

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06757

研究課題名(和文) ミクログリア制御による新規疼痛制御治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel pain therapeutics by microglia control

研究代表者

加納 史也 (Kano, Fumiya)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40801626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：「疼痛」は身体への侵襲や損傷を知らせる重要な感覚である。しかし損傷が修復しても遷延する「神経障害性疼痛」がある。そのメカニズムは神経損傷に伴う神経節内や脊髄内のミクログリアの炎症変性であることが知られている。研究代表者は神経障害性モデルマウスに抗炎症性M2ミクログリア誘導因子を投与することで、組織破壊的な炎症反応を抗炎症・組織再生型に転換し疼痛制御を促進することを見出した。また誘導されたM2ミクログリアの放出する細胞小胞体(エクソソーム)が周囲のSchwann細胞に取り込まれ炎症状態の制御や細胞死の抑制を行うことで疼痛制御を行っていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛の慢性化するメカニズムとして、神経細胞だけでなく、損傷した末梢神経に浸潤・集積するマクロファージと脊髄後角で活性化するミクログリアが重要な役割を担うことを示す基礎的論文が数多く蓄積されている。本研究はミクログリアやマクロファージの役割を深めることで、慢性疼痛のメカニズムの解明と治療薬の開発につながる重要な研究と考える。

研究成果の概要(英文)："Pain" is an important sense that informs the body of the invasion and damage, but there is "neuropathic pain" that persists even if the damage is repaired. It is known that the inflammation is degeneration of microglia. By applying anti-inflammatory M2 microglia-inducing factor to neuropathic model mice, the applicant transforms the tissue destructive inflammatory response into anti-inflammatory / tissue regeneration type. Was found to promote pain control. In addition, the induced endoplasmic reticulum (exosome) released by M2 microglia was taken into the surrounding Schwann cells to control pain by controlling the inflammatory state and suppressing cell death.

研究分野：再生医療

キーワード：神経障害性疼痛 ミクログリア エクソソーム MCP-1 Siglec マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- がん、糖尿病、帯状疱疹あるいは脳卒中などで神経に障害が起きると、「神経障害性疼痛」という慢性痛が発症する。過剰な疼痛の慢性化・難治化すると患者のQOLは極度に低下する。既存の非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬が奏効しがたいために、本邦では約2200万人以上の患者が苦しんでいるといわれている。効果的な新しい鎮痛薬の開発が求められている。

疼痛とミクログリアの極性

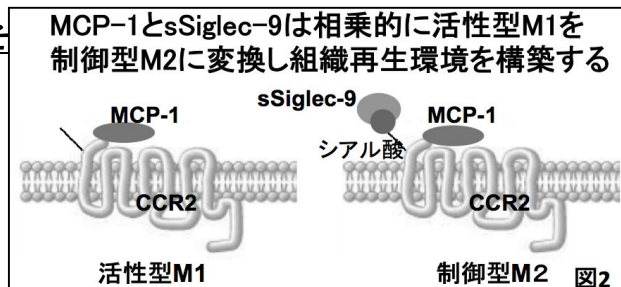
- 末梢神経を損傷させた神経障害性疼痛モデルや神経障害を伴う病態モデル(糖尿病、癌、脊髄損傷、帯状疱疹など)の脳・脊髄において活性型ミ



クログリア(活性型 M1)が集積する。M1 は TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生と放出により神経障害性疼痛に深く関わっている。抑制型ミクログリア(制御型 M2)は抗炎症性サイトカインの産生や組織再生環境の構築、線維化抑制などにより組織再生を促す(図1)。**神経損傷後に脳・脊髄を M2 優位な環境を構築出来れば、強力な鎮痛効果を得られる可能性が高いと考えられた。**

歯髄幹細胞の制御型 M2 誘導能

- 申請者らはヒト歯髄幹細胞とその無血清培養上清から新規 M2 誘導因子を同定した (Matsubara K, *J. NEUROSCI.* 2015)。これは MCP-1 と sSiglec-9)で構成される(図2)。



この複合タンパクを脊髄損傷、低酸素脳症、脳梗塞、アルツハイマーなどの動物モデルに投与すると神経機能が劇的に改善する (Kano F, *STEM CELLS* 2017)。その治療メカニズムは障害を受けた神経に集積した活性型 M1 を制御型 M2 へ変換することで組織環境を抗炎症型へ誘導し、神経機能を再生することであった。**神経障害性疼痛で発現する活性型 M1 を MCP-1/sSiglec-9 を用いて制御型 M2 へ誘導出来れば、強力な鎮痛効果を得られる可能性が高いと考えられた。**

2. 研究の目的

- 帯状疱疹関連疼痛への治療効果：MCP-1 / sSiglec-9 を帯状疱疹関連疼痛マウスモデルへ投与し治療効果を疼痛判定試験、組織、遺伝子発現評価を検討する。さらにその治癒メカニズムを *in vitro* 細胞培養系を用いて解析する。
- ミクログリアの制御型 M2 誘導メカニズム：LPS + IFN γ を用いて活性型 M1 を作製し MCP-1 / sSiglec-9 を投与し制御型 M2 を誘導する。誘導した制御型 M2 で発現する遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に調査し、誘導経路に関する転写因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 帯状疱疹関連疼痛マウスへの MCP-1/sSiglec-9 を投与し、治療有用性を検証する。

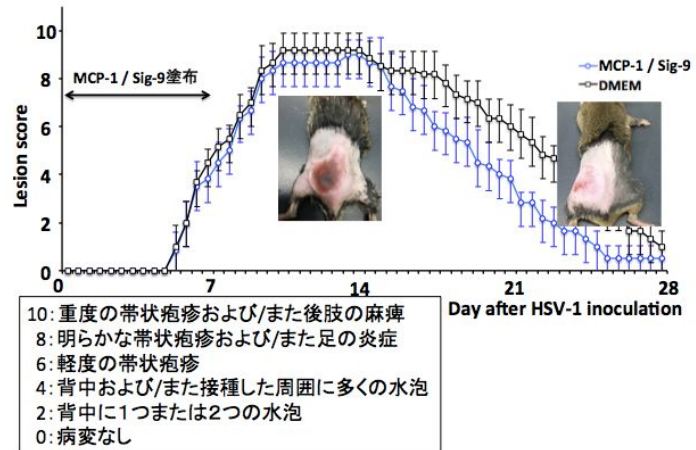
(2) 治療メカニズムの検討： MCP-1/sSiglec-9 投与による脊髄または神経節での組織損傷および神経変性について検証する。

(3) 治療メカニズムの検討：疼痛制御のメカニズムを組織学的解析にて評価する。またサイトカイン遺伝子の発現や各種免疫担当細胞の組織学的解析で評価する。

4. 研究成果

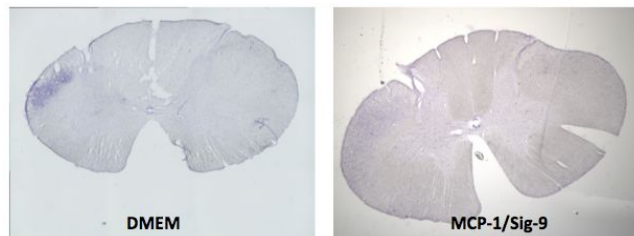
(1) MCP-1/sSiglec-9 による感染後の皮膚損傷の改善(下図)

ヘアレスマウス (HOS: HR-1, 7 射針で擦過し, HSV-1 ウイルス液を擦過部へ滴下し感染させる。偽感染群には HSV-1 ウイルス液の溶媒を滴下する。MCP-1/sSiglec-9 投与群では, 14 日目から皮膚の炎症・発赤の改善した。



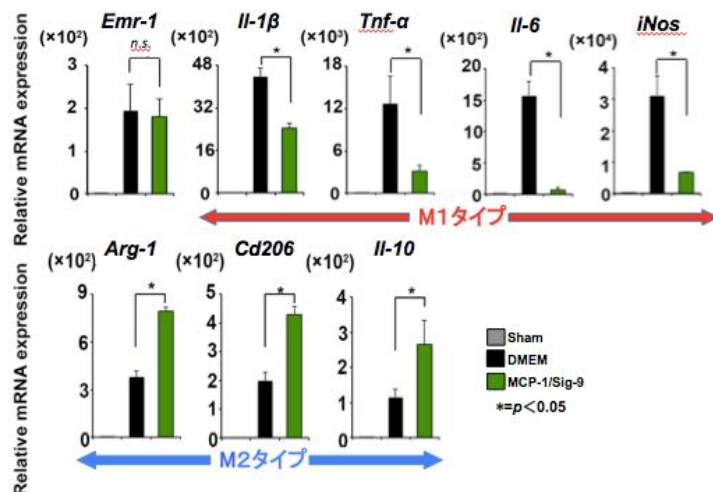
(2) 神経変性抑制効果

感染 7 日目の L5 レベルの脊髄の Nissle 染色を行った。DMEM 塗布群では、左側脊髄後根部の組織変性を認めた。MCP-1/sSiglec-9 投与群では DMEM 投与群と比較し、変性は軽度だった。



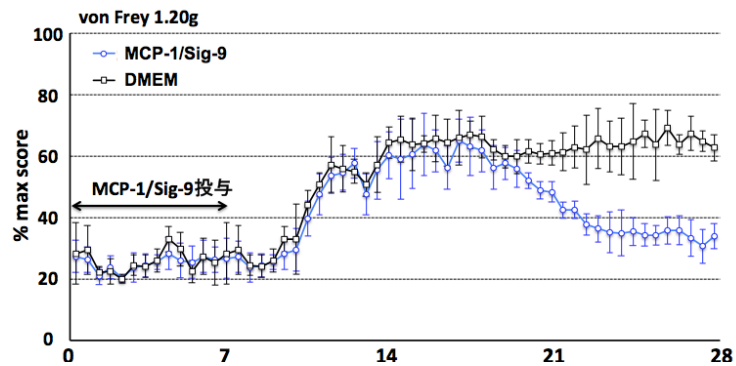
(3) 脊髄後根の遺伝子発現解析

感染 7 日目の L5 レベルの脊髄の real-timePCR を行った。MCP-1/sSiglec-9 投与群と DMEM 群はマクロファージ陽性マーカーの EMR-1 が上昇し、2 群に有意差を認めなかった。MCP-1/sSiglec-9 投与群で群と比較し M1 環境が抑制され、境が構築された。



(4) MCP-1/sSiglec-9 投与による疼痛スコアの改善

6回 von Frey 試験を行い、マウスの逃避行動の行った割合を平均した。MCP-1/Sig-9 投与群では18日目頃より改善した。DMEM 群では回復を認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Jun Ishikawa, Fumiya Kano, Yuji Ando, Hideharu Hibi, Akihito Yamamoto. Monocyte chemoattractant protein-1 and secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 enhance bone regeneration by inducing M2 macrophages. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 査読有, In Press, <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.12.007>

Fumiya Kano, Norihisa Ichimura, Yukiko Wakayama, Kazuto Okabe, Hiroki Sakakura, Hideharu Hibi. Third molar pericoronitis in neutropenia. *IDCASES*, 査読有, 2018;13:e00419. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2018.e00419>

市村典久, 山本憲幸, 西川雅也, 山口聡, 加納史也, 日比英晴. 顎下腺に発生したびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫を含む MALT リンパ腫の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌*, 64 (8):470-474.2018.

〔学会発表〕(計3件)

石川 純, 加納 史也, 竹内千明, 松下嘉泰, 渡邊和代, 日比英晴, 山本朗仁, M2 マクロファージ誘導因子 MCP-1/sSiglec-9 を用いた骨再生効果の検討, 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019

加納 史也, 山本 朗仁, 石川 純, 市村 典久, 日比 英晴, MCP-1 と sSiglec9 はマクロファージの極性変化を介して骨再生を促進する, 第 4 回日本骨免疫学会, 2018

加納 史也, 市村 典久, 坂口 晃平, 中道 瑛司, 山口 聡, 坂倉 寛紀, 歯髄幹細胞由来エクソソームの Schwann 細胞への影響, 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018

〔図書〕(計1件)

Ichimura Norihisa, Yamamoto Noriyuki, Nishikawa Masaya, Sakakura Hiroki, Kano Fumiya, Sato Kotaro, Yamaguchi Satoshi, Hibi Hibi. *Oral Science in Japan 2017*. Human papillomavirus related carcinogenesis in oral cancer. 83-84. 2018

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。