

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861397

研究課題名(和文)メタロプロテアーゼを中心とした慢性疼痛機構解明の新展開

研究課題名(英文)Matrix metalloprotease 12 is a novel prospective molecule regulating neuropathic pain

研究代表者

氏家 悠佳(小林悠佳)(Ujiie, Yuka)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・流動研究員

研究者番号：20511562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛形成において免疫細胞に由来する液性因子を介した神経炎症の重要性を提唱してきたが、疼痛慢性化機序は明らかでない。本研究では、慢性疼痛におけるMMP12の役割について検討した。部分結紮後坐骨神経においてMMP12の発現が増加し、傷害部位周囲のマクロファージに局在していた。LPS活性化マクロファージにおいてMMP12の発現増加が認められた。マクロファージ枯渇薬またはMMP12阻害薬の神経周囲投与により部分結紮による触アロディニアおよび熱痛覚過敏が軽減された。以上の結果より、マクロファージに由来するMMP12は慢性疼痛機構の解明における重要な新規メディエーターとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuroinflammation mediated by activated macrophages is important for pathogenesis of neuropathic pain. Here, we investigated the role of MMP12 in neuropathic pain. The gene expression of MMP12 was increased in the injured sciatic nerve (SCN), and MMP12 protein was localized on infiltrating macrophages in the injured site of SCN. By Dil labeling for peripheral blood vessels, Dil leaked into the surrounding tissue after injury, and macrophages accumulated around Dil labeled peripheral vessels. The expression of MMP12 was increased in LPS-activated macrophages. Perineural injection of macrophages depletion agent attenuated nerve injury-induced both tactile allodynia and thermal hyperalgesia, and suppressed the mRNA expressions of MMP12 and inflammatory cytokines. Furthermore, perineural injection of MMP12 specific inhibitor also suppressed tactile allodynia and thermal hyperalgesia. Taken together, MMP12 derived from macrophages acts as an exacerbating factor of neuropathic pain.

研究分野：薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 神経炎症 マクロファージ メタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

神経系の損傷に起因する神経障害性疼痛の病態には中枢および末梢神経炎症が付随する。神経炎症の制御において神経細胞と免疫細胞のクロストークの重要性が示されている。通常、免疫細胞は生体内の恒常性維持のために生体防御の役割を担うが、神経傷害により免疫機構は異常を呈し、本来の役割を逸脱する。活性化した免疫細胞はサイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターを産生・放出し、神経を興奮させ、中枢・末梢感作を導くことが報告されている。最近では、これら液性因子に加え、Matrix metalloproteinase (MMP)が神経炎症における鍵因子として注目を浴びている。

MMPは細胞外基質を分解する酵素であり、組織構築の維持とリモデリングに重要な役割を果たす。しかしながら、MMPが過剰に活性化することで無秩序な組織破壊を引き起こし、組織修復の遅延や機能障害に導く。また、MMPはサイトカインやケモカインの産生を誘導し、炎症性細胞の炎症組織への遊走を促すことが報告され、炎症への直接的・間接的な関与が多数示されている。痛み領域においても、脊髄グリア細胞により産生されるMMP-2およびMMP-9が神経障害性疼痛に関与することが報告され、疼痛におけるMMPの関与に関心が寄せられているが、これまでにMMP12と末梢神経系の炎症や疼痛との関連性は明らかにされていない。

2. 研究の目的

神経傷害後の末梢神経炎症におけるMMP12の機能について検討し、神経障害性疼痛メカニズム解明への新たな知見を提示することを目標とする。

3. 研究の方法

神経障害性疼痛モデルとして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。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。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。マウス由来マクロファージ細胞株 (RAW264.7)を用い、ELISAにて細胞ライセート中のMMP12の発現量の変化を測定した。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、マウスの坐骨神経およびマクロファージ細胞における遺伝子およびタンパク質発現変化を解析した。

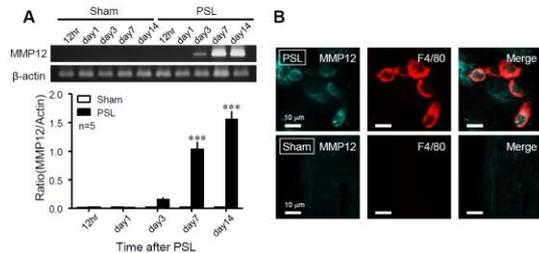
4. 研究成果

(1). 傷害後坐骨神経におけるMMP12の発現とその局在

PSLまたはSham後のSCNにおけるMMP12の発現変化について検討した。RT-PCRにより、PSL7日および14日後にお

いてMMP12 mRNAはShamと比較して有意に発現増加していた (Fig.1A)。免疫染色の結果、PSL7日後のSCNにおいてMMP12のタンパク質は発現増加し、F4/80陽性マクロファージに局在していた (Fig.1B)。

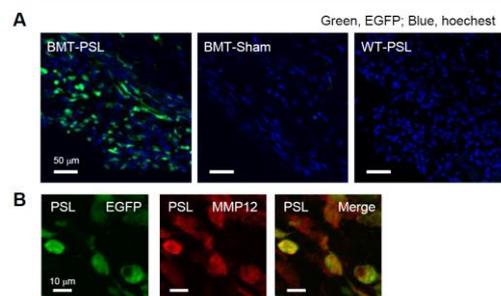
Fig.1 傷害後坐骨神経におけるMMP12の発現とその局在



(2). EGFP陽性骨髄移植マウスにおける骨髄由来MMP12産生マクロファージの発現

MMP12産生マクロファージの由来を明らかにするため、EGFP陽性骨髄細胞を移植した骨髄キメラマウスにPSLおよびSham処置をした。PSL後7日目、骨髄キメラマウスのSCNにおいてEGFP陽性細胞が発現していた。しかしながら、骨髄キメラマウスのSham処置後SCNおよび野生型マウスのPSL後SCNにおいてEGFP陽性細胞は認められなかった (Fig.2A)。さらに、これらEGFP陽性細胞はMMP12産生細胞と共局在していた (Fig.2B)。

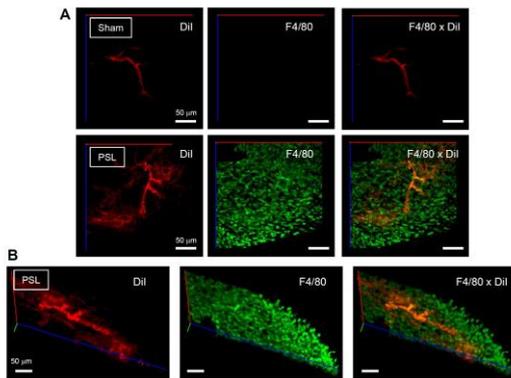
Fig.2 EGFP陽性骨髄移植マウスにおける骨髄由来MMP12産生マクロファージの発現



(3). PSL後坐骨神経における血管動態と免疫細胞の集積

PSLまたはSham処置後14日目のSCNを用いて、DiIで標識される血管とF4/80陽性マクロファージの動態について免疫染色にて評価した。Sham処置後SCNではDiIで標識される血管は直線的で輪郭が明瞭であったが、PSL後SCNではDiIの血管外への漏出が認められ、血管透過性が亢進していた。また、その血管周囲にはF4/80陽性マクロファージの集積が観察された (Fig.3A)。全載標本の撮影した3D画像のx, yおよびz軸を回転させることで傷害神経における血管の周囲を多数のマクロファージが取り巻いている様子が認められた (Fig.3B)。

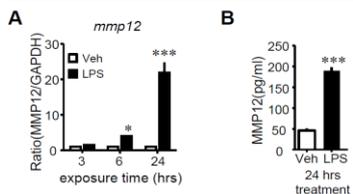
Fig.3 PSL後坐骨神経における血管動態と免疫細胞の集積



(4). 活性化マクロファージにおけるMMP12産生

傷害坐骨神経で発現増加するMMP12の主要な産生源は傷害部位に動員されるマクロファージである可能性が示されたので、実際に活性化マクロファージにおいてMMP12の産生が増加するかを *in vitro* で検討した。LPS(50 ng/ml)処置後 RAW264.7 においてMMP12 mRNA 発現増加が認められた (Fig.4A)。また、細胞ライセート中のMMP12もLPSにより有意に増加した (Fig.4B)。

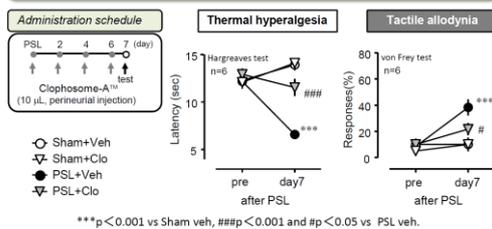
Fig.4 活性化マクロファージにおけるMMP12産生



(5). PSL 誘発性触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の影響

マクロファージ枯渇薬である Clophosome-A™ を傷害坐骨神経周囲に複数回投与し、疼痛評価を行った。PSL 後7日目において、触アロディニアおよび熱痛覚過敏は有意に抑制された (Fig.5)。

Fig.5 PSL誘発性触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の影響

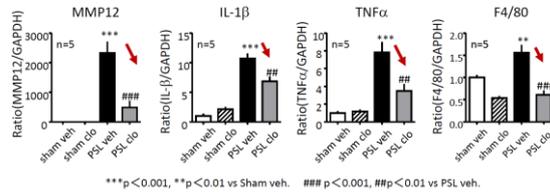


(6). 傷害坐骨神経におけるMMP12および炎症性サイトカインの発現増加に対するマクロファージ枯渇の影響

PSL後7日目の坐骨神経において発現増加したMMP12、典型的な炎症性サイトカイン

(IL-1 β , TNF- α)およびマクロファージマーカー(F4/80)のmRNAはClophosome-A™の傷害神経周囲投与により有意に減弱された (Fig.6)。

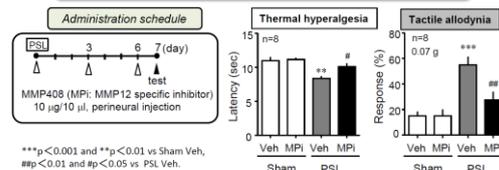
Fig.6 傷害坐骨神経におけるMMP12および炎症性サイトカインの発現増加に対するマクロファージ枯渇の影響



(7). PSL 誘発性熱痛覚過敏および触アロディニアに対する選択的MMP12阻害薬の有効性

MMP12の神経障害性疼痛への機能を検討するため、選択的MMP12阻害薬であるMMP408を傷害SCN周囲に局所投与し、疼痛評価を行った。PSL7日後に観察される熱痛覚過敏はMMP408により有意に抑制された。同様に、PSL誘発性触アロディニアも有意に軽減された (Fig.7)。

Fig.7 PSL誘発性熱痛覚過敏および触アロディニアに対する選択的MMP12阻害薬の有効性



本研究成果より、慢性疼痛制御においてマクロファージは重要な役割を果たし、マクロファージに由来するMMP12は慢性疼痛機構の解明における重要な新規メディエーターとなる可能性が示唆された。

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 11件)

- ① Kobayashi Y, Kiguchi N, Saika F, Kishioka S. Exploration of novel therapeutic targets for neuropathic pain based on the regulation of immune cells. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 35(3):65-72, 2015. *Review*. 査読有。
- ② Kobayashi Y, Kiguchi N, Fukazawa Y, Saika F, Maeda T, Kishioka S. Macrophage-T cell interactions mediate neuropathic pain through the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor ligand system. *J Biol Chem*. 290(20):12603-13, 2015. 査読有。
- ③ Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Ko MC, Kishioka S. TC-2559, an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, suppresses the expression of CCL3 and

- IL-18 through STAT3 inhibition in cultured murine macrophages. *J Pharmacol Sci.* 128(2):83-6, 2015. 査読有.
- ④ Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain.* 156(4):684-93, 2015. 査読有.
- ⑤ Kobayashi Y and Kishioka S. Matrix metalloprotease 12 is a novel prospective molecule regulating neuropathic pain. *PAIN RESEARCH.* 30:37-45, 2015. 査読有.
- ⑥ Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Peripheral alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor signalling attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia after nerve injury in mice. *Acta Physiol (Oxf).* 213(2):462-71, 2015. 査読有.
- ⑦ Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Kishioka S. Epigenetic regulation of CC-chemokine ligand 2 in nonresolving inflammation. *Biomol Concepts.* 5(4):265-73, 2014. 査読有.
- ⑧ Wakida N, Kiguchi N, Saika F, Nishiue H, Kobayashi Y, Kishioka S. CC-chemokine ligand 2 facilitates conditioned place preference to methamphetamine through the activation of dopamine systems. *J Pharmacol Sci.* 125(1):68-73, 2014. 査読有.
- ⑨ 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.* 129(1):169-78, 2014. 査読有.
- ⑩ Maeda T, Ozaki M, Kobayashi Y, Kiguchi N, Kishioka S. HMGB1 as a potential therapeutic target for neuropathic pain. *J Pharmacol Sci.* 123(4):301-5, 2013. 査読有.
- ⑪ 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.* 64(3):666-72, 2013.
- World Congress of NeuroTalk 2015. 2015. 5. 22-24. Hangzhou Blossom Water Museum Hotel, Hangzhou, China.
- ② Kobayashi Y, Kiguchi N, Saika F, Fukazawa Y, Kishioka S. ACTIVATION OF CROSSTALK BETWEEN MACROPHAGES AND T-CELLS LEADS TO NEUROPATHIC PAIN THROUGH GLUCOCORTICOID-INDUCED TNF RECEPTOR LIGAND(GITRL)-GITR PATHWAY. 9th Federation of European Neuroscience Society. 2014. 7. 5-9. Milano Congressi, Milan, Italy.
- ③ Kobayashi Y, Kiguchi N, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S. Interaction between macrophage inflammatory proteins and matrix metalloprotease 12 in macrophage is involved in neuropathic pain. Asian Pain Symposium 2013. 2013. 12. 18-20. 岡崎カンファレンスセンター、愛知.
- 国内学会 (7 件)
- ① 雑賀史浩、氏家悠佳、木口倫一、松崎伸介、岸岡史郎. 神経障害性疼痛に及ぼす MMP12 の影響. 第 128 回日本薬理学会近畿部会. 2015. 11. 20. 千里ライフセンター、大阪.
- ② Kobayashi Y, Kiguchi N, Fukazawa Y, Maeda T, Kishioka S. A novel therapeutic strategy for neuropathic pain through regulating peripheral immune cells. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015. 3. 18-20. 名古屋国際会議場、愛知.
- ③ 小林悠佳、木口倫一、雑賀史浩、門脇友維、岸岡史郎. 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. 8. 28-29. 近畿大学薬学部東大阪キャンパス、大阪.
- ④ 小林悠佳、木口倫一、岸岡史郎. 新規疼痛制御因子としてのマクロファージ由来マトリックスメタロプロテアーゼ 12 の可能性. 第 36 回日本疼痛学会. 2014. 6. 20-21. KKR ホテル大阪、大阪.
- ⑤ Kobayashi Y, Kiguchi N, Saika F, Fukazawa Y, Kishioka S. Direct evidences for a key role of macrophage specific molecule in nerve injury induced neuropathic pain. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014. 3. 19-21. 東北大学百周年記念会館川内萩ホール・仙台国際センター、宮城.
- ⑥ 小林悠佳、木口倫一、雑賀史浩、岸岡史郎. 慢性疼痛の病態基盤におけるマクロファージ由来 matrix metalloprotease 12 の役割. 第 33 回鎮痛薬・オピオイド

[学会発表] (計 10 件)

国際学会 (3 件)

- ① Kishioka S, Kobayashi Y, Kiguchi N, Saika F, Matsuzaki S. Matrix Metalloprotease 12: Novel target for neuropathic pain. BIT's 6th Annual

ペプチドシンポジウム. 2013. 9. 5-6. 神戸大学医学部会館・シスメックスホール
神緑会館、兵庫.

- ⑦ Kobayashi Y, Kiguchi N, Fukazawa Y, Kishioka S. Involvement of matrix metalloprotease 12 in pathogenesis of neuropathic pain. 第56回日本神経科学大会. 2013. 6. 20-23. 京都国際会議場、京都.

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏家 悠佳 (小林 悠佳) (UJIIE YUKA)
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第5部・流動研究員

研究者番号：20511562

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし