

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790649

研究課題名(和文)慢性神経因性疼痛におけるPPARgammaシグナルの役割

研究課題名(英文)The role of PPARgamma signaling in neuropathic pain development

研究代表者

長谷川 麻衣子 (HASEGAWA, MAIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20516637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：PPARgammaシグナルは炎症性M1から抗炎症性M2マクロファージへの極性変化を促進することにより、炎症から創傷治癒期への移行を促している。申請者はPPARgammaシグナルによるマクロファージ極性制御と疼痛の慢性化メカニズムについて検討をおこなった。神経因性疼痛マウスにおいてPPARgammaアゴニストrosiglitazoneはマクロファージ浸潤抑制を介してmechanical allodyniaを軽減した。術後痛、炎症性疼痛モデルではM1からM2への極性変化を促進した。マクロファージのPPARgammaシグナルが慢性疼痛の治療ターゲットとなりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma signaling is known to regulate heterogeneity of macrophages, which are often referred to as proinflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages. M1 macrophages have considerable antimicrobial activity whereas M2 macrophages are involved in wound healing process. We investigated the link between the phenotype switching of macrophage polarization induced by PPAR gamma signaling and pain development. Rosiglitazone significantly ameliorated mechanical allodynia by regulating macrophage infiltration at the inflamed site. The number of M1 macrophages was decreased whereas numbers of M2 macrophages were increased in rosiglitazone-treated sites. We speculate that rosiglitazone significantly alleviated the development of chronic pain, possibly through regulating macrophage polarity at the inflamed site. PPARgamma signaling in macrophages may be a potential therapeutic target for the treatment of pain development.

研究分野：境界医学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：慢性疼痛 マクロファージ極性 PPARgamma

## 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は外傷、手術などの炎症の持続や、脊髄・末梢神経の虚血をはじめさまざまな原因により誘起される。炎症の遷延化によりマクロファージの活性化が持続し、さらなる炎症の慢性化と神経傷害をもたらす。同時にマクロファージは IL-4, IL-10 などの抗炎症性サイトカイン、NT-3, BDNF などの神経栄養因子を産生する(Tsuda M et al. Nature 424:778, 2003)。

つまりマクロファージは神経障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、炎症部位の組織環境は、炎症性サイトカインであると同時に疼痛増強物質である TNF- $\alpha$ 、IL-6 を産生する F4/80+iNOS+M1 マクロファージと、IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生する M2 マクロファージとのバランスによって決定されている。PPAR  $\alpha$  アゴニスト rosiglitazone はマクロファージの極性を M2 型優位にすることによって抗炎症作用を誘導することがわかっている (Lumeng CN et al. J Clin Invest 117:175, 2007、Butovsky et al. Mol Cell Neurosci. 35:490, 2007)。

## 2. 研究の目的

これまでマクロファージが炎症を促進し、慢性痛の病態形成に関与することが示唆されているが、その極性がどのような影響を与えるかについては明らかになっていない。とくに抗炎症型 M2 マクロファージの関与については不明であった。申請者らは部分的坐骨神経結紮(PSNL)モデルマウスにおいて rosiglitazone を急性期の PSNL 1 日後に腹腔内投与すると、機械的刺激に対する疼痛閾値が著しく改善するのに対して、PSNL 26 日後に投与しても効果のないことを先に明らかにした。つまり rosiglitazone は結紮部位における炎症反応を早期に抑制することによって炎症性疼痛から神経因性疼痛への移行を抑制できることが示唆された。そこで当初以下の3点

に絞り研究を進めた。

- 1) PPAR  $\alpha$  アゴニストの作用部位の探索
- 2) PPAR  $\alpha$  アゴニスト投与による抗炎症効果と鎮痛効果の関係
- 3) PPAR  $\alpha$  アゴニストによるマクロファージの極性制御の検討

以上を検討することにより、急性痛から慢性疼痛の病態形成のメカニズムを解明するとともに PPAR シグナルの作用機転を明らかにすることで慢性疼痛に対する新たな治療方法を提示できると考えた。

## 3. 研究の方法

1) PPAR  $\alpha$  アゴニストの作用部位の探索  
坐骨神経結紮部位には術後1日目よりマクロファージの集積と疼痛閾値の低下がみられる。rosiglitazone を手術1日後に腹腔内投与した場合、結紮部位へのマクロファージ浸潤が減少したことから、rosiglitazone はマクロファージの炎症部位への浸潤を末梢で抑制することにより、鎮痛効果を発揮するものと予測される。そこで rosiglitazone 存在下に培養した腹腔マクロファージを坐骨神経結紮部位に局所移植し、rosiglitazone の鎮痛効果がマクロファージを介するかを検討した。

- 2) PPAR  $\alpha$  アゴニスト投与による抗炎症反応効果と鎮痛効果の関係

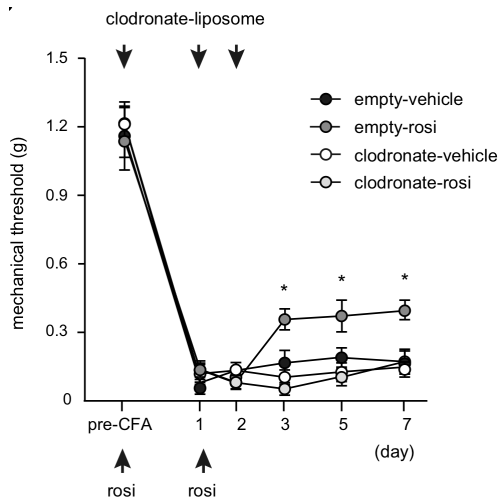
rosiglitazone 投与により M2 への誘導が促進され、M1 由来の疼痛増強物質の産生が減少することが、その鎮痛効果に寄与しているものと予測した。そこで、坐骨神経結紮部位の免疫組織染色により、マクロファージの M1/M2 バランスを検討した。また定量 PCR を用いた rosiglitazone で処理した腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインの profiling を行うことにより、rosiglitazone の抗炎症作用と鎮痛に関する直接因子を同定した。

- 3) PPAR $\gamma$ シグナルによるマクロファージの極性制御の検討

PPAR シグナルが M2 マクロファージへの極性変化を誘導機序については TLR4 から NF- $\kappa$ B の sumoylation を抑制することが指摘されている。しかし NF- $\kappa$ B の下流シグナルについては明らかになっておらず、直接極性制御に関わる因子は不明である。そこで PPAR シグナルが活性化することによりその下流で誘導される因子を検討した。また生理的な環境で、M1/M2 バランスを規定している内因性因子についての検討もおこなった。

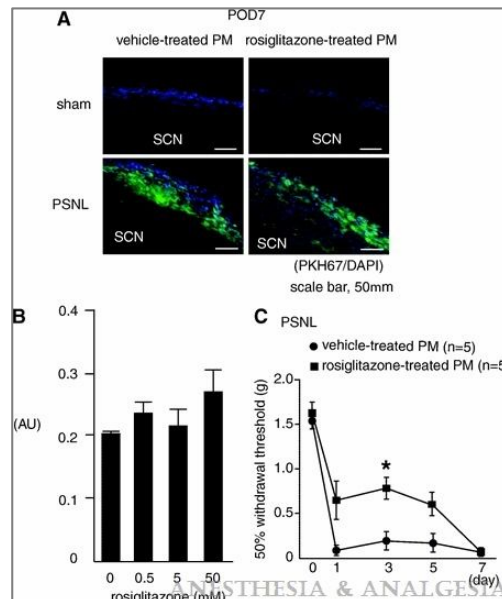
#### 4. 研究成果

1) PPAR アゴニストの作用部位の一つとしてマクロファージが示唆された。Complete Freund's Adjuvant を用いた炎症性疼痛モデルにおいて貪食活性を有するマクロファージのみに取り込まれ、アポトーシスを誘導する Chrodrionate-liposome により組織のマクロファージを除去したところ rosiglitazone の鎮痛作用が消失した (PAIN2013 154: 1402-1412.)。



また坐骨神経結紮神経因性モデルにおいて rosiglitazone で処理した腹腔マクロファージを坐骨神経結紮部位へ局所移植したところ、一時的ではあるが鎮痛効果が得られた (Anesth Analg 2011 113:398-404.)。

rosiglitazone は PPAR 受容体のみでなく、神経終末の TRPC チャンネルに作用することが報告されているが、鎮痛効果は PPAR アンタゴニスト GW9662 で拮抗されているため、主に PPAR を介している



ものと考えられる。また腹腔マクロファージを単離し rosiglitazone と GW9662 を用いて刺激した場合も rosiglitazone の効果が抑制されることから神経終末の TRP チャンネルの寄与は低いと考える。

#### 2) PPAR アゴニスト投与による抗炎症効果と鎮痛効果の関係

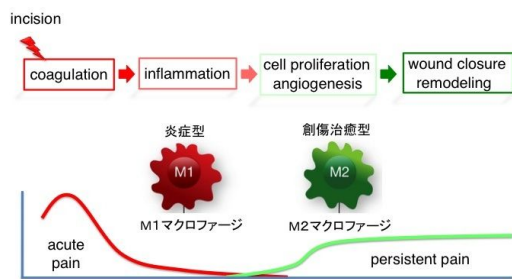
rosiglitazone を局所投与したところ、iNOS、COX2 などの産生が減少し、内因性オピオイドの1つである proenkephalin の遺伝子誘導が促進された。また腹腔マクロファージを用いた細胞実験においても同様の結果が得られた。他の内因性オピオイド エンドルフィンやダイノルフィンの産生量は変化がなかった。つまり PPAR シグナルの活性化は炎症疼痛増強物質の産生を抑制し、鎮痛作用のある内因性オピオイドの産生を促進することが示唆された。今回炎症性サイトカインであり、それ自身が疼痛を誘起する TNF や IL-1 の産生量も検討したが rosiglitazone 投与による変化はみられなかった。これらは好中球からも産生されるため、マクロファージの寄与は低いのかもしれない。

また rosiglitazone とオピオイド受容体アンタゴニストである naloxone を共投与した場合、rosiglitazone の鎮痛作用は減弱することから、late phase における鎮痛作用は主に内因性オピオイドの増加によるものと考えられる。しかし実際、M2 マクロファージ

が proenkephalin を産生しているかは定かではなく、CD206 陽性細胞との co-localization を確認する必要がある。

### 3) PPAR アゴニストによるマクロファージの極性制御の検討

術後痛、炎症痛モデルマウスを用いて、M1/M2 極性変化を検討した。早期にまず M1 マクロファージが増加し、M2 マクロファージの流入は M1 よりも遅いことが明らかになった (*Biochem Biophys Res Commun* 2012 426: 76-82)。炎症性疼痛モデルでは HO-1 inhibitor である SnPP や PPAR アントゴニストの GW9662 の投与により拮抗された。



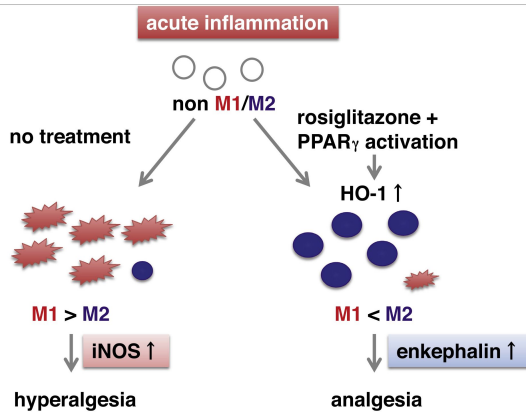
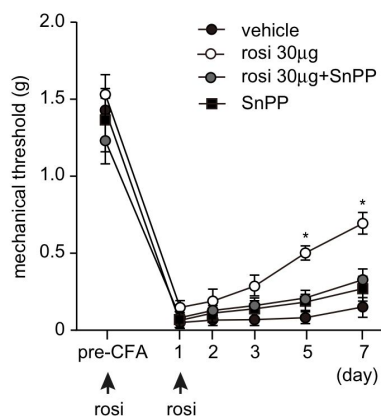
PPAR アゴニストのマクロファージ極性への作用は投与後 2 日ほどの遅延があるが、これは単球から直接 M2 マクロファージに分化するのではなく、M1 マクロファージが M2 へ分化するためであり (*Genes Dev* 2010 24:491)、また炎症初期には感染防御や壊死組織の排除のため M1 優位の環境であることとも合致する。2) の結果とあわせて、急性期には M1 由来メディエーターが炎症・疼痛を促進するが、回復・創傷治癒期に移行すると M2 優位となり抗炎症物質や鎮痛物質の産生が促進される (上図)。この転換が感染の遷延化などにより遅延した場合、M1 優位な組織環境が持続し、疼痛の遷延化へ移行するものと考え、末梢における病態形成のメカニズムとして提示する。

### 4) PPAR アゴニストによるマクロファージの極性制御のメカニズム

PPAR シグナルは NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制することにより M1 マクロファージ極性を維持していると考えられ、M2 への変

換は酸化ストレス反応などで誘導される組織保護因子である heme oxygenase-1(HO-1)が必要である。実際、rosiglitazone を局所投与すると組織中の HO-1 mRNA 量が増加し、免疫組織染色により HO-1 は F4/80+マクロファージにおいて共発現していることが明らかになった。

つまり M2 マクロファージへの変換を直接誘導しているのは HO-1 であり、実際阻害剤である SnPP(Tin protoporphyrin)を投与すると M2 マクロファージ数が減少し鎮痛効果が減弱することがあきらかになった。

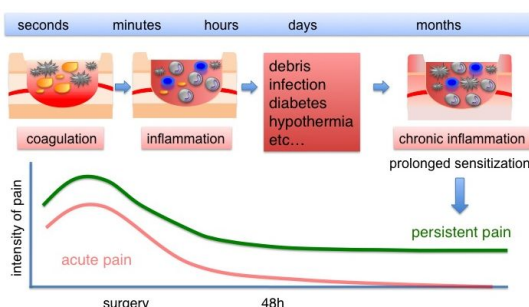


まとめ (上図)

手術の切創など外的侵襲が加わると、感染や壊死組織の排除のためにマクロファージなどの免疫細胞が浸潤する。マクロファージには炎症型の M1 マクロファージと抗炎症型で創傷治癒を促進する M2 マクロファージが存在し、そのバランスにより炎症・創傷治癒が決定される。M1 型は炎症早期に増加し、COX-2 や iNOS などの炎症疼痛増強物質を産生するのに対して、M2 型の増加は M1 に遅れて観察される。M2 型が組織に増加すると内因

性オピオイドであるエンケファリンの産生が増加し鎮痛に作用する。

急性痛が慢性化する末梢メカニズムとしては、M1 から M2 マクロファージへの phenotype shift が障害されることにより炎症が慢性化し、末梢性感作が持続することによると考える。その原因としては、手術創の不適切な管理による感染や壊死組織残存、糖尿病や術中低体温による免疫機能の低下などがあげられる。



## 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4件)

1. Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto T, Nakama M, Godai K, Kojima M, Kuwaki T, Kanmura Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates inflammatory pain through the induction of heme oxygenase-1 in macrophages. *PAIN* 2013 154: 1402-1412. (査読あり)
2. Hasegawa-Moriyama M, Ohnou T, Kurimoto T, Nakama M, Kanmura Y Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 426: 76-82. (査読あり)
3. Suzuki N, Hasegawa-Moriyama M, Takahashi T, Kamikubo Y, Sakurai T, Inada E, Lidocaine attenuates the development of diabetic-induced tactile allodynia by inhibiting microglial activation, *Anesth Analg* 2011 113:941-946. (査

読あり)

4. Takahashi Y, Hasegawa-Moriyama M(equally contributed), Sakurai T, Inada E 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* 2011 113:398-404. (査読あり)

[学会発表](計12件)

1. K. Godai, M. Hasegawa-Moriyama, T. Saito, T. Yamada, Y. Kanmura, Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates inflammatory pain by regulating macrophage polarization, *Neurosciences* 2013年11月(アメリカ合衆国)
2. T. Saito, M. Hasegawa-Moriyama, K. Godai, T. Ohnou, T. Yamada, Y. Kanmura, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonist Rosiglitazone Attenuates Postincisional Pain by Regulating Macrophage Polarization, *Anesthesiology* 2013年10月(アメリカ合衆国).
3. M. Hasegawa-Moriyama, Persistent postsurgical pain : how can we prevent in the perioperative period? 25th Scientific Meeting of The Pain Society of Busan, 2013年8月(大韓民国)
4. 五代幸平、長谷川麻衣子、大納哲也、上村裕一 PPAR $\gamma$  アゴニスト rosiglitazone のマクロファージ極性制御と術後痛抑制効果の検討 第86回日本薬理学会 2013年3月(福岡)
5. M.Hasegawa-Moriyama, PPARgamma agonist as a Potential Therapeutic Agent for Neuropathic Pain , BIT's9th Annual Congress of International Drug Discovery Sciences and Technology, 2011年11月(中国).
6. 五代幸平、長谷川麻衣子、大納哲也、二木貴弘、榎畑京、上村裕一, PPAR $\gamma$  アゴニストによるマクロファージ極性制御と鎮痛作用の検討, 日本ペインクリニック学会第46回大会, 2012年7月(島根)

7. 鈴木尚生子、長谷川麻衣子、櫻井隆、稲田英一、糖尿病性ニューロパチーにおけるリドカインのミクログリアを介した鎮痛効果, 第58回日本麻酔科学会, 2011年5月(神戸).
8. 長谷川麻衣子、高橋良佳、鈴木尚生子、櫻井隆、稲田英一、PPAR- $\gamma$ アゴニスト rosiglitazoneのマクロファージを介した鎮痛効果, 日本麻酔科学会第58回学術集会, 2011年5月(兵庫)
9. Naoko Suzuki, Maiko Hasegawa-Moriyama, Yuji Kamikubo, Kohei Kimura, Takashi Sakurai, Eiichi Inada, Lidocaine attenuates the development of diabetes-induced tactile allodynia by inhibiting macrophage activation., Society for Neuroscience, 2010年11月(San Diego, California, USA)
10. Yoshika Takahashi, Maiko Hasegawa-Moriyama, Takashi Sakurai, Eiichi Inada, PPAR gamma agonist rosiglitazone attenuates the development of neuropathic pain by regulating macrophage activation., Society for Neuroscience, 2010年11月(San Diego, California, USA)
11. 高橋良佳、長谷川麻衣子、鈴木尚生子、櫻井隆、稲田英一 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(神戸)
12. 鈴木尚生子、長谷川麻衣子、高橋良佳、上窪祐二、櫻井隆、稲田英一、糖尿病性ニューロパチーに対するミクログリアを介したリドカインの神経保護作用, 日本ペインクリニック学会, 2010年7月(京都)

〔図書〕(計 1 件)

長谷川麻衣子、上村裕一 麻酔科医のための周術期の疼痛管理 術後痛：創治癒過程の痛み 中山書店 pp.22-28 (2014).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ana-ccm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川麻衣子 ( HASEGAWA, Maiko )  
鹿児島大学 医学部・歯学部附属病院  
講師

研究者番号：20516637

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし