

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861178

研究課題名(和文) 脊髄損傷後慢性疼痛モデルの脳脊髄におけるCCL21とマイクログリアの組織学的検討

研究課題名(英文) Histological investigation of the association between CCL21 and microglia at spinal cord and brain in neuropathic pain model mice after spinal cord injury

研究代表者

本定 和也 (HONJOH, Kazuya)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60634839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6マウス(wild type)、pltマウス(CCL21knock-out)で胸髄圧挫損傷モデルを作成した。4, 14, 28日の時点で疼痛関連評価、microglia/macrophage, M1/M2極性の変化の免疫組織学的検討を行った。疼痛関連評価ではpltマウスはwild typeと比較し疼痛閾値の低下を認めた。免疫組織化学的評価ではpltマウスではwild typeと比較し、M1が減少している結果が得られた。今回の結果からCCL21の欠損では疼痛閾値の低下とM1/M2の極性変化にも影響が出る事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：we made spinal cord contusion model mice(C57BL/6 mouse (wild type), plt mouse (CCL21knock-out)) at T9 level. I performed a sharp pain-related evaluation and immunohistochemistry of the microglia/macrophage, the change of M1/M2 polarity as of 4, 14, 28th. The plt mouse accepted a drop of the sharp pain threshold by the sharp pain-related evaluation in comparison with wild type. The result that M1 decreased was provided with the plt mouse by the immunohistochemical evaluation in comparison with wild type. This result suggested that influence left for a drop of the sharp pain threshold and polar change of M1/M2 by the loss of CCL21.

研究分野：整形外科脊椎外科

キーワード：microglia macrophage CCL21 spinal cord injury

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄に由来する神経障害性疼痛 (neuropathic pain) の病態は、複雑かつ難治性であり、日常生活 やリハビリテーションに多大な影響を及ぼすと考えられている。

しかしながら、その病態解明や治療について未だ確立されていないのが現状である。一部の薬剤が奏功する症例も存在するが、症状が酷似していても同様の治療で効果が得られないことも多く、有効な治療法の開発に至らない要因となっている。

その患者実数についても、未だ詳細は不明であり、数少ない過去の国内外の多施設研究では、四肢の運動麻痺をもつ患者の内、7-8割が痛みあるいは不快な異常感覚をもち、有痛によるADL障害をきたしているものは2-4割と報告されている。

脊髄障害性疼痛は、通常痛みを起ささない触覚刺激が痛みを引き起こすアロデニアや障害脊髄高位以下の締め付けられるような自発痛など様々な痛みを生ずる。しかし、脊髄障害に起因する分子生物学的、神経生理学的、薬理的なメカニズムについては未だ不明な部分が多い。

一般的な疼痛発現メカニズムは、中枢性感作 (central sensitization)、末梢性感作 (peripheral sensitization) として理解されている。一方、脊髄でのマイクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞の活性化が炎症性疼痛や神経障害性疼痛の発現メカニズムに関与していることが近年報告され、疼痛発症における新しいプレーヤーとして注目されている。(Milligan ED et al, Nat Rev Neurosci 2009; McMahon SB et al, Neuron 2009)

特に最近の研究で免疫担当細胞であるマイクログリアが活性型マイクログリアとなる事が神経障害性疼痛の一因であることが明らかとなっている。マイクログリアを活性化させる activator としては以前より IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、substance P、ATP の関与が指摘されていた。

近年、神経障害性疼痛の一つの factor として Cystein-Cystein Chemokine Ligand 21 (CCL21) の存在が注目されている。CCL21 はマイクログリアに P2X4 receptor を発現させ、神経障害性疼痛やアロデニアを引き起こすケモカインとして示唆されている。今回我々は神経障害性疼痛の原因として CCL21 が強く関与している事に注目し、脊髄損傷部位での過剰発現のみが神経障害性疼痛の原因ではない可能性にも着目した。

末梢神経障害モデルにおいて脊髄後角での CCL21 の過剰発現を認めた報告 (Knut et al, The EMBO Journal 2011) も認められ、脊髄損傷部位のみが原因ではなく、遠位の腰膨大部での発現が神経障害性疼痛の一因となっていると考えている。

マウス脊髄損傷モデルにおける組織学的、行動学的評価を行うことで神経障害性疼痛

における CCL21 と microglia/macrophage の関連が明らかになると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊髄障害性疼痛における Cystein-Cystein Chemokine Ligand 21 (CCL21) の関与と脊髄損傷後の損傷部位および損傷部位より遠位における CCL21 の発現と microglia/macrophage の関連に注目した。

現在、脊髄に由来する神経障害性疼痛の病態は、複雑かつ難治性であり、病態解明や治療について未だ確立されていないのが現状である。しかし、脊髄損傷後に生じる二次損傷が疼痛を増強するとの報告がある。またその二次損傷は脊髄損傷部位のみでなく remote lesion にも波及する事が報告されており、below level の神経障害性疼痛の原因と考えられている。

また、二次損傷には炎症サイトカインはとともに、microglia/macrophage の phenotype である組織障害性の M1 type、組織修復性の M2 type の関与が示唆されている。また CCL21 は microglia の活性に寄与するリガンドとして注目され、特に組織障害性である M1 type に特異的に作用すると報告されている。

以上の事より、本研究は、脊髄損傷後の at level と、below level である腰膨大部における CCL21 および microglia/macrophage の phenotype の局在や経時的变化について組織学的、行動学的な評価を行うことで、CCL21 と神経障害性疼痛のメカニズムとの関連を microglia/macrophage による二次損傷に注目して明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

マウス脊髄損傷モデルの作成:

実験動物: wild type として C57/BL6 マウスを用い、CCL21 欠損マウスである plt マウスを用いる。

各マウス 6-9 週齢を Sevoflurane にて沈静後、第 9 胸椎の椎弓切除を行い、IH impactor (60Kdyn) を用いて硬膜上に圧迫を加えて脊髄圧挫損傷モデルを作成する。

行動学的評価:

圧刺激の評価として、von Frey test 熱刺激の評価として、planter test を行う。疼痛関連行動学的評価後の圧挫損傷後 4 日、14 日、28 日目の各モデルマウスを 4% Paraformaldehyde で還流固定を行い、脊髄凍結標本を作成した。

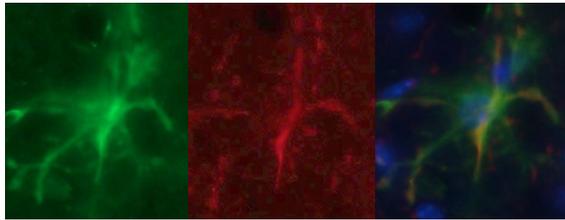
脊髄は損傷部より約 1-2mm 尾側、腰膨大部は L2 level を中心に連続切片を作成した。

蛍光免疫染色:

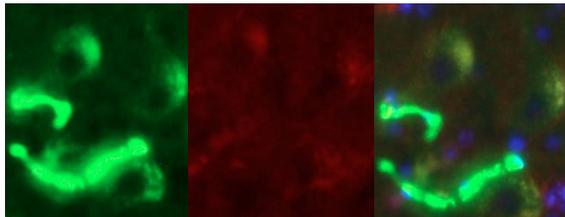
microglia/macrophage のマーカーとして CD11b、M1 type のマーカーとして iNOS、M2 type のマーカーとして CD206 を用いた。

損傷部、腰膨大部の CD11b と iNOS、CD206 の merge 陽性細胞数をカウントし、統計学的

に解析を行った。



CD11b/green CD206/red

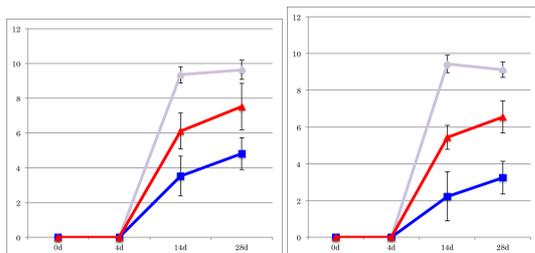


iNOS/red

#### 4. 研究成果

##### 疼痛関連評価:

vonFrey test, planter test とともに *plt* 群では wild 群と比較し各評価の閾値の低下を認めた 14 日目、21 日目で疼痛関連評価での閾値の上昇を認めた。



von Frey test Planter test  
紫:sham/青:wild/赤:plt

##### 蛍光免疫染色:

###### 脊髄損傷部 *Cd11b* 陽性細胞数

まず、損傷部 *CD11b* 細胞数では, Wild 群、*plt* 群とともに損傷後 14 日目で最も増加し、28 日では減少傾向を認めた。

細胞数を比較すると、やや *plt* で *CD11b* 細胞が減少している結果であった。

###### 脊髄損傷部 *M1 type*

*inos* の評価では *iNOS*(+) は 4, 14D で増加傾向にあり、28 日目には減少していた。また、*wild* と比較し、*plt* は *inos* 陽性細胞は優位に少ない結果であった。

###### 脊髄損傷部 *M2 type*

*CD206* は 14 日目で最も増加し、その後減少している結果であった。*wild* 群と *plt* 群ではその細胞数に優位な差は認められなかった。

###### 腰膨大部 *CD11b* 陽性細胞数

腰膨大部では 14 日目に *CD11b* 陽性細胞数はピークとなり、*plt* で *CD11b* 細胞の優位

な減少を認めた。

###### 腰膨大部 *M1 type*

*iNOS*(+) は *plt* で 4D, 14D, 28D で優位に少ない結果であった。

###### 腰膨大部 *M2 type*

*CD206* は 4 日目で優位に *plt* 群で多い結果であったが、14 日目以降優位な差は生じていなかった。

##### 考察

脊髄損傷後の *M1/M2* の変化として、3 日目までに *M1* がピークに達し、*M2* は 7 日目以降でピークを迎えると報告されている。

そのため今回の検討での -4D, 14D で *M1* 減少が脊髄損傷後の急性期の *IFN-* といった pro-inflammatory molecule の低下に繋がっており、脊髄損傷部周囲の neurotoxic, growth inhibitory の低下に繋がるのではと考察している。

また損傷部で *M1* の減少は *M1* が産生する *TNF-*、*IFN-* といったサイトカインの減少が、remote lesion への炎症の波及が低下し、*M1 type* の減少へと繋がるのではないかと考察している。

below level allodynia に関しては、損傷部における *M1 type* の増加と *CCL21* の remote lesion への発現の二つを考えている。

*CCL21* の欠損で、腰膨大部 *M1* 細胞数が減少しているのであれば、below level allodynia の減少に繋がっており、今回の結果が得られたのではと考えている。

今後の検討に関しては *CCL21* 欠損における損傷部の *M1*、*M2* の定量化を行い、そして損傷部および remote lesion である腰膨大部における炎症性サイトカインの発現の評価を行いたいと考えている。

##### 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)

[学会発表](計 4 件)

1. 本定和也、内田研造、中嶋秀明、竹浦直人、高橋藍、坂本拓己、北出誠. マウス脊髄損傷モデルにおける疼痛関連評価と microglia/macrophage phenotype の組織学的解析. 第 8 回日本運動器疼痛学会. 2015.12.12-13. 名古屋

2. 本定和也、中嶋秀明、渡邊修司、竹浦直人、高橋藍、内田研造. マウス脊髄損傷モデルにおける腰膨大部のマイクログリア活性と phenotype の関連の組織学的解析. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015.10.22-23. 富山

3. 本定和也、中嶋秀明、渡邊修司、坂本拓己、高橋藍、北出誠、内田研造. マウス脊髄損

傷モデルにおける CCL21  
と microglia/macrophage phenotype の  
関連の組織学的解析. 第 34 回日本運動器移  
植・再生医学研究会. 2015.9.25-26. 宇部

4. 本定和也、内田研造、中嶋秀明、渡邊修  
司、竹浦直人、馬場久敏. マウス脊髄損傷モ  
デルに対する末梢性ベンゾジアゼピン受容  
体を用いたミクログリア活性の組織学的解  
析. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会.  
2014.10.9-10. 鹿児島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本定 和也 (HONJOH Kazuya)  
福井大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60634839