

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07291

研究課題名(和文) 前帯状皮質ミクログリアに着目した慢性疼痛の病態解明と新規創薬ターゲットの探索

研究課題名(英文) The role of anterior cingulate cortical microglia in pathophysiology of neuropathic pain and novel drug targets

研究代表者

中島 一恵(久岡一恵)(Hisaka-Nakashima, Kazue)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：20393431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性疼痛患者と神経障害性疼痛モデルマウスで共通に見られる脳ミクログリア活性化に着目して、神経障害性疼痛の情動系と感覚系の機能異常に対する役割について神経障害性疼痛モデルマウスを用いて明らかにすることを端緒にして、慢性疼痛時の病態メカニズムに関わる脳内分子基盤を解明することを目的として研究を行った。神経障害性疼痛モデルマウスにおいてhigh mobility group box-1 (HMGB1) が脳ミクログリアの活性化に関与する可能性を明らかにした。さらに、活性化したミクログリアが神経細胞の可塑的变化を誘導し、認知機能などの情動面に影響を及ぼすことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛が如何にして脳ミクログリアを活性化するのは、これまで全く不明であったが、本研究はミクログリア活性化に対するHMGB1の関与を明らかにした。これらの独自の知見を切り口として、慢性疼痛時に活性化する脳ミクログリアの機能と役割について見出すことが出来れば、鎮痛薬の創薬ターゲットとしてのミクログリアの新たな可能性を創造することができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we are intended to elucidate the role of microglia in pathophysiology of neuropathic pain by using partial sciatic nerve ligation (PSNL) model mice. Inhibition of microglia activation by minocycline, local hippocampal microglia depletion with clodronate liposome, or inhibition of high mobility group box-1 (HMGB1) by GZA and anti-HMGB1 antibody blocked cognitive impairment induced by PSNL. Cognitive impairment could be due to degenerative changes in contralateral hippocampal neurons, as observed in PSNL mice. Treatment with anti-HMGB1 antibody blocked PSNL-induced degenerative effects observed in hippocampal neurons. Thus, HMGB1-mediated microglial activation and changes neuronal plasticity could be related to cognitive impairment associated with neuropathic pain.

研究分野：薬理学

キーワード：ミクログリア 神経障害性疼痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では約 2300 万人(およそ 5 人に 1 人)が慢性疼痛に罹患しているが、オピオイドや NSAIDs などの既存の鎮痛薬が効かないため、より有効で安全な鎮痛薬が求められている。慢性疼痛の発症メカニズムは単一のものではなく、複数のメカニズムが混在しているため、慢性疼痛の新たな病因を解明し、病態メカニズムに基づいた新薬の開発が急務である。

これまで、慢性疼痛の病態研究は皮膚などの末梢部分や痛みを脳に伝える一次知覚神経と脊髄が主な対象であった。しかし、事故などで外傷を負った後、怪我をした部分が治癒したにもかかわらず長期間にわたり痛みが持続すること、慢性疼痛により感覚系のみならず情動系の機能障害も生じることから、持続する疼痛により生じる脳機能変化が慢性疼痛の責任病態生理であると考えられる。実際に我々の慢性疼痛モデル動物を用いた研究からも疼痛の慢性化に伴い病変が末梢神経・脊髄から脳へ移行する知見が得られており、脳機能変化が慢性疼痛の原因である可能性が高い。

近年、ポジトロン断層法 (PET) を用いた生体脳画像研究から、活性化ミクログリアを認識する特異的リガンドの結合能が、健常者と比較して慢性疼痛患者の前帯状皮質をはじめとする複数の脳領域で増加していることが報告された (Loggia ML, 2015)。脳ミクログリアは様々な脳機能に関与しており、その活性化は脳内の恒常性を破綻させ、中枢神経疾患発症に関与することが知られている。前帯状皮質は末梢からの痛み刺激が伝達される脳領域であり、前述にもある通り、慢性疼痛の感覚系と情動系の機能制御に重要であることから (Xiao X, 2018)、前帯状皮質ミクログリア活性化に伴う脳機能変化が、慢性疼痛の感覚系と情動系の機能異常に関わる病態メカニズムの一部として考えられる。我々は慢性疼痛の一種である神経障害性疼痛モデル動物を用いて、疼痛の長期化により感覚系だけでなく情動系の機能異常も発症すること、それに伴い前帯状皮質ミクログリアが小さな細胞体で細かい突起が多いラミファイド型 (正常) から大きな細胞体で突起の短いアメポイド型 (活性化) に形態変化することを見出ししている。しかしながら、どのようにミクログリアの形質が変化して正常型から活性化型へと機能が変化しているのか、ミクログリアの活性化により生じる炎症が慢性疼痛の情動系と感覚系の機能異常に対してどのように関与するのかは不明なため、これらを本研究の学術的「問い」として設定し研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では慢性疼痛患者と神経障害性疼痛モデルマウスで共通に見られる前帯状皮質ミクログリア活性化に着目して、情動系と感覚系の機能異常に対する役割についてモデル動物を用いて明らかにすることを端緒にして、慢性疼痛時の病態メカニズムに関わる脳内分子基盤を解明することを目的として行った。

