

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 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21600017

研究課題名（和文）末梢神経損傷後のニューロパシックペインとサイトカインネットワークの
関連研究課題名（英文）Involvement of cytokine network in the pathology of neuropathic pain
following peripheral nerve injury

研究代表者

神原 政仁 (KAMIHARA MASAHIRO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10441312

研究成果の概要（和文）：

末梢神経損傷後のマイクログリアはサイトカインを放出することで痛みを誘発すると考えられている。我々は特に TNF alpha に着目して検討を行った。その結果、末梢神経損傷後 24 時間をピークにマイクログリアに一過性に発現しており、受容体である TNF R1 が脊髄後角の astrocyte と一部の neuron に発現していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Tumor necrosis factor (TNF)-alpha is one of a pro-inflammatory cytokines that may play a key role for the induction of neuropathic pain following nerve injury. However, the precise histological expression of TNF alpha and its receptors mRNA in the spinal cord after nerve injury is not fully understood. TNF alpha mRNA showed the transient increase from 18 hour and peaked at 24 hour following SNI. In the spinal cord of naive rats, TNF alpha and TNFR2 showed a low level expression and TNFR1 mRNA signal was detected in neurons and glial cells in the dorsal horn. Twenty-four hours after SNI, TNF alpha mRNA signals increased in the ipsilateral microglia. TNFR1 and TNF R2 mRNA signals increased strikingly in ipsilateral glial cells at 3 days after SNI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：疼痛学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：末梢神経損傷、マイクログリア、アストロサイト、TNF alpha、脊髄後角、神経因性疼痛

1. 研究開始当初の背景

末梢神経が損傷されると後根神経節や脊髄のグリア細胞が活性化することがわかっている。*in vitro*の実験系においては活性化した microglia からサイトカインが遊離し、ニューロンの興奮性増加に重要な役割を果たしていることが報告されており、これらのことから活性化グリアからのサイトカインが脊髄・後根神経節において神経因性疼痛に関与していることが強く示唆されている。

サイトカインには末梢組織において炎症や痛覚過敏反応を引き起こす作用のある炎症性サイトカイン [Tumor necrosis factor(TNF) alpha, interleukin (IL)-1, 6, 12] と、炎症を抑制する抗炎症性サイトカイン [IL-4, IL-10, IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra)]があり、末梢神経損傷後に脊髄・後根神経節においてこれらサイトカインやサイトカイン受容体発現の増加が報告は散見されているが、どのような細胞で発現が見られるかが不明であるため、サイトカインを介した Neuron – Glia interaction は解明の端緒がない。そのため、本研究では TNF alpha とその受容体を中心にサイトカインの発現について解析を進めた。

2. 研究の目的

サイトカインが果たす役割は *in vitro* の実験や電気生理学・薬理的な実験系でよく調べられているが、一次知覚神経細胞や脊髄などの中枢神経における発現や分布については、未だ断片的な報告しか存在しない。神経因性疼痛モデル動物での発現動態については、さらに不明な点が多い。そのため、脊髄・後根神経節における末梢神経損傷後のサイトカインと

受容体の発現変化を時間的・空間的に調べ発現細胞の同定を行い、神経因性疼痛の発生機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

SD rat ♂ 200-250gを使用し、Spared nerve injury (SNI)モデルを作成した。

(1)半定量的RT-PCR法によるサイトカインの発現変化

SNLモデル作成後1時間から30日までの各タイムコースのDRGや脊髄のcDNAを作成した。炎症性サイトカイン(TNF alpha、リンホトキシン)とそれら受容体の発現変化を調べる為、primerを設計し、半定量的RT-PCR法にて発現変化を検討した。

(2)cRNAプローブの作成

炎症性サイトカイン(TNF alpha、リンホトキシン)やその受容体のRT-PCR法を行い、それらからcDNAを作成した。それを用いて *in situ* hybridization の template となる plasmid cloneを作成した。

(3)*in situ* hybridization histochemistry (ISHH) 法の施行

cRNAプローブを用いたISHHを行い、脊髄や後根神経節における発現を各タイムコースで詳細に検討した。

(4)二重染色法による発現細胞の同定

アストロサイトやマイクログリア、ニューロンのマーカータンパク質抗体を用いて免疫組織化学法を施した後、ISHH法を行い二重染色を行うことで、発現細胞を同定した。

(5)免疫組織化学法・Western blot法によるタンパク質の発現変化

TNF alphaやその受容体であるTNF R1, TNF R2抗体を購入し、Western blot法法を行い抗体の検討を行った。この結果を受けて、免疫

組織化学法を行った。

4. 研究成果

TNF alpha とその受容体である TNF R1、TNF R2 の動態について SNI モデルを作成し、脊髄における発現変化を RT-PCR 法を用いて検討を行った。その結果、TNF alpha mRNA はモデル作成後 18 時間から増加し、24 時間がピークとなり、48 時間後には naive レベルに戻り一過性の増加を示した。TNF R1、TNF R2 は共に 3 日をピークに 14 日まで発現が増加していた。

次に、発現細胞を同定するために *in situ* hybridization 法にて詳細に検討したところ、TNF alpha mRNA は naive ではほとんど検出できなかったが、損傷後 24 時間では脊髄損傷側で増加しており、ニューロンのマーカーである NeuN、astrocyte のマーカーである GFAP、microglia のマーカーである Iba1 抗体を用いて二重 ISHH-免疫組織化学法を行ったところ、ニューロンやアストロサイトではなく、マイクログリアで発現が増加していた。TNF R1 受容体は naive ではアストロサイトと一部の後角表層の neuron に発現が見られ、末梢神経損傷後にはアストロサイトとマイクログリアで発現が増加していた。TNF R2 受容体は naive の脊髄ではほとんど検出されなかったが、損傷 3 日目ではマイクログリアにおける増加が観察された。このことから、TNF alpha のピークが 24 時間で 48 時間後には検出できなくなるにもかかわらず、受容体の発現ピークが 3 日後であるため、他のリガンドが TNF R1、R2 受容体に作用しているのではないかと考え、リンホトキシン alpha とリンホトキシン beta を RT-PCR 法、*in situ* hybridization 法を用いて検討した。その結果、DRG、脊髄においてリンホトキシン alpha、beta 共に検出できず、SNI モデル作成 1~14

日において増加も見られなかった。

これらの結果を受けて、TNF R1、R2 受容体発現のピーク時では TNF alpha 受容体タンパク質の発現動態が mRNA と異なっているのではないかと考え、数種類の TNF alpha 抗体を購入し、Western blot 法と免疫組織化学法を用いて信用できうる抗体を選別した。免疫組織化学法により、損傷後 18 時間、24 時間、48 時間、3 日後の脊髄における TNF alpha タンパク質発現を検討したところ、mRNA 発現と同様の発現動態を示した。

これらのことから、TNF alpha は早期の活性化マイクログリアから放出されることで、神経障害性疼痛の初期形成に関わっていることが示唆される。末梢神経損傷 24 時間後の脊髄後角では TNF alpha がマイクログリアで増加することにより、アストロサイト・脊髄後角 neuron で TNFR1 により受容されることが神経因性疼痛形成の初期段階に関与していると考えられるため、この段階で TNF alpha の働きを抑えることで神経因性疼痛形成を抑制できる事が期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 神原政仁,小林希実子,野口光一. 末梢神経損傷後の脊髄に一過性に増加する TNF alpha, 第 87 会日本解剖学会近畿支部学術集会, 2011.12.3 西宮

2. Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Dai Y, Noguchi K. Transient expression of TNF alpha in the rat spinal cord following peripheral nerve injury. The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2009.10.20. Chicago

6. 研究組織

(1)研究代表者

神原 政仁 (KAMIHARA MASAHITO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10441312

(2)研究分担者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70418961

有村 佳修 (ARIMURA YOSHINOBU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30419824

中野 範 (NAKANO SUSUMU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412019