

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590734

研究課題名(和文) 脂肪組織リモデリングを標的としたTRPチャンネルが担う新規疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on novel mechanism for TRPV1-mediated control of neuropathic pain

研究代表者

前田 武彦 (Takehiko, Maeda)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50271010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、TRPV1による脂肪細胞および免疫細胞の機能調節が神経障害性疼痛を緩和する可能性およびその分子機構を明らかにすることである。神経障害性疼痛モデルマウスの解析により、神経障害部位における免疫細胞の集積及び脂肪細胞の肥大化が生じること、ならびに免疫細胞のTRPV1活性化は疼痛抑制につながることを明らかにした。培養細胞を用いた実験から、免疫細胞と脂肪細胞の相互作用による炎症応答を免疫細胞のTRPV1活性化は抑制することを明らかにした。本研究の成果は、免疫細胞のTRPV1が神経障害性疼痛制御分子としての可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We studied mechanisms for TRPV1-mediated control of neuropathic pain in mice. We found recruitment of immune cells and differentiation and hypertrophy of adipocyte in the injured sciatic nerve tissue. Stimulation of TRPV1 on immune cells inhibited the development of neuropathic pain. Interaction of immune cells and adipocytes in the injured nerve tissue facilitates the development of neuropathic pain, revealed by gene expression profiling in co-culture of immune cells and adipocytes. These studies suggest that TRPV1 on immune cells is a target molecule for the control of neuropathic pain.

研究分野：疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は神経損傷や機能障害を原因とする耐え難い痛みである。その病態生理学的裏付けとして、脊髄ミクログリア細胞の活性化を含む神経炎症反応の関与が慢性疼痛形成の共通基盤として提唱されてきた。しかし、神経障害性疼痛を合併する病態は数多く存在し、疼痛の誘導および維持機構は多様であり、各病態に応じた予防と治療を図ることが求められている。例えば、糖尿病合併症である末梢神経障害の痛みは、現行の治療概念に基づく薬剤では有効性が限られており、十分な除痛が行われていないのが現状である。我々は、最近、末梢神経損傷に基づく神経障害性疼痛のモデル動物を用いて、疼痛成立の新たな機序を検索した。その結果、損傷部位の脂肪組織に炎症性マクロファージが集積し、それに伴い脂肪細胞が肥大する形態変化を見いだした。さらに、脂肪細胞由来のレプチン、ならびに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、疼痛の発現に関わることを明らかにした。この知見は脂肪細胞と免疫細胞が疼痛の誘導・維持過程に必須である可能性を示唆するものである。この過程の制御を目指した治療標的の探索と薬剤開発は重要と考えられるが、このような研究は国内外に見当たらなかった。

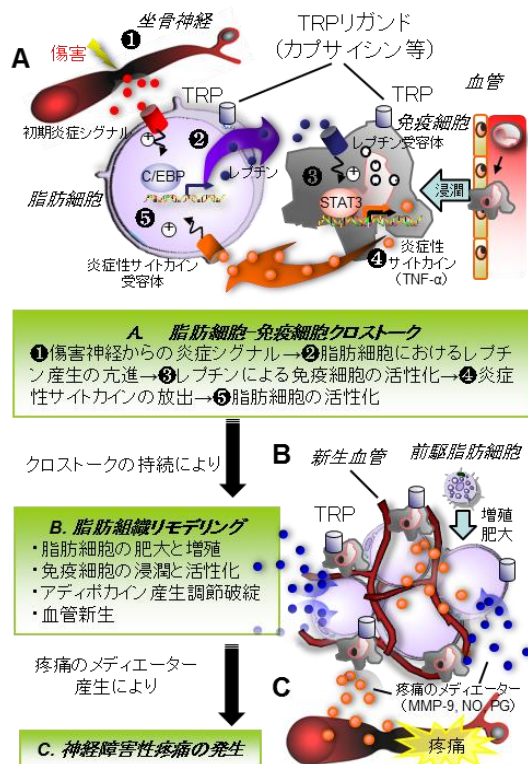


図1. 神経障害性疼痛の形成機構

2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した脂肪細胞と免

疫細胞のクロストークによる新規疼痛形成機構のより詳細な解析と、TRP (transient receptor potential) チャネルファミリーの活性調節による疼痛制御について、以下の仮説を提唱し、モデル動物を用いた実験により検証する。

仮説：1) 脂肪組織のリモデリングは疼痛を遷延する、2) TRP チャネルの活性制御は、脂肪細胞と免疫細胞の細胞間クロストークを抑制することにより、疼痛の慢性化を抑える。

3. 研究の方法

1) 疼痛モデルにおける遺伝子発現ならびに免疫組織化学的解析

神経障害性疼痛モデル (坐骨神経部分結紮マウス) を用いて、脂肪細胞と免疫細胞のそれぞれのマーカー分子、相互作用に関係するマーカー分子、疼痛形成に関与するとされているサイトカインおよびケモカインについて、RT-PCR法により mRNA 発現解析を行った。また、坐骨神経組織の免疫組織化学的解析を行い、マーカー分子の分布と発現の程度を調べた。

2) 疼痛モデルの疼痛行動評価

Seltzer らの方法に従い、マウスの坐骨神経 (SCN) の部分結紮 (PSL) を行い、神経障害性疼痛モデルを作製した。TRPV1 アゴニストであるカプサイシン (CAP) を PSL7 日目に SCN 周囲に投与した。PSL28 日目に von Frey フィラメントによる触アロディニアの評価および、Hargreaves 法による熱痛覚過敏の評価を行った。実験動物としては、TRPV1 ノックアウトマウス (TRPV1-KO)、その対照群として野生型マウスを用いた。

3) 細胞間クロストーク制御機構の解析

免疫細胞と脂肪細胞のクロストークを担うメディエーターの発現変化に及ぼす影響について検討した。継代細胞である J774A (マクロファージ細胞株) および 3T3-L1 (脂肪細胞株) の共培養し、メディエーター分子の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法により解析した。さらに、カプサイシン添加のそれにおよぼす影響について検討した。

4) 免疫細胞 TRPV1 の疼痛形成における機能的役割の検討

免疫細胞に発現する TRP 分子を TRP リガンドが標的にすることを明らかにするために、骨髄移植手技を用いて、TRP リガンドの鎮痛効果を評価した。TRP ノックアウトマウス (TRP-KO) から野生型マウス (WT) へ骨髄移植を行い、骨髄キメラマウスを作製した。具体的には、TRP-KO から採取した骨髄を WT に投与し、WT の造血系幹細胞を TRP-KO のそれに置換した。これにより、WT の免疫細胞は TRP-KO のそれに置換された (TRP-KO→WT)。

TRP-KO→WT マウスと、対照群として WT から WT へ骨髄移植したマウス (WT→WT) について疼痛モデルを作製し、TRP リガンドの鎮痛効果を評価した。

4. 研究成果

1) 脂肪細胞及び免疫細胞の表現形の変化

坐骨神経部分結紮 (PSL) による神経障害性疼痛モデルを用いて、坐骨神経組織における免疫細胞と脂肪細胞の RT-PCR による mRNA 発現解析を行った。その結果、PSL 後 3 から 4 週目において、脂肪細胞の成熟型への分化ならびに肥大化のマーカー分子の発現増加がみとめられた。坐骨神経組織全載標本の BODIPY 染色により、神経上膜に分布する脂肪細胞の肥大化がみとめられた。一方、免疫細胞について検討したところ、炎症型マクロファージ (M1) のマーカー分子ならびに、選択的活性化型マクロファージ (M2) のマーカー分子の発現増加がともにみとめられた。免疫組織学的染色により M1 型マクロファージと M2 型マクロファージの細胞数の増加がみとめられた。これら脂肪細胞とマクロファージの表現形の変化は、触アロディニアおよび熱痛覚過敏の発生と時間的に一致していることから、免疫細胞と脂肪細胞のクロストークが疼痛形成に関与する可能性を示唆された。

2) TRPV1 の疼痛形成への関与

PSL による疼痛モデルについて、TRP ファミリー分子 mRNA 発現を解析した。その結果 TRPV1 の発現上昇がみとめられた。TRPV1 のノックアウトマウスを使用して、TRPV1 分子の疼痛形成における機能的な重要性を検討した結果、触アロディニアについては、野生型との間で差はみられなかった。免疫組織化学的染色を行い、免疫細胞ならびに脂肪細胞を中心に TRPV1 発現分布を調べた。その結果、疼痛の形成および制御において重要なマクロファージおよび脂肪細胞における TRPV1 の発現が明らかになった。本結果を基に、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンを投与して、疼痛に対する影響を検討した。その結果、触アロディニアの減弱効果が認められた。

3) 免疫細胞と脂肪細胞の相互作用の解析

クロストークを担うメディエーターの発現変化に及ぼす、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンの影響について検討した。マクロファージ細胞株および脂肪細胞株の共培養によるメディエーター分子 (TNF- α 、MCP-1) の mRNA 発現レベルの増加がみとめられた。これに及ぼすカプサイシン適用の影響を検討した結果、発現上昇の抑制がみとめられた。これにより、TRPV1 刺激はマクロファージと脂肪細胞の細胞間クロストークを制御することにより、疼痛を減弱する分子機構が示唆された。

4) カプサイシン鎮痛効果における免疫細胞 TRPV1 の機能的な重要性

WT→WT マウスでは、坐骨神経部分結紮 (PSL) により触アロディニアを生じた。WT→WT マウスにおける PSL 誘発触アロディニアは、カプサイシンの組織周囲への投与により減弱した。すなわち、カプサイシンは触アロディニアに対して鎮痛効果を示した。TRP-KO→WT マウスの PSL 誘発触アロディニアは、カプサイシンの投与により部分的に抑制された。WT 由来の骨髄を TRP-KO に移植したマウス (WT→TRP-KO) では、WT→WT マウスと同程度の触アロディニアが生じた。WT→TRP-KO マウスにおける PSL 誘発触アロディニアは、カプサイシンの投与により部分的に減弱した。以上の結果より、鎮痛効果におけるカプサイシンの標的細胞は、少なくとも TRP を発現する免疫細胞である可能性が示唆される。さらに、WT→TRP-KO マウスの PSL 誘発触アロディニアが、カプサイシン投与により部分的に減弱したことは、TRP-KO で消失した鎮痛効果の部分的な回復を意味するものであり、標的細胞の一つが TRP 発現免疫細胞であることを決定づけるものである。

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 8 件)

Maeda T, Ozaki M. Study on Novel Mechanism Underlying Analgesia Targeting TRPV1. YAKUGAKU ZASSHI 査読有, 2014;134:373-378.

Maeda T, Ozaki M, Kobayashi Y, Kiguchi N, Kishioka S. HMGB1 as a potential therapeutic target for neuropathic pain. J Pharmacol Sci. 査読有, 2013;123:301-305.

[学会発表] (計 1 件)

前田武彦: "TRP チャネルを標的とする新規鎮痛機序の解析" 日本薬学会第 133 年会(招待講演). 2013 年 3 月. 横浜.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 武彦 (MAEDA TAKEHIKO)

新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50271010