

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390150

研究課題名(和文)新規自然免疫活性化機構関連分子の神経障害痛発症メカニズムにおける役割の解明

研究課題名(英文) Roles of a newly identified pattern-recognition receptor family which activate innate immunity in development of neuropathic pain.

研究代表者

八坂 敏一 (Yasaka, Toshiharu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20568365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫系細胞と似た機能を持つミクログリアは末梢神経損傷後の脊髄で活性化し神経障害性痛発症に関与する。自然免疫活性化には、パターン認識受容体の役割が重要である。近年ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 関連受容体と呼ばれる新たなパターン認識受容体が報告されたが、神経障害性痛における役割は不明である。ITAM受容体には細胞のダメージから後に続く炎症反応をトリガーするものがある。これらの受容体のノックアウトマウスを用いて、神経障害性痛モデルを調べた結果、ITAM受容体の中には神経障害性痛発症に関与するものがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Microglia are thought to be resident innate immune cells in the central nervous system. It has been reported that microglia in the spinal dorsal horn have important roles in development of neuropathic pain after peripheral nerve injury. On the other hand, pattern-recognition receptors are one of major molecules to activate innate immune cells. Recently, a family of pattern-recognition receptors coupled with ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) has been identified. However, roles of these receptors in neuropathic pain are still unknown. Some members of ITAM-coupled receptors are reported to detect damaged cells and to trigger following inflammatory responses. We observed pain behavior of mice lacking ITAM-coupled receptors after peripheral nerve injury and found that these mice displayed differences in pain behavior compared to wild type mice. These findings suggest that ITAM-coupled receptors contribute to development of neuropathic pain.

研究分野：疼痛学

キーワード：神経障害性痛 ミクログリア 神経免疫関連 パターン認識受容体 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みの発生機序には様々な要因があり、未だ不明な点が多く、治療を困難にしている。慢性化すると、痛みによる精神的苦痛や身体可動域制限などが著しいQOLの低下を起こす。慢性痛の中には、帯状疱疹後神経痛、術後痛、糖尿病による痛みなどがあり、これらは体性感覚系の損傷や疾患によって直接引き起こされるため、神経障害性痛と呼ばれ、自発痛、痛覚過敏、アロディニアなどの症状が見られる。これらは鎮痛薬のNSAIDsやオピオイドが奏効しにくいいため、世界的に多くの患者が苦しんでいる。近年津田らにより末梢神経損傷後に脊髄内のミクログリア細胞が活性化し、痛みの発生機序に重要な役割を担っていることが報告され、大きなブレイクスルーとなった^{1,2)}。以来、脊髄ミクログリアの研究は盛んに行われ新たな知見が発見されてきた。ミクログリアは中枢神経系のマクローファージと呼ばれ、サイトカインやケモカインなどを分泌して炎症反応を惹起し、いわゆる自然炎症あるいは神経炎症と言われる病態を引き起こすと考えられる。また、神経栄養因子も放出して神経細胞にも直接作用する。一方他のグリア細胞、特にアストロサイトの活性化・サイトカイン産生などの重要性も明らかとなってきた。

(2) 細菌やウイルス等には、病原体特有の分子構造 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) があり、自然免疫系細胞にはこれらを認識する受容体がある。さらに、炎症やストレス等により体内の細胞に障害が生じた場合に放出される分子群は、ダメージ関連分子構造 (damage-associated molecular patterns; DAMPs) と呼ばれ、自然免疫系細胞には、これらを認識する受容体も存在する。このような受容体によって自然免疫系細胞は、異物の進入や組織ダメージなどの異変を速やかに感知して活性化し、炎症性サイトカインなどを産生して免疫反応を惹起する。Toll like receptor (TLR)、特にTLR4は、細菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) を認識する代表的なPAMPs受容体で、盛んに研究が行われてきている。しかし、近年TLRによらないPAMPs受容体が自然免疫系を活性化することが報告され注目されている³⁾。それらは多種多様であるが、活性化シグナルをITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を介して伝える共通点があり、ITAM関連受容体とも表現される。ITAM関連受容体はTLRと比較して種類が豊富であり、異なるスペクトラムのPAMPsを認識する。また、DAMPsを認識して自然免疫を活性化することが報告されている。神経障害性痛発症メカニズムにおけるTRLの役割についての研究は報告されているが、ITAM関連受容体についての研究は未だ報告がない。

(3) 神経障害性痛の発症メカニズムを考える際には、ミクログリアやアストロサイトの変動が、どのように脊髄後角の神経細胞に影響し、結果として神経ネットワークの出力を増強するのかを考えなければならない。しかし、これらについては未だ分かっていない。脊髄後角の神経ネットワークは、不明な点が多いが近年盛んに研究されており、その概略が次第に明らかとなってきている。グリア細胞と神経ネットワークの関係を明らかにすることは非常に重要である。

2. 研究の目的

(1) 研究の背景に述べたように、神経障害性痛発症メカニズムに脊髄内ミクログリアが関与し、その活性化によって脊髄内の炎症様病態が起こっていると考えられる。しかし、ミクログリアを活性化するメカニズムは、依然として不明な点が多い。そこで我々は、神経切断からミクログリア活性化に至るプロセスに、組織損傷による細胞のダメージを検知することができるITAM関連受容体が関与しているのではないかと仮説を立てた。本研究の目的はその仮説を検証することである。

(2) ITAM関連受容体には様々な分子が含まれる。もしITAM関連受容体が神経障害性痛に関与しているのであれば、そのうちどの様な分子が関与しているのか、その分子はどの様な細胞に発現しているのか、常に発現しているのか誘導されてくるのか等について調べ、神経障害性痛発症メカニズムにどの様にこれらの受容体が関与しているのかについて明らかにする。

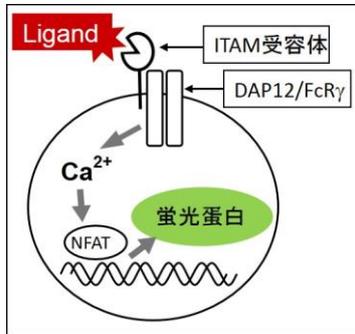
3. 研究の方法

(1) ITAM関連受容体ノックアウトマウスを用いて痛み関連行の解析を行った。ITAM関連受容体の多くは受容体分子自体にITAMを持っておらず、DAP12 (DNAX activating protein of 12 kDa) やFc受容体 γ 鎖等のITAMを持っている分子と会合している。従って、これらの会合分子のノックアウトマウスを解析することによって、DAP12会合あるいはFc受容体 γ 鎖会合ITAM受容体分子群の特徴を調べることができる。これらのマウスを用いて末梢神経損傷モデルを作製し、痛み行動を野生型マウスと比較した。また、これらの分子の他、受容体シグナルの下流に位置するシグナル分子や受容体分子等についても実験を行ったが、報告書ではDAP12及びFc受容体 γ 鎖ノックアウトマウスについて述べる。

(2) 野生型マウスにおいて末梢神経損傷後に見られる脊髄ミクログリアの増殖が、ITAM関連受容体欠損により影響を受けるかどうかを調べた。そのため脊髄切片を免疫組織化学法により染色した。アストロサイトに関しても調べた。

(3) 末梢神経を損傷した野生型マウスの脊髄と後根神経節から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により、ITAM 関連受容体や会合分子の遺伝子発現の時間経過を調べた。

(4) ITAM 関連受容体を活性化する内因性リガンドの検索を行った。ITAM 関連受容体の刺激により蛍光タンパク質を発現する培養細胞（レポーター細胞）を、末梢神経を損傷した野生型マウスの脊髄抽出物で刺激し、

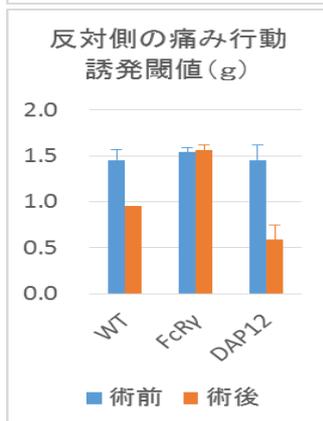
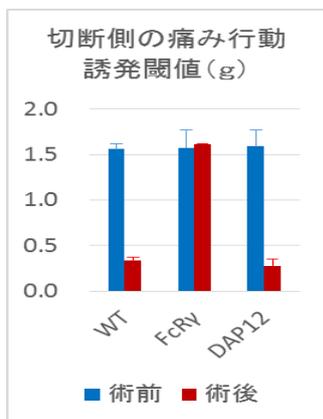


蛍光タンパク質の発現を調べた。

(5) 末梢神経損傷後に脊髄内で炎症性サイトカインやケモカイン、ミクログリア関連分子等の遺伝子発現が増加する。ITAM 関連受容体欠損がこれらの遺伝子発現にどのような影響を与えるかについてリアルタイム PCR 法による定量を行った。

4. 研究成果

(1) ITAM 関連受容体会合分子ノックアウトマウスの末梢神経障害後の痛み関連行を解析結果、通常野生型マウスでは障害側のみの閾値の低下が起るのに対して、DAP12 ノックアウトマウスでは、障害側のみでなく健常側にまで閾値の低下が見られた。この現象はミラーイメージペイントと呼ばれる。この結果により、DAP12

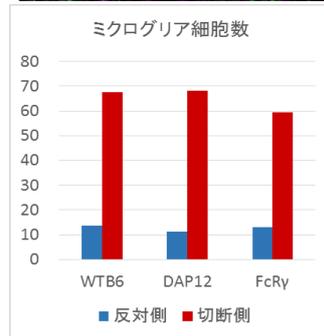
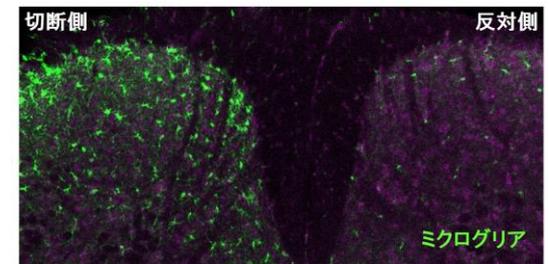


には病態の広がる範囲を規定する役割を持っている可能性があることを示唆している。すなわち、炎症が必要以上に広がるのを抑制しているのかもしれない。

また、Fc 受容体 γ 鎖のノックアウトマウスでは障害側においても閾値の低下が抑制された。この結果により Fc 受容体 γ 鎖には神経障害

による閾値の低下を誘導する役割、すなわち神経障害性痛発症のメカニズムに与与することが示唆された。

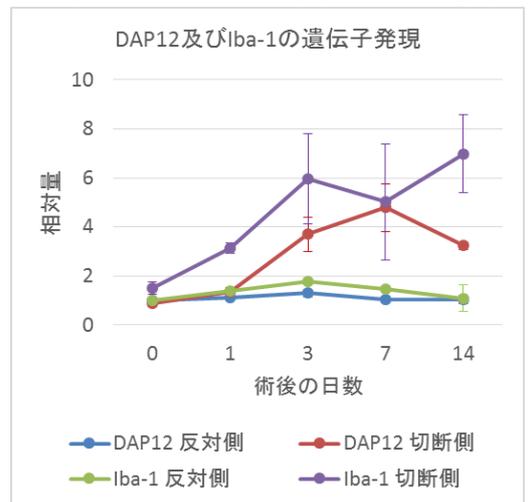
(2) 痛み行動実験により野生型マウス、DAP12 ノックアウトマウス及び Fc 受容体 γ 鎖ノックアウトマウスの間で異なった表現型が得られたことから、脊髄内のミクログリア



の増殖にも差があると予想された。ところが、末梢神経切断から1週間後において、各マウス系統の脊髄ミクログリアの細胞数を計測したところ、

予想に反してノックアウトマウスにおいても野生型と同様の増加が観察された。この結果により、痛み行動発症には、単にミクログリアの細胞数が増加するのではなく、ミクログリアの質的な変化が必要であることが示唆された。これまでも、他の分子に関する報告において、神経切断後に脊髄ミクログリアの増殖は見られるが痛み行動の発症が見られなかった報告もなされている。それらの分子との関係を今後明らかにする必要がある。

(3) 末梢神経損傷後の脊髄内においてこれらの遺伝子発現が増加するかどうかを調べた結果、DAP12 の遺伝子発現が神経損傷後に増加していることが分かった。この増加はミクログリアのマーカーである Iba-1 の増加と



同様であったため、ミクログリアにおいて DAP12 が発現していることが示唆された。DAP12 発現細胞を直接同定するためには、通常 DAP12 特異的な抗体を用いた免疫染色を行うが、この方法に用いることができる抗体は現時点で市販されていないようである。

(4) 末梢神経切断後に脊髄ミクログリアを活性化する分子を検索するために、上述したレポーター細胞を脊髄抽出物で刺激し検索を試みたいが、残念ながら陽性反応を得ることはできなかった。脊髄ミクログリアにおける作用を想定していたが、この実験で用いた ITAM 受容体は脊髄では発現しておらず、後根神経節で発現していることが、後に明らかとなった。従って、今後は損傷部位の組織抽出物を用いてレポーター細胞を刺激して実験を行う必要がある。

(5) ITAM 受容体の欠損が脊髄内の炎症性サイトカインの遺伝子発現にどのような影響を与えるかを調べるため、神経切断から1週間後の脊髄から RNA を抽出し、リアルタイム PCR による定量を行った。実験系の立ち上げから開始したため、安定した結果を得るまでに時間を要してしまった。これまでに文献によって報告されている様々な遺伝子について行動実験と一致するような遺伝子発現の増減をしている分子を検索しているが、これまでのところその発見には至っていない。

(6) 本研究により得られたデータから右図に示すような考察が可能である。

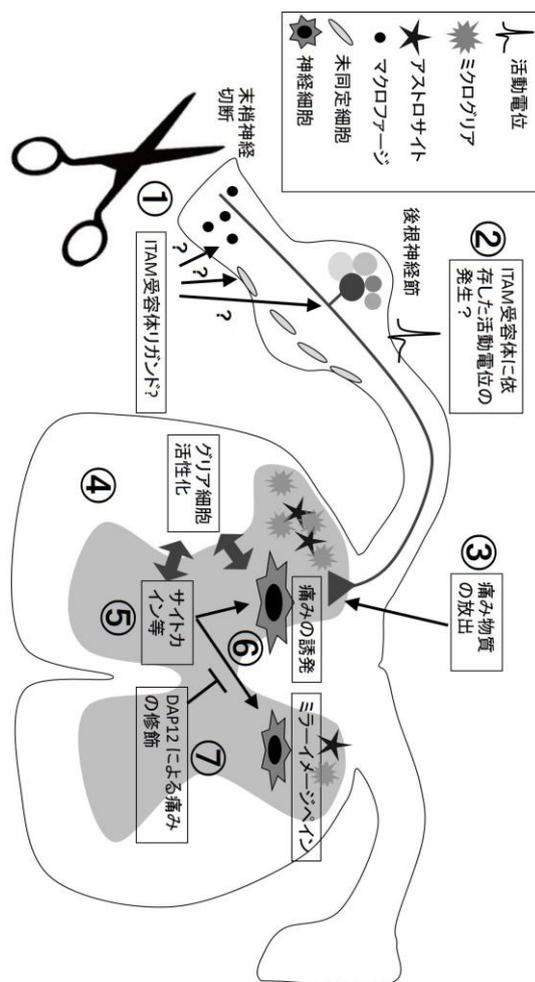
①末梢神経を切断することによりダメージを受けた細胞から ITAM 受容体を活性化しうる物質が放出される。その結果、損傷部位周辺に存在すると考えられる ITAM 受容体を発現している細胞が修飾を受ける。

②ITAM 受容体による修飾が後根神経節細胞（末梢神経の細胞体で脊髄の2次感覚神経に連絡している）の活動性（活動電位の発射頻度や遺伝子発現など）に変化を与える。

③後根神経節細胞の変調により、痛み物質の放出が促進され、それが脊髄内の2次感覚神経に作用して痛みの誘発が起こる。

④後根神経節細胞から放出される物質や損傷を受けた後根神経節細胞の脊髄内の終末部の変性等により、脊髄内のミクログリアやアストロサイトに影響を与え増殖や質的変化をもたらす。

⑤脊髄内の神経細胞やグリア細胞、あるいは血管内皮細胞等がサイトカインやケモカイン等の免疫分子を放出し炎症（様）状態となる。



⑥免疫分子が脊髄内に放出され、さらに神経細胞やグリア細胞の相互作用が起こり、神経障害性痛発症のプロセスが進行する。

⑦DAP12 はミラーイメージペインを抑制する作用があることから、炎症（様）状態を適度に抑制する役割を持つと考えられる。

以上の結果から、ITAM 関連受容体は神経障害性痛発症メカニズムにおいて、いくつかのプロセスに関与しており、また、促進的役割を持つ受容体や抑制的役割を持つ受容体があることが示唆された。これらの分子の作用部位を解明することにより、新たな治療薬の開発に寄与できると考えられる。

<引用文献>

① Tsuda et al. Nature 424, 778-83, 2003
 ② Coull et al. Nature 438, 1017-21, 2005
 ③ Hara et al. Nat Immunol 8, 619-29, 2007

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

① Toshiharu Yasaka, Sheena YX Tiong, Erika Polgár, Masahiko Watanabe, Eiichi Kumamoto, John S Riddell, Andrew J Todd. A putative relay circuit providing low-threshold

mechanoreceptive input to lamina I projection neurons via vertical cells in lamina II of the rat dorsal horn. Molecular Pain 査読有、vol. 10、2014、3、doi: 10.1186/1744-8069-10-3.

[学会発表] (計 2 1 件)

- ① Asako Ishikawa, Mincle is required for development of tactile allodynia in the mouse model of neuropathic pain、平成 2 7 年 3 月 1 4 日、3rd ITAM workshop、J R 博多シテイ
- ② 石川 亜佐子、八坂 敏一、村田 祐造、原 博満、笹栗 智子、園畑 素樹、吉田 裕樹、平川 奈緒美、DAP12 欠損による疼痛行動の変化 (ノックアウトマウスの解析)、第7回日本運動器疼痛学会、平成 2 6 年 1 0 月 2 6 日、ANA クラウンプラザホテル宇部
- ③ 八坂 敏一、痛いの痛いの飛んでいけ : ゲートコントロール説の神経回路に重要である脊髄後角神経細胞の解析、第 24 回日本病態生理学大会、平成 2 6 年 8 月 8 日、北九州国際会議場
- ④ Toshiharu Yasaka, Possible roles of ITAM receptor signaling in neuropathic pain after peripheral nerve injury、平成 2 5 年 3 月 2 3 日、九州大学
- ⑤ 八坂 敏一、村田 祐造、飯笹 英一、池田 弘、津田 誠、園畑 素樹、笹栗 智子、平川 奈緒美、藤田 亜美、熊本 栄一、増子 貞彦、井上 和秀、吉田 裕樹、山崎 晶、原 博満、新規自然免疫活性化受容体の神経障害痛発症における役割 - ノックアウトマウスを用いた行動学的検討 - 、平成 24 年度生理学研究所研究会 痛み研究の新たな展開、平成 2 4 年 1 2 月 1 4 日、自然科学研究機構岡崎バイオサイエンスセンター
- ⑥ 村田 祐造、八坂 敏一、原 博満、李明子、藤田 亜美、津田 誠、井上 和秀、熊本 栄一、吉田 裕樹、増子 貞彦、DAP12 および CARD9 ノックアウトマウスによる神経障害痛モデルの組織学的検討、第 35 回日本神経科学大会、平成 2 4 年 9 月 1 8 日、名古屋国際会議場

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 疼痛発症モデル動物および疼痛治療薬
発明者 : 吉田 裕樹、原 博満、八坂 敏一、村田 祐造、笹栗 智子、平川 奈緒美
権利者 : 佐賀大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2013-183612

出願年月日 : 平成 2 4 年 9 月 5 日

国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八坂 敏一 (YASAKA, Toshiharu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 2 0 5 6 8 3 6 5

(2) 研究分担者

原 博満 (HARA, Hiromitsu)

鹿児島大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授

研究者番号 : 2 0 3 9 2 0 7 9

村田 祐造 (MURATA, Yuzo)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号 : 2 0 1 2 8 1 4 3

池田 弘 (IKEDA, Hiroshi)

福井大学・工学系研究院・教授

研究者番号 : 8 0 3 7 7 4 7 3

(3) 連携研究者

津田 誠 (TSUDA, Makoto)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号 : 4 0 3 7 3 3 9 4

山崎 晶 (YAMASAKI, Sho)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号 : 4 0 3 1 2 9 4 6

(4) 研究協力者

平川 奈緒美 (HIRAKAWA, Naomi)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号 : 2 0 1 7 3 2 2 1

園畑 素樹 (SONOHATA, Motoki)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号 : 5 0 3 0 4 8 9 5

飯笹 英一 (IIZASA, Eiichi)

鹿児島大学・医歯 (薬) 学総合研究科・助教

研究者番号 : 2 0 6 3 1 9 9 8

笹栗 智子 (SASAGURI, Tomoko)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 0 0 3 8 0 7 6 7

石川 亜佐子 (ISHIKAWA, Asako)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 9 0 4 0 4 1 2 8