

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：24701
 研究種目：若手研究B
 研究期間：2011 年度～2012 年度
 課題番号：23791724
 研究課題名（和文） 神経障害性疼痛におけるマクロファージとT細胞間クロストーク機構の解明
 研究課題名（英文） The crosstalk pathway between macrophages and T-lymphocytes involves in neuropathic pain.
 研究代表者
 小林 悠佳 (KOBAYASHI YUKA)
 和歌山県立医科大学・医学部・薬理学
 研究者番号：20511562

研究成果の概要（和文）：免疫細胞の活性化による神経炎症は神経障害性疼痛の病態形成因子となる。本研究では、神経障害性疼痛におけるマクロファージおよびT細胞間クロストークの重要性を検討した。傷害神経に共刺激分子(GITRL, GITR)を有するマクロファージおよびT細胞が多数集積した。これら免疫細胞間のクロストーク阻害により疼痛が軽減された。したがって、免疫細胞間クロストークを介した神経炎症の制御が神経障害性疼痛に重要な役割を果たす可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：The activated immune cells-induced peripheral neuroinflammation contributes to the pathogenesis of neuropathic pain. We investigated the involvement of crosstalk between macrophages and T cells in neuropathic pain. Macrophages and T-lymphocytes infiltrated in the injured sciatic nerve, and they expressed GITRL and GITR which are co-stimulatory molecules. The inhibition of crosstalk alleviated nerve injury-induced neuropathic pain. Therefore, the regulation of neuroinflammation through a crosstalk between macrophages and T-lymphocytes cells plays a crucial role in neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

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：神経障害性疼痛、神経炎症、マクロファージ、T細胞、GITR、GITRL

1. 研究開始当初の背景

「痛み」は生体内に生じた組織損傷に対して警告シグナルを発することで身体の異常を感知し、異常状態から回復しようとする生体防衛システムの一つである。一方で、慢性疼痛下では、生体防御の機能を逸脱した痛みが組織損傷の消失後も持続し、既存の鎮痛薬に抵抗性を示すとともに有効な治療法は存在しない。慢性疼痛治療法の確立を目指し、数多くの基礎的研究がなされているが、その発症・維持メカニズムは複雑かつ多岐に渡るため決定的な治療ターゲットの確定には至っていない。

当研究室ではこれまでに、神経障害性疼痛モデルを用いて、神経損傷部位に浸潤するマクロファージ由来の炎症性サイトカインおよびケモカインが神経炎症に関与し、神経障害性疼痛の形成因子として重要な役割を果たすことを報告してきた。(Kiguchi N, Kobayashi Y et al., *PAIN*, 2010., Kiguchi N, Kobayashi Y et al., *Curr Opin Pharmacol.*, 2012.) しかし、神経炎症が一過性に終息せず「痛み」の慢性化を導く機構の全体像は掴めていない。その中心的な役割を担う細胞として、T細胞の機能に着目した。T細胞は免疫システムの司令塔として機能する主要な

リンパ球である。近年、炎症制御に働く新たなT細胞サブセットの発見など次々に新たな知見が報告され、T細胞を中心とした免疫学的研究は革新的に進歩しているが、痛み領域においてT細胞の関与を検討した研究は数少ない。本研究での予備実験において、損傷坐骨神経におけるT細胞マーカーのmRNA発現増加やそれに集積するT細胞が多数観察されており、神経障害性疼痛とT細胞の関連性は非常に高いと考えられる。そこで、痛みの慢性化のプロセスにマクロファージとT細胞の密接な相互作用が「痛み」慢性化を制御するスイッチングハブとして重要な役割を担うという仮説を立てた。

2. 研究の目的

慢性疼痛の病態基盤のトリガーポイントとなる末梢神経炎症に焦点を当て、それに対する免疫細胞の関与について追究する。神経炎症に関与する免疫細胞としてこれまでにマクロファージの重要性を示してきたが、新たにT細胞に着目する。慢性疼痛におけるマクロファージ-T細胞間クロストークの関与を明らかにし、神経障害性疼痛の治療ターゲットの探索を目指す。

3. 研究の方法

神経障害性疼痛モデルとして当教室で既に確立している坐骨神経部分結紮 (Partial Sciatic nerve Ligation: PSL) モデルを用いた (Fig.1)。疼痛評価は、von Frey テストおよび Hargreaves テストを用いて機械的アロディニア、熱痛覚過敏をそれぞれ行動学的に評価した (Fig.1)。対照群として坐骨神経の露出のみを行う Sham 群を作製した。RT-PCR 法および免疫染色法による生化学・組織化学的手法を用いて、マウスの坐骨神経における遺伝子およびタンパク質発現変化を解析した。また、採取した血液や腹腔マクロファージにおける免疫細胞の集団変化をフローサイトメトリーにより測定した。

Fig.1 神経障害性疼痛モデルと疼痛評価法

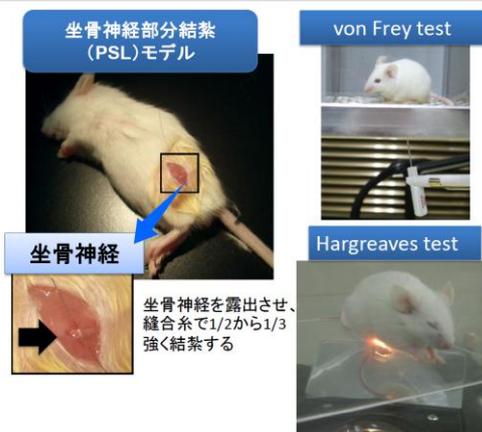


Fig.2 傷害後坐骨神経におけるマクロファージの集積

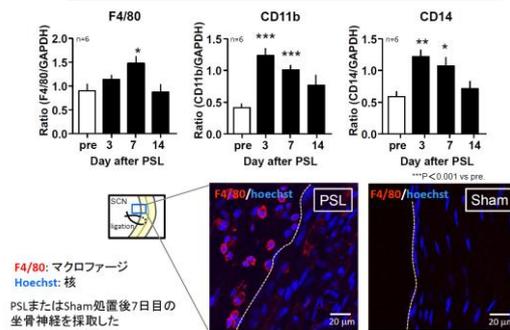
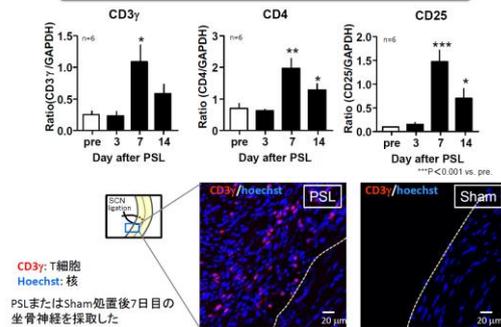


Fig.3 傷害後坐骨神経におけるT細胞の集積



4. 研究成果

(1) 傷害後坐骨神経における免疫細胞の集積

傷害後坐骨神経における免疫細胞の集積を検討した。RT-PCRにより、PSL後坐骨神経におけるマクロファージマーカー(F4/80, CD11b, CD14)およびT細胞マーカー(CD3γ, CD4, CD25)mRNAの発現増加が認められた。また、免疫染色により、PSL処置7日目の坐骨神経においてF4/80陽性マクロファージ、CD3γ陽性T細胞の集積が観察された (Fig.2, Fig.3)。

(2) 傷害後坐骨神経における共刺激分子 (GITRL, GITR)の発現増加

グルココルチコイド誘発性TNF受容体 (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor:GITR) およびそのリガンドであるGITRLは免疫細胞に局在し、これら2つの分子間相互作用が免疫細胞の活性や炎症を制御していると報告されている (Nocantini G et al., *Eur J Immunol.*, 2005, Ronchetti S et al., *Blood.*, 2002)。そこで、神経傷害による神経炎症に対するこれらの分子の関与について検討した。坐骨神経におけるGITR, GITRLのmRNAはPSLにより有意に発現増加していた (Fig.4)。また、抗GITR抗体、抗GITRL抗体と免疫細胞マーカーとの二重免疫染色の結果より、GITRはCD3γ陽性T細胞、GITRLはF4/80陽性マクロファージにそれぞれ局在することが明らかとなった (Fig.5)。

Fig.4 傷害後坐骨神経における共刺激分子 (GITRL, GTR)のmRNA発現増加

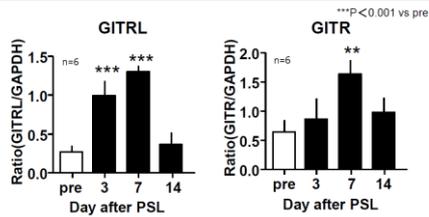
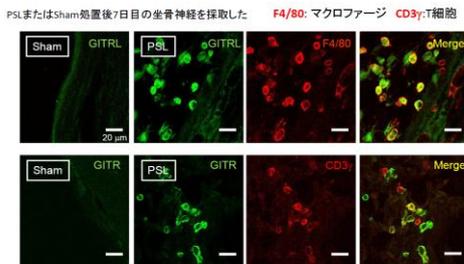


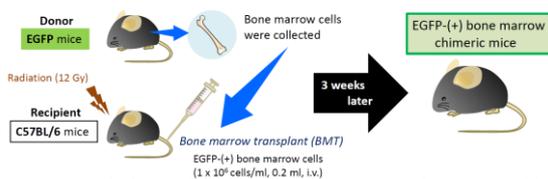
Fig.5 傷害後坐骨神経におけるGITRL, GTRの発現とその局在



(3) 傷害坐骨神経周囲の血管に由来する免疫細胞の浸潤

EGFP-tg マウスの大腿骨から骨髓を採取し、EGFP 陽性骨髓細胞の懸濁液を調整した。放射線 (12 Gy) 照射した野生型マウスにEGFP 陽性骨髓細胞 (1 x 10⁶ cells/ml, 0.2 ml) を尾静脈内投与することで EGFP キメラマウスを作製した (Fig.6)。

Fig.6 EGFP陽性骨髓細胞移植によるEGFP chimeric マウスの作製



PSL を施した EGFP キメラマウスの坐骨神経を用いて免疫染色を行った。PSL7 日目の坐骨神経の傷害部位において EGFP 陽性細胞が多数認められた (Fig.7)。一方、Sham 群ではほとんど観察されなかった。したがって、PSL により集積する免疫細胞の一部は傷害神経に集積した血管由来の細胞であることが示唆された。さらに、抗 GITRL 抗体を用いた免疫染色の結果、集積する EGFP 陽性細胞に GITRL が局在することも明らかとなった (Fig.8)。

(4) PSL 誘発性機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏に対するマクロファージ枯渇薬の影響

リポソーム化クロドロナート (clo)はクロドロン酸が内包されたリポソームであり、clo を取り込ませたマクロファージは高効率に除去されることが報告されている (Barclay J et al., *PAIN*, 2007., Feng B et al. *PLoS One*, 2011.). PSL 前日および PSL4 日目に clo (1 mg, i.v.) を投与し、PSL7 日目に疼痛評

Fig.7 傷害後坐骨神経におけるEGFP陽性細胞の集積

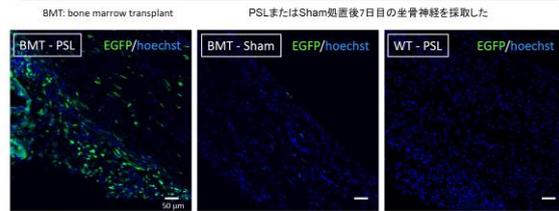
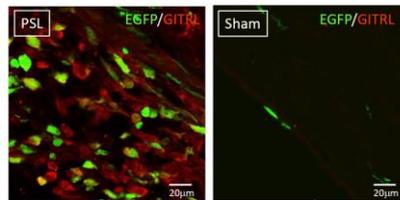


Fig.8 EGFP陽性細胞におけるGITRLの発現



価を行った。PSL により誘発される機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏は clo により有意に減弱された (Fig.9)。また、clo および溶媒投与後の腹腔内マクロファージを回収し、マクロファージマーカー (F4/80, CD14) を用い、フローサイトメトリー解析を行ったところ、clo により腹腔マクロファージの顕著な減少を認めた (Fig.10)。

(5) PSL 誘発性熱痛覚過敏および機械的アロディニアに対する T 細胞枯渇の影響

活性化 T 細胞の細胞膜抗原である CD25 (IL-2 receptor) に対する中和抗体 (0.1 mg/0.1 ml, i.p.) を PSL 前日および PSL6 日目に投与し、PSL7 日目に疼痛評価を行った。PSL 誘発性機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏は抗 CD25 抗体により有意に減弱された (Fig.11)。

Fig.9 PSL誘発性神経障害性疼痛に対する clodronateの影響

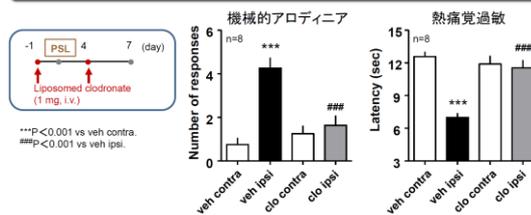


Fig.10 clodronateによる腹腔マクロファージの減少

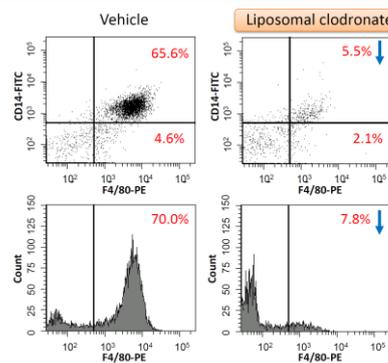


Fig.11 PSL誘発性神経障害性疼痛に対するCD25中和抗体の影響

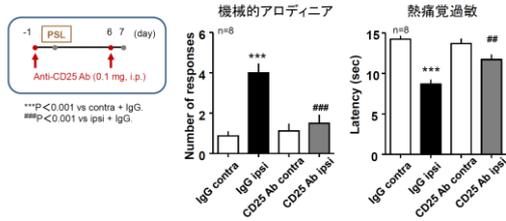
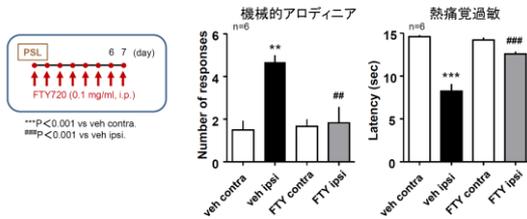


Fig.12 PSL誘発性神経障害性疼痛に対するFTY720の影響



多発性硬化症治療薬であるフィンゴリド塩酸塩(FTY720)はリンパ節からの T 細胞の放出を抑制し、血中 T リンパ球を減少させることが知られている(千葉健治ら, 日薬理誌, 2012.)。FTY720 (0.1 mg/kg, i.p.)を PSL 直後から 1 日 1 回、7 日間反復投与し、PSL 7 日目に疼痛評価を行った。PSL 誘発性機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏は FTY720 により有意に減弱された (Fig.12)。また、FTY720 の最終投与後の血液を回収し、T 細胞マーカー(CD4, CD25)を用いて血中 T 細胞のフローサイトメトリー解析を行った結果、血中 T 細胞数は FTY720 により減少していた (Fig.13)。

(6) PSL 誘発性熱痛覚過敏および機械的アロディニアに対する GITRL-GITR 経路阻害の影響

傷害坐骨神経に集積する免疫細胞における GITR-GITRL 経路の機能を検討するため、GITRL に対する中和抗体を用いて疼痛評価を行った。抗 GITRL 抗体 (100 ng)は PSL 直後および PSL3, 6, 9, 12 日目に傷害坐骨神経周囲に局所投与した。

Fig.13 FTY720による血液中T細胞の減少

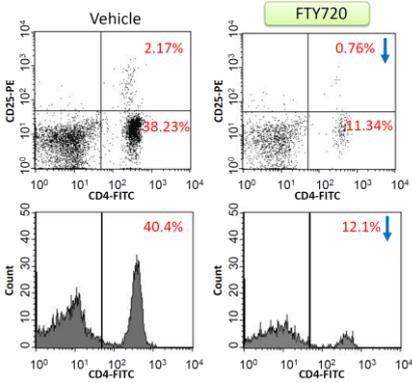
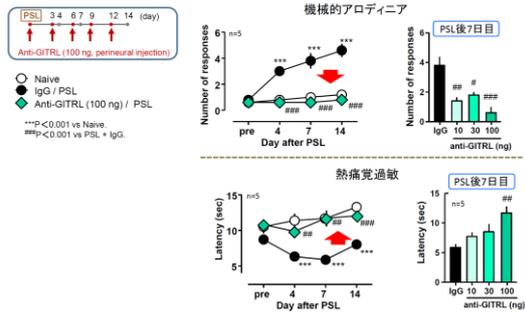
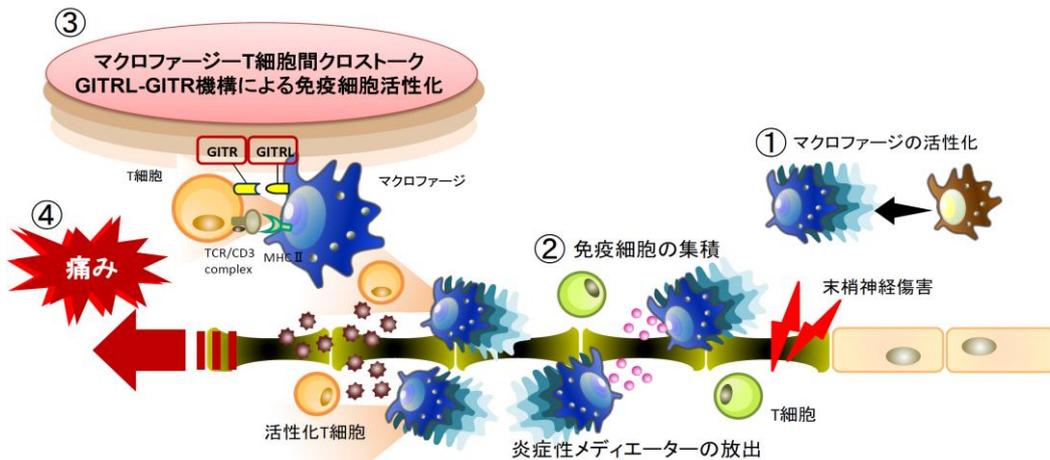


Fig.14 PSL誘発性神経障害性疼痛に対するGITRL中和抗体の影響



PSL 誘発性機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏は GITRL の中和抗体により有意に減弱され、その効果は中和抗体の用量に依存的した (Fig.14)。

本研究結果より、傷害坐骨神経に多数のマクローファージおよび T 細胞が集積し、これらの免疫細胞には共刺激分子である GITR, GITRL が存在することを見出した。またこれらの共刺激分子間の相互作用が神経炎症を介して神経障害性疼痛を誘導することが明らかとなった。本研究では、神経障害性疼痛に対する治療薬創薬ターゲットとしてマクローファージ - T 細胞間クロストーク制御分子の可能性を提唱する (下図)。



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 5 件)

- ① Kobayashi Y, Kiguchi N, Maeda T et al. The critical role of spinal ceramide in the development of partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 421(2), 318-322, 2012. 査読有
- ② Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T et al. Epigenetic augmentation of the MIP-2/CXCR2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves elicits neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 340(3), 577-587, 2012. 査読有
- ③ Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T et al. Activation of nicotinic acetylcholine receptors on bone marrow-derived cells relieves neuropathic pain accompanied by peripheral neuroinflammation. *Neurochem Int.* 61, 1212-1219, 2012. 査読有
- ④ Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 β participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Eur J Pain.* 16, 1271-1280, 2012. 査読有
- ⑤ Kiguchi N, Kobayashi Y and Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol.* 12(1), 55-61, 2012. 査読無

[学会発表] (計 22 件)

国際学会

- ① Kobayashi Y, Kiguchi N, Yohji Fukazawa et al. Matrix metalloprotease 12 derived from macrophages participates in pathogenesis of neuropathic pain. International Symposium for Neuroscience 2013. 2. 26. 仙台.
- ② Kiguchi N, Kobayashi Y and Kishioka S. Macrophage inflammatory proteins contributing to neuropathic pain were upregulated by histone modifications after peripheral nerve injury. International Symposium for Neuroscience 2013. 2. 26. 仙台.
- ③ Kobayashi Y, Kiguchi N and Kishioka S. The critical role of spinal ceramide in the development of partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain in mice. Neuroscience 2012. 2012. 10. 13-17. New Orleans, LA.
- ④ Kiguchi N, Kobayashi Y and Kishioka S.

Augmentation of MIP-2/CXCR2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves facilitates neuropathic pain. Neuroscience 2012. 2012. 10. 13-17. New Orleans, LA.

- ⑤ Kishioka S, Wakida N, Kobayashi Y et al. Nicotine acts on the bone marrow-derived immune cells and prevents neuropathic pain following peripheral nerve injury. Neuroscience 2012. 2012. 10. 13-17. New Orleans, LA.
- ⑥ Kishioka S, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. Novel mediators of peripheral sensitization. 2012. 9. 13-15. Calabria, Italy.
- ⑦ Kishioka S, Maeda T, Kobayashi Y et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation relieves expression of behavioral sensitization to methamphetamine and of neuropathic pain in mice. 2011 meeting of Behavior, Biology and Chemistry: Translational Research in Addiction. 2011. 3. 5-6. San Antonio, TX.
- ⑧ Kishioka S, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. Nicotine prevents neuropathic pain following peripheral nerve injury through the suppression of neuroinflammation. The 42 th International Narcotics Research Conference. 2011. 6. 18-22. Hollywood, FL.
- ⑨ Kobayashi Y, Kiguchi N and Kishioka S. GITRL-GITR pathway involves in neuropathic pain through the crosstalk between macrophages and T-lymphocytes. Italian-Japanese International Seminar for Neurosciences. 2011. 9. 1. 仙台.
- ⑩ Kiguchi N, Kobayashi Y and Kishioka S. Augmentation of MIP-2/CXCR2 axis due to histone H3 acetylation in injured peripheral nerves contributes to neuropathic pain. Italian-Japanese International Seminar for Neurosciences. 2011. 9. 1. 仙台.

国内学会

- ① 小林悠佳, 木口倫一, 岸岡史郎. Ceramide and its metabolite act as enhancer of pain transmission through spinal glial cells. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013. 3. 21-23. 福岡.
- ② 木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎. Angiogenic macrophage contributes to neuropathic pain associated with peripheral neuroinflammation. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013. 3. 21-23. 福岡.
- ③ 岸岡史郎, 木口倫一, 小林悠佳, 門脇友維, 和木田直希. Macrophage-mediated angiogenesis and

neuropathic pain after peripheral nerve injury. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013. 3. 21-23. 福岡.

④小林悠佳, 木口倫一, 前田武彦, 和木田直希, 岸岡史郎.

The role of GITRL-GITR pathway in the development of neuropathic pain. 第 35 回日本神経科学大会. 2012. 9. 18-21. 名古屋.

⑤木口倫一, 小林悠佳, 前田武彦, 岸岡史郎. Nicotinic acetylcholine receptor signaling located on the bone marrow-derived cells relieves neuropathic pain. 第 35 回日本神経科学大会. 2012. 9. 18-21. 名古屋.

⑥小林悠佳, 木口倫一, 和木田直希, 岸岡史郎.

セラミドによる脊髄グリア細胞活性化は神経障害性疼痛に関与する. 第 32 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム. 2012. 9. 15-16. 東京.

⑦木口倫一, 小林悠佳, 前田武彦, 富永信太, 中村淳, 岸岡史郎.

骨髄由来細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体シグナルは神経障害性疼痛を改善する. 第 121 回日本薬理学会近畿部会. 2012. 6. 29. 徳島.

⑧小林悠佳, 木口倫一, 前田武彦, 岸岡史郎. The crosstalk between macrophages and T-lymphocytes plays a crucial role in neuropathic pain. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012. 3. 14-16. 京都.

⑨木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎.

Macrophage inflammatory proteins produce peripheral neuroinflammation leading to neuropathic pain. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012. 3. 14-16. 京都.

⑩小林悠佳, 木口倫一, 岸岡史郎.

神経障害性疼痛におけるマクロファージ-T細胞間クロストークを介した GITRL-GITR 経路の機能解析. 第 120 回日本薬理学会近畿部会. 2011. 11. 11. 京都.

木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎.

MIP-2 が担う神経障害性疼痛形成機構における好中球の役割. 2011. 11. 11. 京都.

⑪小林悠佳, 木口倫一, 岸岡史郎.

傷害後坐骨神経における免疫細胞の集積と GITR および GITRL の発現増加. 第 5 回日本緩和医療学会年会. 2011. 9. 15-16. 幕張.

⑫木口倫一, 小林悠佳, 前田武彦, 中村淳, 富永信太, 岸岡史郎.

末梢ニコチン性アセチルコリン受容体を介する神経障害性疼痛抑制機構. 第 119 回日本薬理学会近畿部会. 2011. 7. 8. 名古屋.

[図書] (計 0 件)

[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.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160416/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 悠佳 (KOBAYASHI YUKA)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 2011562

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし