

機関番号：32620

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009 ~2010

課題番号：21791476

研究課題名（和文）ミクログリアにおける補体受容体シグナルの役割の解明と脳虚血疾患治療への応用

研究課題名（英文）PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone attenuates the development of neuropathic pain by regulating macrophage activation.

研究代表者

高橋 良佳 (TAKAHASHI YOSHIKA)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：70445550

研究成果の概要（和文）：末梢神経傷害時には、マクロファージ浸潤による神経炎症により神経因性疼痛を引き起こす。また、糖尿病などの分野で既に臨床応用されている Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) はマクロファージの性質を制御しており、末梢神経傷害時のマクロファージの動態と PPAR $\gamma$  の効果について、マウスの坐骨神経結紮モデルを使用して調べた。早期の PPAR $\gamma$  投与はマクロファージの浸潤を抑制し、抗炎症物質を誘導することでアロディニアを改善した。これらの結果は今後の神経因性疼痛治療の可能性を含んでいる。

研究成果の概要（英文）：Neuroinflammation triggered by macrophage infiltration into sites of peripheral nerve injury may result in neuropathic pain. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) signaling regulates the properties of macrophages. So we investigated the macrophage-mediated effects of PPAR $\gamma$  signaling on neuropathic pain triggered by peripheral inflammation using have not been partial sciatic nerve ligation (PSNL) mice model. PPAR $\gamma$  treatment in the early phase of neuropathic pain significantly alleviated the development of tactile allodynia by regulating macrophage infiltration and production of proinflammatory molecules at the inflamed site. Our results indicate that the activation of PPAR $\gamma$  signaling in macrophages during the early phase may suppress neuropathic pain development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：慢性神経因性疼痛、マクロファージ、PPAR $\gamma$ 、Rosiglitazone、炎症

### 1. 研究開始当初の背景

周術期の神経保護は麻酔科医にとって大きな課題であるが周術期に回避できなかった神経損傷、虚血による変性に対する事後的療法はいまだ姑息的治療にとどまっている。また脳神経系は神経細胞の脆弱性や解剖学的性質から脳自体に対する治療的アプローチが困難であり、末梢における容易な治療法の開発が切望されている。

### 2. 研究の目的

神経系のマクロファージであるミクログリアにおける補体受容体シグナルは広く脳虚血、神経変性疾患、疼痛などの病態形成と深く関わっている。慢性神経因性疼痛は外傷、自己免疫疾患などの炎症性疾患、脊髄、末梢神経の虚血など様々な原因により誘発される。炎症の遷延化により末梢マクロファージのみでなく脊髄ミクログリアの活性化による炎症性物質の活性化が持続し、さらなる炎症の助長と神経細胞のシナプス形成異常をもたらす。同時に BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)などの神経栄養因子を産生する。つまりマクロファージは神経傷害と神経保護の相反する作用を有し、慢性疼痛の病態を修飾している。

マクロファージは 2 つの極性を有し、CCR2+CD11c+、炎症性サイトカイン産生型の M1 マクロファージと CCR2-CD11c-、抗炎症性サイトカイン(IL-10)産生型の M2 マクロファージとのバランスによって決定される。Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) アゴニスト (Rosiglitazone, Pioglitazone) はマクロファージの極性を M1 から M2 細胞に形質転換することによって抗炎症性作用を誘導することが分かっている。

これまでマクロファージやミクログリアが炎症を促進し、慢性神経因性疼痛の病態形成に関与することが示唆されているが、その極性が疼痛形成にどのような影響を与えるかについては知られていない。そこで本研究では慢性神経因性疼痛モデルを作製し PPAR $\gamma$  アゴニストによるマクロファージの制御とその炎症抑制作用、疼痛伝達における影響を検討する。

### 3. 研究の方法

神経傷害疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮 (Partial Sciatic Nerve Ligation: PSL) をしたマウスを使用し、PPAR $\gamma$  アゴニストである Rosiglitazone を腹腔内、または局所投与し、末梢レベルでの痛みを与える効果を検

証する。

具体的には

#### ① PPAR $\gamma$ アゴニストの作用部位の検索

- (1) 坐骨神経結紮部位へのマクロファージの浸潤を Rosiglitazone と Vehicle 群で比較する。
- (2) 坐骨神経結紮部位における IL-6, IL-1b, iNOS などの M1 マクロファージ由来炎症起因物質の定量を行うとともに、後根神経節ニューロンから産生される MMP9, COX2 といった疼痛により誘導される炎症物質の定量を行う。

#### ② PPAR $\gamma$ アゴニスト投与による炎症反応抑制と鎮痛効果の関係の検索

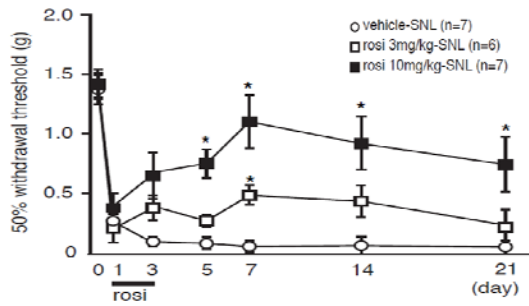
Rosiglitazone のターゲットがマクロファージであること、炎症反応を抑制し、神経保護作用を発揮することを証明するために、マウス腹腔内マクロファージを単離し ex vivo で Rosiglitazone 処理した後、SNL の結紮部位に移植する。

- (1) Rosiglitazone 処理マクロファージ移植による鎮痛効果を von Frey test により評価する。
- (2) 炎症部位への集積や活性化の抑制を NF- $\kappa$ B, p38 のリン酸化や遊走因子の受容体である CCR2 の同定によって検討する。

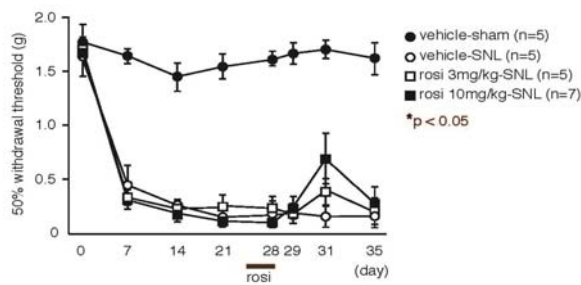
#### ③ PPAR $\gamma$ アゴニストによるマクロファージ制御の検討

マクロファージにおける Rosiglitazone の作用と細胞内メカニズムを明らかにするため

- (1) C57BL6J マウスの腹腔内からマクロファージを単離精製し、Rosiglitazone 処理し、p38 のリン酸化や遊走因子の受容体である CCR2 の発現変化を免疫細胞染色によって評価する。

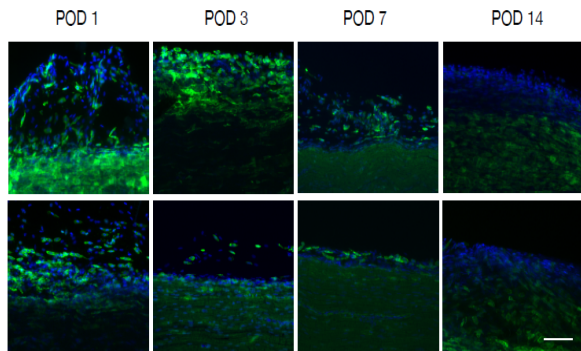


術後 Day1-3 の 3 日間 Rosiglitazone (3mg/kg, 10mg/kg) を腹腔内投与し von Frey test により疼痛閾値を調べた。

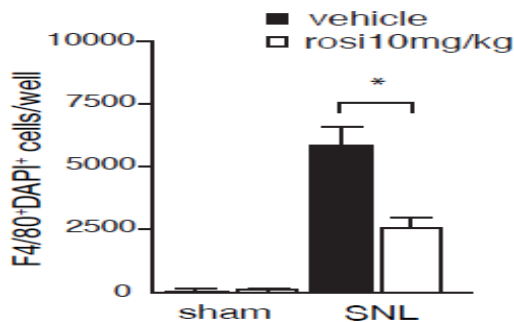


術後 Day26-28 の 3 日間 Rosiglitazone 腹腔内投与。

⇒早期の Rosiglitazone 腹腔内投与はアロディニアを軽減し、鎮痛効果を持続させた。



坐骨神経結紮部位の免疫組織染色 (上段:Vehicle, 下段:Rosiglitazone, scale bar 100µm, Immuno-labeling Green: F4/80 Blue: DAPI )



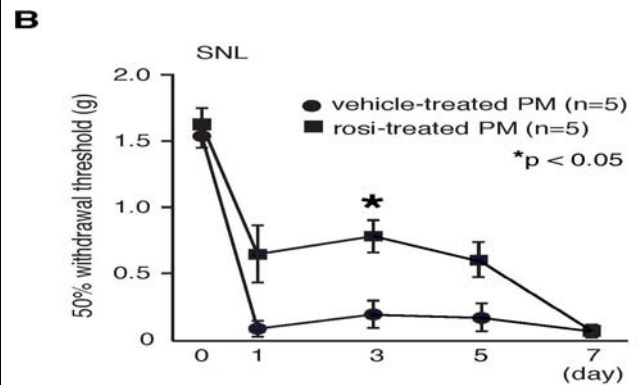
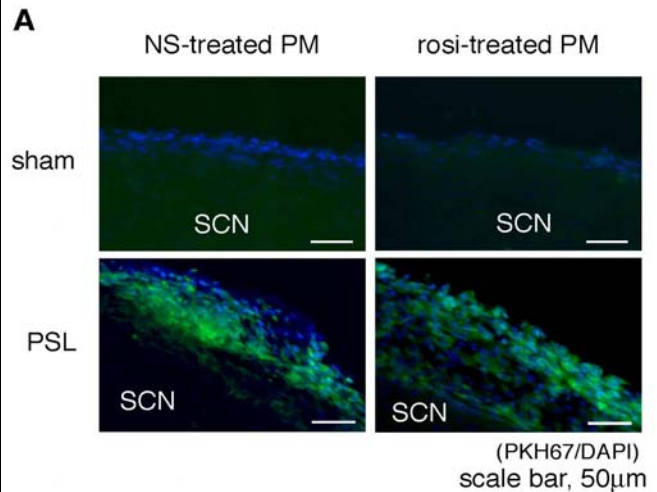
⇒Rosiglitazone 投与群では坐骨神経結紮部位でのマクロファージの浸潤が少ない。



Sham PSLN  
(V: Vehicle R: Rosiglitazone 10mg/kg)

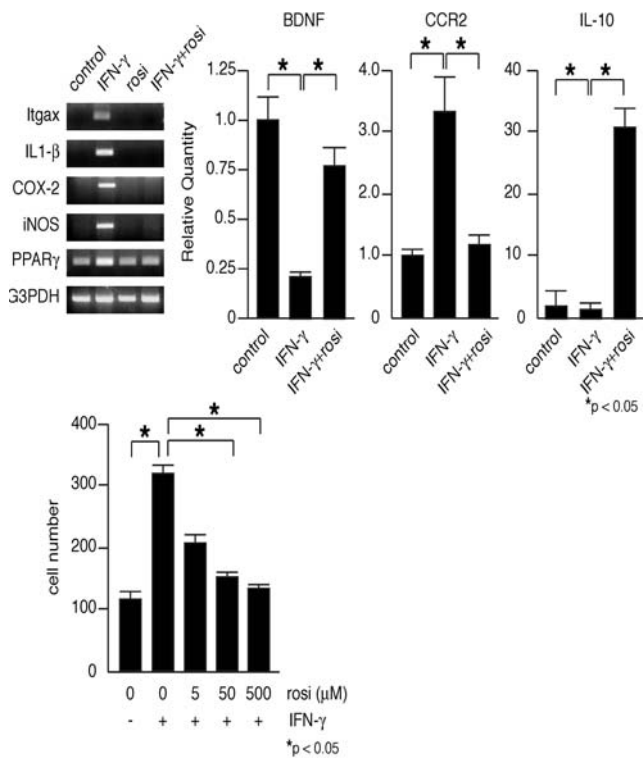
Rosiglitazone は坐骨神経結紮部位で炎症性物質の誘導を抑制する。

⇒Rosiglitazone の早期投与はマクロファージの浸潤と炎症性物質の双方を抑制する可能性が示唆される。



Rosiglitazone で前処理した腹腔内マクロファージを坐骨神経結紮部位に局所投与。

⇒効果は長期的ではないものの、アロディニアを改善させることから、サイトカインやケモカインを介してシグナル伝達が行われていることが考えられる。



(上段左 : RT-PCR, 上段右、下段 : quantitative PCR)

上段 : Rosiglitazone で前処理した細胞は有意に IFN  $\gamma$  が誘導する炎症性物質を抑制した。

下段 : MCP-1 の走化性は容量依存性に減少した。

⇒前処理した腹腔内マクロファージにも抗炎症作用がみられた。

以上の結果より、Rosiglitazone は末梢のレベルで傷害部位へのマクロファージの浸潤を抑制し、炎症性物質の誘導を制御している。これらの炎症性物質を早期に抑制すること神経因性疼痛へ発展していく流れを緩和することができる可能性があると考えられる。

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 1 件)

Takahashi Y, Hasegawa-Moriyama M, Inada E, Sakurai T, The Macrophage-Mediated Effects of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonist Rosiglitazone Attenuate Tactile Allodynia in the Early Phase of Neuropathic Pain Development, Anesth Analg, peer-reviewed, in press

[学会発表] (計 2 件)

①高橋良佳、慢性神経因性疼痛における rosiglitazone のマクロファージを介した鎮痛作用の解析、日本神経科学会、2010 年 9 月 3 日、神戸

②Yoshika Takahashi,

PPAR  $\gamma$  agonist rosiglitazone attenuates the development of neuropathic pain by regulating macrophage activation.

Neuroscience annual meeting November 15th 2010, San Diego

[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

高橋 良佳 (TAKAHASHI YOSHIKA)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：70445550

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし