

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890265

研究課題名（和文）IL-18 を介したミクログリア-アストロサイト相互作用と神経因性疼痛

研究課題名（英文）IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury

研究代表者

三好 歆 (MIYOSHI KAN)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30454755

研究成果の概要（和文）：末梢神経障害モデル動物において脊髄における IL-18 の著明な発現増強が引き起こされ、疼痛発現機構に関与していることを明らかにした。その詳細な結果としては、脊髄マクログリアにおいて神経障害後 3 日目をピークとした IL-18 の発現増強が確認され、IL-18 に対する中和抗体を髄腔内に持続的に処置することによって疼痛発現が抑制され、さらには脊髄アストロサイトの活性化も抑制された。一方、IL-18 リコンビナントプロテインを髄腔内に処置する事によって持続的な痛覚過敏状態が確認され、さらに脊髄アストロサイトの活性化が確認された。これらのことから、神経障害時においては脊髄マクログリアにおいて IL-18 の発現増強が引き起こされ、脊髄グリア細胞間における相互作用を引き起こすことで痛覚過敏を引き起こしていることを明らかにした。さらに、IL-18 の内因性捕捉タンパク質である IL-18 binding protein (IL-18 bp) を髄腔内に持続的に処置することによって、痛覚過敏の抑制効果が認められた。このことは、IL-18 bp の治療薬としての可能性を示唆したものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nerve injury induced a striking increase in IL-18 expression in the dorsal horn, and IL-18 was upregulated in hyperactive microglia. The functional inhibition of IL-18 signaling pathways suppressed injury-induced tactile allodynia and the induction of astroglial markers. Conversely, intrathecal injection of IL-18 induced behavioral, morphological, and biochemical changes similar to those observed after nerve injury. Our results indicate that IL-18-mediated microglia/astrocyte interactions in the spinal cord have a substantial role in the generation of tactile allodynia. Thus, blocking IL-18 signaling in glial cells might provide a fruitful strategy for treating neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：神経解剖学 ペインリサーチ

科研費の分科・細目：医歯薬学・解剖学一般

キーワード：IL-18, microglia, neuropathic pain, spinal cord, astrocytes, glial interaction

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛をはじめとする難治性疼痛は発症の仕組みがわかっておらず、NSAIDs（非ステロイド系抗炎症薬）やモルヒネが効かない場合は治療法がないため、患者や周囲の人たちの心身への負担は重い。神経因性疼痛は末梢神経あるいは中枢神経の損傷によるものが多く、例えば、手術の後遺症（術後痛）、がん、脊髄損傷、帯状疱疹、糖尿病性神経炎、および三叉神経痛などによって引き起こされる。自発痛や痛覚過敏があり、さらに通常では痛みを感じない、例えば空調機器からの空気が当たる、肌着が触れるといった弱い刺激でも激痛を訴える異痛症（アロディニア）に悩まされることもある。

ミクログリアは存在こそ知られていたものの、その本態、機能は曖昧であった。ここ20年で急速に研究が進み、グリア細胞が神経活動の調節にも積極的に関わっていることが示され、生体内でも様々な生理的役割あるいは疾患への関与が注目されている。実際に、神経因性疼痛モデルラットでは脊髄後角のミクログリアにおいて細胞体の肥大化、突起の退縮、および細胞増殖など、活性化の典型的な形態変化が認められる。この活性化型ミクログリアにおけるP2X₄受容体を介して、神経因性疼痛の発症維持に重要な役割を果たしていると考えられている。その後、P2X₄受容体の他に、ケモカイン受容体のCCR2やCX₃CR1、そしてTLR4などが、神経因性疼痛に重要なミクログリア分子として報告され、神経因性疼痛に対する脊髄ミクログリアの重要性が注目を集めている。

アストロサイトもミクログリア同様、ここ20年で急速に研究が進んできた。実際に、神経因性疼痛モデルラットでは脊髄におけるアストロサイトの増殖などが認められる。また、これまでの知見から神経因性疼痛発現初期段階においてはミクログリアが重要な役割を果たし、それに伴ったアストロサイトの活性化が神経因性疼痛維持に重要である可能性が考えられている。実際、ミクログリア活性化阻害剤ミノサイクリンは、神経因性疼痛形成前に投与すると疼痛形成を抑制するが、

神経因性疼痛形成後に投与しても疼痛を抑制しないことが報告されている。さらに、アストロサイトを含むグリア細胞の機能調節薬であるプロペントフィリンは、神経因性疼痛形成後に投与しても疼痛発現を抑制する。これらの知見から、神経因性疼痛発現の初期におけるミクログリアがアストロサイトの活性化に何らかの影響を及ぼし、神経因性疼痛の発症維持に重要な役割を果たしていることが予想される。

2. 研究の目的

近年、グリア細胞が炎症性サイトカインなどを遊離することにより、神経因性疼痛発現に関与するという報告が増加してきており、神経免疫と痛みという分野が注目されている。この炎症性サイトカインのうち、IL-18は最初interferon-gamma inducing factorとして報告され、その後もTh2サイトカイン産生やFasリガンドの誘導など、様々な生物学的活性を持つことが報告され、現在注目を集めている炎症性サイトカインのひとつである。しかしながら、脊髄後角を含めた中枢神経系における痛覚伝達機構への関与はまったく報告されておらず未だ不明のままである。一方、これまでにグリア-ニューロン間での相互作用に関する報告は散見されるものの、神経因性疼痛発現におけるミクログリアとアストロサイトとの相互作用についての報告は皆無である。今回の申請では神経因性疼痛モデルの脊髄における、IL-18を介したミクログリア-アストロサイト相互作用に着目し、シグナル伝達分子の活性化とグリア細胞自身の形態変化あるいはグリア細胞における遺伝子発現の変化、さらには神経因性疼痛との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 疼痛関連動作 (heat/cold hyperalgesia, mechanical allodynia) の確認

SD雄性ラットを用いて代表的な神経因性疼痛モデルであるBennettモデル (chronic constriction injury: CCI)、およびChungモデル (spinal nerve ligation: SNL)、さらに末梢炎症性疼痛モデルであるcomplete

Freund's adjuvant (CFA) モデルを作製し、疼痛関連動作 (thermal hyperalgesia、mechanical allodynia) を経時的に観察、確認した。CFAは神経因性疼痛モデルの対照として使用した。

(2) 脊髄後角、およびDRGにおけるIL-18、IL-18Rおよび炎症性サイトカインの増減の定量化

術後 1、3、7、14、21 日目に L5 レベルの脊髄後角と L4/5DRG を摘出し、IL-18 および IL-18R に対する polyclonal 抗体を用いた免疫組織化学、および Western blotting を施行し、定量化を行った。また、IL-18 および IL-18R がニューロンで増加しているのか、グリアで増加しているのかをニューロンのマーカーである MAP2、NeuN、ミクログリアのマーカーである Iba1、OX42、およびアストロサイトのマーカーである GFAP を用いてそれぞれ同定した。DRG ニューロンの場合にはさらに NF200 との二重染色を行うことで有髄線維を有する大型ニューロンか、あるいは無髄線維を有する小型ニューロンかを決定した。DRG グリアの場合には GFAP との二重染色を行うことで衛星細胞での発現変化を確認した。

(3) IL-18 および IL-18R に対する中和抗体の髄腔内投与

IL-18 および IL-18R に対する中和抗体を、osmotic ポンプを用いて持続的に髄腔内投与し、疼痛関連動作 (thermal hyperalgesia、mechanical allodynia、cold allodynia/hyperalgesia) を抑制、あるいは増悪させるかを行動学的に評価、観察した。また、IL-18 を捕捉する事により IL-18 の機能発現を抑制する内因性タンパク質として IL-18 binding protein (IL-18BP) が知られており、米国において臨床治験が進んでいる。そこで、今後の臨床応用を考慮し、IL-18BP リコンビナントプロテインを osmotic ポンプにより持続的に髄腔内投与し、疼痛関連動作に対する影響を行動学的に検討した。また IL-18 に対する中和抗体も同様に髄腔内投与し、疼痛関連動作とサイトカイン発現変化との関連を明らかにした。

