、活性化マイクログリアそのものの性質を文字通り「逆転」させ、炎症性細胞の増加によって破綻した脊髄後角の「修理」を行うための基礎的な研究を行う事である。前提として、近年明らかになりつつあるマクロファージ系譜の細胞の極性である M1/M2 バランスがマイクログリアにも存在し、[炎症-抗炎症バランス] がいくつかの分子で調節可能であり、末梢神経損傷後の活性化マイクログリアが不可逆ではないという報告に着想の原点をおいている。

また、実際の神経障害性疼痛モデルのマイクログリアにおいて上記の分子の受容体発現を検討した結果、インターロイキン4受容体(IL-4R)が脊髄マイクログリアでリガンドの増加を伴わずに増加し、髄腔内へのインターロイキン4の投与がSTAT6の活性化を伴って疼痛を減弱した、という2つの結果を得た。

この計画には内因性のマイクログリア極性の調節が発想の基礎をなしており、既知の抗炎症性サイトカインであるIL-4の受容体のIL-4Rがリガンドを伴わない発現上昇をしていることから出発している。更に抗炎症性のIL-4やIL-10等に加えて、これまで発見されてきたマイクログリアの活性化要素であるヌクレオチド受容体や脂質メディエーター受容体を多重的かつ波状的に阻害する事は単なる鎮痛だけでなくマイクログリアの表現型への干渉としては極めて斬新である。加えて発痛増悪に関わるマイクログリアの表現型を免疫システムの内因性の調節因子を積極的に利用する事により抗炎症因子に転換する事は in vivo の中枢神経系では未知のトライアルであり、挑戦的要素を大いに含む芽生え期の研究計画であると言える。また、後に続くメカニズムの解析にも多くの材料を提供する事が予想され、これは免疫学との学際的發展という観点からも神経-免疫連関の新しい研究領域の萌芽的要素を含んでいると考えられる。

## 3. 研究の方法

体重 200~250g のオスの Sprague Dawley ラットをセボフルランで麻酔し、SNI 神経損傷モデルを作成した。SNI 手術後 3~5 日目に浸透圧ポンプを介してラットに髄腔内薬物を投与した。

RT-PTR, *in situ*ハイブリダイゼーション組織化学、蛍光免疫組織化学を用いて、ラット脊髄における各種遺伝子発現を検討した。RT-PCRに用いたIL-4、IL-4R、およびGAPDH cDNAのPCRプライマーは、IL-4 (accession number NM\_201270) sense 5' -GCTATTGATGGGTCTCAGCC-30 and antisense 50-GGACATGGAAGTGCAGGACT-3' ; IL-4R (accession number AB015747) sense 880-899

5' -GCTGGGTGTCAGCATCTCCT-3' ; and antisense 50-GGGGCCTCAAACAGCTCCAT-3' ; GAPDH (accession number M17701) sense 5' -CCAGGGCTGCCTTCTTGT-30 and antisense 50-CCAGCCTTCTCCATGGTGGT-3' である。

*In situ*ハイブリダイゼーション組織化学のプロトコルは、以前に公開された方法に基づいて施行した。<sup>35</sup> SUTP 標識アンチセンスおよびセンス cRNA を用い、ハイブリダイゼーション反応後、スライドを NTB エマルジョンでコーティングし、6~8 週間露光した。D-19 (Kodak) で現像し、切片はヘマトキシリンエオシンで染色した。

IHC と ISHH の二重標識分析を用いて、ニューロンとグリア細胞における IL-4R mRNA の分布を調べた。以下の抗体を二重標識分析に使用した：ウサギ抗 Iba1 ポリクローナル抗体(1:100)、マウス抗 NeuN モノクローナル抗体(1:2000)、ウサギ抗 GFAP ポリクローナル抗体(1:2000)、およびウサギ抗リンパ球抗原 6 複合抗体(1:1000)。

蛍光 IHC には次の抗体を使用した：ウサギ抗 pSTAT6 ポリクローナル抗体(1:500)およびマウス抗 Iba1 ポリクローナル抗体(1:500)。

薬物投与 SNI 手術の2日後、L5 椎骨の尾側のへらを、セボフルランによる吸入麻酔下で部分的椎弓切除を施行し、くも膜下腔に tubing を行った。くも膜下腔内投与に用いた薬剤は、ウシ血清アルブミン (BSA)、ラット組換えインターロイキン-4 (rIL-4)、可溶性 IL-4R、正常山羊 IgG、または IL-4R 抗体であった。

疼痛行動測定 すべての SNI ラットは、手術前1日、手術後2~8日、手術後14~20日に、後足の足底表面の機械的疼痛閾値を、Dynamic Von Frey filament を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

・末梢神経損傷は脊髄ミクログリアにおける IL-4R 発現を増加させる

SNI 後に起こる IL-4 および IL-4R mRNA 発現の詳細な変化を調べると、さまざまな RT-PCR 条件を使用しても IL-4 mRNA の発現を脊髄では検出することはできませんでした。対照的に、IL-4R 遺伝子発現は正常動物の脊髄で観察され、損傷後36時間で大きく増加しました。この増加は、損傷後2週間継続した。次に ISHH を用いて、IL-4R mRNA の発現を細胞レベルで調べると、IL-4R mRNA のシグナルは正常脊髄の後角で弱く、末梢神経損傷により同側の後角における IL-4R の大きな遺伝子発現増加を確認できた。SNI モデルラットの後角で IL-4R mRNA を発現する細胞型を同定するために二重染色 ISHH を実行すると、脊髄後角 I-II 層における IL-4R mRNA のシグナル陽性細胞の大部分は IBA1-IR ミクログリアであることが明らかとなった。

・IL-4 投与は神経損傷誘発性機械的異痛症を軽減する

神経障害性疼痛における内因性 IL-4R の関与の可能性を調べるために、浸透圧ポンプを用いて可溶性 IL-4R と IL-4R の中和抗体を3日間髄腔内投与した。注入は SNI 手術の2日後に開始した。可溶性 IL-4R も脊髄 IL-4R の中和も神経障害性疼痛モデルラットの機械的閾値に影響を与えなかった。次にミクログリアにおける脊髄 IL-4R の活性化が、神経障害性疼痛などの痛み行動を変化させるかどうかをさらに検討した。rIL-4 (2 ng、20 ng、200 ng、1 μg、または 5 μg /日)を3日間浸透圧ポンプを用いて髄腔内投与すると、機械的異痛は、正常群と比較して rIL-4 投与群で軽減された。最高用量群 (5 μg /日)では損傷後7日まで鎮痛効果を示した。続いて、既に確立された神経障害性疼痛に rIL-4 注入が抑制効果を有するかどうかを調べると、傷害後14日目に髄腔内に投与開始した rIL-4 は、投与期間中の神経障害性疼痛行動を有意に改善した。

・pSTAT6 の発現は末梢神経損傷後の脊髄後角で増加し、ミクログリアと共有している

IL-4 は、STAT6 依存的に誘導性マクロファージ機能と炎症反応を阻害する抗炎症性サイトカインであり、rIL-4 による抗侵害受容における STAT6 の役割を検討した。SNI ラットの脊髄において、損傷と同側の後角で pSTAT6 免疫反応が増加していた。pSTAT6<sup>ir</sup> の増加は手術後3日目と7日目で有意に増加していた (950% ± 437% および 1,393% ± 246%)、その後14日目までにベースラインに戻った。Iba1 免疫反応と pSTAT6 免疫反応の二重標識分析により、pSTAT6-ir 細胞の大部分も Iba1 免疫反応陽性であり、この結果は STAT6 シグナル伝達が末梢神経損傷後の活性化ミクログリアにおいて、活性化されたことを示唆している。

・rIL-4 の脊髄注入は、脊髄ミクログリアにおける損傷誘発 pSTAT6 の発現をさらに増加させ、Iba1 免疫反応性を弱める

さらに rIL-4 の脊髄注入により、損傷後4日目のミクログリアの損傷誘発性 pSTAT6 のレベルが有意に増加することがわかり、ミクログリアでの IL-4R 刺激が STAT6 シグナル伝達を通じて機械的異痛症を抑制したことを示唆している。さらに、神経損傷によるミクログリア活性化に対する IL-4 の効果を評価すると、rIL-4 注入は Iba1-ir の増加を減少させた。

まとめ

最終的に得られた結果は、末梢神経傷害後にラット脊髄において、IL-4受容体の増加を確認出来た。そして組織学的確認実験により、その増加は活性化したマイクログリアで生じていることを証明出来た。さらに細胞内シグナル伝達因子であるSTAT 6のリン酸化フォームと共存していることが判った。これらの結果は、末梢神経障害後の活性化マイクログリアには、これまで報告されてきた炎症促進性の作用のみならず、炎症抑制性の受容体増加という側面があり、外来性の治療の新しい可能性を示唆したと言える。これらの結果は、グリア関係のトップ雑誌であるGLIAに発表することが出来た。

さらに、後根神経節(DRG)におけるIL-4受容体の関与を追求するために、本研究を1年間延長し実験を行った。これは、上記で述べた脊髄内IL-4を受容する細胞成分(主にマイクログリア)について、グリア細胞以外の細胞要素(一次感覚神経終末成分)の関与する可能性があったためそれを検討した。結果的にマイクログリア以外にIL-4を受容する細胞腫は存在しないことが実験で明らかとなり、結論としてはIL-4の細胞内情報伝達系の動きを示す細胞成分は脊髄マイクログリアに限定していることが判明した。つまり、上記の結論で間違い無いという結果が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shinoda Masamichi、Fukuoka Tetsuo、Takeda Mamoru、Iwata Koichi、Noguchi Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Spinal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion reverses reduction of Kv4.1-mediated A-type potassium currents of injured myelinated primary afferent neurons in a neuropathic pain model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919841196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yang Yanjing、Wang Shenglan、Kobayashi Kimiko、Hao Yongbiao、Kanda Hirosato、Kondo Takashi、Kogure Yoko、Yamanaka Hiroki、Yamamoto Satoshi、Li Junxiang、Miwa Hiroto、Noguchi Koichi、Dai Yi	4. 巻 4
2. 論文標題 TRPA1-expressing lamina propria mesenchymal cells regulate colonic motility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 122402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.122402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okubo Masamichi、Yamanaka Hiroki、Kobayashi Kimiko、Noguchi Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Differential expression of mGluRs in rat spinal dorsal horns and their modulatory effects on nocifensive behaviors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919875026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanda Hirosato、Ling Jennifer、Tonomura Sotatsu、Noguchi Koichi、Matalon Sadis、Gu Jianguo G.	4. 巻 104
2. 論文標題 TREK-1 and TRAAK Are Principal K <sup>+</sup> Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 960 ~ 971.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2019.08.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Huang Tianliang, Okauchi Takashi, Hu Di, Shigeta Mika, Wu Yuping, Wada Yasuhiro, Hayashinaka Emi, Wang Shenglan, Kogure Yoko, Noguchi Koichi, Watanabe Yasuyoshi, Dai Yi, Cui Yilong	4. 巻 15
2. 論文標題 Pain matrix shift in the rat brain following persistent colonic inflammation revealed by voxel-based statistical analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806919891327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okutani Hiroai, Yamanaka Hiroki, Kobayahi Kimiko, Okubo Masamichi, Noguchi Koichi.	4. 巻 66
2. 論文標題 Recombinant interleukin-4 alleviates mechanical allodynia via injury-induced interleukin-4 receptor alpha in spinal microglia in a rat model of neuropathic pain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1775-1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23340.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusuyama K, Tachibana T, Yamanaka H, Okubo M, Yoshiya S, Noguchi K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Upregulation of calcium channel alpha-2-delta-1 subunit in dorsal horn contributes to spinal cord injury-induced tactile allodynia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine J	6. 最初と最後の頁 1062-1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.spinee.2018.01.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K, Dai Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Negative Regulation of TRPA1 by AMPK in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 98-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db17-0503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Noguchi Koichi
2. 発表標題 Molecular mechanism of pain -novel findings in pain research-
3. 学会等名 AOSRA-PM2019 日本区域麻酔学会第6回学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田浩里, 戴毅, 野口光一, グージャングオ.
2. 発表標題 眼窩下神経CCIモデルによる神経障害性疼痛へのKv4.3チャネルの役割
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中志穂, 辻彩乃, 助永憲比古, 野口光一, 廣瀬宗孝.
2. 発表標題 開胸術の周術期における痛みとTRPA1遺伝子のDNAメチル化との関係
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小暮洋子, 王勝蘭, 山本悟史, 野口光一, 戴毅.
2. 発表標題 炎症性腸疾患モデルラットに伴う内臓痛に対する大建中湯の効果
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野口光一.
2. 発表標題 痛みのメカニズム最新の知見.
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Noguchi K.
2. 発表標題 Effect of peripheral nerve injury on the Axo-axonic contacts between injured C-fiber and spinal neuron.
3. 学会等名 17th IASP World Congress on Pain(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Noguchi K.
2. 発表標題 Cellular distribution of brain derived neurotrophic factor in spinal dorsal horn of neuropathic pain model rats
3. 学会等名 17th IASP World Congress on Pain(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y.
2. 発表標題 Nedd4-2 in DRG neurons contributes to diabetic neuropathic pain through TRPA1 channels
3. 学会等名 17th IASP World Congress on Pain(国際学会)
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----