

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19220

研究課題名(和文)コロニー刺激因子群による脊髄グリア細胞活性化機構と神経障害性疼痛誘発の多角的解析

研究課題名(英文)The role of colony-stimulating factors on microglial proliferation and neuropathic pain in rats

研究代表者

大久保 正道 (Okubo, Masamichi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70581495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経損傷により誘発される脊髄マイクログリアの増殖メカニズムを調べた。受傷1日後から損傷を受けた感覚ニューロンでマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)が増加した。M-CSF受容体は脊髄マイクログリアで恒常的な発現を認め、受傷2日後から有意に発現増加した。M-CSF受容体拮抗薬髄腔内投与は、末梢神経損傷により誘発される脊髄マイクログリアの増殖と神経障害性疼痛の発症を有意に抑制した。ナイスラット髄腔内へのリコンビナントM-CSFの投与は、内在性マイクログリアの増殖を誘発し足底の疼痛閾値を有意に低下させた。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression of mRNAs for macrophage-CSF (M-CSF), granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF), granulocyte-CSF (G-CSF) and IL-34 in the dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord after peripheral nerve injury in rats. RT-PCR and ISHH revealed that M-CSF and IL-34, but not GM- or G-CSF, mRNAs were constitutively expressed in the DRG, and M-CSF robustly increased in injured-DRG neurons. M-CSF receptor mRNA was expressed in naive rats and increased in spinal microglia following peripheral nerve injury. Intrathecal injection of M-CSF receptor inhibitor partially but significantly reversed the proliferation of spinal microglia and mechanical allodynia induced by peripheral nerve injury. Furthermore, intrathecal injection of recombinant M-CSF induced microglial proliferation and mechanical allodynia.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経障害性疼痛 末梢神経 損傷 マイクログリア 増殖 コロニー刺激因子 脊髄

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢神経を損傷すると脊髄に存在するマイクログリアは増加および活性化し疼痛誘発物質を産生・遊離する。これまで、マイクログリアから遊離された疼痛誘発物質により後角ニューロンの興奮性に変調が起き、神経障害性疼痛を誘発することは知られていた。

(2) 末梢神経を人為的に損傷させた神経障害性疼痛モデル動物(ラット、マウス)を用いた検討で、脊髄で起こるマイクログリアの増加は血管から流入したマクロファージの増加ではなく、脊髄内在性マイクログリアの増殖により数的増加が起きるとの報告がなされた。増殖を誘発する因子は損傷ニューロン由来であると予想されるが、その詳細は不明であった。

(3) 临床上、ヒトの神経に直接障害が及ぶ外傷の後、神経障害性疼痛が起きるかどうかは予測困難であり、治療はあくまでも神経障害性疼痛が生じてから開始されている。しかしながら、既存鎮痛薬に抵抗を示すことが多く、難治化する前に投薬を開始する予防的治療法の開発や神経障害性疼痛の発症メカニズムの解明が望まれる。

### 2. 研究の目的

末梢神経障害性疼痛モデルラットを用いて、脊髄後角でのマイクログリア増殖と神経障害性疼痛に対するコロニー刺激因子群(CSFs; Macrophage-CSF (M-CSF), Granulocyte Macrophage-CSF (GM-CSF), Granulocyte-CSF (G-CSF))およびインターロイキン 34 (IL-34)の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。実験方法の倫理的問題については予め具体的実験方法を兵庫医科大学動物実験委員会に提出して、その承諾を得た。また、米国 NIH による実験動物の取り扱いに関するガイドンスに基づき、使用動物の数とその苦痛が最小になるように努力した。

(2) 動物に対する手術操作はいずれもセボフルラン吸入による適切な麻酔深度で行った。神経障害性疼痛モデルには世界的に広く利用されている Spared nerve injury (SNI) モデルを用いた。作成方法の手順は以下の通りである。

- イ) 左大腿下外側部を1センチ程度切開し、坐骨神経が脛骨神経、総腓骨神経、腓腹神経に分岐する箇所を露出させる。
- ロ) 腓腹神経のみを温存し、残りの2分枝を結紮・切断する。
- ハ) その後、速やかに皮膚の縫合を行う。

(3) モデル動物の後根神経節(DRG)と脊髄のサンプル採取を行い、CSFs・IL-34の経時的な(ナイーブ、モデル作成1、2、3、7、14日後)発現動態を観察した。方法は conventional RT-PCR と放射性同位元素でラベルした RNA プローブを利用した in situ hybridization (ISH) 法を用いた。各遺伝子の PCR プライマーにより増幅されたフラグメントを用いて部分的 cDNA テンプレートを作成した。以下に各遺伝子の部分的 cDNA テンプレートの情報を記す。

Gene	Accession No.	Bases
M-CSF	NM023981	1731-2205
GM-CSF	XM_340799	42-426
G-CSF	NM_017104	628-1159
IL-34	BC098808	180-704
M-CSFR	NM_00102990	2571-3075
GAPDH	NM_017008	80-351

(4) 細胞マーカー(NeuN, Iba-1, GFAP)を用いた免疫組織化学二重標識法にて CSFs・IL-34・M-CSFR を発現する細胞腫(ニューロン、マイクログリア、アストロサイト)の同定を行った。またマイクログリアの増殖能および活性化を観察するために Ki67、p-p38 抗体をそれぞれ用いた。以下に使用した抗体情報を記す。

抗体	販売元
Anti-NeuN	millipore
Anti-GFAP	Calbiochem
Anti-Iba1	Wako
Anti-Ki67	Abcam
Anti-pp38	Cell Signaling

(5) (3)にて発現増加が認められた M-CSFR 拮抗薬を髄腔内投与して、末梢神経損傷によるマイクログリア増殖に与える影響と、機械的刺激に対する閾値を測定する Anesthesiometer を用いて、痛覚過敏を足底部で計測し、非投与群と比較した。

(6) ナイーブラットの髄腔内にリコンビナント M-CSF を投与して、マイクログリアの増殖動態と足底の疼痛閾値を測定した。

### 4. 研究成果

2年間にわたる研究により以下の成果を得た。

(1) M-CSF mRNA の発現は末梢神経損傷1日後に DRG で有意に増加した。その発現細胞は損傷した DRG ニューロンであった。一方、GM-, G-CSF mRNA の発現は検出感度以下であった。IL-34 は恒常的に DRG で発現が認められたが、モデルによる発現変化はなく、発現細胞もグリア細胞であった。これらの結果と CSF の機能的背景より、末梢神経損傷による脊髄マイクログリアの増殖に影響を与え得る損傷 DRG ニューロン由来の因子は M-CSF で

あることが明らかになった。

(2) 脊髄における M-CSFR mRNA の発現を検討した結果、マイクログリアに恒常的な発現を認め、末梢神経損傷後 2 日から損傷側にて有意な増加をみた。この実験結果から、損傷 DRG ニューロンで増加する M-CSF は、マイクログリアにて恒常的に発現する M-CSFR に受容され、増殖シグナルを誘導させていることが予測された。

(3) (2) の実験結果を裏付けるために、神経障害性疼痛モデルラットの髄空内へ M-CSFR 阻害薬を投与した。その結果、細胞分裂マーカー (Ki67) のマイクログリアでの発現誘導が有意に抑制されることが明らかとなり、M-CSF は末梢神経損傷によるマイクログリア増殖の重要な要因の一つであることが強く示唆された。

(4) 神経障害性疼痛モデルラットの髄空内へ M-CSFR 阻害薬を投与した結果、機械的刺激に対する痛覚過敏が有意に減弱した。このことは、M-CSF が損傷 DRG ニューロンから脊髄マイクログリアの増殖を誘発し、神経障害性疼痛を惹起させる因子であることを示唆した。

(5) (4) の実験結果を検証するために、ナীবラットの髄空内にリコンビナント M-CSF を投与したところ、マイクログリアは Ki67、p-p38 MAPK 共に陽性となり細胞分裂と活性化が誘発され、また行動実験から痛覚過敏が惹起される結果を得た。この結果より、M-CSF は脊髄内在性マイクログリアの増殖と活性化を誘発することが解明された。

本研究は、これまで不明であった末梢神経障害性疼痛を発症させる脊髄内在性マイクログリア増殖のカギとなる因子を損傷ニューロンに求め、造血系幹細胞増殖因子、M-CSF が損傷 DRG ニューロンで de novo な発現上昇をすることを発見した。この M-CSF はマイクログリア増殖と神経障害性疼痛誘発の極めて重要なとして重要な役割を果たしていることを明らかにしたと考えている。この研究成果は以下の英文雑誌に掲載された。

#### 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)

Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Noguchi K. Microglial TNF $\alpha$  Induces COX2 and PGI2 Synthase Expression in Spinal Endothelial Cells during Neuropathic Pain. eNeuro.

2017.4(2),e0064-17. 査読有

Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Kanda H, Yagi H, Noguchi K. Macrophage-colony stimulating factor derived from injured primary afferent induces proliferation of spinal microglia and neuropathic pain in rats. PLoS One. 12;11(4): e0153375. 2016. 査読有

[学会発表](計 7 件)

Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K. Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat spinal cord. The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2017) 2017.11.15 Washington DC.

山中 博樹, 小林 希実子, 大久保 正道, 野口 光一. 神経傷害性疼痛モデル動物の脊髄後角における損傷 C 線維の形態的可塑性. 第 39 回日本疼痛学会 2017.6.17 神戸

Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Kanda H, Yagi H, Noguchi K. Macrophage-colony stimulating factor derived from injured primary afferent induces proliferation of spinal microglia and neuropathic pain in rats. 16th World Congress on Pain. 2016.9.28 横浜

Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Noguchi K. Annexin A2 in primary afferents contributes to neuropathic pain associated with tissue type plasminogen activator. 16th World Congress on Pain 2016.9.28 横浜

Okutani H, Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Hirose M, Noguchi K. Expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 and its receptor in dorsal horn of neuropathic pain model rats. 16th World Congress on Pain 2016.9.28 横浜

小林 希実子, 神田 浩里, 山中 博樹, 大久保 正道, 野口 光一. 末梢神経損傷後のラット脊髄における PGE2 合成酵素と EP 受容体の発現変化. 第 39 回日本神経科学大会 2016.7.22 横浜  
奥谷 博愛, 小林 希実子, 山中 博樹, 大久保 正道, 廣瀬 宗孝, 野口 光一. 神経障害性疼痛モデルラットの脊髄後角における IL-4 および IL-4 受容体の発現変化. 第 38 回日本疼痛学会 2016.6.24 札幌

[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

大久保 正道 (Okubo, Masamichi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70581495

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )