

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09059

研究課題名(和文) 脊髄障害性疼痛におけるCCL21および活性化ミクログリアの動態解析と治療開発

研究課題名(英文) Distribution of CCL21 and activated microglia in spinal cord-related pain

研究代表者

平井 貴之(Hirai, Takayuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：30569132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリア活性化やM1 type遊走を惹起するケモカインであるCCL21発現が欠損したマウス(plt マウス)の脊髄損傷モデルを用いた研究を行った。CCL21は、M2 typeの走化性に影響を与えず、M1タイプのみを誘導した。CCL21欠損により、損傷部でM1 typeの血行性マクロファージ/活性化ミクログリアの浸潤が減少し、M1 typeが発現する炎症性サイトカインの発現が減少した。損傷部の炎症の減弱が腰膨大部への炎症波及低下につながり、脊髄損傷後の神経障害性疼痛がpltマウスで減少した。CCL21が脊髄損傷後初期に疼痛を予防する薬物標的となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、CCL21が血行M1 typeの遊走を惹起し、ならびに損傷部の炎症反応の増加に重要な役割を果たしていることを示唆している。CCL21のこれらの効果は、負傷部位だけでなく、SCI高位以遠である腰膨大部に波及し、NePを誘発した可能性を示した。これらの結果は、CCL21がSCI後のNePに重要なサイトカインであり、SCI後のNePを緩和するための新しい治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CCL21 is a chemokine that activates microglia in the central nervous system. In this study we used an SCI model in mutant (plt) mice with deficient CCL21 expression.

SCI-induced hypersensitivities to mechanical and thermal stimulation were relieved in plt mice. In immunohistochemical analysis, the phenotype of microglia/macrophages was M1 type-dominant in both types of mice at the lesion site and lumbar enlargement. A decrease of M1-type microglia/macrophages was seen in plt mice, while the number of M2-type microglia/macrophages did not differ between these mice. In immunoblot analysis, expression of M1-induced cytokines was decreased in plt mice, while that of M2-induced cytokines did not differ in the two types of mice. The results indicate that suppression of expression of inflammatory cytokines by decreasing the number of M1-type microglia/macrophages at the injured site and lumbar enlargement is associated with provision of an environment for reduction of neuropathic pain.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：脊髄損傷 神経障害性疼痛 ミクログリア マクロファージ CCL21 pltマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷(SCI)は正常な運動や感覚の障害を引き起こし、SCI 後の 80%以上の患者が損傷部位高位以下の、通常痛みを起こさない触覚刺激が痛みを引き起こす allodynia などの神経障害性疼痛(NeP)を訴えると報告されている。しかし SCI 後の NeP の病態は複雑かつ難治性であり、治療法について未だ確立されていないのが現状である。病態の一因には活性化されたミクログリア/マクロファージから放出される神経興奮性のモジュレーターによって誘発される可能性がある。特に SCI 後の炎症反応では、ミクログリア/マクロファージは組織障害性の M1 type や組織修復性の M2 type といった様々な phenotype に分化し、その働きが関心を集めている。またケモカインは、ニューロンとミクログリアのコミュニケーションにおいても注目を集めている。CCL21 は、中枢神経系では損傷されたニューロンでのみ発現し、中枢神経系のミクログリアを活性化や、M1 type の遊走を惹起するケモカインである。過去の研究では、末梢神経損傷モデルの NeP と CCL21 の関連は報告されているが、SCI と M1/M2 type への働きを検討した報告はまだない。

2. 研究の目的

本研究は、CCL21 の役割を特定するために、CCL21 発現が欠損したマウス (paucity of lymph node T cell マウス: 以下 *plt* マウス) の脊髄損傷モデルを用いて、運動・疼痛関連評価を行い、M1/M2 type ミクログリア/マクロファージの動態及び炎症性サイトカインとの関連について脊髄損傷部、腰膨大部で評価を行うことを目的とした。

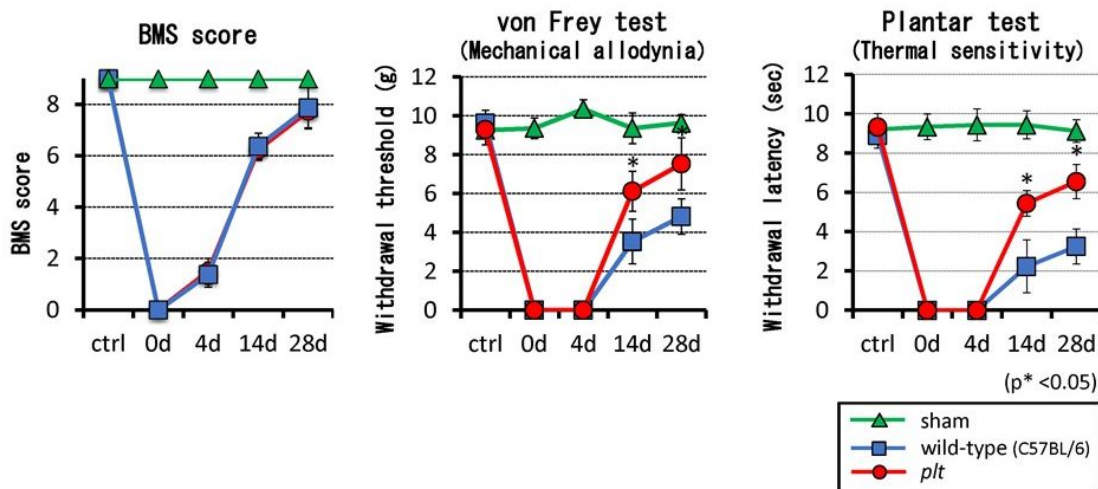
3. 研究の方法

脊髄損傷モデル: C57BL/6 マウス(以下 wild-type)、*plt* マウス(10-12 週齢)を麻酔下に T9-T10 level の椎弓切除を行い IH impactor を用いて 60Kdyn の胸髄圧挫損傷モデルを作成し、以下の項目の比較検討を行った。

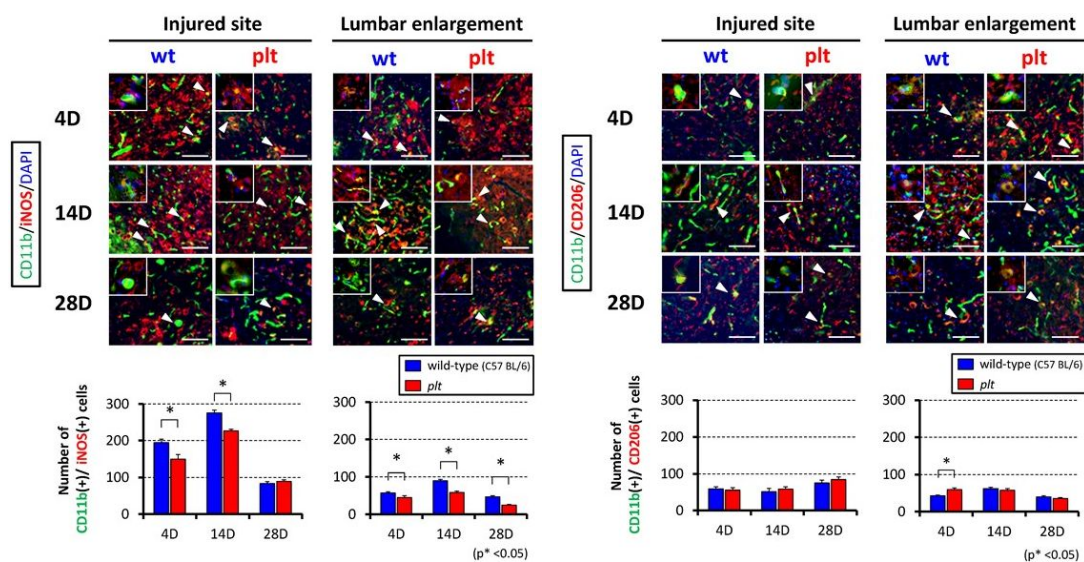
- (1) 損傷後 4 日、14 日、28 日目に行動学的評価として肢運動機能評価 (Basso Mouse Scale for Locomotion) を行い、NeP による疼痛関連評価として圧刺激を von Frey test, 熱刺激を Planter test を用いて評価した。
- (2) 損傷後 4 日、14 日、28 日目の T9-T10 高位の損傷部及び L3-L4 高位の腰膨大部の凍結切片を作成しミクログリア/マクロファージのマーカーとして CD11b、M1 マーカーとして iNOS、M2 マーカーとして CD206 を用いて免疫染色を行い merge 陽性細胞数の評価を行った。
- (3) 損傷後 4 日、14 日、28 日目の T9-T10 高位の損傷部及び L3-4 高位の腰膨大部の組織を採取し、Western blotting を用いて炎症性サイトカインとして TNF- α 、IFN- γ 、抗炎症性サイトカインとして IL-4、IL-10 を評価した。
- (4) 損傷後 4 日、14 日に T9-T10 高位の損傷部及び L3-4 高位の腰膨大部の組織を採取し、各部位の Flowcytometry を行なった。CD45⁺/CD11b⁺/GR-1⁻/iNOS⁺分画の細胞を血行性 M1 type(M1 type マクロファージ)とし、CD45⁺/CD11b⁺/GR-1⁺/iNOS⁺分画の細胞を常在性 M1 type(M1 type ミクログリア)とした。また、CD45⁺/CD11b⁺/GR-1⁻/CD206⁺分画は、血行性 M2 type(M2 type マクロファージ)、CD45⁺/CD11b⁺/GR-1⁺/CD206⁺分画は常在性 M2 type(M2 type ミクログリア)として解析を行なった。

4. 研究成果

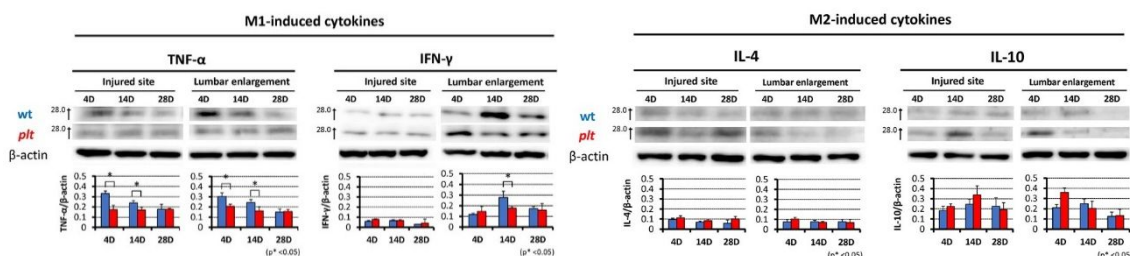
- (1) 行動学的評価: wild-type と *plt* マウスでは BMS には有意な差は認めなかった。疼痛関連評価の von Frey test、Planter test では対照的に *plt* マウスで有意な疼痛閾値の増加を認めた。



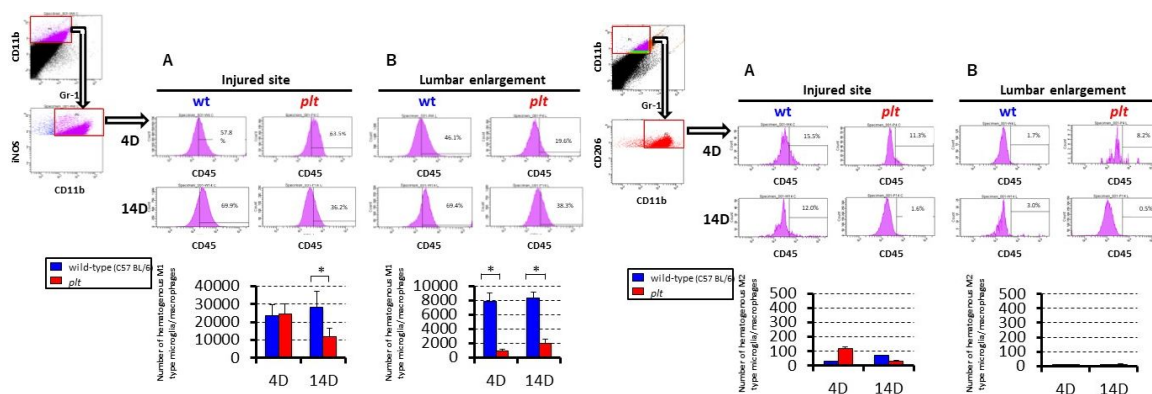
- (2) 免疫染色：損傷部位及び腰膨大部の CD11b⁺/iNOS⁺細胞 (M1 type) の数は、*plt* マウスで wild-type と比較し 4 日および 14 日目に細胞数の増加が有意に抑制されていた。損傷部位、腰膨大部で CD11b⁺/CD206⁺細胞 (M2 type) の数は、CD11b⁺/iNOS⁺細胞数よりも少なく、wild-type および *plt* マウスの差は認めなかった。



- (3) Western blotting: *plt* マウスでは、wild-type と比較して、損傷部位と腰膨大部で TNF- α の発現は、SCI 後 4 日、14 日で有意に減少していた。IFN- γ の発現は、損傷部位で差がなかったが、*plt* マウスの腰膨大部で 14 日目に有意な発現の低下を認めた。IL-4 と IL-10 の発現に両群で損傷部位と腰膨大部で有意な差は認めなかったが、*plt* マウスでわずかに増加していた。



- (4) flowcytometry: 損傷部位で、損傷後 4 日では両群に差を認めなかったが、14 日で *plt* マウスの血行性 M1 type が wild-type に比較し有意に減少していた。腰膨大部では、4 日、14 日目で、血行性 M1 type の数は wild-type よりも *plt* マウスで有意に少なかった。血行性 M2 type は両群共細胞数自体が非常に少なく、損傷部位と腰膨大部で両群に差は認めなかった。



末梢神経損傷後の NeP において、CCL21 は活性化型ミクログリアの P2X4 受容体の発現を誘導し、疼痛関連因子の放出につながると報告されている。また SCI 後は損傷脊髄のマクローファジは脊髄微小環境に基づいて M1/M2 に分化し、二次損傷の増悪から修復まで様々な働きをされるとされている。最近の報告は、CCL21 の受容体である CCR7 が M1 細胞で特異的に発現し、それら遊走を引き起こすことを示している。本研究で CCL21 は、M2 type の走化性に影響を与えることなく、M1 タイプのミクログリア/マクローファジの走化性のみを誘導した。このため、CCL21 の欠損により、*plt* マウスで SCI 後おける損傷部で M1 type の血行性マクローファジ/活

性化ミクログリアの浸潤が減少し、M1 type が発現する炎症性サイトカインの発現が減少したことを示唆している。損傷部の炎症の減弱は腰膨大部への炎症の波及低下にもつながり、そのため SCI 後の NeP が *plt* マウスで減少したと考察している。特に損傷早期においてこの変化が見られたため、CCL21 が SCI の損傷後の初期段階でより効果的に NeP を予防するための薬物標的となりうることを実験的に示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honjoh K, Nakajima H, Hirai T, Watanabe S, Matsumine A	4. 巻 13
2. 論文標題 Relationship of Inflammatory Cytokines From M1-Type Microglia/Macrophages at the Injured Site and Lumbar Enlargement With Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in the CCL21 Knockout (plt) Mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Hideaki, Honjoh Kazuya, Watanabe Shuji, Kubota Arisa, Matsumine Akihiko	4. 巻 737
2. 論文標題 Distribution and polarization of microglia and macrophages at injured sites and the lumbar enlargement after spinal cord injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135152 ~ 135152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Matsumine A
2. 発表標題 Neuropathic pain after spinal cord injury relieves in CCL21 knockout (plt) mouse through decreasing of M1 type microglia/macrophage and inflammatory cytokines at the injured site and lumbar enlargement
3. 学会等名 Cervical Spine Research Society European Section Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本定和也、中嶋秀明、高橋藍、山本悠介、出淵雄哉、松峯昭彦
2. 発表標題 CCL21欠損マウス脊髄損傷モデルにおけるbelow-levelの疼痛と炎症性サイトカインによるmicroglia/macrophage phenotypeの変化
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本定和也、中嶋秀明、高橋藍、山本悠介、出淵雄哉、松峯昭彦
2. 発表標題 CCL21欠損マウス脊髄損傷モデルにおける損傷部・腰膨大部の炎症性サイトカインによるM1/M2 phenotypeの変化
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田 有咲、中嶋 秀明、渡邊 修司、本定 和也、松峯 昭彦
2. 発表標題 脊髄損傷後の損傷部および腰膨大部におけるactivated microgliaおよびhematogenous macrophageの動態と極性
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中嶋 秀明 (Nakajima Hideaki) (10397276)	福井大学・学術研究院医学系部門・講師 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------