(4) IL18上流分子の決定

IL-18を増加すると予想される因子 (TLR4のアゴニストであるLPS、サイトカイン、あるいはケモカインなど) をナイーブのラットに髄腔内投与することで、実際に脊髄後角やDRGにおいてIL-18の発現増加、さらにはその下流分子の発現増加が生じるかどうか

かを免疫組織化学、Western、RT-PCR法、および *in situ* hybridization法により決定した。

(5) IL-18下流分子の決定

IL-18およびIL-18Rに対する中和抗体またはIL-18BPの髄腔内投与によって減少、あるいは増加する分子を免疫組織化学、Western blot 法、RT-PCR 法、および *in situ* hybridization法により探索した。

(6) IL-18を介したミクログリアアストロサイト相互作用の解明

ミクログリアは様々なサイトカインおよび栄養因子を産生・放出することでアストロサイトに影響を及ぼしていると考えられているが、その調節因子は全く不明である。そこで、ラット由来IL-18リコンビナントプロテインをナイーブのラットに髄腔内投与することでアストロサイトの機能および形態変化が生じるかどうかについて免疫組織化学、Western blot法、RT-PCR法、および *in situ* hybridization法により検討した。

4. 研究成果

Interleukin-18 (IL-18) は様々な生物学的活性を持つことが報告され、現在注目を集めている炎症性サイトカインのひとつである。この IL-18 は、神経因性疼痛下では脊髄ミクログリアにおいて発現増加が引き起こされ、その受容体である IL-18 受容体はアストロサイトにおいて発現増加が引き起こされていることを明らかにした。このことから、神経因性疼痛下において脊髄ミクログリアからの IL-18 の遊離増加が、脊髄アストロサイトの活性化を引き起こすことにより疼痛発現に関与していることが推察された。実際、髄腔内に IL-18、および IL-18 受容体に対する中和抗体を持続的に処置することにより神経因性疼痛発現が抑制された。このことから脊髄における IL-18 を介したグリア間相互作用が神経因性疼痛発現に関与していることが明らかとなった。一方、この IL-18 の発現誘導に関与する因子についても検討したところ、toll-like receptor (TLR) のうち TLR4 のアゴニストである lipopolysaccharide (LPS) を髄腔内に投与することにより IL-18 が誘導され、神経因性疼痛モデルラットに、TLR4 に対する

siRNA を処置することにより IL-18 の発現増加が抑制された。これらのことから、神経因性疼痛下においては脊髄マイクログリアにおける TLR4 の活性化に伴った IL-18 の発現増加が引き起こされ、脊髄アストロサイトにおいて発現増加した IL-18 受容体に作用する事で疼痛発現に関与していることが明らかになった。これら、グリア細胞を介した疼痛発現機序の研究成果は、J. Neurosci.、Glia、J. Neurochem. 等の国際紙に発表した。

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 6 件)

