

平成 22 年 6 月 1 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19603013

研究課題名(和文) 帯状疱疹後神経痛の発症における T 細胞の関与に関する研究について

研究課題名(英文) Role of T cells in the onset of postherpetic neuralgia.

研究代表者

武田 昌子(TAKEDA MASAKO)

国際医療福祉大学・大学病院・講師

研究者番号：50433628

研究成果の概要(和文)：帯状疱疹後痛を発症したマウスにおいて、帯状疱疹発症の場である脊髄後根神経節を免疫組織染色法を用いて研究した結果、CD4陽性T細胞が帯状疱疹後痛の病態により関与している可能性が示唆された。しかしCD4欠損マウスを用いた研究からは帯状疱疹から帯状疱疹後痛への発症に関してCD4陽性T細胞は、直接関与しているわけではないことが示唆された。このことから帯状疱疹後痛の発症にはMHC遺伝子そのものが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dorsal Root Ganglion (DRG) in the postherpetic neuralgia model mouse have shown the possibility that CD4 positive T cells are involved in the onset of postherpetic neuralgia. If CD4 positive T cells are involved in the onset of postherpetic neuralgia, CD4 knockout mouse will not develop to postherpetic neuralgia from herpes zoster. But in this study, there were no significant differences between control mouse and CD4 knockout mouse as to the onset of postherpetic neuralgia. Therefore it is suggested that MHC genes (H-2^b) itself are directly involved in the onset of postherpetic neuralgia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
20年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
21年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：疼痛学・免疫遺伝学

科研費の分科・細目：疼痛学・9025

キーワード：帯状疱疹後神経痛、HLA 遺伝子、帯状疱疹痛モデルマウス、T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みは生体の防御反応としての重要な役割を担っているが、疾病に伴い慢性化した痛みは社会生活を極めて困難にし、生活の質を著しく低下させる。神経系の機能障害の結果生じる神経障害性疼痛は、臨

床上、慢性疼痛の多くを占め、一般的に難治的で十分に疼痛がコントロールできないものが多い。

その神経障害性疼痛の一つである帯状疱疹後神経痛(postherpetic neuralgia:PHN)は、その疼痛発生機序は明らかにされていない。

幼少期に水痘帯状疱疹ウイルス (varicella zoster virus:VZV) に初感染し水痘を発症、治癒後に水痘帯状疱疹ウイルスは脊髄神経後根神経節 (dorsal root ganglion:DRG) や三叉神経節に潜伏感染する。その後細胞免疫の低下などの理由から潜伏感染していたウイルスが再活性化されると、神経節から末梢神経を通過して皮膚に帯状疱疹を発症させる。通常は、数週間後に治癒するが約15%の割合で疱疹消失後3ヶ月から半年を経過しても疼痛が残存することがあり、これをPHNという。研究代表者はこれまでに、PHNとヒト白血球抗原 (Human histocompatibility antigen:HLA) との遺伝的素因、

HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302、との関連を見出した。一方でPHNに進行しなかった帯状疱疹とはその遺伝的な関連がないことを確認した。

(2) 一方、連携研究者は単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1) 感染による帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛のモデルマウスを作製した。それを用いて研究代表者はモデルマウスにおいてもヒトのHLA遺伝子に相当するマウスにおける、主要組織適合性複合体 (Major Histocompatibility Complex:MHC) 遺伝子、H-2^bとの関与を見出し、さらにCD3陽性T細胞との関連も示唆した。

2. 研究の目的

この研究は、未だ解明されていない PHN の発症機序あるいは病態を解明することを目的としている。

感染細胞上に抗原提示された HLA クラス I 分子は CD8 陽性 T 細胞により認知され、HLA クラス II 分子は CD4 陽性 T 細胞に認識される。PHN 患者と HLA 遺伝子との関連の見出されたことから、HLA 分子と T 細胞との免疫学的なかわりに着目し、帯状疱疹から PHN への進行に T 細胞が関与している可能性について帯状疱疹後痛モデルマウスを用いて研究する。

3. 研究の方法

まず、胸腺欠損ヌードマウスは T 細胞が存在しないため、このマウスで帯状疱疹後痛が発症しなければ、T 細胞がその発症になんらかの関与があると考えられる。次に T 細胞のなかで、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞のどちらが有意に関連があるかを調べるために、CD4 陽性 T 細胞欠損マウス (系統は、C57BL/6:MHC 遺伝子は H-2^b) を用いて帯状疱疹後痛が発症するかを調べた。さらに、帯状疱疹の発症の場である DRG を帯状疱疹後痛モデルマウスから採取して免疫組織染色法を用いて MHC 分子、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞が存在するかを調べた。

以下に帯状疱疹後痛モデルマウスの作成方法と免疫組織染色法について記す。

(1) 疼痛関連反応の評価

後肢足蹠への機械的刺激を von Frey filament を用いて行い、逃避反応や足振り動作などを指標に疼痛関連反応 (アロディニアと痛覚過敏) を評価する。

(2) 帯状疱疹痛モデルマウスの作製

マウスをペントバルビタール麻酔下でバリカンと除毛クリームを用いて右腹部から後肢を除毛する。後肢の表皮に乱切を加え、HSV-1 を経皮接種する。接種 4-5 日目にかけてヒトの帯状疱疹に類似した皮疹が出現し、疼痛反応も同時期より出現してくる。すべてのマウスに安定した疼痛反応が観察される接種 6 日目を急性帯状疱疹痛マウスとして使用する。

(3) 帯状疱疹後神経痛モデルマウスの作製

HSV-1 接種マウスに発症した帯状の皮疹は、接種 5-8 日目にかけて徐々に悪化するが、接種後 10 日目あたりから瘡蓋が剥れ始め接種 15 日目までにはほぼ完全に治癒する。一部のマウスは皮疹の治癒とともに疼痛反応も消失するが、半数以上においては皮疹治癒後も疼痛関連反応が持続する。後者のマウスを帯状疱疹後神経痛モデルマウスとして使用する。

(4) 帯状疱疹後神経痛への移行率

1 群 24 匹として実験を行う。全 HSV-1 接種マウスのうち、接種後 35-40 日目において疼痛関連反応の持続するマウスの匹数を帯状疱疹後神経痛移行率 (%) として算出する。

(5) 免疫組織染色法

エーテルで麻酔をした後、断頭をして脊髄を取り除いて腰髄第 4 番、5 番レベルの DRG を採取し、直ちに -80℃ に凍結保存する。凍結保存した組織を cryotome を用いて 10 μm の薄切切片をつくり、ゼラチンコーティングしたスライドグラスに貼り付ける。その後 4% パラホルムアルデヒドにて室温で固定、洗浄をし、さらに 4℃ の 100% エタノールで固定する。次に内因性ペルオキシダーゼ阻害のために 0.3% 過酸化水素加メタノールに 30 分間浸漬する。biotin conjugated anti-mouse CD4、biotin conjugated anti-mouse CD8a を各々 100 倍希釈にして 4℃ で約 20 時間反応させる。洗浄後、200 倍希釈した avidin-biotin-peroxidase complex を用いて室温で約 2 時間反応させ、diaminobenzidine に 1% 過酸化水素水を加えたものを用いて約 30 分間反応させて、生理食塩水で洗浄し、ヘマトキシリンでカウンター染色を行い、脱水、透徹を行いマウンテ

イングメデイウムにて封入する。

4. 研究成果

(1) 胸腺欠損ヌードマウスを用いたモデルマウスの作製

胸腺欠損ヌードマウスを用いて、帯状疱疹後痛モデルマウスを作成する過程を施行して他の系統のマウスと同様に帯状疱疹後痛へ移行するかどうかを調査する。もし帯状疱疹後痛を発症しないならT細胞がその発症に関与しているという可能性があったが、試行錯誤を重ねたが最長18日までしか生存しなかった。その間、von Frey法により帯状疱疹後痛と診断されたマウスはいなかった。また、運動神経麻痺を起こしたマウスもいなかった。

(2) 免疫組織染色の結果

各系統の帯状疱疹後痛を発症したマウスの脊髄後根神経節(dorsal root ganglion:DRG)において免疫組織染色法を用いて、CD3陽性T細胞が実際はCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞いずれが優位であるかを研究した結果、CD4陽性T細胞が帯状疱疹後痛の病態により関与している可能性が示唆された。

(3) CD4陽性T細胞欠損マウスを用いたモデルマウスの作製

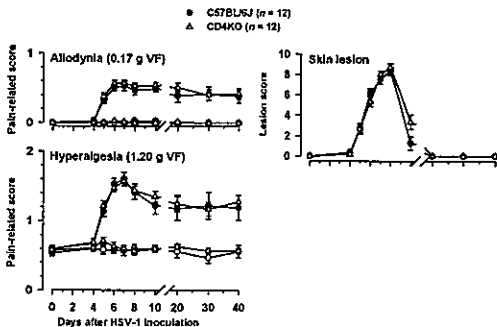
ジャクソン研究所より既成のCD4陽性T細胞欠損マウス(系統はC57BL/6:MHC遺伝子はH-2^b)を輸入してそれらを繁殖させて使用した。第6~7週令に達した段階で帯状疱疹後痛モデルマウスを作製する過程を施行して、帯状疱疹後神経痛の発症率をコントロールのC57BL/6マウスと比較した。その結果、両者の帯状疱疹後痛の発症率はほぼ同様で有意差は認められなかった(表-1)。なおこれらのマウスに急性期においてCD4陽性T細胞が存在しないことは免疫組織染色にて確認した。

図-1は、帯状疱疹スコアがCD4陽性T細胞欠損マウスとコントロールのC57BL/6マウス、両者と比較して有意差がなかったことを示したものの(skin lesion)とvon Frey法における2種類の痛みの種類(allodyniaとhyperalgesia)の評価において両者の比較の図を示したものである。両者ともにウイルス接種した方の後肢、対側のコントロールの後肢においてvon Freyスコアに有意差は認められなかった。

表-1

マウス	n	接種40日目において疼痛が持続していたマウスの数
C57BL/6J	12	8 (67%)
CD4欠損マウス	12	9 (75%)

図-1



○, △は各マウスのウイルス接種しなかった方コントロールの足の von Frey 法の結果。

(4) 今後の展望

今回の研究からは、予想に反してCD4陽性T細胞は帯状疱疹から帯状疱疹後痛への発症に関して直接関与しているわけではないことが示唆された。このことから、帯状疱疹後痛の発症にはMHC遺伝子そのものが関与している可能性が示唆された。一方でCD4陽性T細胞の関与は見出せなかったが、今後はCD3陽性NKT細胞、さらにNK細胞の関与について研究する予定である。現在NK細胞機能が低下したマウス(系統はC57BL/6)を用いて帯状疱疹後痛が発症するかを研究しているところである。

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2件)

(1) 武田 昌子

帯状疱疹後神経痛の遺伝的素因と免疫学的機構の解析 ペインクリニック 査読無 30 (別冊秋号), 2009, S540-S548.

(2) 井関 雅子 武田 昌子

神経障害性疼痛の遺伝的多型 麻酔 査読無 58 (9), 2009, 1112-1121.

[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 昌子 (TAKEDA MASAKO)

研究者番号 : 50433628

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHIRO)

研究者番号 : 00397176