

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10391

研究課題名(和文)慢性圧迫脊髄に起因する疼痛や感覚障害に関する組織化学的検討

研究課題名(英文) Pathological of neuropathic pain with chronic progressive spinal cord compression.

研究代表者

竹浦 直人 (Takeura, Naoto)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：00615304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性脊髄圧迫に起因する疼痛や感覚障害の病態は複雑かつ難治性であり、日常生活動作や健康寿命に影響を及ぼすが、その病態や治療は未だ十分な解明がなされていない。本研究では、ヒト頸髄症の病態をシミュレートする慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy マウス)を用いその上位頸髄圧迫部位での解析を行なった。評価項目は、圧迫程度に応じた脊髄後角に発現する疼痛関連物質の組織化学的評価を行った。また、脊髄内 microglia 活性および血液脊髄関門の破綻により脊髄内へ流入しうる macrophage の組織学的評価のため、GFP を発現する遺伝子改変マウス骨髄を twy マウスに移植し、疼痛が慢性化する病態について検討した。

研究成果の概要(英文)：To identify the cell type that expressed p-p38 and p-ERK MAPK in spinal cord with chronic compression. Of 12 weeks old twy/twy mice, double stained cells for p-ERK and CD11b were rarely found. The cell markers showed that p-p38 MAPK-IR cells completely co-localized with CD11b, but not with either GFAP or NeuN at all-time points examined. The rate of MAPK-positive/GFP-positive cells was higher as the degree of the compression of spinal cord. As a result of this research, we suggested that in the spinal cord with chronic compression the failure and hyperpermeability of BSCB could be occur according to compression degree and that hematogenous macrophage would be random migration in the spinal cord could be as one of the clinical condition of the neuropathic pain.

研究分野：脊髄 基礎研究

キーワード：脊髄慢性圧迫 twyマウス MAPK マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

### 慢性脊髄圧迫に起因する疼痛の病態については、未だ十分に解明されていない。

急性脊髄損傷においては、神経細胞の necrosis や apoptosis を助長する不適切な微小環境を作り出しており、我々は急性脊髄損傷モデルに対して、TNF antagonist (Etanercept®) を用いることで、急性期の過剰な炎症性サイトカインの発現を抑制し、neuron や oligodendrocyte の細胞死抑制や損傷後脊髄組織・運動機能改善に寄与する可能性のあることを報告している<sup>1)</sup>。

慢性脊髄圧迫の代表疾患である後縦靭帯骨化症の特定疾患医療受給者証交付件数(難病情報センター)は毎年増加しており、平成23年度では前年度からの増加数2396名、件数32043名となっており、今後も患者数の増加が予想される。後縦靭帯骨化症のような圧迫性髄症の患者においては、約6割に神経障害性疼痛の訴えがあり<sup>2)</sup>、諸家の報告をみても慢性圧迫脊髄症の治療は、疼痛管理の側面からも難渋することが多い。日常生活動作や健康寿命に多大な影響を及ぼす慢性脊髄圧迫に起因する疼痛や感覚障害においては、その病態を解明し、疼痛や感覚障害に対する治療を進展させることが切望されている。

急性脊髄損傷では、macrophage の動態や役割が注目されており、損傷脊髄の微小環境に影響をおよぼすと言われ<sup>3)4)</sup>、我々の先行研究でも神経損傷後の修復への関与していることを報告している<sup>5)</sup>。しかし、慢性圧迫脊髄における macrophage の動態はまだ明らかではない。我々の先行研究では、これまでに慢性圧迫脊髄における macrophage の M1, M2 subtype について評価・検討し、これらが組織障害やミエロパチーの病態に関与している可能性を報告している<sup>6)</sup>。

本研究では、それらの研究を踏まえて、慢性圧迫脊髄における activated microglia/ macrophage の血液脊髄関門を介した動態を

評価するために、GFP を発現する遺伝子改変マウス骨髄を twy マウスに移植し、脊髄圧迫部位での脊髄内での疼痛や感覚障害に起因すると考えられる種々の物質の発現変化、および脊髄を構成する細胞の変化について評価・検討する。

## 2. 研究の目的

慢性脊髄圧迫に起因する疼痛や感覚障害の病態について、MAPK の発現変化を免疫組織学的に捉え、更に圧迫脊髄内の活性型マイクログリア及びマクロファージの動態をキメラマウス(GFP を発現する遺伝子改変マウス骨髄を twy マウスに移植したモデル)を作成して評価する。上記の結果をまとめ、慢性圧迫脊髄に起因する疼痛が持続する病態を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物として、圧迫性頸髄モデルである twy/twy マウスを用いた。先行研究を参考にして、12週齢を軽度圧迫群、18週齢を中等度圧迫群、24週齢を高度圧迫群として経時的な圧迫程度を7T-MRI撮影で確認した。脊髄障害性疼痛発現の評価として、脊髄後角における substance-P、CREB および MAPK である p-38、ERK1/2 について免疫組織学的に検討した。CD11b (microglia/ macrophage) の脊髄圧迫部における発現変化を蛍光二重染色および flow cytometry で評価した。経時的な圧迫程度に応じた hematogenous macrophage の動態の評価として、EGFP マウス骨髄を尾静脈より移植した GFP chimeric twy mouse を作製した。更に、GFP 陽性細胞 (hematogenous macrophage) と MAPK との二重陽性細胞の定量的評価を行った。hematogenous macrophage の脊髄血液関門を介した動態の評価として PDGFR、occludin、ZO-1 で免疫組織化学的検討を行った。

#### 4. 研究成果

コントロール群および twy マウス 12 週齢では脊髄内に GFP 陽性細胞はほとんどなく、18 週齢および 24 週齢で脊髄内に GFP 陽性細胞の発現を認めた。microglia / macrophage のマーカーである CD11b 抗体と GFP との二重陽性細胞を定量化すると、圧迫に応じて CD11b/GFP 二重陽性の hematogenous macrophage の数および割合が増加していた。脊髄内に発現した GFP 陽性細胞をソーティングし、フローサイトメトリーを行うと、18 週齢よりも 24 週齢で GFP+/CD11b+/CD45+/GR-1- (macrophage) の細胞の割合が増加していた (図 1)。

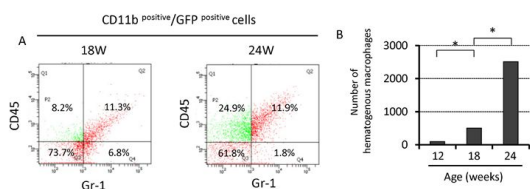


図1. hematogenous macrophages

twy マウス 12 週齢、18 週齢および 24 週齢の脊髄の Western blot を行うと、p-p38, p-ERK1/2 (MAPK) の発現が経時的に増加していた。GFP/ p-p38 二重陽性細胞、GFP/ p-ERK1/2 二重陽性細胞の割合も圧迫程度に応じて増加していた (図 2)。PDGFR-、Zo-1 および occludin を用いた評価では、18 週をピークに血管脊髄関門の破綻がみられた (図 3)。

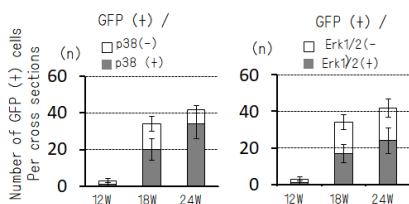


図2. MAPK / GFP 二重陽性細胞

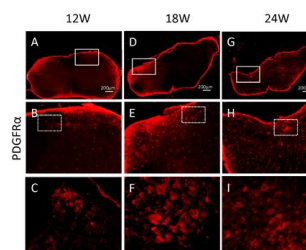


図3. 血液脊髄関門評価 (PDGFR $\alpha$ )

本研究の結果から、慢性圧迫脊髄においても圧迫程度に応じた血管脊髄関門の破綻・透過性の亢進が生じていることが示唆され、それにより脊髄内に遊走してきた hematogenous macrophage が脊髄障害性疼痛の病態のひとつとして働いている可能性が示唆された。

#### 【文献】

- 1) Watanabe S, Uchida K, Nakajima H et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. *Stem Cells* 33:1902-1914, 2015
- 2) Hirai T, Uchida K, Nakajima H et al. The prevalence and phenotype of activated microglia/macrophages within the spinal cord of the hyperostotic mouse (twy/twy) changes in response to chronic progressive spinal cord compression: implications for human cervical compressive myelopathy. *PLoS One* 8:e64528, 2013
- 3) Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, et al. Apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy): possible pathomechanism of human cervical compressive myelopathy. *Eur Spine J* 21:490-497, 2012
- 4) Glass CK, Saijo K, Winner B, et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934, 2010
- 5) Figley SA, Khosravi R, Fehlings MG et

al. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury. J Neurotrauma 3:541-52, 2014  
6) Ozawa H, Sato T, Kokubun S et al. Clinical significance of intramedullary Gd-DTPA enhancement in cervical myelopathy. Spinal Cord. 48(5):415-422, 2010

## 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 5件)

1) 竹浦直人, 中嶋秀明, 高橋藍, 本定和也, 坂本拓己, 小久保安朗

慢性脊髄圧迫における MRI 髄内輝度変化と血液脊髄関門の透過性変化

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

2016 年 10 月 14 日

福岡国際会議場

2) 竹浦直人, 中嶋秀明, 高橋藍, 本定和也, 内田研造

慢性脊髄圧迫モデルにおける血管脊髄関門機能変化と脊髄障害性疼痛発現

第 89 回日本整形外科学会学術総会

2016 年 05 月 12 日(木)

パシフィコ横浜

3) 竹浦直人, 中嶋秀明, 高橋藍, 本定和也, 坂本拓己, 杉田大輔

圧迫性頸髄症モデル(twy マウス)を用いた脊髄障害性疼痛に関する基礎的研究

第 126 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会

2016 年 04 月 08 日(金)

アクトシティ浜松

4) 竹浦直人, 中嶋秀明, 高橋藍, 渡邊修司, 本定和也, 北出誠, 杉田大輔, 内田研造

圧迫性頸髄症に伴う慢性疼痛における血液脊髄関門を介した macrophage の動態

第 8 回日本運動器疼痛学会

2015 年 12 月 12 日(土)

名古屋国際会議場

5) 竹浦直人, 中嶋秀明, 高橋藍, 本定和也, 内田研造

慢性脊髄圧迫に伴う疼痛に blood-spinal cord barrier の破綻が関与している

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会

2015 年 10 月 22 日(木)

富山国際会議場ほか

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

竹浦 直人 (TAKEURA Naoto)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号: 00615304

(2)研究分担者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA Hideaki)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号: 10397276

内田 研造 (UCHIDA Kenzo)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 60273009

(平成 27 年度まで)