- ①. Kondo T, Obata K, Miyoshi, K., Sakurai J, Tanaka J, Miwa H, Noguchi K. Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. Gut 2009; 58:1342-52. 査読有
- ②. Miyoshi, K., Obata, K., Kondo, T., Okamura, H. and Noguchi, K. (2008) Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. J. Neurosci., 28, 12775-12787. 査読有
- ③. Nemoto, T., Fujii, H., Narita, M., Miyoshi, K., Nakamura, A., Suzuki, T. and Nagase, H. (2008) Synthesis of a novel 6,14-epoxymorphinan derivative and its pharmacology. Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 6398-6401. 査読有
- ④. Nakamura, A., Narita, M., Miyoshi, K., Shindo, K., Okutsu, D., Suzuki, M., Higashiyama, K. and Suzuki, T. (2008) Changes in the rewarding effects induced by tramadol and its active metabolite M1 after sciatic nerve injury in mice. Psychopharmacology, 200, 307-316. 査読有
- ⑤. Nemoto, T., Fujii, H., Narita, M., Miyoshi, K., Nakamura, A., Suzuki, T. and Nagase, H. (2008) Syntheses of 4,6'-epoxymorphinan derivatives and their pharmacologies. Bioorg. Med. Chem., 16, 4304-4312. 査読有
- ⑥. Narita, M., Nakamura, A., Ozaki, M., Imai, S., Miyoshi, K., Suzuki, M. and Suzuki, T. (2008) Comparative pharmacological profiles of morphine and oxycodone under a neuropathic pain-like state in mice: evidence for less sensitivity to morphine. Neuropsychopharmacology, 33, 1097-1112. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ①. 三好 歓, 野口 光一. 脊髄マイクログリアにおける caspase-1 の発現増加とアロディニア. 第 83 回日本薬理学会年会 2010. 3. 16, 大阪
- ②. 三好 歓, 野口 光一. 脊髄マイクログリアにおける caspase-1 の発現増加は炎症性サイトカインの活性化を介して神経障害性疼痛の発症に関与する. 第 2 回日本運動器疼痛研究会 2009. 11. 7, 東京
- ③. Miyoshi, K., Obata K, Noguchi K. Interleukin-1 β converting enzyme (ICE) upregulation in spinal glial cells contributes to tactile allodynia after nerve injury. The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) 2009. 10. 20, Chicago, U. S. A.
- ④. 小畑 浩一, 三好 歓, 野口 光一. 脊髄マイクログリア細胞における caspase-1/IL-18 シグナリングと神経障害性疼痛. 第 11 回 ORIGIN 夏の神経科学ワークショップ 2009. 8. 29-30, 長野
- ⑤. 三好 歓, 小畑 浩一, 野口 光一. 脊髄マイクログリアにおける interleukin-1 β converting enzyme (ICE) の発現増加とアロディニア. 第 31 回日本疼痛学会 2009. 7. 17-18, 名古屋
- ⑥. 小畑 浩一, 三好 歓, 野口 光一. 非傷害一次知覚ニューロンにおける R E T シグナリング増強と神経因性疼痛. 第 31 回日本疼痛学会 2009. 7. 17-18, 名古屋
- ⑦. 三好 歓, 小畑 浩一, 野口 光一. 脊髄マイクログリアにおける I C E の発現増加とアロディニア. 第 7 回整形外科痛みを語る会 2009. 7. 4-5, 福岡
- ⑧. Miyoshi, K., Obata, K. and Noguchi, K. (2008) IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11. 15-19, Washington D. C., U. S. A.
- ⑨. Kondo, T., Obata, K., Miyoshi, K., Sakurai, J., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) TRPA1 mediates gastric distension-induced visceral pain in rats. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11. 15-19, Washington D. C., U. S. A.
- ⑩. 三好 歓 (2008) IL-18 を介した脊髄後角におけるマイクログリア・アストロサイト相互作用と神経因性疼痛. 第 10 回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ, 9. 5-6, 宮崎.

- ⑪. 三好 歆, 小畑浩一, 野口光一 (2008)
脊髄マイクログリアにおける I L-1 8
の発現増加とアロディニア. 第 30 回日
本疼痛学会, 7.19-20, 福岡. (Pain
Research, 23, 96, 2008)
- ⑫. 三好 歆, 小畑浩一, 野口光一 (2008)
I L-1 8 を介した脊髄後角におけるマ
イクログリア・アストロサイト相互作用
と神経因性疼痛. 第 31 回日本神経科
学大会, 7.9-11, 東京. (Neurosci.
Res., 61(Suppl.1), S132, 2008.)
- ⑬. 小畑浩一, 三好 歆, 野口光一 (2008)
神経因性疼痛における脊髄グリア細胞
の役割. 第 6 回整形外科痛みを語る会,
7.5-6, 新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 歆 (MIYOSHI KAN)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30454755