### 3. 研究の方法

・神経障害性疼痛モデルマウス：全身麻酔下で ddY 系雄性マウス (5 週齢) 左足坐骨神経を部分結紮し神経障害性疼痛モデルマウス (partial sciatic nerve ligation: PSNL 群) を作製した。対照群は坐骨神経を露出させたのみのマウス (Sham 群) を用いた。(動物実験許可番号: A20-163)

・行動薬理的解析：情動系機能は強制水泳テスト、社会的相互作用テスト、新規環境下食餌行動抑制テストを用いて不安・うつ様行動を評価し、新奇物体探索試験、Y-迷路試験で認知機能を評価した。感覚系機能は von Frey テストを用いて疼痛閾値を測定し、アロディニア (異痛症) を評価した。

・生体ミクログリア：マウス海馬組織または前帯状皮質組織から FACS システムで生体ミクログリアを単離した。

・初代培養ミクログリア：Wistar 系ラット新生仔から定法に従い作製した。

・免疫染色：マウスの脳を 4%パラホルムアルデヒドにより固定した後に凍結し、クリオスタットを用いて切片を作製した。抗 ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) 抗体によりミクログリアを染色し、蛍光顕微鏡を用いて得られた画像に対して解析ソフト (BZ-X Analyzer) にて輝度解析を行った。

・ゴルジ染色：マウスの脳を FD Rapid GolgiStain™ Kit を用いて Golgi-Cox 染色法を行った。顕微鏡により海馬 CA1 領域における神経細胞を撮影した。得られた画像から各マウスにつき 6 つの神経細胞をランダムに選択して分析し、平均値を測定した。ImageJ を用いて神経細胞の樹状突起の長さと同数数を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛モデルマウス脳において、前帯状皮質だけでなく島皮質、海馬、嗅周皮質、扁桃体においてもミクログリアの活性化を確認した。そこで、本研究では前帯状皮質だけでなく、その他の脳領域 (特に海馬) にも着目して研究を行った。

(2) 神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、術後 8 週で認められる前帯状皮質ミクログリアの

活性化には炎症反応を惹起する damage-associated molecular patterns (DAMPs)の一種である high mobility group box-1 (HMGB1)が関与することが示された。

(3) 神経障害性疼痛モデルマウスにおいて認められる前帯状皮質ミクログリアの活性化に伴う慢性炎症が術後 8 週で生じる不安うつ様行動に關与する可能性が示唆された。

(4) 術後 2 週の神経障害性疼痛モデルマウス海馬組織において、核分画中の HMGB1 が減少していたことから HMGB1 が核から細胞質へ移行し、細胞外へ放出される可能性が示唆された。

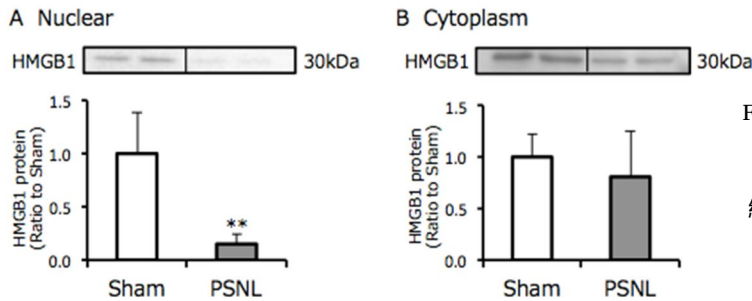


Fig. 1 神経障害性疼痛モデルマウスの術後 2 週目の海馬における核画分 (A) 及び細胞質画分(B) における HMGB1 量の変化

(5) 神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、HMGB1 による海馬ミクログリアの活性化は、術後 2 週で認められる疼痛閾値の低下には関与が認められなかったが、認知機能障害に關与する可能性が HMGB1 中和抗体を用いた検討から示唆された。

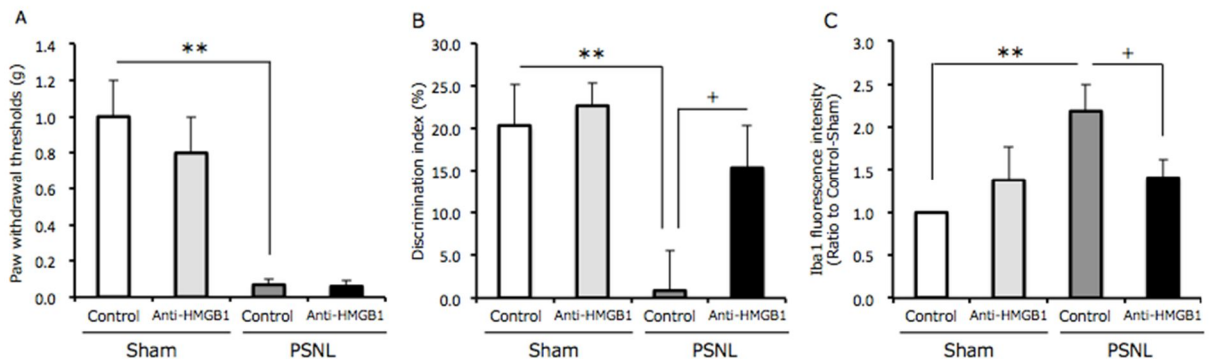


Fig.2 HMGB1 中和抗体経鼻投与が神経障害性疼痛モデルマウスの術後 2 週目における疼痛閾値 (A)、認知機能 (B)、海馬ミクログリアの活性 (C)に及ぼす影響

(6) 神経障害性疼痛モデルマウスの術後 2 週における認知機能低下に対して、海馬ミクログリアの活性化に伴う海馬神経細胞の形態変化(突起短縮とスパイン密度低下)が關与する可能性が示唆された。

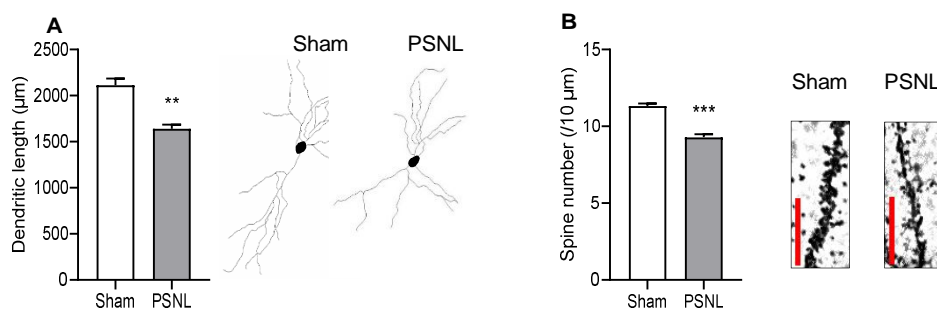


Fig. 3 神経障害性疼痛モデルマウスの術後 2 週目の海馬における神経突起の長さ(A) 及びスパイン密度 (B)

(7) 術後 2 週の神経障害性疼痛モデルマウス海馬において、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA2 の低下を確認したことから、グルタミン酸神経伝達に異常が生じている可能性が示唆された。

(8) 術後 8 週の神経障害性疼痛モデルマウス海馬において、ミトコンドリア機能障害とミトコンドリア由来 DAMPs の発現変化を確認した。

(9) 神経障害性疼痛モデルマウス海馬におけるミトコンドリア機能障害が術後 8 週で認められる不安うつ様行動に關与する可能性が示唆された。

(10) マウス海馬組織から FACS システムを用いて生体ミクログリアを単離することが可能となった。今後は実験条件をさらに検討して、成体ミクログリアの回収率を上げて解析を行う予定である。

(11) 初代培養ミクログリアを用いた検討から、ストレスホルモンであるグルココルチコイドがグルココルチコイド受容体を介して HMGB1 の核から細胞質への移行を誘導し、細胞外への放出を促進していることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hisaoka-Nakashima Kazue, Moriwaki Kodai, Yoshimoto Natsuki, Yoshii Toshiki, Nakamura Yoki, Ago Yukio, Morioka Norimitsu	4. 巻 112
2. 論文標題 Anti-interleukin-6 receptor antibody improves allodynia and cognitive impairment in mice with neuropathic pain following partial sciatic nerve ligation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 109219 ~ 109219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2022.109219	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 -
1. 著者名 Hisaoka-Nakashima Kazue, Ohata Kazuto, Yoshimoto Natsuki, Tokuda Shintarou, Yoshii Nanako, Nakamura Yoki, Wang Dengli, Liu Keyue, Wake Hidenori, Yoshida Takayuki, Ago Yukio, Hashimoto Kouichi, Nishibori Masahiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 355
2. 論文標題 High-mobility group box 1-mediated hippocampal microglial activation induces cognitive impairment in mice with neuropathic pain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114146 ~ 114146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2022.114146	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 -
1. 著者名 Nakamura Y, Fukuta A, Miyashita K, Zhang FF, Wang D, Liu K, Wake H, Hisaoka-Nakashima K, Nishibori M, Morioka N	4. 巻 186
2. 論文標題 Perineural high-mobility group box 1 induces mechanical hypersensitivity through activation of spinal microglia: involvement of glutamate-NMDA receptor dependent mechanism in spinal dorsal horn.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 114496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2021.114496	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森岡 徳光、中村 庸輝、中島 一恵、西堀 正洋
2. 発表標題 慢性疼痛モデル：抗体製剤の経鼻投与による疼痛と付随する情動・認知機能異常に対する改善効果
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本 夏輝、中島 一恵、中村 庸輝、森岡 徳光
2. 発表標題 海馬のミトコンドリア機能障害は神経障害性疼痛マウスに不安・うつ行動を誘発する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内 佑香、中島 一恵、中村 庸輝、王 登莉、劉 克約、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 ラット大脳皮質由来初代培養ミクログリアにおけるglucocorticoid誘導性 high-mobility group box-1放出メカニズムの検討
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本 夏輝、中島 一恵、中村 庸輝、森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスにおける脳内ミトコンドリア由来DAMPs発現変化とミトコンドリア機能障害に関する検討
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森岡 徳光, 中島 一恵, 中村 庸輝
2. 発表標題 慢性疼痛によるストレスがもたらす情動・認知機能異常へのhigh mobility box-1とミクログリアの関与
3. 学会等名 第43回 日本生物学的精神医学会 第51回 日本神経精神薬理学会 合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 一恵, 大畑 一努, 森脇 航大, 吉本 夏輝, 中村 庸輝, 王 登莉, 劉 克約, 和氣 秀徳, 西堀 正洋, 森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛により生じる認知機能低下に対するHMGB1の関与
3. 学会等名 第43回 日本生物学的精神医学会 第51回 日本神経精神薬理学会 合同年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本 夏輝, 中島 一恵, 中村 庸輝, 吾郷 由紀夫, 森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスにおける海馬での神経可塑性変化に関する検討
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本 夏輝, 中島 一恵, 大畑 一努, 中村 庸輝, 王 登莉, 劉 克約, 和氣 秀徳, 吾郷 由希夫, 西堀 正洋, 森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛マウスにおける認知機能障害に対するHMGB1中和抗体の効果に関する検討
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大畑 一努、中島 一恵、森脇 航大、吉本 夏輝、中村 庸輝、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛マウスの認知機能低下に対するHMGB1の役割に関する検討
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本 夏輝、中島 一恵、中村 庸輝、森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスの脳におけるミトコンドリア由来DAMPsの発現変化に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 史奈、中島 一恵、東 穂奈美、中村 庸輝、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、仲田 義啓、森岡 徳光
2. 発表標題 Corticosterone 処置によるラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトからの high-mobility group box 1 放出機構の検討
3. 学会等名 NPBPPP 2020 合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 史奈、中島 一恵、竹内 佑香、東 穂奈美、中村 庸輝、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、仲田 義啓、森岡 徳光
2. 発表標題 ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトにおけるcorticosterone誘導性 high mobility group box 1放出増加メカニズムの検討
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 森脇 航大、中島 一恵、吉井 稔紀、中村 庸輝、森岡 徳光
2. 発表標題 抗マウスIL-6受容体抗体 (MR16-1) は神経障害性疼痛モデルマウスにおける疼痛閾値の低下と認知機能低下を改善する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森脇 航大、中島 一恵、吉井 稔紀、中村 庸輝、森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスにおける疼痛閾値の低下と認知機能低下に対する抗マウスIL-6受容体抗体MR16-1の効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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	森岡 徳光  (Morioka Norimitsu)  (20346505)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授   (15401)	
研究 分担者	中村 庸輝  (Nakamura Yoki)  (60711786)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教   (15401)	

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
---------	---------