

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590730

研究課題名(和文)慢性疼痛を担う神経-血管新生ネットワークの分子基盤解明

研究課題名(英文) Identification of crosstalk between pathological angiogenesis and neurons in regulating chronic pain

研究代表者

岸岡 史郎 (Kishioka, Shirō)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60137255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経-血管新生ネットワークに基づく、慢性疼痛の分子メカニズム解明を目的とした。末梢神経傷害後にはマクロファージや好中球などの免疫細胞が浸潤し、血管新生促進因子であるVEGFを産生していた。組織化学的解析により、傷害後の末梢神経では病的な血管新生の亢進が観察され、これはVEGFシグナルによる血管内皮細胞の増殖により裏付けられた。薬理的にVEGFシグナルを抑制阻害すると、神経傷害に伴う慢性疼痛が改善された。結論として、傷害神経におけるVEGFシグナル依存的な異常血管新生は慢性疼痛の増悪因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined the molecular mechanism of chronic pain through relationship between neuron and angiogenesis. Macrophages and neutrophils were accumulated into peripheral nerves after injury, and they produced vascular endothelial growth factor (VEGF). We identified the progression of pathological angiogenesis in the injured nerves using immunohistochemistry, and these phenomenon was confirmed by proliferation of endothelial cells by VEGF signaling. Moreover, pharmacological inhibition of VEGF signaling was able to prevent injury-induced chronic pain. In conclusion, we propose that VEGF signaling-dependent pathological angiogenesis in the injured peripheral nerves might be key component of chronic pain.

研究分野：薬理学、疼痛学

キーワード：慢性疼痛 神経障害性疼痛 血管新生 VEGF サイトカイン 炎症 血管内皮細胞 ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経系の損傷や機能障害に起因する慢性疼痛は従来の鎮痛薬に抵抗性を有し、新規治療戦略に繋がる創薬シーズが探索されている。近年では疼痛伝達経路における神経、グリア細胞および免疫細胞のクロストークを介した慢性炎症が慢性疼痛に重要な役割を果たすとされており、その分子基盤解明が疼痛研究における重要課題である。

(2) 申請者らはサイトカインネットワークが仲介する末梢神経炎症(末梢感作)の重要性を提唱してきた。末梢脂肪細胞由来アディポカインであるレプチンがグリア細胞および免疫細胞を活性化し、慢性疼痛の形成に重要な役割を果たすことを見出している。またレプチンシグナルに依存するマクロファージ炎症性タンパク質などのケモカイン発現変動が慢性疼痛の形成を担っており、それらはエピジェネティクス制御により調節されていることを世界で初めて明らかにしている(PNAS 2009; Pain 2010)。アディポカイン-ケモカインネットワークの調節機構および標的細胞応答を含めた総合的理解を深めることにより、治療への応用を視野に入れた慢性疼痛研究の更なる発展が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、末梢感作依存的な慢性疼痛制御を担う神経-血管新生ネットワークの分子基盤を解明すると共に、末梢慢性疼痛形成機構の総合的理解を目的とした。種々のサイトカインにより制御される血管新生はエネルギー供給および免疫細胞の局所輸送を担い、損傷治癒において重要な役割を果たす。その一方、悪性腫瘍の微小環境において血管新生は炎症を増悪し、腫瘍増殖を促進する。よって血管新生は神経傷害後の末梢感作においても重要な役割を果たすことが示唆される。申請者らは傷害後の末梢神経において免疫細胞(単球、好中球、リンパ球)の浸潤を確認している。さらに血管内皮細胞マーカーであるCD31および血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現増加が起こることを既に明らかにしており、傷害により破綻した神経-血管ネットワークの再構築が末梢感作に重要であることを裏付けている(図1)。

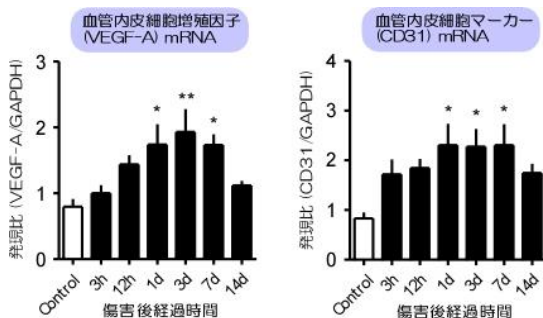


図1: 傷害神経における血管新生因子発現増加

(2) 以上の点を踏まえ、傷害により増加する疼痛メディエーターと神経-血管新生ネットワークの時間・空間的な制御機構との関連性は慢性疼痛の病態理解に重要な要素であると考えられる。本研究により疼痛研究において過去に類を見ない新たな知見を提供し、慢性疼痛制御機構の解明と新規治療戦略の確立が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 坐骨神経部分結紮: ICR系雄性マウス(20-25g)を用い、ペントバルビタール麻酔下にて後肢坐骨神経の約1/3を縫合糸できつく結紮した。使用薬物はPBSまたはDMSOに溶解し、坐骨神経周囲に投与量を10μlとして局所投与した。

(2) RT-リアルタイムPCR: 坐骨神経より総RNAを抽出し、cDNAを作製した。SYBR Greenの蛍光強度を指標とした定量的リアルタイムPCRを行い、各々のmRNA発現を定量化した。

(3) 組織化学解析: 深麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、蛍光色素DiIを灌流して血管内皮細胞を標識した。摘出した坐骨神経組織をCD31抗体にて染色し、倒立型蛍光顕微鏡にて蛍光を観察した。また坐骨神経の凍結組織切片を作成し、各々の特異的抗体と共にインキュベートした。共焦点レーザー顕微鏡にて目的タンパク質の発現を評価した。

(4) クロマチン免疫沈降: 坐骨神経よりヒストン-DNA複合体を調整した。アセチル化およびメチル化ヒストンH3特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、DNAを抽出した。プロモーター領域に特異的なプライマーを用いたPCRにより、ヒストン修飾を評価した。

(5) 疼痛行動評価: 金網上で馴化させたマウスの後肢足底中央を屈曲圧0.07gまたは0.16gのvon Freyフィラメントで刺激し、逃避反応を示した回数増加により触アロディニアを評価した。強化ガラス板上で馴化させたマウスの後肢足底中央に放射熱を照射し、逃避反応を示すまでの潜時の短縮により熱痛覚過敏を評価した。

4. 研究成果

(1) マクロファージおよび好中球におけるVEGFA発現増加: マウスの坐骨神経に部分結紮を施すと、傷害部位におけるVEGFA mRNAの発現増加が認められた。同様にVEGFAタンパク質の発現増加も観察され(図2)、その産生源は血中より傷害部位に浸潤したマクロファージおよび好中球であることが示された。

(2) ヒストン修飾に基づくVEGFA発現増

加機構：VEGFA の発現調節機構について検討したところ、そのプロモーター領域において遺伝子転写を促進的に制御するヒストン H3 のアセチル化 (K9) やトリメチル化 (K4) が生じていた。末梢神経傷害後に集積するマクロファージおよび好中球において、ヒストン修飾変化に依存した VEGFA の発現増加が示唆された。

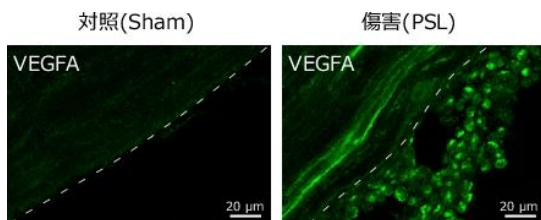


図2: 傷害坐骨神経におけるVEGF発現

(3) 傷害坐骨神経における VEGF 受容体発現増加：VEGF 受容体には VEGFR1 および VEGFR2 が知られており、傷害坐骨神経においてはその両者の発現が認められた。VEGFR1 はマクロファージおよび血管内皮細胞に発現しており、一方で VEGFR2 は血管内皮細胞にのみ局在していた。

(4) 傷害坐骨神経における異常血管新生の亢進：蛍光色素 DiI を用いて血管内皮細胞を標識する組織化学解析により、傷害坐骨神経における長期的な病的血管新生が観察された (図3)。この血管新生は血管内皮細胞の増加によっても裏付けられた。傷害末梢神経における血管新生の亢進は慢性神経炎症の重要な構成要素であることが示唆された。

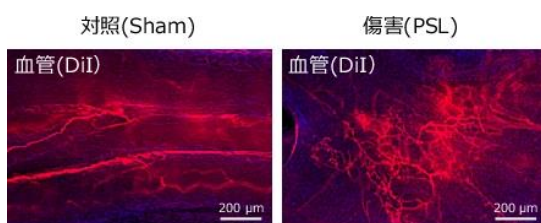


図3: 傷害坐骨神経における異常血管新生

(5) 神経障害性疼痛における VEGF シグナルの関与：坐骨神経傷害により惹起される触アロディニアおよび熱痛覚過敏は、VEGFA 中和抗体を傷害部位に局所投与することにより抑制された。VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬もまた、神経障害性疼痛に対する抑制効果を有していた。よって VEGF シグナルは神経障害性疼痛に関与することが示唆された。

(6) まとめ：本研究の結論として、傷害末梢神経に浸潤するマクロファージおよび好中球において VEGFA が発現増加し、マクロファージまたは血管内皮細胞に発現する VEGFR を介して病的血管新生が誘導される

(図4)。この VEGFA-VEGFR シグナルは末梢神経感作に基づく神経障害性疼痛の重要な病態分子基盤であることが明らかとなった。

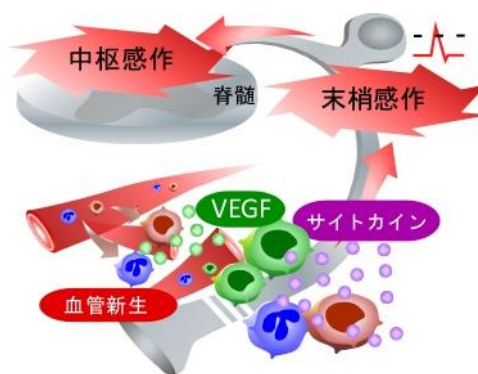


図4: 神経-血管新生クロストークと慢性疼痛

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 9 件)

① Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S: Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain* 2015; 156(4): 684-693. 査読有. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000097.

② Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S: Peripheral alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor signaling attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia after nerve injury in mice. *Acta Physiol* 2015; 213(2): 462-471. 査読有. doi: 10.1111/apha.12437.

③ Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Kishioka S: Epigenetic regulation of CC-chemokine ligand 2 in nonresolving inflammation. *Biomol Concepts* 2014; 5(4): 265-273. 査読有. doi:10.1515/bmc-2014-0022.

④ Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S: Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. *J Neurochem* 2014; 129(1): 169-178. 査読有. doi: 10.1111/jnc.12614.

⑤ Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Kishioka S: Epigenetic upregulation of CCL2 and CCL3 via histone modifications in infiltrating macrophages after

peripheral nerve injury. *Cytokine* 2013; 64(3): 666-672. 査読有. doi: 10.1016/j.cyto.2013.09.019.

⑥ Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, Tominaga S, Nakamura J, Fukazawa Y, Ozaki M, Kishioka S: Activation of nicotinic acetylcholine receptors on bone marrow-derived cells relieves neuropathic pain accompanied by peripheral neuroinflammation. *Neurochem Int* 2012; 61(7): 1212-1219. 査読有. doi: 10.1016/j.neuint.2012.09.001.

⑦ Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 β participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Eur J Pain* 2012; 16(9): 1271-1280. 査読有. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00146.x.

⑧ Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, Fukazawa Y, Tohya K, Kimura M, Kishioka S: Epigenetic augmentation of the macrophage inflammatory protein 2/C-X-C chemokine receptor type 2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves elicits neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 340(3): 577-587. 査読有. doi: 10.1124/jpet.111.187724.

⑨ Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S: Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12(1): 55-61. 査読無 (招待). doi: 10.1016/j.coph.2011.10.007.

[学会発表] (計 15 件)

①小林悠佳、他：末梢免疫細胞を標的とした神経障害性疼痛病態の解明、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場 (名古屋)。

②門脇友維、他：マクロファージ由来血管内皮細胞増殖因子は神経障害性疼痛に関与する、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場 (名古屋)。

③門脇友維、他：末梢性神経障害性疼痛におけるマクロファージ由来血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の関与、第 126 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 10 月 24 日、和歌山県 JA ビル (和歌山)。

④木口倫一、他：マクロファージを標的とした神経障害性疼痛治療戦略の検討、第 34

回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2014 年 9 月 6 日、東京都医学総合研究所 (東京)。

⑤Kiguchi N, Kishioka S: Peripheral macrophages in long-lasting neuroinflammation and neuropathic pain、生体機能と創薬シンポジウム 2014、2014 年 8 月 29 日、近畿大学東大阪キャンパス (大阪)。

⑥小林悠佳、他：傷害坐骨神経周囲の新生血管網形成とマクロファージ、生体機能と創薬シンポジウム 2014、2014 年 8 月 28 日、近畿大学東大阪キャンパス (大阪)。

⑦Kiguchi N、他：Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves mediates peripheral sensitization in neuropathic pain、29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology、2014 年 6 月 23 日、バンクーバー (カナダ)。

⑧岸岡史郎、他：神経障害性疼痛治療標的としての末梢ニコチン性アセチルコリン受容体、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター (仙台)。

⑨門脇友維、他：マクロファージ由来 VEGF は血管新生および神経障害性疼痛に関与する、第 124 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 11 月 1 日、京都ガーデンパレス (京都)。

⑩木口倫一、他：神経障害性疼痛における末梢性 VEGF シグナルの関与、第 33 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2013 年 9 月 6 日、神戸大学医学部会館 (神戸)。

⑪木口倫一、岸岡史郎：傷害末梢神経におけるヒストン修飾は神経障害性疼痛を調節する、第 35 回日本疼痛学会、2013 年 7 月 13 日、大宮ソニックシティ (さいたま)。

⑫木口倫一、他：マクロファージによる血管新生と神経障害性疼痛、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡)。

⑬木口倫一、他：血管新生マクロファージは末梢神経炎症を伴う神経障害性疼痛に関与する、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日、福岡国際会議場 (福岡)。

⑭Kishioka S、他：Nicotine acts on the bone marrow-derived immune cells and prevents neuropathic pain following peripheral nerve injury、*Neuroscience* 2012、2012 年 10 月 16 日、ニューオリンズ (アメリカ)。

⑮木口倫一、岸岡史郎： マクロファージ炎症性タンパク質は末梢神経炎症を介して神経障害性疼痛を惹起する、第 34 回日本疼痛学会、2012 年 7 月 21 日、熊本市国際交流会館（熊本）。

〔その他〕

①和歌山県立医科大学医学部薬理学教室ホームページ

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160416/index.html>

②木口倫一、岸岡史郎： 傷害神経における VEGF シグナルは末梢神経感作に基づく神経障害性疼痛に関与する、BioMed サークラス.com、執筆者自身による研究論文レビュー
http://biomedcircus.com/paper_03_28.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸岡 史郎 (KISHIOKA, Shiroh)

和歌山県立医科大学医学部・教授

研究者番号： 60137255

(2) 研究分担者

木口 倫一 (KIGUCHI, Norikazu)

和歌山県立医科大学医学部・講師

研究者番号： 90433341

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： 20511562

(4) 研究協力者

門脇 友維 (KADOWAKI, Yui)