

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09308

研究課題名（和文）絞扼性神経障害に関するT細胞サブセットの同定と神経ペプチドによる治療法の開発

研究課題名（英文）Identification of T Cell Subsets Involved in Constriction Nerve Injury and Development of Therapeutic Methods Using Neuropeptides

研究代表者

高相 晶士（Takaso, Masashi）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90439117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、外傷性末梢神経障害および絞扼性神経障害に伴う神経障害性疼痛の病態解明と治療法の開発を目指した。ラットモデルとT細胞サブセット欠失マウスを用いて、アロディニアの発症・進行に関するT細胞サブセットを同定した。CD8陽性T細胞が疼痛に関与し、TNF- $\alpha$ がCXCL10を介してCD8 T細胞の誘導に寄与することを示した。さらに、Peptide Lvの抗炎症作用をノックアウトマウスおよび合成したPeptide Lvを用いて明らかにした。しかし、in vivoでの抗炎症作用は限定的であり、Peptide Lvの治療効果についてはさらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、絞扼性末梢神経障害におけるCD8陽性T細胞の役割を明らかにし、T細胞サブセットの動態と神経障害性疼痛の関連性を示した。特に、CD8陽性T細胞が疼痛発生と進行に関与している可能性を示した。また、Peptide Lvが末梢神経の抗炎症作用を持つ可能性を示した。これにより、新規治療シースとしてのPeptide Lvの有効性が検討され、将来的な疼痛治療の開発に貢献する重要な知見が得られた。末梢神経障害に伴う神経障害性疼痛は、現行の薬物療法では治療が困難であり、社会的に大きな問題となっている。本研究の成果は、疼痛の機構の解明と新しい治療法の開発に繋がり、患者のQOL向上に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the pathophysiology of traumatic peripheral nerve injuries and constriction nerve injuries, and to develop therapeutic methods for neuropathic pain. Using rat models and knockout mice lacking specific T cell subsets, we identified the T cell subsets involved in the onset and progression of allodynia. CD8-positive T cells were shown to contribute to pain, and TNF- $\alpha$  was found to induce CD8 T cells via CXCL10. Furthermore, the anti-inflammatory effects of Peptide Lv were confirmed using knockout mice and synthetic Peptide Lv, although sustained-release gel formulations might be necessary for effective in vivo treatment. Future research will further investigate the therapeutic potential of Peptide Lv.

研究分野：整形外科

キーワード：絞扼性神経障害 T細胞 CD8

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外傷性末梢神経障害、絞扼性神経障害に伴う重度末梢神経障害は、薬物療法に抵抗性を示し、効果を確実に期待できる外科的治療はわずかである。申請者は重度末梢障害に対する治療法を確立すべく、末梢神経障害の病態解明と新規治療シーズの開発を行ってきた。申請者はこれまでに T 細胞が神経障害性疼痛に関与する可能性を示してきたが、神経障害性疼痛に関与する T 細胞に関与するサブセットは不明であった。また、疼痛治療シーズの開発には至っていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究ではラットおよび種々の T 細胞サブセットが欠失したノックアウトマウスを用いて絞扼性神経障害におけるアロデニア発症・進行に関与する T cell サブセットの同定を行った。また、Peptide Lv を標的とした治療法の可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. ラット絞扼性神経傷害モデルにおける T 細胞サブセットの動態と除圧効果の検討

8 週齢雌性ウイスターラットの坐骨神経を結紮し、絞扼性神経傷害モデル (CCI) を作製した。CCI の 3 日後、ラットをランダムに CCI 群 (CCI-G) と CCI+除圧群 (CCI+dec-G) に割り付けた。CCI 前 (control)、CCI 後 3 日 (POD3)、7 日 (POD7)、14 日 (POD14) に Von Frey filament による疼痛評価を行った。また、リアルタイム PCR を用いて T 細胞および T 細胞遊走・活性化因子 (*Cd3*, *Cd4*, *Cd8*, *Cxcl10*, *Tnfa*) の発現を検討した。また、フローサイトメトリーを用いて CD3 陽性陽性細胞数を検討した。免疫組織化学染色を用いて CD3 および TNF- $\alpha$  陽性細胞の局在を検討した。さらに、坐骨神経から細胞を採取し、TNF- $\alpha$  による *Cxcl10* の発現制御を検討した。

#### 3-2. CD8 陽性 T 細胞欠失マウスを用いた検討

ラット研究の結果から、絞扼性神経傷害における CD8 陽性 T 細胞の関与が示唆されたため、CD8 T 細胞欠失マウス 7 週齢雌性 C57BL/6J マウス (野生型) および CD8 陽性 T 細胞欠失マウス (B2M) の坐骨神経を結紮し、絞扼性神経傷害モデル (CCI) を作製した。傷害後 POD3, 7, 14 に坐骨神経を採取し、フローサイトメトリー解析、網羅的遺伝子解析 (RNA-Seq) および PCR 解析を行った。また、M1 および M2 マクロファージマーカーの発現を検討した。

#### 3-3. Peptide Lv を標的とした末梢神経治療シーズの開発

Peptide Lv を標的とした末梢神経治療の可能性を検討するために、絞扼性神経傷害モデルにおける Peptide Lv の発現動態を検討した。7 週齢雌性 C57BL/6J マウス (野生型) を用いて CCI モデルを作製後、0, 5, 7, 14 日目に坐骨神経を採取した。リアルタイム PCR を用いて Peptide Lv の発現を検討した。また、Peptide Lv KO マウスを用いて Peptide Lv 欠損の影響を検討した。さらに、坐骨神経細胞に合成した Peptide Lv1 1 $\mu$ g/ml を添加し、抗炎症作用を検討した。また、CCI モデルに Peptide Lv の投与を行った。

### 4. 研究成果

#### 4-1. ラット絞扼性神経傷害モデルにおける T 細胞サブセットの動態と除圧効果

POD3 では control に比べ有意な疼痛閾値の低下を認めた。POD7, 14 において、CCI + dec-GCCI-G は CCI-G に比べ有意に疼痛閾値が高かった (図 1)。CCI-G における CD3 陽性細胞の割合、*Cd3* の発現は有意に増加した (図 2, 3)。同様に *Cd4*, *Cd8* の発現は POD7, POD14 において control に比べ有意上昇したが、CD8 の発現は CCI+dec-G において有意に低下した (図 3)。このことから末梢神経傷害には CD8 T 細胞が関与している可能性が示唆された。また、POD7 において TNF- $\alpha$ , CXCL10 の発現上昇を認め、さらに、in vitro において TNF- $\alpha$  は *Cxcl10* の発現および CXCL10 産生を誘導した (図 4)。このことから、ケモカインリガンド CXCL10 を介して坐骨神経内に CD8 T 細胞が誘導される可能性が示唆された。

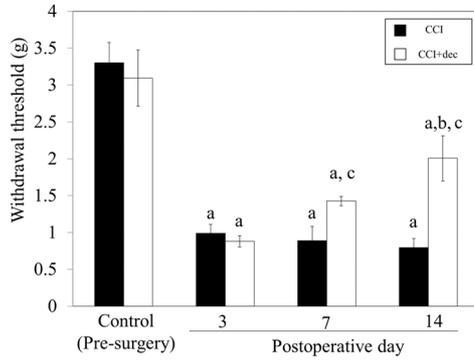


図1. 疼痛閾値の変化

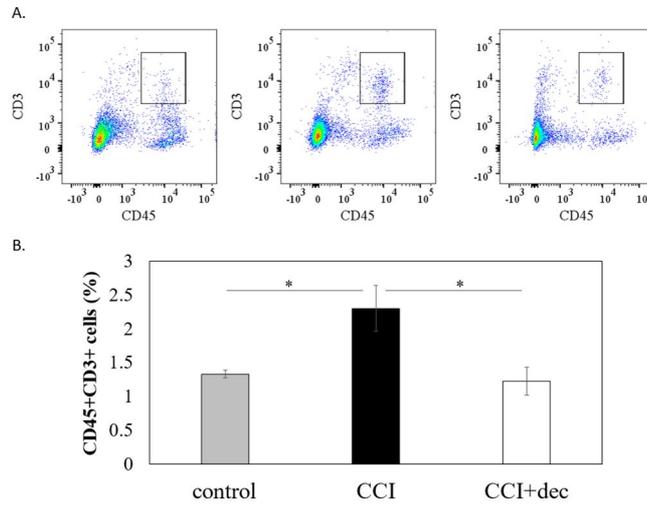


図2. 坐骨神経におけるT細胞の割合

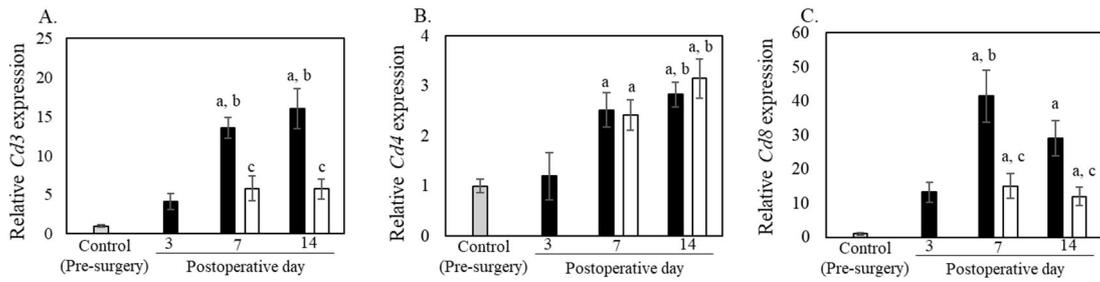


図3. T細胞関連マーカー発現の時系列変化

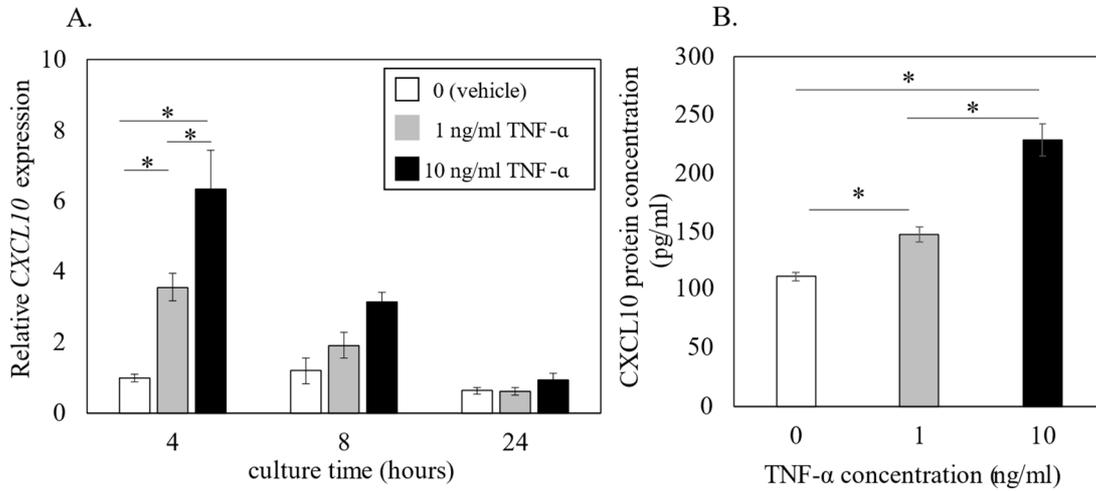


図 4. TNF-α による CXCL10 の発現誘導

#### 4-2. 末梢神経傷害における CD8 陽性細胞欠失の影響

フローサイトメトリーの結果、野生型マウスでは CCI 後に CD3+CD8+T 細胞の増加を認めた。一方、B2M KO マウスで CD3+CD8+ T 細胞は検出されなかった。RNA-Seq データのパスウェイ解析の結果、B2M KO 群では TGF-β pathway に関する遺伝子群の発現が低下していることが示された (図 5)。また、M2 マクロファージに関する遺伝子群の低下が認められた。このことから、CD8 陽性 T 細胞はマクロファージの極性化に関与している可能性が示唆された。

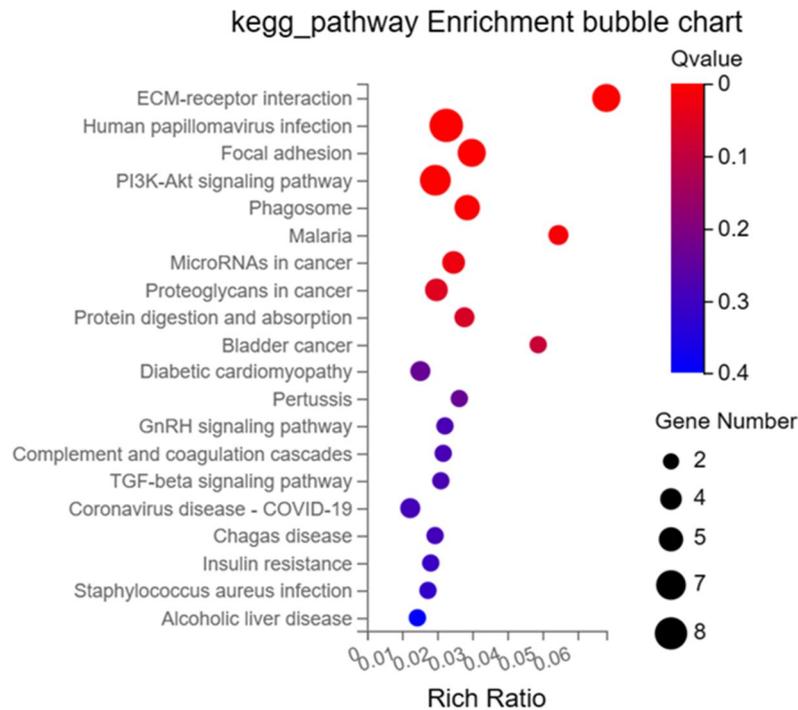


図 5. パスウェイ解析 (KEGG 解析)

#### 4-3. 末梢神経傷害における Peptide Lv の欠損の影響と Peptide Lv 投与の影響

Peptide Lv の発現は CCI 後に著しく減少した (図 6)。Peptide Lv の欠失マウスでは NO 合成酵素 Inos の発現が上昇した (図 7)。さらに、Peptide Lv の添加により、Inos の発現は低下した (図 8)。このことから、Peptide Lv は末梢神経に対して抗炎症物質として働くことが示された。しかし、CCI モデルに投与による Inos の減少は認められなかった。このことから、徐放ゲル剤などの併用が必要かもしれない。

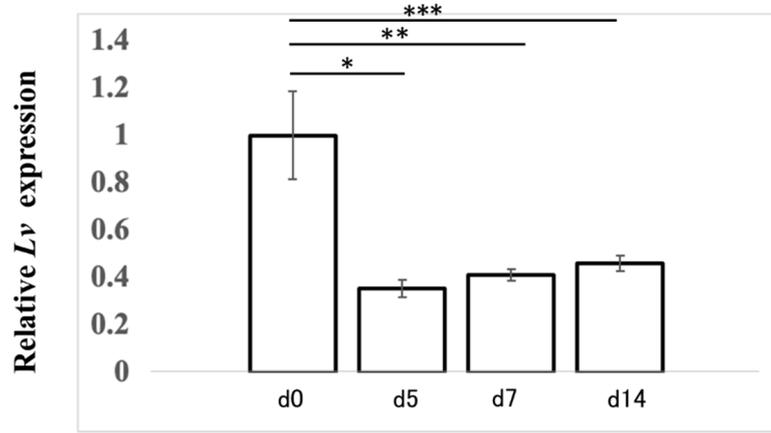


図 6. 末梢神経傷害後の Peptide Lv の発現

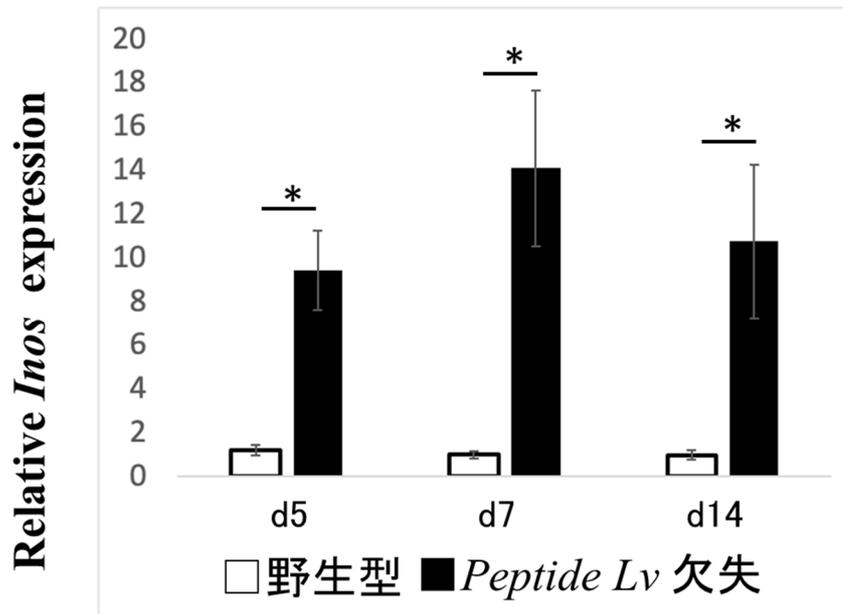


図 7. Inos 発現における Peptide Lv 欠損の影響

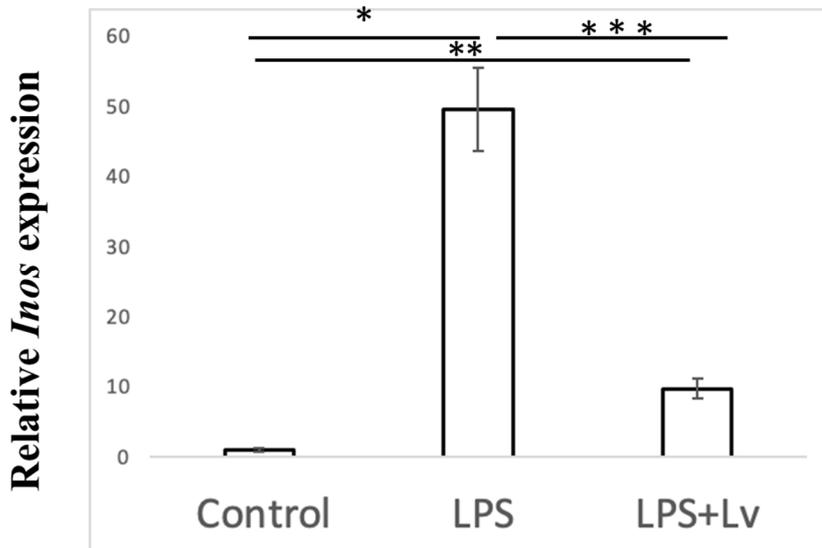


図 8 Peptide Lv による Inos 発現抑制効果

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 Mukai M, Uchida K, Inoue G, Satoh M, Miyagi M, Hirose N, Matsuura Y, Ohtori S, Takaso M	4. 巻 40
2. 論文標題 Nerve decompression surgery suppresses TNF- expression and T cell infiltration in a rat sciatic nerve chronic constriction injury model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2537-2545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.25280	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 Mukai M, Uchida K, Hirose N, Murakami K, Inoue G, Miyagi M, Shiga Y, Sekiguchi H, Inage K, Orita S, Suzuki T, Matsuura Y, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 23
2. 論文標題 Frozen vein wrapping for chronic nerve constriction injury reduces sciatic nerve allodynia in a rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurosci	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12868-022-00719-7	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横関雄司、内田健太郎、向井務晃、迎学、井上玄、宮城正行、高相晶士
2. 発表標題 末梢神経障害におけるV-set and transmembrane domain containing 4の役割の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白澤 栄樹、内田 健太郎、井上 玄、宮城 正行、横関 雄司、柴田 直弥、小沼 賢治、向井 務晃、高相 晶士
2. 発表標題 絞扼性末梢神経障害モデルにおいてCD8T細胞はマクロファージの極性化に関与する
3. 学会等名 第38回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023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	松下 治 (Matsushita Osamu)  (00209537)	岡山大学・医歯薬学域・教授  (15301)	
研究分担者	廣澤 直也 (Hirosawa Naoya)  (10882748)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教  (12501)	
研究分担者	佐藤 雅 (Satoh Masashi)  (40611843)	北里大学・医学部・講師  (32607)	
研究分担者	宮城 正行 (Miyagi Masayuki)  (90627556)	北里大学・医学部・講師  (32607)	

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