

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 10 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21600011

研究課題名（和文）炎症性および神経障害性疼痛における CCL3, CCR5 の関与

研究課題名（英文）The involvement of CCL3, CCR5 in inflammatory and neuropathic pain

研究代表者

仙波 恵美子（SENBA EMIKO）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00135691

研究成果の概要（和文）：マウスで神経障害性疼痛モデルを作製し、末梢神経、DRG、脊髄後角に誘導される macrophage/microglia の機能種について検討し、骨髄移植によりその起源についても検討した。損傷神経では術後 3 日目をピークとして M1 macrophage が著明に増加し、これらは骨髄由来であった。DRG と後角においては術後 3 日～1 週間をピークとして、それぞれ M2 macrophage, M1 microglia の著明な増加があり、Ki-67 陽性を示した。EGFP 陽性細胞の侵入は 3 週間後になって認められたことから、初期に増加するのは常在型であると思われる。

研究成果の概要（英文）：Polarity and origins of macrophages and microglia in peripheral nerves, dorsal root ganglia (DRG) and dorsal horns were examined in Seltzer model mice. In injured sciatic nerves, the number of M1 macrophages got its peak at 3 days after surgery. Most of these macrophages were shown to be derived from the bone marrow. After 3~7 days, M2 macrophages and M1 microglia were increased in the DRG and dorsal horns, respectively. These cells were considered to be resident, since EGFP-positive macrophages and microglia were first detected at 3 weeks after surgery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
22 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
23 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
総計	3,800,000 円	1,140,000 円	4,940,000 円

研究分野：神経科学・疼痛学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛、Seltzer モデル、macrophage、microglia、極性、骨髄移植、DRG、脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは、知覚神経終末に発現する種々の受容体 (H1-R, 5-HT2A-R, 5-HT3-R, OSMR β , IL-31RA など) が痛みや痒みの受容、炎症性あるいは神経障害性疼痛の発症や維持に働くメカニズムについて検討を進めてきた。今回、炎症や損傷修復に重要な役割を果たしているケモカインおよびケモカイン受容体が、慢性痛、すなわち炎症性疼痛(inflammatory pain)や神経障害性疼痛(neuropathic pain)にどのように関与しているかについて検討を行なう。

多くのケモカイン、例えば CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CXCL12 (SDF-1)などを皮膚に注入すると痛覚過敏や allodynia の症状を発現することが報告されている(White et al., PNAS 104:20151, 2007)。CCL3, CCL5 の共通の受容体は CCR1, CCR5 であるが、CCR1 は 85% の DRG ニューロンに発現し、その多くが capsaicin 受容体 (TRPV1) と共存して互いに細胞内シグナル伝達系の transactivation を介して痛みを強めていることが、培養 DRG ニューロンを用いて明らかにされている(Zhang et al., PNAS 102:4536, 2005)。しかし、一次知覚伝達系における CCL3, CCR5 の発現についての詳細は不明である。

そこで、本研究課題においては、当初、Complete Freund Adjuvant (CFA)による炎症性疼痛、および神経障害性疼痛のモデルを作製し、末梢から脊髄後角に至る痛覚伝達系における CCL3, CCR1, CCR5 の発現動態を明らかにすることを目的とした。臨床的に問題となる慢性痛の発症・維持におけるこれらのケモカインおよびその受容体の役割が明らかになれば、これらをターゲットにした治療法の開発につながるこ

と期待できる。

申請者らの preliminary な検討において、CCL3-KO マウスでは正常では熱刺激・機械的刺激に対してコントロール(C57BL/6)と同様の反応を示すが、炎症性疼痛モデルを作製するとその反応が減弱していること、神経障害性疼痛のモデル動物では1日後から2週間にわたって DRG と脊髄後角において CCR5 陽性の macrophage/microglia 様細胞が増加することを明らかにしている。

2. 研究の目的

当初の研究の目的は、サイトカインやケモカインが難治性疼痛の発症や維持にどのように関与するかを明らかにすることであったが、本研究課題名にある CCL-3(MIP-1 α) が神経障害性疼痛の発症に関与することについては、2010年に他のグループによって報告されたため(Kiguchi et al., Pain 149:305, 2010; Kiguchi et al., Neurosci.Lett. 484:17, 2010)、本研究では視点を変えて、個々のサイトカインやケモカインの役割よりもそれらを産生・放出する macrophage/microglia の極性の変化(M1/M2)が、神経障害性疼痛の発症や経過・組織の修復などにどのように関与するかということについて検討することにした。神経損傷後、DRG において CCR5 を発現する macrophage が増えることに注目し、それらの macrophage の極性や動態、およびその起源を明らかにすることを目指した。

神経障害性疼痛の発症には microglia や macrophage が関与することが注目されており、神経障害性疼痛の動物モデルの坐骨神経部分結紮モデル(Seltzer モデル)マウスでは、後根神経節(dorsal root ganglia ; DRG)に macrophage の浸潤が認められる

ことが報告されているが、その macrophage の詳しい機能種や役割は不明である。そこで本研究では、神経障害性疼痛の病態時の傷害された末梢神経、DRG、および脊髄後角における macrophage/microglia の誘導およびその機能種の検討を行い、さらにこれらの細胞の起源（組織常在型あるいは骨髄由来）についても検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 慢性疼痛モデル動物の作製

生後8週の雄性 C57BL/6J マウスを用い、isoflurane 吸入麻酔下に坐骨神経本幹の 1/2~1/3 を絹糸(8.0)で結紮し、神経障害性モデル(Seltzer モデル)を作製した。

(2) 骨髄移植

EGFP を発現する transgenic mice の大腿骨より骨髄を採取し、前日(24時間前)に 10 gray の放射線を照射した recipient mice (C57BL/6J)の尾静脈より注入した。4週間後、recipient mice においても上記と同様に坐骨神経を結紮し、Seltzer モデルを作製した。

(3) 組織学的検討

Seltzer モデル作製後、3日、7日、14日、21日目に、4%パラホルム液を用いて灌流固定し、損傷神経、DRG、および脊髄を取り出し、後固定の後、30%蔗糖液にて脱水し、n-hexane+ドライアイスで凍結し、クリオスタットにて厚さ 10 μ m の凍結切片を作製した。コントロール群(naïve および sham operation)においても同様に組織を採取した。macrophage/microglia のマーカーとして Iba-1, F4/80, OX-42 抗体、M1 macrophage/microglia のマーカーである iNOS, CD86 に対する抗体、M2 macrophage/microglia のマーカーである arginase-1, CD206, CD163 に対する抗体、astrocyte のマーカーとして抗 GFAP 抗体、neuron のマーカー

として抗 NeuN 抗体、シグナル伝達分子として pSTAT-3 抗体、細胞増殖のマーカーとして Ki-67 抗体、2次抗体として Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 594 標識抗体を用いて、EGFP 標識や核染色 DAPI を含め、蛍光二重・三重染色を行った。Keyence microscope BZ-9000 あるいは Zeiss LSM 710 confocal laser-scanning microscope を用いて組織の観察ならびに解析を行った。

4. 研究成果

坐骨神経部分結紮(partial nerve ligation: PSL) 後1日目の坐骨神経傷害部に、iNOS 陽性・CD86 陽性・Arginase-1 (Arg-1)陰性の M1 macrophage と好中球の浸潤が認められ、3日目には著明に増加した。一方、PSL 後2日目の傷害側の DRG で macrophage の有意な増加が認められ、それらの macrophage の多くが、予想に反して Arg-1 陽性、iNOS 陰性の M2 macrophage であり、その多くは CD206 陽性/CD163 陽性であることから M2a タイプであり、一部は CD206 のみ陽性であることから M2c タイプであることがわかった。M2a macrophage が分泌する IL-10 は、炎症性サイトカインの分泌を減少させることから、神経障害性疼痛の症状の抑制に重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。脊髄後角においては、PSL 後3日目から傷害側において iba-1 陽性の microglia が増加し始め、1週間目にピークに達しその後減少した。CD86 陽性の M1 microglia は後角 I~III 層に分布し、CD206 陽性/CD163 陽性の M2a microglia は主として後角 IV/V 層に認められた。

(1) macrophage/microglia の極性の検討

PSL 後、常在型 microglia や脊髄後角に侵入してきた血行性の単球/macrophage が活性化して細胞肥大や増殖が起こる。こ

これらの細胞により産生されるサイトカイン・ケモカインが様々な細胞の誘導と活性化に働き、疼痛の発症と維持に重要な役割を果たしていると考えられている(Zhang J. et al., *J. Neurosci.* 27:12396-12406, 2007)。

活性型 microglia は、発現する受容体や産生するサイトカインの種類によって、大きく M1 と M2 に分けられる。M1 は、INF γ や LPS の刺激により誘導され、NO や炎症性サイトカインを産生することで炎症の促進と組織損傷に関与するのに対して、IL-4 や IL-13 で刺激された macrophage は、M2 型となり、炎症を抑え、組織の修復に働く。M2 はさらに表面抗原や産生するサイトカインの違いにより M2a, M2b, M2c に分けられる。例えば脊髄損傷モデルでは、損傷後 1 週目までは M1, M2 とも誘導されているが、2~4 週間後になると、M1 が優勢になる(Kigerl K.A. et al., *J. Neurosci.* 29:13435-13444, 2009)。このことが炎症を長引かせ組織の修復を遅らせる原因になっているのではないかと考えられる。

一方、神経障害性疼痛モデルマウスでは、坐骨神経損傷部においては iNOS 陽性、Arginase-1 陰性の macrophage が大多数を占め、DRG では、殆ど全ての macrophage が arginase-1 陽性で、その多くが CD163 陽性の M2a macrophage であることが、本研究により明らかになっている(Komori et al., *NeuroReport* 22 : 911-917, 2011)。

後角では PSL 後 3 日目から Iba-1 陽性の microglia の発現がみられ、PSL 1 週間後の患側の脊髄後角において Iba-1, CD86 共に発現が増強し、両者が共存することが確認された。ナイーブでは約 10% の Iba1 陽性 microglia が CD86 陽性を示したが、PSL 3 日後には約 60%、1 週間後には約 80% の microglia に CD86 の発現が観察され、その

後漸減した。CD86 は M1、M2a に発現するが、arginase-1 陽性の microglia は認められないことから、後角の CD86 陽性 microglia は M1 であると思われる。CD163/ F4/80 陽性の M2 microglia は後角深層に少数認められたが、PSL による変動は示さなかった。

以上をまとめると、マウスの坐骨神経部分損傷では、1) 脊髄後角表層に活性化 microglia の増加が見られ、それらの多くは CD86 陽性の M1 型であること、2) arginase-1 や CD163 によって標識される M2 サブタイプは増加を示さないことがわかった。これまでの結果を考え合わせると、末梢神経損傷部および脊髄後角では M1 サブタイプ、DRG では M2 サブタイプというように、それぞれ異なった極性を示す macrophage/microglia が誘導され、神経障害性疼痛の発症や維持においてそれぞれ異なった役割を果たしていることが示唆された。

(2) 脊髄後角における細胞増殖の検討

前述のように PSL 後の Iba-1 陽性 microglia の数は、ナイーブ群との比較でも健側との比較でも、3 日後から 21 日後まで患側において有意に増加していた。このような活発な microgliosis には、microglia の増殖が関与していると考えられるため、細胞増殖のマーカーである Ki67 抗体を用いて検討した。

PSL 3 日後の患側の後角には、多くの Ki67 陽性細胞が認められたが、7 日後には減少し、その後はほとんど検出できなくなった。さらに、Ki-67 を発現している細胞タイプについて調べたところ、NeuN や GFAP 陽性細胞ではなく、Ki-67 陽性反応は OX-42 陽性 microglia の核に認められた。これらの結果は、PSL 後の活発な microgliosis には、術後早期の microglia の増殖が重要であることを示している。

次に、microglia の増殖に STAT3 が影響を及ぼしているかどうかについて検討した。リン酸化 STAT3 の発現は NeuN 陽性のニューロンや OX-42 陽性 microglia ではなく、GFAP 陽性アストロサイトの核に認められたことから、microglia の増殖には STAT3 以外のシグナリング分子が関与していると考えられる。

(3) 骨髄由来 macrophage/microglia の侵入について

① 神経損傷部位への macrophage の侵入

ナイーブ群の坐骨神経には EGFP 陽性細胞はまったく観察されないが、PSL 3 日後には、結紮部周辺を中心に多くの EGFP 陽性細胞が認められた。これらの EGFP 陽性細胞は OX-42 にも陽性を示したことから、骨髄由来の macrophage であることがわかった。OX-42 陽性の EGFP 細胞数は PSL 3 日後が最も多く、その後漸減した。

② DRG および脊髄後角への骨髄由来 macrophage の侵入

ナイーブ群および PSL 後 3 日から 14 日までの DRG および後角には、EGFP 陽性細胞は認められなかったが、PSL 2 1 日後には、患側の DRG および後角に EGFP 陽性細胞が観察され、さらにこれらの細胞は OX-42 陽性であることから、骨髄由来 macrophage/microglia が DRG および後角に侵入することが確認された。これらの結果は、PSL 21 日後の DRG/後角における macrophage の増加や microgliosis には骨髄由来の単球/macrophage も関与することを示している。以上の結果より、末梢神経の損傷は患側の後角に活発な microgliosis を誘導するが、神経損傷後早期のミクログリオシスには常在型 microglia の増殖が重要であり、骨髄由来 macrophage は後期の microgliosis に貢献していると思われる。また、神経損傷数週間後

に脊髄後角や DRG に浸入した骨髄由来 macrophage は、末梢神経損傷後の長期間に亘る痛み感受性の亢進に関与する可能性が考えられる。今後、これらの macrophage について、例えば M1 や M2 の極性化、特異的なシグナリング分子の活性化などをさらに詳細に検討し、神経障害性疼痛の発症・維持における役割を明らかにして行きたい。また、当初の目的であった、macrophage/microglia における CCR5 の発現とその役割についても検討を加える予定である。

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 5 件)

1. Komori T, Morikawa Y, Inada T, Hisaoka T, Senba E : Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. NeuroReport 22 : 911-917, 2011. (査読あり)

2. Imbe H, Senba E, Kimura A, Donishi T, Yokoi I, Kaneoke Y : Activation of mitogen-activated protein kinase in descending pain modulatory system. J Signal Transduct. 2011 : 468061, 2011. (査読あり)

3. Takemura Y, Yamashita A, Horiuchi H, Furuya M, Yanase M, Niikura K, Imai S, Hatakeyama N, Kinoshita H, Tsukiyama Y, Senba E, Matoba M, Kuzumaki N, Yamazaki M, Suzuki T, Narita M : Effects of gabapentin on brain hyperactivity related to pain and sleep disturbance under a neuropathic pain-like state using fMRI and brain wave analysis. Synapse. 65(7) : 668-676, 2011. (査読あり)

4. Imbe H, Okamoto K, Donishi T, Senba E, Kimura A : Involvement of descending

facilitation from the rostral ventromedial medulla in the enhancement of formalin-evoked nocifensive behavior following repeated forced swim stress. Brain Res. 1329 : 103-12, 2010. (査読あり)

5. 仙波恵美子 : 一次求心ニューロンの分子マーカー [特集 : 分子マーカーの基礎と臨床]. Clinical Neuroscience 28(12) : 1359-1362, 2010 (査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

1. 上勝也、仙波恵美子 : マウス坐骨神経部分結紮に対する常在型 microglia と骨髄由来 macrophage/microglia の反応. 第 17 回グリア研究会 2012.10. 神戸

2. 上勝也、広田真一、細江さよ子、仙波恵美子 : 坐骨神経部分損傷後の脊髄後角におけるグリア細胞の長期応答と macrophage・サブタイプの分布様式. 第 35 回日本神経科学大会. 2012.9. 名古屋

3. 広田真一、上勝也、細江さよ子、仙波恵美子 : 坐骨神経部分損傷後の脊髄後角におけるグリア細胞の長期応答と macrophage・サブタイプの分布様式. 第 34 回日本疼痛学会, 2012. 7. 熊本

4. 小森忠祐, 森川吉博, 稲田剛司, 久岡朋子, 仙波恵美子 : 末梢神経損傷後の末梢神経および後根神経節における浸潤 macrophage のサブタイプの検討. 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011.9. 加賀

5. 仙波恵美子, 稲田剛司, 小森忠祐, 森川吉博 : 神経障害性疼痛モデルマウスの後根神経節における macrophage の機能種の検討. 第 33 回日本疼痛学会(愛媛ペイン 2011), 2011.7. 松山

6. Senba E., Narita M : Effects of Gabapentin on Brain Hyperactivity in Animal Models of Chronic Pain State: a

[図書] (計 2 件)

1. Senba E., Okamoto K, Imbe H : Central sensitization and descending facilitation in chronic pain state. In New Insights into Fibromyalgia (Ed. Williams S. Wilke), INTECH, Croatia, pp.19-40, 2011(査読あり)

2. 仙波恵美子 : 11 節 インターロイキン系 [3 部 治療・臨床を意識したこれからの疼痛治療薬開発動向, 1 章 有望な鎮痛カスケードの開発動向]. 「慢性疼痛における薬剤選定と治療薬開発」技術情報協会編, 技術情報協会, 東京, pp.352-357, 2010.9. (査読なし)

[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 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仙波 恵美子 (SENBA EMIKO)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 0 0 1 3 5 6 9 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし