神経障害性疼痛と末梢免疫系細胞の中樞移行

末梢神経損傷により脊髄内浸潤する免疫系細胞と 神経障害性疼痛の関わり—TRPM2 チャネルの役割—

中川 貴之, 勇 昂一, 原口 佳代,
宗 可奈子, 朝倉佳代子, 白川 久志, 金子 周司

要約: 末梢神経の損傷等により発生する難治性の神経障害性疼痛には、損傷した末梢神経周辺へ浸潤した免疫系細胞による侵害受容性の一次感覚神経の過敏化(末梢神経感作)に加え、脊髄内グリア細胞の活性化により誘導される脊髄後角神経の過敏化(中枢神経感作)が関与することが知られている。これまで、末梢および脊髄内での神経炎症応答は個別に議論されてきたが、最近、末梢神経損傷により、血液-脊髄関門が破綻し、マクロファージやTリンパ球などの免疫系細胞が脊髄内に浸潤することが報告された。我々もこの点に注目し、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するトランスジェニックマウスによる骨髄キメラマウスを用い、末梢神経損傷時のGFP陽性骨髄由来細胞の浸潤を観察した。その結果、末梢神経の損傷部位周辺に多量のGFP陽性免疫系細胞が浸潤するとともに、脊髄内においても、脊髄ミクログリアの活性化のピーク(約3日後)からやや遅れて、末梢神経損傷7~14日後にかけてGFP陽性免疫系細胞、特にマクロファージが数多く浸潤する様子が観察された。また、免疫系細胞が脊髄内浸潤した領域は、脊髄ミクログリアの活性化領域とほぼ一致することも確認している。一方、我々はこれまでに、過酸化水素などの活性酸素種に対するセンサーとして機能し、免疫系細胞やグリア細胞にも発現する transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) が神経障害性疼痛に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究において我々は、TRPM2 遺伝子欠損マウスと GFP トランスジェニックマウスを組み合わせた骨髄キメラマウスを作製し、末梢神経損傷時の免疫系細胞の脊髄内浸潤に TRPM2 が関与することを明らかにした。本稿では、神経障害性疼痛における末梢由来免疫系細胞の脊髄内浸潤につい

て、我々の最近の知見を中心に概説する。

1. はじめに

感覚神経の損傷、感染、糖尿病などの代謝性疾患やある種の薬剤等により末梢の感覚神経が障害を受けると、激しい痛みやしびれ、異常感覚といった症状を呈する難治性の末梢神経障害性疼痛が惹起される。現在、神経障害性疼痛の治療には、 Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\text{-}\delta$ リガンドのプレギャバリンや三環系抗うつ薬、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬、オピオイドなどが用いられているが(1)、多くの場合、それらは対症療法に過ぎず、神経障害性疼痛を根本的に治療できる鎮痛薬は現在のところ存在しない。このような現状から、神経障害性疼痛を治療できる新たな「慢性疼痛治療薬」の開発が必要であり、そのためには痛みの慢性化、難治化機構の解明および新規疼痛治療標的の探索が必須となる。

神経障害性疼痛の発症機序として、末梢および脊髄内での神経-免疫細胞間の相互作用による神経炎症応答が深く関与する。すなわち、損傷した末梢神経周辺へ浸潤した好中球、マクロファージやTリンパ球などの免疫系細胞が、神経炎症応答により一次感覚神経の過敏化を引き起こす(末梢神経感作)だけでなく、その入力先である脊髄後角で痛覚伝達を担う脊髄後角神経の機能的過敏化(中枢神経感作)が誘導されることで長期間持続する神経障害性疼痛が惹起されると考えられている。この中枢神経感作の誘導には、脊髄内のグリア細胞(ミクログリアやアストロサイト)が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。神経障害性疼痛と脊髄グリア細胞との関連については、これまでも多くの知見が蓄積されてきており、新規

キーワード: 神経障害性疼痛, マクロファージ, ミクログリア, 脊髄内浸潤, TRPM2
京都大学大学院 薬学研究科 生体機能解析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

E-mail: tnakaga@pharm.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日: 2013 年 7 月 9 日, 依頼原稿

Title: Involvement of spinally-infiltrated immune cells in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain: roles of TRPM2

Author: Takayuki Nakagawa, Koichi Isami, Kayo Haraguchi, Kanako So, Kayoko Asakura, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko

鎮痛薬の標的候補として注目されてきた(2)。

2. 末梢免疫系細胞の中樞浸潤

脳や脊髄などの中枢神経系内の環境は、通常、血液-脳関門あるいは血液-脊髄関門により保護され、細菌やウイルスのほか、循環血液中の物質や血球などが容易に通過できないよう防御機構を備えている。さらに、中枢神経系内での免疫担当細胞であるミクログリアが周囲の環境を常に監視するとともに、アストロサイトが中枢神経機能を維持・調節するなど、中枢神経内の環境を維持するための機構が幾重にも張り巡らされている。一方、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症等の中枢神経変性疾患や、脳虚血障害、出血性脳障害等の脳血管障害などの中枢疾患においては、グリア細胞の異常活性化による脳内環境の破綻が、その発症や進行に関わっていることが明らかにされている。また、これら疾患に伴った血液-脳/脊髄関門の破綻により、マクロファージやTリンパ球等の末梢免疫系細胞が脳・脊髄実質内に浸潤し、グリア細胞とともに脳内環境の破綻に関与し、各疾患の進行や重症化に寄与することも示唆されている(3)。

一方、末梢神経損傷時にも、マクロファージやTリンパ球などの末梢由来の免疫系細胞が脊髄内に浸潤することが報告されている(4-9)。末梢神経損傷や炎症、C線維の刺激などにより血液-脊髄関門が破綻し、脊髄内へ末梢血流を循環する炎症性メディエーターや末梢免疫系細胞が浸潤したものと考えられている(10, 11)。

3. 緑色蛍光タンパク質 (GFP) 陽性骨髄キメラマウスを用いた免疫系細胞の浸潤の観察

我々は、末梢神経損傷による神経障害性疼痛と免疫系細胞との関連を検討するため、GFPを発現するトランスジェニックマウスによる骨髄キメラマウスを用い、末梢神経損傷時のGFP陽性骨髄由来細胞の浸潤を観察した。GFP陽性骨髄キメラマウスを作製するため、ドナーマウスとなるGFPトランスジェニックマウスの大腿骨から採取したGFP陽性骨髄細胞を、ガンマ線を照射し骨髄細胞を破壊したレシピエントの野生型(WT)マウスに尾静脈から移植した。SPF環境下で6週間飼育したGFP陽性骨髄キメラマウスの血液から採取した細胞をフローサイトメトリーで検討したところ、白血球の約95%がGFP陽性骨髄由来細胞に置き換わっていることを確認している。このGFP陽性骨髄キメラマウスを用いて、まず、神経障害性疼痛の発

症を確認した。GFP陽性骨髄キメラマウスおよび骨髄移植を行っていないnaïveマウスのL4脊髄神経の切断手術(Chungモデル)を施したところ、von Freyファイラメントによる機械刺激に対する感受性は、脊髄神経切断3日後から両者において有意に低下し、少なくとも14日間は持続する機械的アロディニアが生じたが、両群間に差は認められなかった。このことから、GFP陽性骨髄キメラマウス作製によって、神経障害性疼痛の発症に影響はないことが確認できた。

このL4脊髄神経切断手術を施したマウスから、損傷部位周辺の脊髄神経、坐骨神経、後根神経節、後根を摘出し、GFP陽性骨髄由来細胞、すなわち免疫系細胞を観察したところ(図1)、脊髄神経、坐骨神経、後根神経節内において多数のGFP陽性細胞の浸潤が観察された。脊髄神経切断3日後にはすでに多数の浸潤が認められたが、7, 14日後とその数は徐々に増加していった。また、マクロファージのマーカーとして抗Iba1抗体で蛍光免疫染色を施し、GFP陽性免疫系細胞におけるIba1陽性マクロファージの存在を確認したところ、脊髄神経、坐骨神経、後根神経節内に浸潤したGFP陽性免疫系細胞のおよそ半数はIba1陽性マクロファージであった。一方、後根においては、予想外にGFP陽性細胞の浸潤は少なかった。損傷部位周辺へ浸潤したGFP陽性免疫系細胞は、坐骨神経や後根神経節へも拡がりを見せるが、脊髄方向に上行する免疫系細胞は後根神経節でトラップされているようである。当初、我々は末梢神経損傷時の免疫系細胞の脊髄内への浸潤経路として、損傷部位周辺に大量に浸潤した免疫系細胞が後根の神経束に沿って上行し脊髄内に浸潤する可能性も考えていたが、このような可能性は低いと考えられた。

次に、脊髄内におけるGFP陽性免疫系細胞の浸潤を観察、計数したところ、脊髄神経切断3日後では僅かにしか浸潤は認められなかったが、7, 14日後と経つにつれ、特に脊髄後角、また脊髄前角の処置側においても多くのGFP陽性免疫系細胞の浸潤が認められた(図2)。また、抗Iba1抗体で蛍光免疫染色を施したところ、GFP陽性免疫系細胞の半数以上はIba1陽性マクロファージであった。一方、Iba1陽性/GFP陰性の常在性ミクログリアの細胞数は、脊髄神経切断3日後をピークに増加し、その後、7, 14日後と経つにつれ、減少した。これらの結果から、脊髄神経切断3日後をピークに常在性ミクログリアが活性化し、引き続き、やや遅れて7, 14日後に末梢由来免疫系細胞の脊髄内浸潤が生じるものと考えられた。また、GFP陽性免疫系細胞が脊髄内に浸潤した領域は、損傷を施した

図1 L4 脊髄神経切断後の末梢神経への GFP 陽性免疫系細胞の浸潤の様子

GFP 陽性骨髄キメラマウスの L4 脊髄神経を切断し、3、7、14 日後に後根、後根神経節、脊髄神経、坐骨神経における Iba1 蛍光免疫染色（赤）によるマクロファージおよび GFP 陽性免疫系細胞（緑）の浸潤を観察した。

図2 L4 脊髄神経切断後の脊髄後角への GFP 陽性免疫系細胞の浸潤の様子

GFP 陽性骨髄キメラマウスの L4 脊髄神経を切断し、3、7、14 日後に脊髄後角処置側における Iba1 蛍光免疫染色（赤）によるミクログリア／マクロファージおよび GFP 陽性免疫系細胞（緑）の浸潤を観察した。右の図は単位面積あたりで計数した細胞数を表している。緑：Iba1⁺/GFP⁺細胞（脊髄内浸潤したマクロファージ以外の細胞）、黄：Iba1⁺/GFP⁺細胞（脊髄内浸潤したマクロファージ）、赤：Iba1⁺/GFP⁻細胞（常在性ミクログリア）。

L4 脊髄神経の支配領域を中心に吻側・尾側に拡がり、Iba1 陽性／GFP 陰性の常在性ミクログリアの活性化領域とほぼ一致していた。これらの結果は、末梢免疫系細胞の脊髄内浸潤には、先行して活性化した常在性ミクログリアが関与していることを推察させるものである。一方、末梢神経損傷による血液－脊髄関門の破綻は、ミクログリア阻害薬であるミノサイクリンの脊髄くも膜下腔内投与によって影響を受けないとも報告されており(11)、さらなる検討が必要である。

4. 神経障害性疼痛におけるマクロファージ／ミクログリアに発現する活性酸素感受性 TRPM2 の役割

一方、我々はこれまで、transient receptor potential (TRP) チャネルの1つである TRPM2 と炎症性疼痛や神経障害性疼痛との関連について検討してきた。TRPM2 は、過酸化水素などの活性酸素種に対するセンサーとして機能し、単球、マクロファージ、好中球、T リンパ球などの免疫系細胞、また中枢ではミクログ

リアにも発現することが知られており、最近では特に免疫応答や炎症応答との関連が着目されている (12-15). そこで我々は、TRPM2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、各種疼痛モデルでの疼痛行動への影響を評価した。その結果、熱侵害刺激、機械侵害刺激、化学侵害刺激などに対する侵害受容行動や術後痛モデルなど侵害受容性疼痛の側面が大きいと言われるモデルにおいて TRPM2-KO の影響は認められなかったが、ホルマリンテスト第 II 相、酢酸ライジング行動、カラゲニン誘発炎症性疼痛モデル、モノヨード酢酸関節腔内投与による変形性関節症モデル、多発性硬化症の実験動物モデルと考えられている実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) モデルなど炎症性の疼痛モデルや、末梢神経損傷による神経障害性疼痛モデル、ストレプトゾトシンによる糖尿病性神経障害モデル、パクリタキセルによる抗がん剤誘発末梢神経障害モデルにおいて、TRPM2-KO マウスにおいて有意な減弱が認められた。これらの結果から、TRPM2 は、正常な痛覚伝達によって媒介される侵害受容性疼痛への寄与は少ないが、侵害受容性の末梢神経や中枢神経の神経炎症応答が基盤となる炎症性疼痛や神経障害性疼痛に関与することが示唆される。

そこで、坐骨神経部分結紮による神経障害性疼痛モデル (Seltzer モデル) を用いて、マクロファージあるいはミクログリアに発現する TRPM2 の役割を検討した。その結果、坐骨神経結紮部位周辺に浸潤するマクロファージでの TRPM2 mRNA 発現量が有意に増加すること、また、結紮 8 時間~14 日後までの間に坐骨神経結紮部位周辺に浸潤する F4/80 陽性マクロファージの細胞数に WT および TRPM2-KO マウス間で差はなかったが、Gr-1 陽性好中球の細胞数が損傷 8 時間後において有意に減少していた。また、主にマクロファージから産生され、強力な好中球走化作用を示す CXC ケモカイン CXCL2 (16) の結紮部位周辺での産生が、TRPM2-KO マウスでは部分的ではあるが有意に減少していた。同様に、TRPM2-KO マウスから調整した培養マクロファージにおいても CXCL2 産生能低下を確認している。これらの結果から、マクロファージの TRPM2 は、活性化したマクロファージからの CXCL2 産生に関与しており、好中球の浸潤を介して、神経障害性疼痛発症の基盤となる一次感覚神経の神経炎症応答、すなわち末梢神経感作に関与すると考えている (17)。また、脊髄内においても、抗 Iba1 抗体を用いた磁気活性化セルソーティングにより脊髄後角から分離採取したミクログリア/マクロファージにおいて、TRPM2 mRNA 発現量が有意に増加していること、

TRPM2-KO マウスにおいて、Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージの活性化 (Iba1 免疫活性および p38 リン酸化) が坐骨神経結紮 3~14 日後において顕著に抑制されていることを見出している。また、TRPM2-KO マウスから調整した培養ミクログリアを用いて、LPS/インターフェロン- γ 刺激による CXCL2 産生、iNOS 誘導、NO 産生能が低下していることも確認している (17)。これらの結果から、脊髄ミクログリア/マクロファージの活性化にも TRPM2 が関与していることが示唆される。

5. 免疫系細胞の脊髄内浸潤における TRPM2 の役割

上記の検討で、神経障害性疼痛に対するマクロファージの TRPM2 を介した応答 (CXCL2 産生、好中球浸潤) の寄与は部分的であり、時間的にもごく初期に限られたものであったため、脊髄ミクログリアの TRPM2 がより大きく寄与しているのではないかと予測していた。そこで、WT マウスおよび TRPM2-KO マウス間で骨髄キメラマウスを作製し、マクロファージおよび脊髄ミクログリアそれぞれの TRPM2 の寄与を検討した。GFP トランスジェニックと掛け合わせた WT および TRPM2-KO ドナーマウスから GFP 陽性 WT あるいは TRPM2-KO 骨髄細胞を採取し、ガンマ線を照射し骨髄細胞を破壊したレシピエントの WT あるいは TRPM2-KO マウスに尾静脈から移植した。すなわち、WT 骨髄細胞を WT レシピエントマウスに移植した TRPM2^{BM+/Rec+} キメラマウス、TRPM2-KO 骨髄細胞を WT レシピエントマウスに移植した TRPM2^{BM-/Rec+} キメラマウス、WT 骨髄細胞を TRPM2-KO レシピエントマウスに移植した TRPM2^{BM+/Rec-} キメラマウス、TRPM2-KO 骨髄細胞を TRPM2-KO レシピエントマウスに移植した TRPM2^{BM-/Rec-} キメラマウスの 4 種類の GFP 陽性骨髄キメラマウスを作成した (図 3)。これらのマウスに対して、坐骨神経部分結紮を施し、神経障害性疼痛の発生を検討したところ、TRPM2^{BM+/Rec+} キメラマウスでは、ほぼ WT マウスと同程度の機械的アロディニアが生じたのに対して、予想に反して、他の TRPM2^{BM-/Rec+} キメラマウス、TRPM2^{BM+/Rec-} キメラマウスおよび TRPM2^{BM-/Rec-} キメラマウス、いずれにおいても、機械的アロディニアの有意な減弱が認められた。これらの結果は、マクロファージおよびミクログリアいずれの TRPM2 も神経障害性疼痛に寄与することを示唆するものである (18)。神経障害性疼痛にマクロファージおよびミクログリア両者が寄与することは、ケモカイ

図3 WT/TRPM2-KO マウス間での GFP 陽性骨髄キメラマウスの作製法

GFP トランスジェニックと掛け合わせた WT および TRPM2-KO ドナーマウスから GFP 陽性 WT あるいは TRPM2-KO 骨髄細胞を採取し、ガンマ線を照射し骨髄細胞を破壊したレシピエントの WT あるいは TRPM2-KO マウスに尾静脈から移植し、TRPM2^{BM+/Rec+} キメラマウス (WT 骨髄細胞を WT レシピエントマウスに移植)、(TRPM2-KO 骨髄細胞を WT レシピエントマウスに移植)、TRPM2^{BM+/Rec-} キメラマウス (WT 骨髄細胞を TRPM2-KO レシピエントマウスに移植)、および、TRPM2^{BM-/Rec-} キメラマウス (TRPM2-KO 骨髄細胞を TRPM2-KO レシピエントマウスに移植) の4種類の GFP 陽性骨髄キメラマウスを作成した。

ン受容体 CCR2 での骨髄キメラマウスを用いた検討でも報告されている(6)。

そこで、坐骨神経部分結紮 14 日後という比較的遅い時期において、坐骨神経の損傷部位周辺および脊髄後角内への GFP 陽性末梢免疫系細胞の浸潤を観察したところ、多数の GFP 陽性免疫系細胞の浸潤が認められ、その半数以上は Iba1 陽性マクロファージであることが確認できたが、いずれの骨髄キメラマウス間でも差は認められなかった(18)。なお、前述の TRPM2-KO マウスでの解析でも、好中球の浸潤数に差が認められたのは坐骨神経部分結紮 8 時間後という非常に早い時間のみで、14 日後に主に浸潤しているマクロファージの数には差が認められていない(17)。

また、坐骨神経部分結紮 14 日後の脊髄後角において、TRPM2^{BM+/Rec+} キメラマウスにおいては、脊髄後角の処置側において、脊髄後角反対側と比較して、Iba1 陽性細胞数、すなわち常在性ミクログリア／末梢由来マクロファージの細胞数が増加し、また、多数の GFP 陽性細胞、すなわち末梢由来の免疫系細胞の浸潤が認められた。一方、TRPM2^{BM+/Rec+} キメラマウスと比較して他の 3 種類の TRPM2-KO 骨髄キメラマウスいずれ

においても、Iba1 陽性の常在性ミクログリア／末梢由来マクロファージの細胞数および脊髄内浸潤した GFP 陽性免疫系細胞数が減少していた。さらに、Iba1 陽性／GFP 陽性細胞、すなわち、脊髄内に浸潤したマクロファージの細胞数が、3 種類の TRPM2-KO 骨髄キメラマウスいずれにおいても有意に減少していたが、Iba1 陽性／GFP 陰性細胞、すなわち、常在性ミクログリアの細胞数に差は認められなかった。これらの結果は、坐骨神経部分結紮 14 日後という神経障害性疼痛の慢性期において、TRPM2 は脊髄常在性ミクログリアの活性化には影響を与えていないが、末梢由来の免疫系細胞、特にマクロファージの脊髄内浸潤に重要な役割を果たしていることを示唆している(18)。

6. おわりに

TRPM2-KO マウスおよび GFP 陽性骨髄キメラマウスを組み合わせた今回の検討から、TRPM2 は、まず、末梢神経損傷初期(1 日以内)に生じる損傷部位周辺でマクロファージから産生させる CXCL2 を介した好中球遊走に関与し、一次感覚神経の神経炎症応答、すなわち末梢神経感作の誘導に寄与すること、また、損傷 3 日後をピークとする脊髄後角内の常在性ミクログリアの活性化にも関与し、中枢神経感作の誘導にも重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、TRPM2 は、末梢神経損傷 7~14 日後に生じる末梢由来免疫系細胞、特にマクロファージの脊髄内浸潤にも関与し、神経障害性疼痛の維持に対しても何らかの役割を担っているものと考えられた(図 4)。今回の研究結果から、脊髄常在性ミクログリアおよび脊髄内浸潤したマクロファージ両者とも神経障害性疼痛に関与することが明らかとなったが、それらのタイムコースが少しずれていることから、脊髄常在性ミクログリアおよび脊髄内浸潤した末梢免疫系細胞は役割を交代させながら神経障害性疼痛に関与しているのかもしれない。すなわち、末梢神経損傷後、中枢神経系では脊髄常在性ミクログリアの初期の応答が神経障害性疼痛の誘導に関わるとともに、脊髄内グリア細胞が血液-脊髄関門の破綻および免疫系細胞の脊髄内浸潤を惹起し、さらに、脊髄内浸潤したマクロファージなどの免疫系細胞が脊髄後角神経の機能的変化を維持し、神経障害性疼痛の慢性化に寄与しているのではないかと考えている。今後、末梢神経損傷後の免疫系細胞脊髄内浸潤の詳細なメカニズム、役割等を明らかにできれば、神経障害性疼痛の慢性化機構の解明、さらには、末梢免疫系細胞の脊髄内浸潤機構を標的とした新たな慢性疼痛治療薬開発の可能性も期待できると考えている。

図4 末梢神経損傷による免疫系細胞の脊髄内浸潤における TRPM2 の関与

謝辞：TRPM2-KO マウスは京都大学工学研究科・森泰生教授から御供与頂いた。本稿で紹介した主な研究内容は科学研究費補助金若手研究 (B) (23790641) および新学術領域研究「脳内環境」(24111527) の助成を受けて実施したものである。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Dworkin RH, et al. Pain. 2007;132:237-251.
- 2) Ren K, et al. Nat Med. 2010;16:1267-1276.
- 3) Wilson EH, et al. J Clin Invest. 2010;120:1368-1379.
- 4) Sweitzer SM, et al. Pain. 2002;100:163-170.
- 5) Hu P, et al. Brain Behav Immun. 2007;21:599-616.
- 6) Zhang J, et al. J Neurosci. 2007;27:12396-12406.
- 7) Cao L, et al. Eur J Immunol. 2008;38:448-458.
- 8) Cao L, et al. Eur J Immunol. 2009;39:3562-3569.
- 9) Costigan M, et al. J Neurosci. 2009;29:14415-14422.
- 10) Beggs S, et al. Mol Pain. 2010;6:74.
- 11) Echeverry S, et al. J Neurosci. 2011;31:10819-10828.
- 12) Yamamoto S, et al. Nat Med. 2008;14:738-747.
- 13) Knowles H, et al. PNAS. 2011;108:11578-11583.
- 14) Di A, et al. Nat Immunol. 2012;13:29-34.
- 15) Magnone M, et al. J Biol Chem. 2012;287:21067-21081.
- 16) Takamp-Olson P, et al. J Exp Med. 1990;172:911-919.
- 17) Haraguchi K, et al. J Neurosci. 2012;32:3931-3941.
- 18) Isami K, et al. PLOS ONE. 2013;8:e66410.