

術後痛および神経障害性疼痛の形成に関与する
炎症性細胞の時空間的役割

2016

勇 昂一

謹呈

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成 29 年 3 月 23 日

勇 昂一

術後痛および神経障害性疼痛の形成に関与する
炎症性細胞の時空間的役割

2016

勇 昂一

目次

緒言	1
第一章 好中球浸潤抑制が術後痛および創傷治癒に与える影響	3
実験方法	4
実験結果	7
考察	14
第二章 神経損傷に伴う骨髄由来炎症性細胞脊髄内浸潤における TRPM2 の関与 ...	16
実験方法	17
実験結果	20
考察	26
第三章 マウス系統間の神経障害性疼痛感受性差における炎症性細胞の関与	28
実験方法	29
実験結果	33
考察	45
総括および結論	49
謝辞	50
発表論文目録	51
参考文献	52

緒言

神経損傷や組織傷害等によって惹起される疼痛は、急性疼痛と慢性疼痛に大別することができる。急性疼痛が傷害部位を守るための生体防御警告系として重要な生理的役割を担うのに対し、慢性疼痛は傷害部位が治癒してもなお持続する痛みであり、生体防御系としての機能を持たないだけでなく、日常生活における活動を制限し、患者の QOL を著しく損なうことから、治療すべき疾患の一つとして認識されており、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求められている。

実験動物を用いたこれまでの基礎研究から、疼痛の形成には、神経損傷部位や傷害組織、また損傷を受けた神経の後根神経節 (DRG) に浸潤する炎症性細胞から産生される炎症性メディエーターを介した一次感覚神経の過敏化 (末梢神経感作)、および中枢神経系への中継点である脊髄後角でのグリア細胞活性化による脊髄後角神経の過敏化 (中枢神経感作) が重要な役割を担うことが報告されている。当研究室でも脊髄ミクログリアやマクロファージに発現するカチオンチャンネルの一種である **transient receptor potential channel melastatin 2 (TRPM2)** が、炎症性疼痛や神経障害性疼痛に寄与することを、**TRPM2 ノックアウト (TRPM2KO)** マウスを用いた検討より明らかにしている。しかし、これら病態的な痛みの治癒あるいは進行・慢性化と、組織/末梢神経損傷後に各部位で順次、浸潤・活性化する各炎症性細胞の時空間的な関連は明らかになっていない。本研究では術後痛および神経障害性疼痛の形成における末梢および中枢の炎症性細胞の時空間的役割について検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章では、マウス足底を切開する術後痛モデルを作製し、術後痛および組織修復へのマクロファージと好中球の関与について検討を行い、好中球の術部位周辺への早期浸潤が術後痛と組織修復のどちらにも重要な役割を担うことを示した。

第二章では、野生型と **TRPM2KO** 間の骨髄移植により作製した骨髄キメラマウスを用いた検討より、脊髄ミクログリアや末梢炎症性細胞に発現する **TRPM2** のそれぞれの神経障害性疼痛慢性化への寄与を示した。また、神経損傷に伴う末梢炎症性細胞の脊髄内浸潤への **TRPM2** の関与を示した。

第三章では、複数のマウス系統を用いて、神経障害性疼痛感受性差に **DRG** や脊髄における免疫応答性の違いが関与することを示した。また、**C57BL/6J** と **C3H/He** マウス間の骨髄移植により作製した骨髄キメラマウスを用いた検討より、**DRG** マクロファージと脊髄ミクログリア応答性のフェノタイプがそれぞれ、神経障害性疼痛の形成と維持に寄与することを示した。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである

ANOVA:	analysis of variance
Arg1:	arginase 1
ATP:	adenosine 5'-triphosphate
cDNA:	complementary deoxyribonucleic acid
CCL2:	chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR2:	chemokine (C-C motif) receptor 2
CX3CL1:	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
CX3CR1:	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
DNA:	deoxyribonucleic acid
DRG:	dorsal root ganglion
FGF2:	fibroblast growth factor 2
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
GFP:	green fluorescent protein
IFN γ :	interferon gamma
IL:	interleukin
IL1 β :	interleukin 1 beta
IL1R1:	interleukin 1 receptor, type 1
IL6:	interleukin 6
IL6R α :	interleukin 6 receptor, alpha
IR:	immunoreactivity
i.t.:	intrathecal
LPS:	lipopolysaccharide
MHC:	major histocompatibility complex
mRNA:	messenger ribonucleic acid
N.S.:	not significant
PB:	phosphate buffer
PBS:	phosphate buffered saline
PBS-T:	0.1% Triton-X100 phosphate buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PFA:	paraformaldehyde
pSNL:	partial sciatic nerve ligation
QOL:	quality of life
RNA:	ribonucleic acid
rRNA:	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction
SEM:	standard error of mean
SNT:	spinal nerve transection
TGF β :	transforming growth factor beta
TLR4:	Toll-like receptor 4
TNF α :	tumor necrosis factor alpha
TRPM2:	transient receptor potential melastatin 2
TRPM2KO:	transient receptor potential melastatin 2 knock out

第一章 好中球浸潤抑制が術後痛および創傷治癒に与える影響

術後痛は切開を伴う手術後に共通して認められる特徴であり、しばしば術部位の創傷治癒に伴い回復する。術後痛の効果的な治療は QOL を改善し、合併症や慢性痛へのリスクを軽減させるため、非ステロイド性抗炎症性薬やオピオイド、プレガバリン等の鎮痛薬を用いた先行鎮痛が行われている (1, 2)。しかしながら、50-70%の患者は中程度から重度の術後痛に悩まされており、術後痛の解明および新規治療標的の発見が望まれている (3-5)。

これまで、足底を切開し足底筋に傷害を与える実験動物の術後痛モデルを用いて (6, 7)、術部位周辺へ浸潤する炎症性細胞と経時変化について検討が行われてきた。好中球は術後 1 日をピークとして術部位周辺へと浸潤し、サイトカインやケモカインの産生を介して術部位の感染を防ぐとともに疼痛惹起にも寄与しており (8)、ビンブラスチン硫酸塩や抗好中球抗体を用いた好中球除去は足底切開後の機械的痛覚過敏を抑制することが報告されている (9)。また、好中球の浸潤から少し遅れて、術部位周辺にはマクロファージや T 細胞の浸潤も認められ、特にマクロファージのサブセットの一種である CD11b 陽性 Ly6G 陽性ミエロイド細胞 (単球や皮膚常在性マクロファージ) が術後の機械的痛覚過敏に大きく寄与することも報告されている (10)。

このように集積した炎症性細胞は望ましくない疼痛を引き起こすものの、これらの細胞は傷害組織の修復に不可欠である (11-13)。特に、マクロファージの創傷治癒への寄与に関しては、マクロファージフェノタイプに着目した詳細な検討が行われている。マクロファージは古典的活性化による炎症性 M1 マクロファージと選択的活性化による抗炎症性 M2 マクロファージという 2 つのフェノタイプに分類され (14)、M2 マクロファージが創傷治癒には重要であると報告されている (15, 16)。一方で M1 マクロファージは炎症性サイトカイン産生を介して、傷害組織を増悪することも報告されており (17)、近年、こうしたマクロファージの分化に、好中球との相互作用が寄与することも報告されている (18)。しかしながら、術後痛における、各炎症性細胞の役割や相互作用の詳細は明らかになっていない。

本研究ではマクロファージと好中球に着目し、術後痛および術後の創傷治癒における、各炎症性細胞の役割や相互作用について明らかにした。

実験方法

1) 使用動物

実験には雄性 C57BL/6J 系マウス（体重 20-25 g、6-8 週齢；日本 SLC、静岡）を使用した。全ての動物は室温が 24 ± 1 °C、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行われた。

2) 使用薬物と薬物投与

イソフルランはファイザー株式会社（Manhattan, New York, USA）より購入した。ソムノペンチルは共立製薬株式会社（東京）より購入した。イソジンは Meiji Seika ファルマ株式会社（東京）より購入した。5%ヒビテン液は大日本住友製薬株式会社（大阪）より購入した。コルヒチンは Sigma-Aldrich 社（St Louis, Missouri, USA）より購入し、0.75 mg/kg/day で術前 2 日前より 1 日 1 回腹腔内投与した。クロドロン酸およびコントロールリポソーム製剤は FormuMax Scientific 社（Sunnyvale, California, USA）より購入し、術前 1 時間前に 100 μ L/mouse で尾静脈より単回投与した。

3) 術後痛モデル作製

既報に従い、術後痛（postoperative pain; POP）モデルを作製した（6, 7）。イソフルラン吸入麻酔下、メス（No.11、フェザー安全剃刀株式会社、大阪）を用いて、マウス右足底の踵からつま先に向かい縦方向に約 5 mm 表皮を切開した。切開部位から露出した足底筋をピンセットで数秒持ち上げた後、周辺をイソジンにて消毒した。

4) von Frey フィラメントテスト

非侵害性機械刺激に対するアロディニアは、0.04 g の von Frey フィラメント（North Coast Medical, Gilroy, California, USA）を用いて測定した。穴のあいた金属板上にアクリル製の囲い（株式会社山本製作所、東京）を置き、その中でマウスを 30 分以上馴化させた後、測定を行った。von Frey フィラメントを、フィラメントをわずかに曲がる程度の強さで 1-2 秒間、マウス後肢足底切開部位周辺にあてる操作を 10 回繰り返し、足を振る、舐める等の逃避行動を示す回数を計測し、反応頻度（%）を算出した。

5) 蛍光免疫染色法

○経心灌流固定および冠状切片作製

マウスをソムノペンチル麻酔下にて開胸し、0.01 M PBS (pH 7.4) を 10 mL 経心灌流することで脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) で経心灌流し、全身を固定した。その後、足底を採取し、4% PFA で 4 °C にて 4 時間、後固定を行った。次に 30 % sucrose in 0.01 M PBS に 4 °C にて一晩静置し、ティシュー・テック O.C.T.コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社、東京) に包埋して、-80 °C のイソペンタン (ナカライテスク株式会社、京都) により各組織を凍結した。次に、マイクロトーム刃 (LEICA819; Leica, Nussloch, Germany) を装着した凍結マイクロトーム (LEICA3000; Leica) を用いて厚さ 14 μ m の凍結切片を作製し、MAS コート付きスライドガラス (松浪硝子工業株式会社、大阪) に接着させ、凍結切片を風乾後、-80 °C で凍結保存した。

○蛍光抗体法

スライドガラス上の冠状切片を PBS で 15 分洗浄後、ブロッキング液 (4% ヤギ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) を含む 0.1 % Triton-X100 含有 PBS (PBS-T)) を用いて、室温にて 1 時間ブロッキング処理を行い、一次抗体液中で 4 °C にて一晩反応させた。一次抗体として、rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (019-19741, 1:500; WAKO, 大阪)、rat monoclonal anti-Gr1 antibody (MAB1037, 1:200; R&D Systems, Minneapolis, USA) を PBS-T に希釈して用いた。PBS による洗浄後、遮光し、二次抗体液中で室温にて 1 時間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:500; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rat IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA) を PBS-T に希釈して用いた。PBS で洗浄後、VECTASHIELD Hard set (H-1400; Vector Laboratories) とカバーガラス (松浪硝子工業) を用いて封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i、オリンパス株式会社、東京) により切開部位周辺画像を取得した。各マウスあたり 2-3 枚の切片を Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) により定量し、Gr1 陽性 (Gr1⁺) 細胞数および Iba1 免疫活性強度の平均を算出した。

6) リアルタイム RT-PCR 法

ソムノペンチル麻酔下、0.01 M PBS (pH 7.4) を 10 mL 経心灌流することで脱血した後、両足の足底を採取し液体窒素で急速冷却した。組織は使用するまで -80 °C で保存し、全 RNA は NucleoSpin® RNA (U0955、タカラバイオ株式会社、滋賀) あるいは

ISOGEN (株式会社ニッポンジーン、東京) を用いて、仕様書に基づき抽出を行った。抽出した RNA は ReverTra Ace® (東洋紡株式会社、大阪) を用いて cDNA に逆転写し、全 RNA 1 µg 分に相当する cDNA を THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を用いて全量 20 µL にて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。反応は StepOne™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用い、95 °Cで 10 分、その後 95 °Cで 30 秒、60 °Cで 30 秒、72 °Cで 30 秒を 40 サイクルのプログラムで行った。解析には StepOne™ software (Applied Biosystems) を用いた。PCR 産物の確認は、融解曲線により行った。各 mRNA の発現量は標準曲線法を用いて計算し、内部標準として測定した無処置マウスの各組織における mRNA との相対的な値として算出した。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである (北海道システム・サイエンス株式会社、北海道)。

IL1β (Fw: 5'-TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC-3', Rv: 5'-TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG-3'), CCL2 (Fw: 5'-AAC TCT CAC TGA AGC CAG CTC T-3', Rv: 5'-GTG GGG CGT TAA CTG CAT-3'), CCR2 (Fw: 5'-AGA GGT CTC GGT TGG GTT GT-3', Rv: 5'-CAC TGT CTT TGA GGC TTG TTG C-3'), CD86 (Fw: 5'-TTG TGT GTG TTC TGG AAA CGG AG-3', Rv: 5'-AAC TTA GAG GCT GTG TTG CTG GG-3'), Arg1 (Fw: 5'-ACA TTG GCT TGC GAG ACG TA-3', Rv: 5'-ATC ACC TTG CCA ATC CCC AG-3'), TGFβ (Fw: 5'-TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G-3', Rv: 5'-GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC-3'), FGF2 (Fw: 5'-GTC ACG GAA ATA CTC CAG TTG GT-3', Rv: 5'-CCC GTT TTG GAT CCG AGT TT-3'), 18S rRNA (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA-3').

7) 創傷治癒評価

ソムノペンチル麻酔下、切開部位の画像を撮影し、横幅 (切開方向に対し垂直) の長さを Image J software (National Institute of Mental Health) にて測定した。

8) 統計解析

図中の数値は平均値±標準誤差 (SEM) で表記した。有意差検定は、機械的アロディニアは two-way analysis of variance (ANOVA) に続く Bonferroni's *post hoc* test を、免疫蛍光法、リアルタイム PCR、創傷治癒の評価では two-way ANOVA に続く Bonferroni's *post hoc* test を用いたが、IL1β mRNA 発現解析には unpaired *t* test を用い、Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, California, USA) により解析した。危険率 5 %未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

足底切開誘発機械的アロディニア

マウス足底切開後、切開部位周辺への von Frey フィラメント (0.04 g) の触刺激による反応頻度が増加し、手術 1 日後および 3 日後において有意に増加したが、切開していない反対側後肢の反応頻度に変化は認められなかった。この機械的アロディニアは、手術 1 日後が最も顕著であり、7 日後には認められなくなった (図 1-1A)。足底切開部位周辺の免疫染色より、反対側ではほとんど認められなかった Gr1 陽性好中球や Iba1 陽性マクロファージの、切開部位周辺における著しい増加が認められた。Gr1 陽性好中球は、手術 1 日後をピークとして浸潤していたのに対し、Iba1 陽性マクロファージは術後徐々に増加を示し、手術 7 日後においても認められた (図 1-1B)。

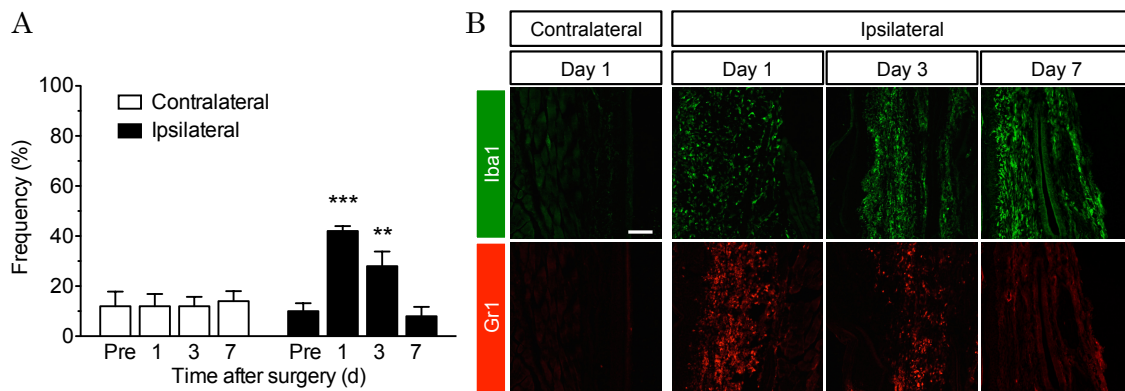


図 1-1 術後痛モデルマウスの機械的アロディニア

(A) 足底切開はマウス右側後肢に施した。von Frey フィラメントの両足底への触刺激は術前 (pre) および手術 1、3、7 日後に行い、フィラメントに対する反応頻度を測定した。n = 5. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. pre.

(B) 足底切開処置側および反対側の手術 1、3 および 7 日後における、Iba1 (緑) および Gr1 (赤) の免疫染色画像。スケールバーは 100 μm を表す。

好中球の浸潤抑制が足底切開後の機械的アロディニアに与える影響

図 1-1 で示された、術後痛への好中球の関与を検討するため、コルヒチン (19) を手術 2 日前より 1 日 1 回腹腔内投与することで、好中球の浸潤を薬理的に抑制したマウスを用いて検討を行った。コルヒチンを投与したマウスでは、手術 1 日後および 3 日後で認められる Gr1 陽性好中球の浸潤が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制され(図 1-2A, C)、また Iba1 免疫活性の増大も手術 3 日後では有意に抑制されていた(図 1-2A, B)。さらに、コルヒチン投与群では、手術 1 日後の機械的アロディニアが生理食塩水投与群に比べ有意に抑制され、3 日後においても機械的アロディニアは減弱していた(図 1-3)。

マクロファージ除去が足底切開後の機械的アロディニアに与える影響

次に、術後痛へのマクロファージの関与を検討するため、末梢血マクロファージを除去したマウスを用いて術後痛モデルを作製した。末梢血マクロファージは、単核食細胞系の貪食作用により単球/マクロファージを選択的に除去するクロドロン酸リポソーム (20) を手術 1 時間前に尾静脈内投与することで除去した。コントロールリポソーム製剤 (vehicle) 投与群とクロドロン酸投与群で術後の Gr1 陽性好中球の浸潤は同程度に認められたが(図 1-4A, C)、vehicle 群で認められた手術 1 日後および 3 日後における Iba1 免疫活性の増大は、クロドロン酸群で有意に抑制された(図 1-4A, B)。しかしながら、術後の機械的アロディニアは両群間で同程度に認められた(図 1-5)。

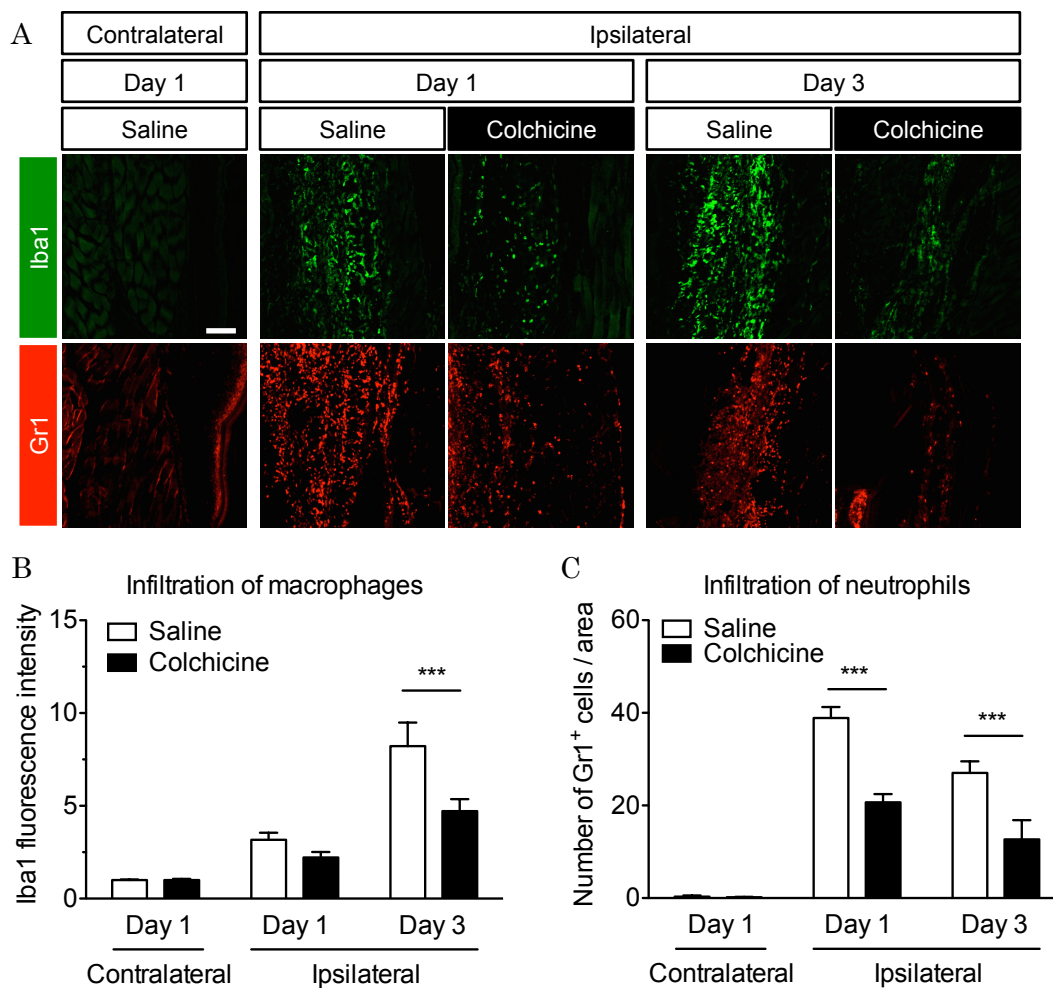


図 1-2 コルヒチンが切開部位周辺の好中球およびマクロファージ浸潤に与える影響

コルヒチン (0.75 mg/kg) あるいは生理食塩水は、手術 2 日前より 1 日 1 回腹腔内投与した。スケールバーは 100 μ m を表す。

(A) 手術 1、3 日後の足底における Iba1 (緑) および Gr1 (赤) の免疫染色画像。

(B, C) 足底切開部位周辺における Iba1 免疫活性強度 (B) と Gr1 陽性細胞数 (C) の定量結果。

$n = 6-16$. *** $p < 0.001$, vs. saline.

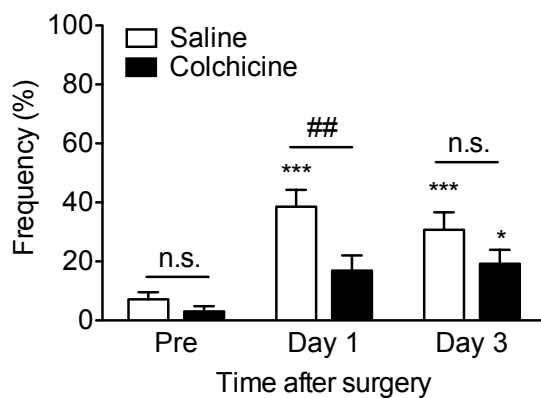


図 1-3 術後の機械的アロディニアにコルヒチンが与える影響

術前 (pre) と手術 1、3 日後に von Frey ファイラメントによる疼痛試験を行った。 $n = 13-17$. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, vs. pre in each group. ## $p < 0.01$, vs. saline. n.s., not significant.

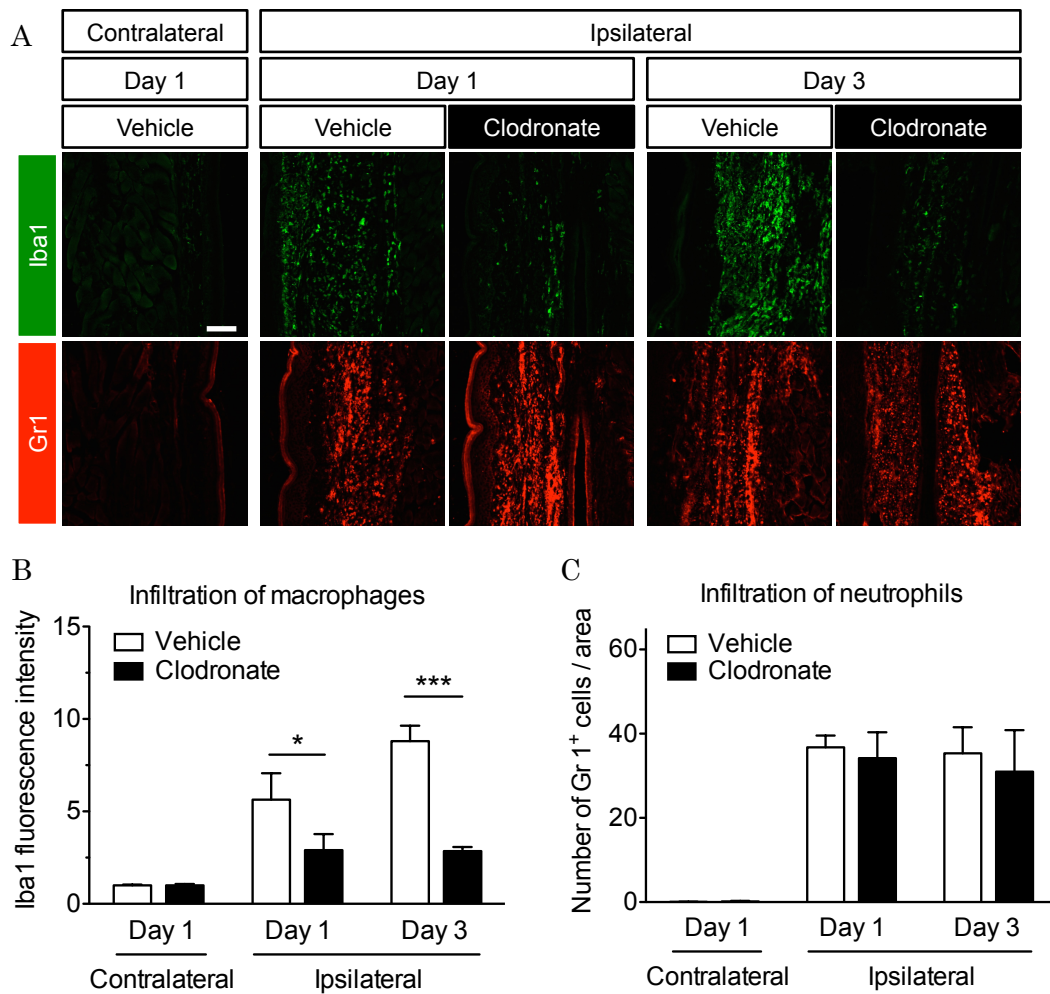


図 1-4 クロドロン酸が術後のマクロファージおよび好中球浸潤に与える影響

クロドロン酸 (100 μ L/mouse) あるいはコントロールリポソーム (vehicle) は、手術 1 時間前に尾静脈より投与した。スケールバーは 100 μ m を表す。

(A) 手術 1、3 日後の足底における Iba1 (緑) および Gr1 (赤) の免疫染色画像。

(B, C) 足底切開部位周辺における Iba1 免疫活性強度 (B; $n = 4-11$) と Gr1 陽性細胞数 (C; $n = 3-8$) の定量結果。* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, vs. vehicle.

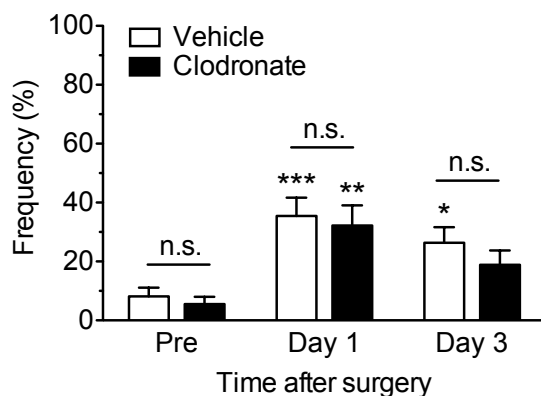


図 1-5 術後の機械的アロディニアにクロドロン酸が与える影響

術前 (pre) と手術 1、3 日後に von Frey フィラメントによる疼痛試験を行った。 $n = 9-11$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. pre in each group. n.s., not significant.

好中球浸潤抑制が術後の炎症応答やマクロファージフェノタイプに与える影響

コルヒチン投与により術後痛が抑制されたが、これに関して切開部位周辺の手術 1 日後の炎症応答に着目し検討を行った。リアルタイム PCR の解析より、反体側後肢でほとんど検出されなかった炎症性サイトカインのインターロイキン 1 β (IL1 β) mRNA 発現が、生理食塩水投与群では足底切開後に著しく増大し、コルヒチン投与群では有意に抑制されていた (図 1-6A)。また、好中球やマクロファージから産生される CCL2 ケモカインや、マクロファージの遊走に関与する CCR2 ケモカイン受容体 (21) の mRNA 発現は術後有意に上昇したが、コルヒチン投与群での有意な発現上昇は認められなかった (図 1-6B, C)。

序論でも述べた通り、マクロファージの分化に好中球から放出されるメディエーターが関与することが知られていることから (18)、コルヒチンにより好中球の浸潤が抑制された術後痛モデルマウスにおいてもマクロファージの分化に影響が認められるか検討を行った。炎症性 M1 マクロファージの指標である CD86、および抗炎症性 M2 マクロファージの指標であるアルギナーゼ 1(Arg1)の mRNA 発現変動を解析したところ、生理食塩水投与群で手術 1 日後に認められた CD86 mRNA の有意な発現上昇は、コルヒチン群で有意に抑制されていた (図 1-6D)。また、生理食塩水投与群では、手術 1 日後において Arg1 mRNA 発現が有意に上昇していたが、コルヒチン投与群では有意な発現上昇は認められなかった (図 1-6E)。

術後創傷治癒にマクロファージおよび好中球が与える影響

最後に、術後に浸潤する好中球やマクロファージの創傷治癒への関与について検討を行った。足底切開部位の、切開方向に対する垂直方向への広がりを目盛を指標に治癒を評価したところ、コルヒチン投与により好中球浸潤を抑制したマウスでは、生理食塩水投与群に比べ創傷治癒が遅く、手術 3 日後において修復が有意に抑制されていた (図 1-7A, B)。一方、クロドロン酸投与によりマクロファージを除去したマウスでは vehicle 群と同程度に修復が認められ、組織修復の遅延は生じなかった (図 1-7C, D)。そこで、コルヒチンによる好中球浸潤抑制が、組織修復に関与する線維化促進因子である TGF β (22) と FGF2 (23) の mRNA 発現に与える影響について、リアルタイム PCR により解析した。手術 1 日後において生理食塩水投与群では反対側後肢に比べ処置側で TGF β および FGF2 mRNA の有意な発現上昇が認められたが、コルヒチン投与群では mRNA 発現上昇は有意に抑制されていた (図 1-8)。

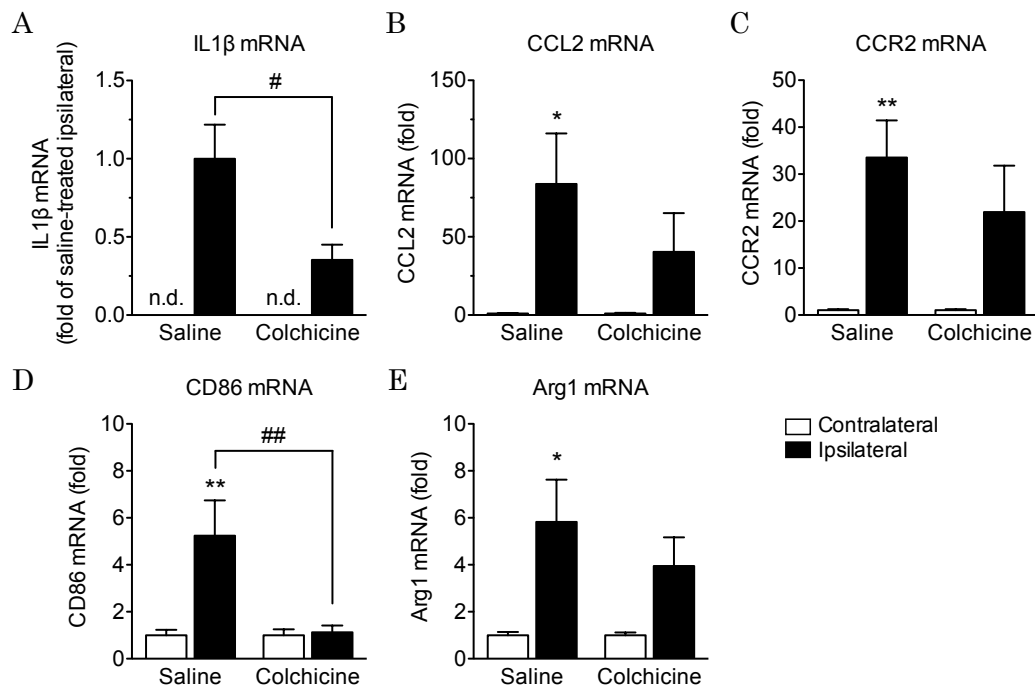


図 1-6 コルヒチンが切開部位の炎症応答やマクロファージフェノタイプに与える影響

コルヒチン (0.75 mg/kg) あるいは生理食塩水は、手術 2 日前より 1 日 1 回腹腔内投与し、各群の足底組織は手術 1 日後に採取した。IL1 β (A; $n = 13$)、CCL2 (B; $n = 6-7$)、CCR2 (C; $n = 6-7$)、CD86 (D; $n = 7-8$)、Arg1 (E; $n = 8$) mRNA は定量的リアルタイム PCR によって測定した。各 mRNA 発現量は 18S rRNA を基準とし、各群の反対側の発現量に対する相対値として算出した。ただし、IL1 β mRNA 発現量は反対側で検出できなかったため、生理食塩水投与群処置側の発現量に対する相対値として算出した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs. contralateral. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, vs. saline. n.d., not determined.

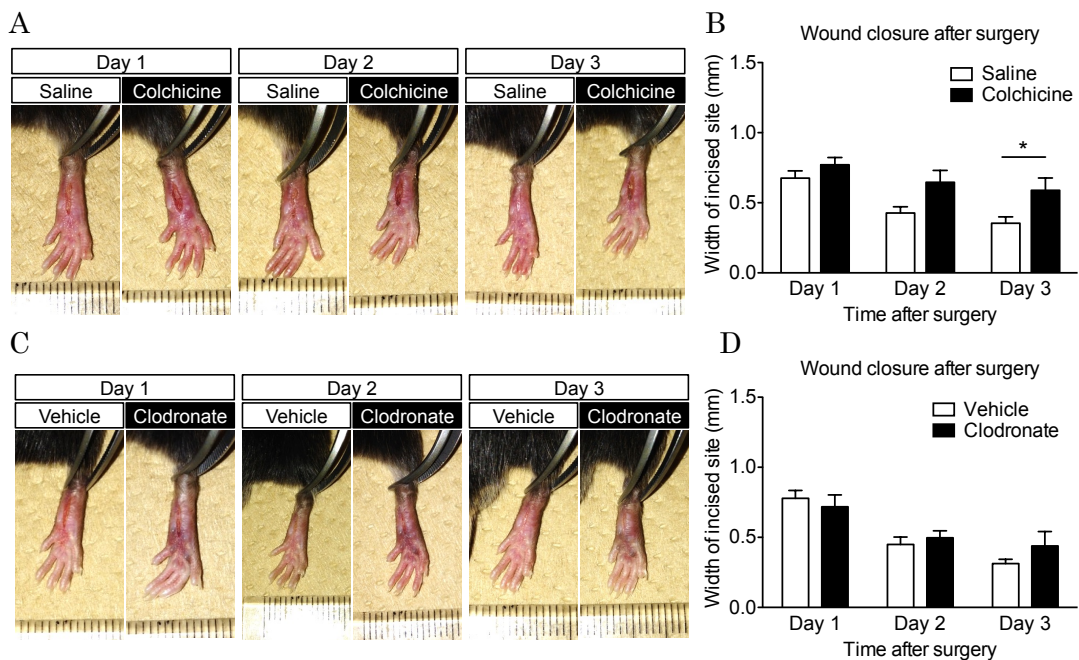


図 1-7 コルヒチンおよびクロドロン酸が足底切開後の創傷治癒へ与える影響

(A, B) コルヒチン (0.75 mg/kg) あるいは生理食塩水は、手術 2 日前より 1 日 1 回腹腔内投与した。足底切開 1、2 および 3 日後の足底画像を撮影し (A)、切開方向に対し垂直方向への傷の広がり測定した (B)。 $n = 8$. $*p < 0.05$, vs. saline.

(C, D) クロドロン酸 (100 μ L/mouse) あるいはコントロールリポソームは手術 1 時間前に尾静脈内投与した。足底切開 1、2 および 3 日後の足底画像を撮影し (C)、切開方向に対し垂直方向への傷の広がり測定した (D)。 $n = 3-5$.

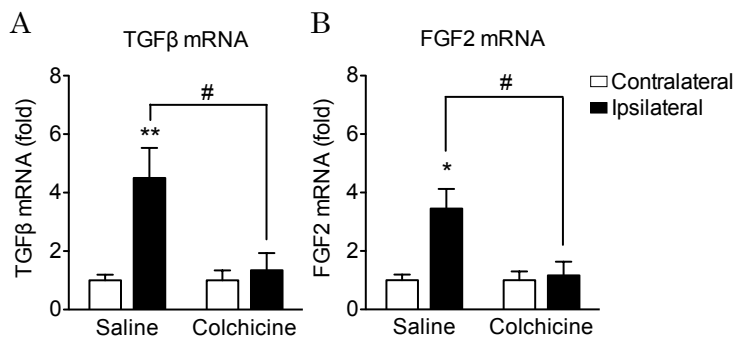


図 1-8 コルヒチンが足底切開後の線維化促進因子の発現に与える影響

コルヒチン (0.75 mg/kg) あるいは生理食塩水は手術 2 日前より 1 日 1 回腹腔内投与し、各群の足底組織は手術 1 日後に採取した。TGF β (A) および FGF2 (B) mRNA は、定量的リアルタイム PCR によって測定し、各 mRNA 発現量は 18S rRNA を基準とし、各群の反対側の発現量に対する相対値として算出した。 $n = 4$. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$, vs. contralateral. $\#p < 0.05$ vs. saline.

考察

本研究では術後痛モデルマウスを用いて、足底切開後の機械的アロディニアおよび組織修復へのマクロファージや好中球の関与について明らかにした。

切開 1 日後の足底では、単球/マクロファージ遊走因子である CCL2 ケモカインが産生され、ケモカイン受容体である CCR2 を発現するマクロファージの浸潤が促進されるが、クロドロン酸を用いた検討より、術後に浸潤するマクロファージが術後痛形成へ関与しないことが示唆された。CCR2 を欠損したマクロファージでは CCL2 を介した遊走能が低下するが、CCR2 欠損遺伝子改変マウスにおいても、術後の機械的アロディニアが正常に形成されることが報告されており (10)、さらに、今回作製した術後痛モデルでは、機械的アロディニアが消失した手術 7 日後においても、マクロファージの指標である Iba1 免疫活性が著しく認められたことから、術後痛にはマクロファージの寄与が小さいことが示唆される。

一方、コルヒチンによる好中球浸潤抑制は術後痛形成を有意に抑制したが、これはビンブラスチン硫酸塩あるいは抗好中球抗体を用いて好中球浸潤を抑制した過去の報告とも一致している (9)。活性化した好中球は様々な発痛物質や炎症性メディエーターを放出することが知られており (24)、術後に切開部位へ浸潤する好中球が初期の炎症応答や疼痛形成に重要な役割を担っていると考えられる。特に IL1 β は発痛作用も有していることから (25)、コルヒチン投与マウスでの IL1 β 産生抑制が術後痛減弱に大きく寄与していたと考えられる。また好中球によってもたらされる炎症応答は、CCL2 を介したマクロファージの浸潤や、浸潤したマクロファージの炎症性 M1 フェノタイプへの分化にも必要であることが示唆された。一方で、M1 マクロファージも、IL1 β や IL6、TNF α といった炎症性メディエーターを放出することが知られており (26)、さらに、コルヒチンはマクロファージに作用し、IL1 β の細胞外への放出に影響を与えることも報告されている (27)。そのため、今回確認された IL1 β の抑制は、コルヒチンのマクロファージへの影響が寄与する可能性も考えられるが、上述した通り、クロドロン酸を用いた検討より、術後痛へのマクロファージの寄与は部分的であると考えられる。特に、今回の術後痛モデルでは、手術 1 日後のマクロファージの浸潤が少なく、顕著な浸潤が認められる 3 日以降では CD86 mRNA 発現上昇が消失し、M1 フェノタイプが認められないことも確認しており、そのためマクロファージの術後痛への関与が小さかったと考えられる。一方で、足底筋を持ち上げることで傷害を与える今回の術後痛モデルと異なり、さらに足底筋をメスで傷つける術後痛モデルでは、術後 1 日目からもマクロファージの浸潤が顕著であることを確認しており、こうした術後痛モデルでは、機械的アロ

ディニアや熱痛覚過敏を好中球除去だけで減弱できないことも報告されている (10)。そのため、筋肉や自由神経終末への傷害が重度で、損傷早期からマクロファージの浸潤が顕著な場合は、好中球の浸潤抑制だけで術後痛を抑制できない可能性がある。

術後痛への炎症性細胞の寄与は本研究以外にも、上記で紹介したように、これまでに複数報告されている。しかしながら、炎症性細胞を標的とした術後痛の減弱が術後の組織修復に与える影響について検討した報告はほとんどない。組織修復への炎症性細胞の関与に関しては、これまで実験動物の背側に傷害を与えるモデルで検討が行われており、主にマクロファージの関与が示唆されている (28-30)。しかしながら、クロドロン酸を用いた今回の検討では、手術 3 日後には切開した表皮の修復がコントロール群と同程度に認められ、マクロファージ除去の影響は認められなかった。だが、表皮の修復が完了し、術後痛が消失した 7 日後においても多数のマクロファージが足底で確認されたこと、さらに組織損傷に伴うリモデリングが長期にわたることを考慮すると (29)、持続的なマクロファージ除去は慢性期における組織リモデリングを障害することが考えられる。

一方で、コルヒチンを用いた検討から、好中球浸潤抑制により術後の線維化促進因子 (TGF β 、FGF2) の産生が抑制され、表皮組織修復に好中球が重要であることが示唆されたが、好中球浸潤抑制に伴い、組織片の貪食に重要な役割を担う M1 フェノタイプ (26) や組織リモデリングに必要な M2 フェノタイプ (31) へのマクロファージの分化が抑制されたことも組織修復遅延に寄与したと考えられる。しかしながら、好中球の組織修復への関与については統一した見解は得られておらず (13, 32, 33)、術後痛と同様に、組織損傷の程度により寄与の度合いが左右されると考えられる。

以上より、術後痛にはマクロファージよりも好中球の寄与が大きく、早期に浸潤した好中球による炎症応答は引き続き浸潤するマクロファージの分化にも重要であること、さらに好中球は足底切開後の組織修復にも重要な役割を担っていることが明らかになった (図 1-9)。そのため、好中球浸潤抑制は術後痛を軽減するが、損傷組織の修復を遅延させる恐れもあり、好中球の機能に影響を与えずに術後痛をコントロールする必要があると考えられる。

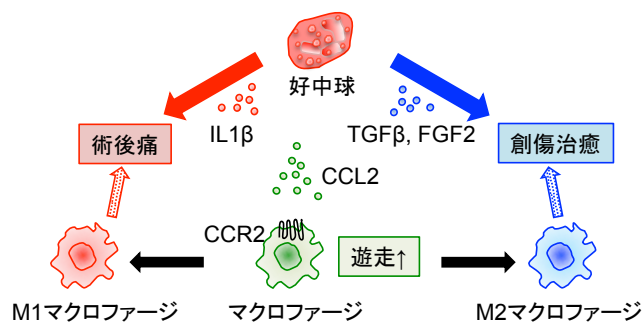


図 1-9 術後浸潤する好中球とマクロファージの術後痛への影響

術部位に早期に浸潤する好中球は、術後痛やマクロファージの分化、創傷治癒に重要な役割を担う。

第二章

神経損傷に伴う骨髄由来炎症性細胞脊髄内浸潤における TRPM2 の関与

神経障害性疼痛は主に末梢神経損傷により惹起される疼痛であり、炎症性細胞と神経の相互作用が重要な働きをすることが報告されている (34, 35)。末梢神経損傷に伴い、マクロファージや好中球、T 細胞、マスト細胞等が損傷した神経に浸潤し、さらに浸潤部位で活性化した炎症性細胞は、痛覚惹起に寄与する炎症性メディエーターを放出し、侵害受容性求心性神経の過敏化を引き起こす (末梢神経感作)。一方、脊髄では損傷を受けた末梢神経からのシグナルによりミクログリアやアストロサイトが活性化し、シナプス亢進や脊髄後角での侵害受容応答を促進する (中枢神経感作) (36)。さらに、末梢神経損傷に伴い、脊髄への末梢炎症性細胞の浸潤が惹起され、神経障害性疼痛に寄与することも報告されているが (37-41)、この脊髄内浸潤についての詳細は明らかになっていない。

Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) は、活性酸素種によって開口する非選択的カチオンチャネルの一種であり (42, 43)、単球/マクロファージ、好中球、ミクログリアといった炎症性細胞に広く発現している (44-46)。単球/マクロファージに発現する TRPM2 は炎症性サイトカイン/ケモカインの産生に関与し、好中球の浸潤を促すことで病態の増悪に寄与することや (47-49)、T 細胞に発現する TRPM2 が細胞増殖や炎症性サイトカインの産生/放出に寄与することなどが報告されている (50, 51)。このように炎症性細胞や免疫系細胞に発現する TRPM2 は、様々な病態の炎症応答や免疫応答において重要な働きをすることが示唆されている。

当研究室でも、マクロファージや脊髄ミクログリアに発現する TRPM2 が、末梢や中枢での炎症応答増悪を介して神経障害性疼痛に寄与することを報告している (52)。しかしながら TRPM2 ノックアウト (TRPM2KO) マウスを用いた検討では、末梢炎症性細胞と脊髄ミクログリアに発現する TRPM2 のそれぞれの、神経障害性疼痛における役割について明らかにすることは難しい。そこで本研究では、野生型マウスと TRPM2KO マウス間で骨髄移植を行うことで、末梢炎症性細胞のみで TRPM2 を欠損する、あるいは末梢炎症性細胞のみで TRPM2 を発現する骨髄キメラマウスを作製し、末梢炎症性細胞および中枢グリア細胞に発現する TRPM2 の神経障害性疼痛への寄与をそれぞれ検討した。

実験方法

1) 使用動物

TRPM2 ノックアウト (TRPM2KO) マウスは京都大学工学研究科の森泰生先生より供与していただいた。TRPM2KO マウスはバックグラウンド系統である C57BL/6J 系マウスに 10 世代戻し交配させた。GFP トランスジェニックマウスは C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) C14-Y01-FM1310sb (C57BL/6GFP; 日本 SLC) を用いた (53)。その他については、第一章実験方法に同じ。

2) 使用薬物

第一章実験方法に同じ。

3) 神経障害性疼痛モデル作製

既報に従い、坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation; pSNL) モデルを作製した (54, 55)。ソムノペンチル麻酔下 (64.8 mg/kg)、ヒビテン液にて消毒したオペ道具 (FST, Canada) を用いて、マウス右後肢大腿上部の坐骨神経を露出し、背側の結合組織から丁寧に剥離した。腰仙骨神経幹の坐骨神経分岐点付近の遠位側において坐骨神経の 1/2-1/3 を眼下丸 00000 バネ夏目縫合針 (株式会社夏目製作所、東京) および 9-0 号バージンシルク (株式会社河野製作所、京都) で結紮した。その後、切開した皮膚を絹製縫合糸 (株式会社村瀬縫合糸、京都) で縫合し、周辺をイソジンにて消毒した。

4) von Frey フィラメントテスト (up-down 法)

非侵害性機械刺激に対するアロディニアは、刺激強度の異なる 7 本 (0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1.0 g) の von Frey フィラメント (North Coast Medical) を用いた up-down 法に従い測定した (56, 57)。穴のあいた金属板の上にアクリル製の囲い (株式会社山本製作所) を置き、その中でマウスを 30 分以上馴化させた後、測定を行った。0.16 g のフィラメントから開始し、フィラメントをわずかに曲がる程度の強さで 1-2 秒間、マウス後肢足底面にあてる操作を 5 回繰り返し 1 試行とした。フィラメントをあてた際、反応を示さなければ 0 点、後肢を持ち上げれば 1 点、後肢を激しく振るあるいは舐めれば 2 点とスコアを付け、各試行でスコアの合計が 5 点以上であれば 1 段階弱いフィラメントを、4 点以下であれば 1 段階強いフィラメントを選択して試行を繰り返し、最初に半数以上の逃避行動を示すあるいは 2 回目以降に半数以下の逃避行動を示したフィラメントから 4 回の試行を繰り返して、50%逃避行動閾値を算出した (56, 58)。

5) 骨髄キメラマウスの作製

ドナーマウスには、TRPM2KO と GFP トランスジェニックマウスを交配させた GFP 陽性・TRPM2^{+/+}マウスをさらに交配させて得られた、GFP 陽性 TRPM2^{-/-}および GFP 陽性 TRPM2^{+/+}を用いた。レシピエントマウスは移植前日の夕刻から絶食させ、移植当日に 10 Gy のガンマ線を照射した。ドナーマウスは頸椎脱臼により安楽死させ、ヒビテン液にて消毒後、大腿骨および脛骨を単離した。26G 注射針 (NN-2613S; テルモ株式会社、東京) の針先を単離した骨内に刺し、2-3 mL の冷 PBS を注入して骨髄細胞を回収した。1500 rpm で 10 分間遠心を行った後、上清を捨て、PBS で細胞濃度を 1.0×10^7 cells/mL に調整し、ガンマ線照射 3-5 時間後のレシピエントマウスに 2.0×10^6 cells/200 μ L で尾静脈内投与した (59)。移植後、レシピエントマウスはフィルター付きケージ内で飼育し、10 日間 25 mg/L カナマイシン (Meiji Seika ファルマ) を飲用水で与え、移植 6 週後に実験に用いた。本論中の表記に関して、C57BL/6J レシピエントマウスに GFP 陽性 TRPM2^{+/+}を移植したマウスを TRPM2^{BM+/Rec+}、GFP 陽性 TRPM2^{-/-}を移植したマウスを TRPM2^{BM-/Rec+}、TRPM2KO レシピエントマウスに GFP 陽性 TRPM2^{+/+}を移植したマウスを TRPM2^{BM+/Rec-}、GFP 陽性 TRPM2^{-/-}を移植したマウスを TRPM2^{BM-/Rec-}と表記した。

6) フローサイトメトリー解析

骨髄移植 6 週後の骨髄キメラマウスより末梢血 100 μ L を尾静脈より採取した。採取した末梢血に、浸透圧を 1/3 にした生理食塩水 300 μ L を加え 10 秒間の振盪により溶血を行った後、生理食塩水 1 mL を加えて速やかに浸透圧を戻した。その後、 $2000 \times g$ で 5 分間遠心し上清を捨て、生理食塩水 1 mL にて洗浄を行い $2000 \times g$ で 5 分間遠心を行った。上清を捨て、0.02 M ethylenediaminetetraacetic acid および 0.01% bovine serum albumin を含む PBS 溶液 500 μ L に懸濁させ、フローサイトメーター (Gallios, Beckman Coulter, Brea, California, USA) を用いて、末梢血に含まれる GFP 陽性骨髄由来細胞の純度を測定した。ネガティブコントロールには C57BL/6J 由来末梢血を、ポジティブコントロールには GFP トランスジェニックマウス由来末梢血を用いた。

7) 蛍光免疫染色法

○経心灌流固定および冠状切片作製

後肢大腿骨上部の坐骨神経および L3-5 腰髄を摘出し、第一章実験方法と同じく切片を作製した。

○蛍光抗体法

一次抗体として、rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (019-19741, 1:500; WAKO) を、二次抗体として、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:500; Thermo Fisher Scientific) を用いた。各マウスあたり 2-3 枚の切片 (坐骨神経: 200 μ m \times 200 μ m、脊髄後角: 300 μ m \times 200 μ m) を Image J software (National Institute of Mental Health) により定量し、Iba1 陽性細胞数および GFP 陽性細胞数を定量した。その他については、第一章実験方法に同じ。

8) 統計解析

図中の数値は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で表記した。有意差検定は、機械的アロディニア測定には Kruskal-Wallis test に続く Dunn's *post hoc* test を、Iba1 陽性細胞数と GFP 陽性細胞数は one-way analysis of variance (ANOVA) に続く Tukey-Kramer *post hoc* test を用いて、Prism 5 software (GraphPad) により解析した。危険率 5% 未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

WT/TRPM2KO 骨髄キメラマウスの作製とフローサイトメトリー解析

末梢炎症性細胞に発現する TRPM2 の神経障害性疼痛への関与を検討するため、ガンマ線照射した野生型あるいは TRPM2KO レシピエントマウスに、野生型あるいは TRPM2KO ドナーマウス由来 GFP 陽性骨髄由来細胞を移植し、TRPM2 を正常に発現する骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM+/Rec+})、末梢炎症性細胞でのみ TRPM2 を欠損した骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM-/Rec+})、末梢炎症性細胞でのみ TRPM2 を発現した骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM+/Rec-})、全身で TRPM2 を欠損した骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM-/Rec-}) の 4 種類を作製した。フローサイトメトリーより、骨髄移植 6 週間において、骨髄キメラマウスにおける血液中の骨髄由来細胞は、90%以上が GFP 陽性細胞に置換されていた (図 2-1)。

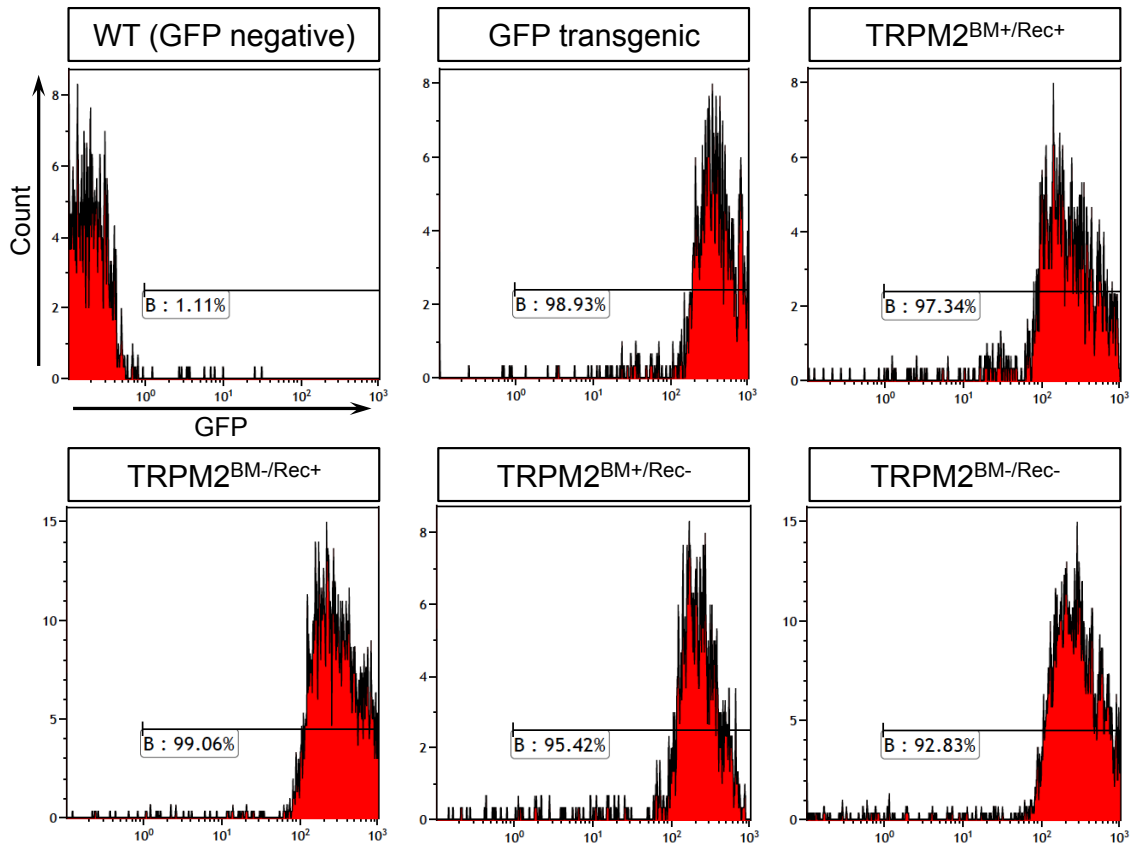


図 2-1 骨髄キメラマウスにおける血中 GFP 陽性細胞のフローサイトメトリー解析

各ヒストグラムは野生型マウス (A; GFP 陰性コントロール)、GFP 遺伝子改変マウス (B; GFP 陽性コントロール)、TRPM2^{BM+/Rec+} (C)、TRPM2^{BM-/Rec+} (D)、TRPM2^{BM+/Rec-} (E)、TRPM2^{BM-/Rec-} (F) の血液中における GFP 陽性細胞の割合を表す。実験に使用した骨髄キメラマウスでは、90%以上の骨髄由来細胞が置換されることを確認した。

骨髄キメラマウスにおける神経障害性疼痛

各骨髄キメラマウスで坐骨神経部分結紮モデル (pSNL) を作製したところ、TRPM2^{BM+/Rec+}マウスでは神経損傷後、処置側後肢の機械刺激に対する 50%逃避行動閾値が低下し、神経損傷 3、7、14 日後において有意な低下が認められた。一方、TRPM2 を欠損した各骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM-/Rec+}、TRPM2^{BM+/Rec-}、TRPM2^{BM-/Rec-}) では、神経損傷後の機械的アロディニアが減弱した。TRPM2^{BM-/Rec+}マウスでは、神経損傷 3 日後において、神経損傷前に比べ 50%逃避行動閾値の有意な低下が認められたが、神経損傷 7 および 14 日後には有意な低下は認められなかった。また TRPM2^{BM+/Rec-}マウスおよび TRPM2^{BM-/Rec-}マウスでは、神経損傷前と比べ 50%逃避行動閾値の有意な低下も認められず、TRPM2^{BM+/Rec+}マウスに比べ、TRPM2^{BM+/Rec-}マウスでは神経損傷 3 および 7 日後の機械的アロディニアが有意に減弱し、TRPM2^{BM-/Rec-}マウスでは神経損傷 3 日後の機械的アロディニアが有意に減弱していた (図 2-2A)。また、反対側の後肢への機械刺激に対する 50%逃避行動閾値には、各骨髄キメラマウスにおいて有意な変化は認められなかった (図 2-2B)。

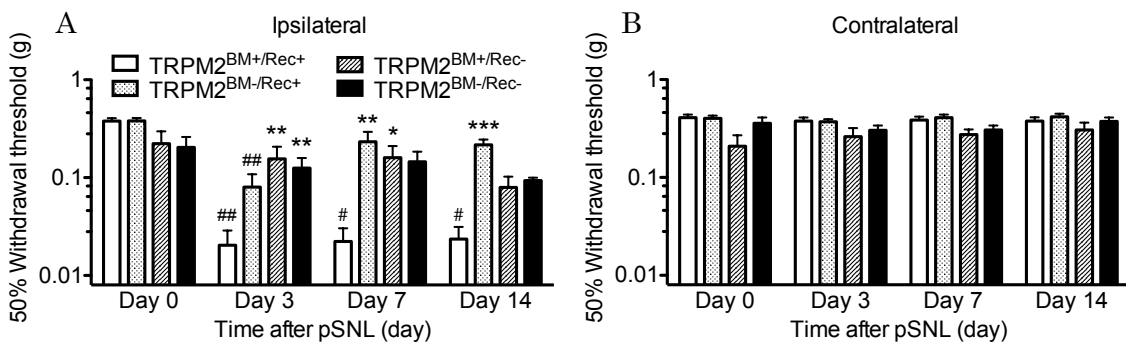


図 2-2 WT/TRPM2KO 骨髄キメラマウスでの末梢神経損傷後の機械的アロディニア

(A, B) 神経結紮前 (day 0) および神経結紮 3、7、14 日後において、各骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM+/Rec+}、TRPM2^{BM-/Rec+}、TRPM2^{BM+/Rec-}、TRPM2^{BM-/Rec-}) の神経結紮側 (A) および反対側 (B) 後肢の、機械刺激に対する 50%逃避行動閾値を von Frey フィラメントを用いて測定した。n = 5-7. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001, vs. TRPM2^{BM+/Rec+}. #*p* < 0.05; ##*p* < 0.01, vs. data of corresponding BM chimeric mice on day 0.

神経損傷後の坐骨神経への Iba1 陽性および GFP 陽性細胞の浸潤

GFP 陽性骨髄キメラマウスでは、神経損傷 3 から 14 日後にかけて GFP 陽性細胞が浸潤することが確認されているが、ここでは各骨髄キメラマウスにおける、神経損傷 14 日後の坐骨神経への GFP 陽性細胞の浸潤について検討を行った。まず神経損傷を与えていない反対側の坐骨神経への浸潤を検討したところ、各骨髄キメラマウスとも、わずかに Iba1 陽性細胞や GFP 陽性細胞が認められたが、有意な差は認められなかった (図 2-3A, B、表 2-1)。一方、坐骨神経結紮部位周辺では Iba1 陽性細胞や GFP 陽性細胞の著しい浸潤が認められ (図 2-3A, B)、50-65%の GFP 陽性細胞は Iba1 陽性細胞であることが明らかになった。GFP 陽性細胞数は TRPM2^{BM+/Rec+} や TRPM2^{BM+/Rec-} で増加傾向であったが、Iba1 陽性細胞や GFP 陽性細胞数に有意な差は認められず、さらに各骨髄キメラマウス間で Iba1 陰性/GFP 陽性細胞、Iba1 陽性/GFP 陽性細胞、Iba1 陽性/GFP 陰性細胞数に有意な差は認められなかった。また、Iba1 陽性/GFP 陰性細胞は全ての骨髄キメラマウスで、その割合が非常に少ないことが明らかになった (表 2-1)。

Contralateral sciatic nerve at 14 days after pSNL				
	TRPM2 ^{BM+/Rec+}	TRPM2 ^{BM-/Rec+}	TRPM2 ^{BM+/Rec-}	TRPM2 ^{BM-/Rec-}
Total cells	3.7 ± 0.7	4.3 ± 1.3	3.0 ± 0.6	3.4 ± 0.8
Iba1 ⁺ cells	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.2 ± 0.6
GFP ⁺ cells	3.3 ± 0.9	4.0 ± 1.5	3.0 ± 0.6	3.2 ± 0.7
Iba1 ⁻ /GFP ⁺ cells	3.0 ± 0.6	3.0 ± 1.2	2.0 ± 0.6	2.2 ± 0.9
Iba1 ⁺ /GFP ⁻ cells	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0	0.2 ± 0.2
Iba1 ⁺ /GFP ⁺ cells	0.3 ± 0.3	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.5

Ipsilateral sciatic nerve at 14 days after pSNL				
	TRPM2 ^{BM+/Rec+}	TRPM2 ^{BM-/Rec+}	TRPM2 ^{BM+/Rec-}	TRPM2 ^{BM-/Rec-}
Total cells	24.7 ± 7.3	25.0 ± 0.6	32.0 ± 4.6	20.6 ± 3.0
Iba1 ⁺ cells	18.7 ± 7.3	15.7 ± 3.7	17.0 ± 6.1	11.2 ± 3.6
GFP ⁺ cells	18.7 ± 4.3	23.3 ± 1.8	32.0 ± 4.6	19.6 ± 2.8
Iba1 ⁻ /GFP ⁺ cells	6.0 ± 2.0	9.3 ± 3.7	15.0 ± 2.5	9.4 ± 2.7
Iba1 ⁺ /GFP ⁻ cells	6.0 ± 3.2	1.7 ± 1.7	0	1.0 ± 1.0
Iba1 ⁺ /GFP ⁺ cells	12.7 ± 4.1	14.0 ± 2.0	17.0 ± 6.1	10.2 ± 3.3

表 2-1 神経損傷 14 日後の坐骨神経における Iba1 陽性および GFP 陽性細胞数

神経損傷 14 日後の坐骨神経における各細胞数を測定した。n = 3-5.

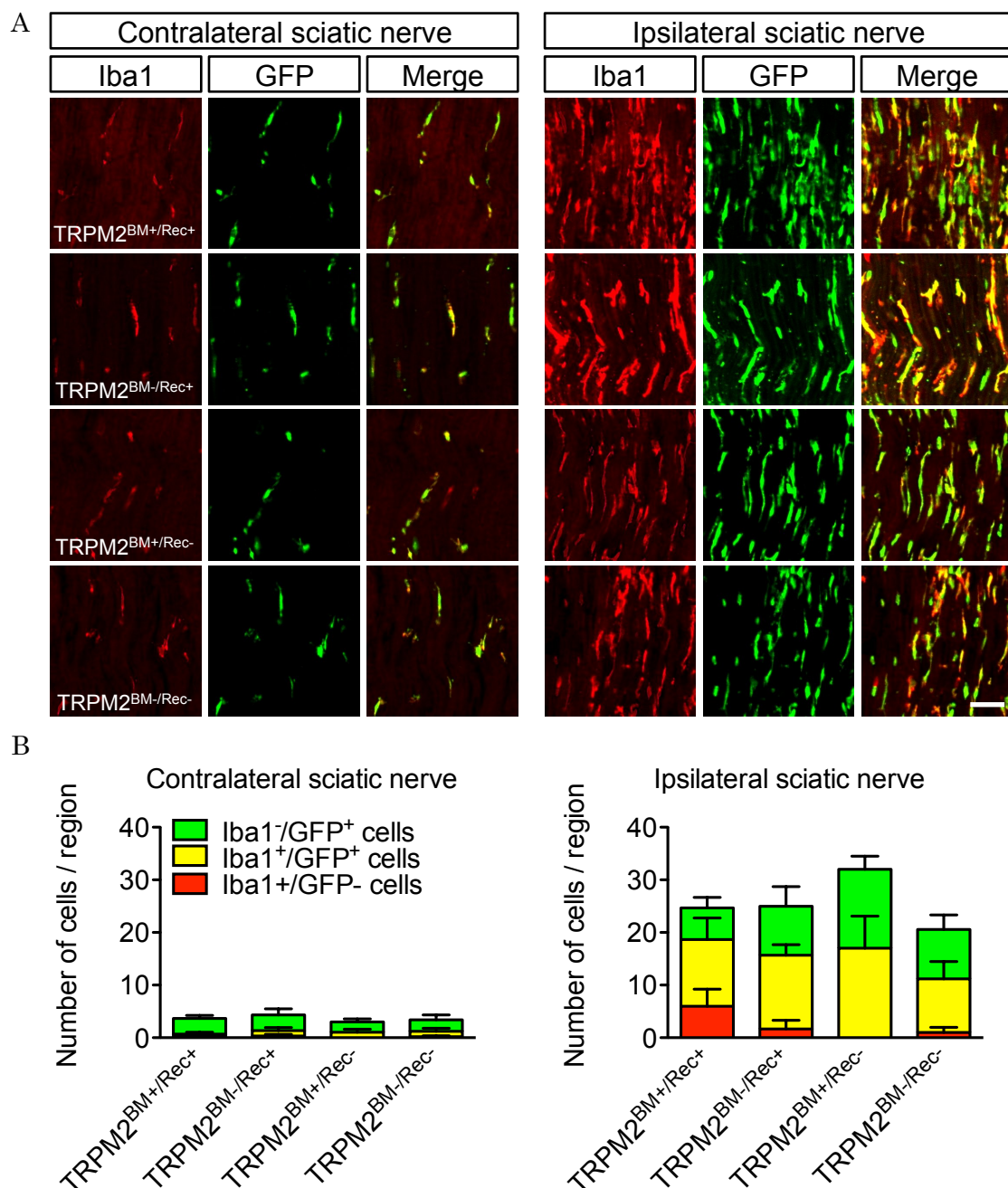


図 2-3 各骨髄キメラマウスの損傷坐骨神経への GFP 陽性骨髄由来細胞浸潤

(A, B) 神経損傷 14 日後の各骨髄キメラマウスの坐骨神経へ浸潤した GFP 陽性細胞および Iba1 陽性細胞を、GFP 蛍光 (緑) および抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色 (赤) により可視化し (A)、各細胞を定量した (B)。 $n = 3-5$ 。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を表す。

神経損傷後の脊髄後角における Iba1 陽性および GFP 陽性細胞の浸潤

次に脊髄後角における GFP 陽性細胞の浸潤について検討を行った。神経損傷に伴う骨髄由来細胞の浸潤はこれまでに報告されているが (39)、今回作製した骨髄キメラマウスでも神経損傷 14 日後において、損傷側の脊髄後角で Iba1 陽性細胞および GFP 陽性細胞が著しく上昇しており、50-95%の GFP 陽性細胞が Iba1 陽性細胞であることが明らかになった (図 2-4A, B)。さらに、Iba1 陽性細胞や GFP 陽性細胞は TRPM2^{BM+/Rec+} に比べ、TRPM2 を欠損した各骨髄キメラマウス (TRPM2^{BM-/Rec+}、TRPM2^{BM+/Rec-}、TRPM2^{BM-/Rec-}) において有意ではないものの減少しており、Iba1 陽性/GFP 陽性細胞の数は有意に減少していた。しかし、Iba1 陽性/GFP 陰性細胞や Iba1 陰性/GFP 陽性細胞には各骨髄キメラマウス間で有意な差は認められなかった (図 2-4B, C、表 2-2)。反対側の脊髄後角では、いずれの骨髄キメラマウスにおいても上述の細胞種はほとんど認められず、各骨髄キメラマウス間での差も認められなかった (図 2-4B, C、表 2-2)。

Contralateral spinal dorsal horn at 14 days after pSNL				
	TRPM2 ^{BM+/Rec+}	TRPM2 ^{BM-/Rec+}	TRPM2 ^{BM+/Rec-}	TRPM2 ^{BM-/Rec-}
Total cells	3.7 ± 0.7	4.0 ± 2.0	5.0 ± 0.4	5.2 ± 1.7
Iba1 ⁺ cells	3.0 ± 0.0	3.3 ± 1.9	3.6 ± 0.9	3.8 ± 1.4
GFP ⁺ cells	1.0 ± 1.0	1.0 ± 0.6	2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.8
Iba1 ⁺ /GFP ⁺ cells	0.7 ± 0.7	0.7 ± 0.3	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.5
Iba1 ⁺ /GFP ⁻ cells	2.7 ± 0.3	3.0 ± 2.1	2.4 ± 0.6	3.2 ± 1.1
Iba1 ⁺ /GFP ⁺ cells	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.7 ± 0.5

Ipsilateral spinal dorsal horn at 14 days after pSNL				
	TRPM2 ^{BM+/Rec+}	TRPM2 ^{BM-/Rec+}	TRPM2 ^{BM+/Rec-}	TRPM2 ^{BM-/Rec-}
Total cells	41.0 ± 4.6	25.0 ± 10.1	24.3 ± 1.5	23.8 ± 5.8
Iba1 ⁺ cells	39.0 ± 3.6	20.0 ± 7.9	20.0 ± 2.0	20.2 ± 5.7
GFP ⁺ cells	32.7 ± 5.5	15.0 ± 10.0	19.4 ± 3.2	13.3 ± 2.6
Iba1 ⁺ /GFP ⁺ cells	2.0 ± 1.0	5.0 ± 5.0	4.2 ± 1.8	3.7 ± 1.1
Iba1 ⁺ /GFP ⁻ cells	8.3 ± 1.8	10.0 ± 5.5	4.8 ± 2.6	10.5 ± 3.7
Iba1 ⁺ /GFP ⁺ cells	30.7 ± 4.6	10.0 ± 5.5*	15.2 ± 2.3*	9.7 ± 2.7**

表 2-2 神経損傷 14 日後の脊髄後角における Iba1 陽性および GFP 陽性細胞数

神経損傷 14 日後の脊髄後角における各細胞数を測定した。n = 3-6.

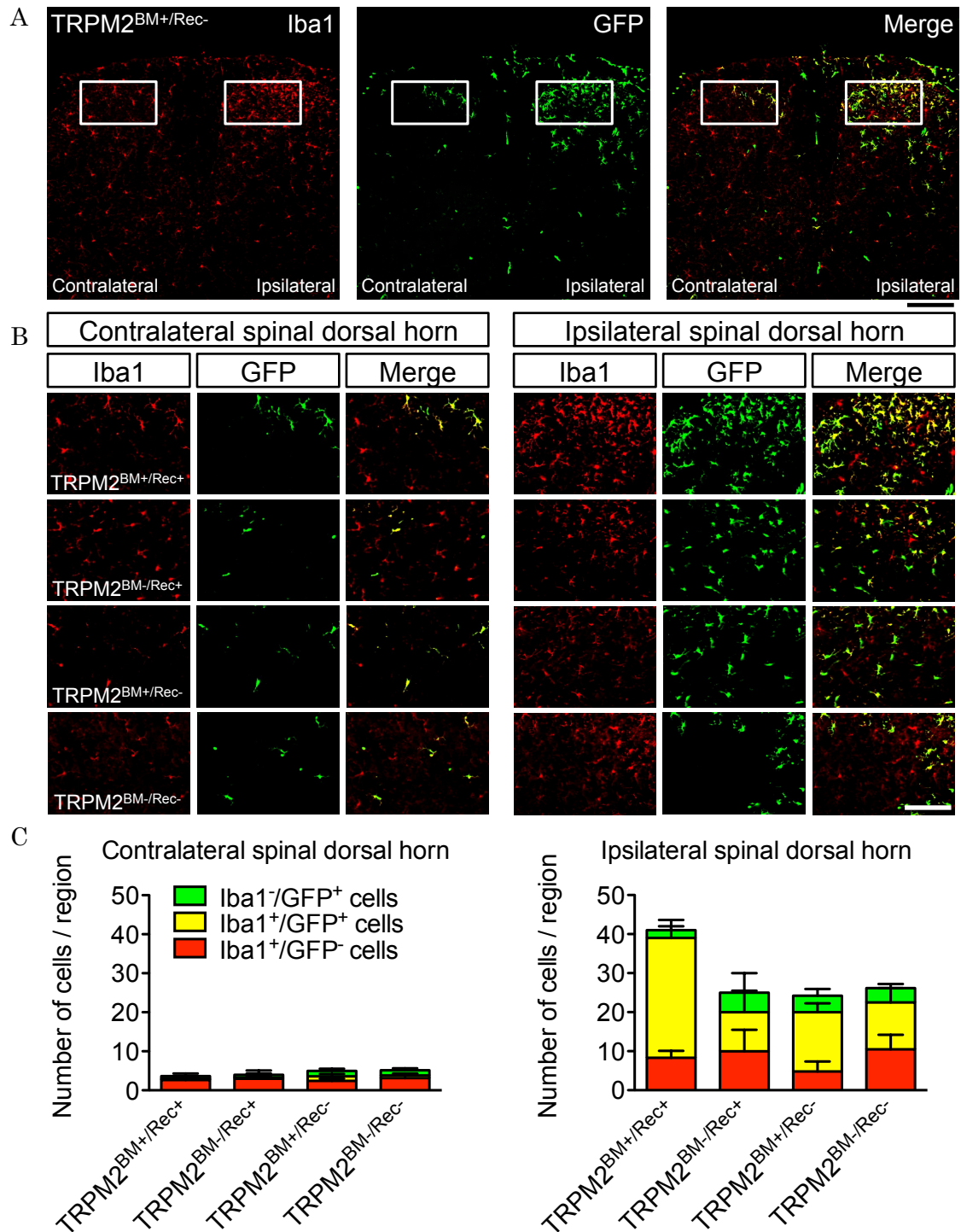


図 2-4 各骨髄キメラマウスの脊髄後角への GFP 陽性骨髄由来細胞浸潤

(A-C) 神経損傷 14 日後の各骨髄キメラマウスの脊髄における GFP 陽性細胞および Iba1 陽性細胞を、GFP 蛍光（緑）および抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色（赤）により可視化し（A, B）、各細胞を定量した（C）。 $n = 3-6$ 。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ （A）および $100 \mu\text{m}$ （B）を表す。

考察

野生型マウスと TRPM2KO マウスより作製した骨髄キメラマウスを用いて、本研究より末梢炎症性細胞や脊髄ミクログリアに発現する TRPM2 が、神経損傷後のマクロファージの脊髄内浸潤に関与し神経障害性疼痛に寄与することを明らかにした。

これまで TRPM2KO マウスにおいて神経障害性疼痛が減弱することを確認しており、神経損傷早期の坐骨神経への好中球の浸潤抑制および脊髄ミクログリアの活性化が抑制されることを明らかにしている (52)。好中球の坐骨神経への浸潤には、マクロファージの TRPM2 を介した、好中球の強力な遊走因子である CXCL2 ケモカイン (60) の産生が寄与することを確認しているが、好中球の浸潤は神経損傷 1 日後という非常に早期においてのみ認められる。一方で、Iba1 を指標とした脊髄ミクログリアの活性化抑制は、神経損傷 3 から 14 日後という長期にわたり TRPM2KO マウスで認められ、TRPM2 欠損による長期にわたる脊髄ミクログリア活性化抑制が神経障害性疼痛の形成に大きく寄与していたと考えられる。この仮説は脊髄ミクログリアで TRPM2 を欠損した TRPM2^{BM+/Rec-}マウスで神経損傷に伴う機械的アロディニアが減弱していた結果と一致する。しかしながら、脊髄ミクログリアで TRPM2 を発現する TRPM2^{BM-/Rec+}マウスでも機械的アロディニアが減弱していたことから、マクロファージ等の骨髄由来末梢炎症性細胞に発現する TRPM2 も神経障害性疼痛の維持に寄与することが示唆される。

今回作製した骨髄キメラマウスでは、神経損傷 14 日後の坐骨神経で多数の GFP 陽性細胞が浸潤し、半数以上が Iba1 陽性マクロファージであったが、TRPM2^{BM-/Rec+}マウスにおいて、Iba1 陽性/GFP 陽性マクロファージをはじめとする GFP 陽性細胞の数に TRPM2^{BM+/Rec+}マウスとの差が認められなかったことから、マクロファージ等の骨髄由来細胞の遊走能に TRPM2 が関与していないことが示唆された。しかしながら、マクロファージに発現する TRPM2 が炎症性サイトカインの発現に関与することも報告されており (49)、TRPM2^{BM-/Rec+}ではマクロファージによる末梢神経感作が TRPM2^{BM+/Rec+}に比べ減弱していた可能性が考えられる。

一方で、神経損傷 14 日後の脊髄後角において、TRPM2 を欠損した全ての骨髄キメラマウスで Iba1 陽性細胞が減少傾向であることが認められたが、常在性脊髄ミクログリアを示す Iba1 陽性/GFP 陰性細胞の数には、各 TRPM2 欠損骨髄キメラマウスで差は認められず、Iba1 陽性/GFP 陽性マクロファージの浸潤のみが有意に抑制されていた。GFP 陽性骨髄キメラマウスを用いた検討から、神経損傷 7 日以降から骨髄由来細胞の脊髄内浸潤が認められることを確認しており、また TRPM2KO マウスを用いた以前の検討では、神経損傷に伴う初期のミクログリア活性化に TRPM2 が関与することを明ら

かにしたが (52)、今回の結果は、少なくとも神経損傷 14 日後の常在性脊髄ミクログリア増殖への TRPM2 の関与は小さく、損傷後期の脊髄で増加した Iba1 陽性細胞のほとんどが脊髄内浸潤したマクロファージであることを示唆している。脊髄内に浸潤したマクロファージはミクログリア様に分化することが報告されており (39)、また TRPM2 欠損骨髄キメラマウスでは神経障害性疼痛が減弱していたことから、脊髄内浸潤したマクロファージは常在性脊髄ミクログリアとともに神経障害性疼痛の形成や維持に寄与することも示唆される。

神経損傷に伴う末梢炎症性細胞の脊髄内浸潤はこれまでも報告されており (37-41)、血液脊髄関門の破綻が関与すると示唆されている (61, 62)。血液脊髄関門は脊髄と末梢血管の間に形成される、物理的および生化学的なバリアーであるが、末梢神経損傷に伴う脊髄内炎症応答は血液脊髄関門を破綻させ、脊髄内への炎症性メディエーターや末梢炎症性細胞の浸潤を促すこととなる。この脊髄内浸潤に TRPM2 がどのように関与するかを明らかにできなかったが、TRPM2^{BM+/Rec-}では、TRPM2 を介した常在性脊髄ミクログリア活性化抑制が、神経損傷に伴う脊髄内微小環境の変化を抑え、血液脊髄関門の破綻や末梢炎症性細胞の脊髄内浸潤を抑制したと考えられる。しかしながら、血液脊髄関門の破綻は脊髄ミクログリアの活性化に非依存적であるとの報告もあり (61)、また脊髄ミクログリアで TRPM2 を発現する TRPM2^{BM-/Rec+}マウスでも脊髄内浸潤が抑制されたことから、脊髄内浸潤の詳細なメカニズム解明にはさらなる検討が必要である。

さらに、骨髄キメラマウス作製時のガンマ線の照射により、血液脳関門の破綻 (63) や単球/マクロファージ遊走因子である CCL2 ケモカインの産生増大 (64)、血管拡張作用を有する PGE₂ の COX2 を介した産生増大などが報告されており (65)、ガンマ線非照射の動物に比べ、脊髄内浸潤が生じやすくなることが懸念されている。もちろん、ガンマ線非照射の動物においても神経損傷に伴う血液脊髄関門の破綻や骨髄由来細胞の脊髄内浸潤が報告されているが (38, 40, 41, 61)、骨髄キメラマウス作製時の適切なガンマ線照射についての検討も必要になると考えられる。

本研究より、末梢炎症性細胞あるいは脊髄ミクログリア等で TRPM2 を欠損した各骨髄キメラマウスで、TRPM2^{BM-/Rec-}マウスと同様に、神経障害性疼痛が抑制されることを明らかにした。TRPM2 を欠損した各骨髄キメラマウスでは、神経損傷 14 日後における脊髄後角への骨髄由来細胞、特にマクロファージの浸潤が抑制されており、脊髄ミクログリアや末梢炎症性細胞に発現する TRPM2 が、末梢神経損傷に伴う骨髄由来細胞の脊髄内浸潤に重要な役割を担うことが示唆される。また、マクロファージの脊髄内浸潤が常在性脊髄ミクログリア活性化よりも遅れて認められることから、脊髄内浸潤したマクロファージが神経障害性疼痛の慢性化に寄与することが示唆される。

第三章

マウス系統間の神経障害性疼痛感受性差における炎症性細胞の関与

神経損傷により麻痺や感覚異常、重度の機械的アロディニアを伴う神経障害性疼痛が惹起され (66)、約 7%の神経障害性疼痛患者は既存の薬が奏効しない難治性疼痛へと進行する (67)。これまでに複数の慢性疼痛動物モデルが作製され、神経障害性疼痛の形成や維持のメカニズムについて検討が行われているが (35)、末梢や中枢における自然免疫機構と神経系の相互作用を理解することが、神経障害性疼痛の複雑な機構を解明するにあたって重要になると考えられる(34, 68)。神経損傷に伴い、マクロファージや T 細胞、好中球等の末梢炎症性細胞が活性化し、ケモカインやサイトカイン、ニューロトロフィンを放出するが、これにより神経系と免疫系の相互連関が促され、末梢神経感作が惹起される (34, 69)。脊髄後角では、損傷を受けた一次感覚神経からの持続的な痛みシグナルにより、ミクログリアやアストロサイトといった脊髄グリア細胞の活性化が惹起され、細胞外シグナル分子の放出を介して、脊髄神経における神経興奮性や痛み伝達に影響を与える (70-74)。このように、末梢や中枢の免疫系に着目した検討から、神経障害性疼痛病態形成に重要な役割を果たす、いくつかの免疫因子が明らかになっているが (74, 75)、時間的 (早期あるいは後期) および空間的 (末梢あるいは中枢) な免疫応答の神経障害性疼痛形成への寄与については十分に解明されていない。

一方、ある種の病態の臨床的特徴には少なからず個人差が認められており、異なる遺伝的背景を有する近交系マウスを用いた検討から、遺伝的変異による免疫応答の違いは病態の多様性に影響することが示唆されている。例えばハプロタイプに基づいた遺伝的解析により、MHC ハプロタイプの T 細胞活性化への影響は、呼吸器多核体ウイルス感染症 (RS ウイルス感染症) の後遺症や (76)、薬剤による接触性皮膚炎 (77)、自己免疫疾患 (78, 79) 等の感受性の重要な決定因子であることが報告されている。しかしながら、これまでの痛み研究は遺伝的に均一な単一のマウス系統のみを用いて行われており、疾患の重症度や進行度の個人差という臨床的特徴を説明するには不十分であったと考えられる。そのため、ストレイン特異的な疼痛フェノタイプを、免疫応答の時間空間的な観点から検討することは、遺伝的多様性に基づく神経障害性疼痛の個人差の理解を深めるために有用であると考えられる。

そこで本研究では、異なる遺伝的背景を有する 4 系統の近交系マウス (C57BL/6J、C3H/He、DBA/2、A/J) を用い、神経障害性疼痛感受性差のメカニズムについて、末梢および中枢における経時的な免疫応答の変化に着目し検討を行った。

実験方法

1) 使用動物

実験には雄性 C57BL/6J 系、C3H/He 系、DBA/2 系および A/J 系マウス（体重 20-25 g、6-8 週齢；日本 SLC）を使用した。その他については、第二章実験方法に同じ。

2) 使用薬物

LPS および ATP は Sigma-Aldrich 社より購入した。IL6 は BioLegend 社 (San Diego, California, USA) より購入した。CX3CL1 は R&D Systems 社 (Minneapolis, Minnesota, USA) より購入した。その他については、第二章実験方法に同じ。

3) 神経障害性疼痛モデル作製

○坐骨神経部分結紮モデル

第二章実験方法に同じ。

○脊髄神経切断モデル

既報に従い、脊髄神経切断 (spinal nerve transection; SNT) モデルを作製した (80, 81)。ソムノペンチル麻酔下 (64.8 mg/kg)、ヒビテン液にて消毒したオペ道具 (FST) を用いて、マウス背部皮膚を切開し、L4 腰髄由来脊髄神経を露出後、マイクロ剪刀 (MB-51-7、株式会社夏目製作所) にて神経を切断した。その後、切開した皮膚を絹製縫合糸 (株式会社村瀬縫合糸) で縫合し、周辺をイソジンにて消毒した。

4) 疼痛様行動の評価

○von Frey フィラメントテスト (up-down 法)

刺激強度の異なる 7 本の von Frey フィラメント (North Coast Medical; 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1.0, 2.0 g) を用い、第二章実験方法に同じく測定を行った。

○Hot plate テスト

熱性侵害刺激に対する受容閾値の測定は、hot plate (UGO BASILE, Milan, Italy) を用いて行った。常温の hot plate 上にアクリル製の観察筒を置き、マウスを 15 分馴化させホームケージへと戻した。その後 hot plate を 52 °C あるいは 55 °C に保ち、再度マウスを観察筒に入れ、lifting、licking、biting あるいは jumping 行動を呈するまでの時間を測定した。後肢の火傷による傷害を防ぐため、cut off time は 25 秒とした。

○Hargreaves test

熱性侵害刺激に対する受容閾値の測定は Hargreaves radiant heat apparatus (UGO BASILE) を用いて行った。ガラス板の上に設置したアクリル製の囲いにマウスを入れ、1 時間以上馴化させた後、測定を行った。正常マウスが 12~15 秒で逃避行動を示すように光線の強度を設定した。マウス足底に光線を照射し逃避行動を呈するまでの時間を測定した。この試行を 3 回行い、3 回の測定時間の平均値を熱刺激に対する反応潜時とした。後肢の火傷による傷害を防ぐため、cut off time は 25 秒とした。

5) 骨髄キメラマウスの作製

ドナーマウスおよびレシピエントマウスには 6 週齢の雄性 C57BL/6GFP、C57BL/6J、C3H/He を用い、レシピエントマウスには 8 Gy あるいは 10 Gy のガンマ線を照射した。その他については、第二章実験方法に同じ。本論中の表記に関して、C57BL/6J レシピエントマウスに C57BL/6J を移植したマウスを C57BL/6J^{C57BL/6J-BM}、C3H/He を移植したマウスを C57BL/6J^{C3H/He-BM}、C57BL/6GFP を移植したマウスを C57BL/6J^{C57BL/6GFP-BM}、C3H/He レシピエントマウスに C57BL/6J を移植したマウスを C3H/He^{C57BL/6J-BM}、C3H/He を移植したマウスを C3H/He^{C3H/He-BM}、C57BL/6GFP を移植したマウスを C3H/He^{C57BL/6GFP-BM}、C57BL/6GFP に C3H/He を移植したマウスを C57BL/6GFPC^{3H/He-BM} と表記した。

6) フローサイトメトリー解析

フローサイトメーター (BD FACSAria™ II, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) を用いて、末梢血に含まれる GFP 陽性骨髄由来細胞の純度を測定した。ネガティブコントロールには C57BL/6J あるいは C3H/He 由来末梢血を、ポジティブコントロールには C57BL/6GFP 由来末梢血を用いた。解析には FACSDiva™ software (Becton, Dickinson and Company) を用いた。その他については、第二章実験方法に同じ。

7) 蛍光免疫染色法

○経心灌流固定および冠状切片作製

後肢大腿骨上部の坐骨神経、L4 腰髄由来後根神経節 (DRG) および、L3-5 腰髄周辺を摘出し、第一章実験方法に同じく切片を作製した。

○蛍光抗体法

一次抗体として、rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (019-19741, 1:500; WAKO)、rat monoclonal anti-CD206 antibody (MCA2235A488, 1:400; AbD Serotec, Kidlington, UK)、mouse monoclonal anti-TLR4 antibody (ab22048, 1:100; abcam, Cambridge, UK)、rabbit polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (Z0334, 1:500; Dako, Denmark) を用い、二次抗体として、Alexa Fluor 594-, 488- or 405-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:500; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rat IgG (1:400; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-mouse IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) を用いた。各マウスあたり 2-3 枚の切片を Image J software (National Institute of Mental Health) により定量し、各指標の免疫活性強度と陽性細胞数を定量した。その他については、第一章実験方法に同じ。

8) リアルタイム RT-PCR 法

培養細胞、L4 腰髄由来 DRG および L3-L5 腰髄から、第一章実験方法に同じく全 RNA の回収、および定量的リアルタイム PCR を行った。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである (北海道システム・サイエンス株式会社)。

IL1B (Fw: 5'-TCC AGG ATG AGG ACA TGA GCA C-3', Rv: 5'-GAA CGT CAC ACA CCA GCA GGT TA-3'), CX3CL1 (Fw: 5'-GCG ACA AGA TGA CCT CAC GA-3', Rv: 5'-TGT CGT CTC CAG GAC AAT GG-3'), IL6 (Fw: 5'-GGG ACT GAT GCT GGT GAC AA-3', Rv: 5'-TGC CAT TGC ACA ACT CTT TTC T-3'), IL1R1 (Fw: 5'-GTC ATT CTT GTG CAC GCC AG-3', Rv: 5'-AAC TGC CTC CTC AAG TCA GC-3'), CX3CR1 (Fw: 5'-GCG ACA AGA TGA CCT CAC GA-3', Rv: 5'-TGT CGT CTC CAG GAC AAT GG-3'), IL6R α (Fw: 5'-CTT GGA TAG CAG AGC CCA GGA-3', Rv: 5'-CGT ACT GAT CCT CGT GGT TGG-3'), CCL2 (Fw: 5'-AAC TCT CAC TGA AGC CAG CTC T-3', Rv: 5'-GTG GGG CGT TAA CTG CAT-3'), TNF α (Fw: 5'-TAG CCC ACG TCG TAG CAA AC-3', Rv: 5'-ACA AGG TAC AAC CCA TCG GC-3'), 18S rRNA (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA-3').

9) ミクログリア初代培養

培養ミクログリアは C57BL/6J あるいは C3H/He マウス新生仔 (P0-2 day) の全脳より単離培養した (82)。氷冷麻酔を行ったマウス新生仔より全脳を摘出し、0.25% trypsin 及び 0.1 mg/mL bovine pancreatic DNaseI (Sigma-Aldrich) を含有する Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, D5796, Sigma-Aldrich) を用いて、15 分間 37 °C で処理を施した。1700 rpm で 10 分遠心後、培養液は 10% 非働化ウシ血清 (FBS, JRH Biosciences)、5 µg/mL インスリン (Sigma-Alcrich)、1 % antibiotic-antimycotic solution (ナカライテスク) を含む DMEM 培地に再懸濁し、75 cm² の培養フラスコ (Thermo Fisher Scientific) に播種し、37 °C、5 % CO₂ インキュベーターで培養した。2 日後に培地を交換した後、以降 3-4 日毎に培地を交換した。2-3 週間後、培養フラスコを 150 rpm で 90 分振盪後、上清を回収しペトリ皿 (#351029, BD Falcon) に播種し、数時間のプレインキュベーションの後、各種薬物を処置した。

1 0) 脊髄くも膜下腔内 (i.t.) 投与

マウス背部皮膚を切開し、L3 と L4 の棘突起を露出させた。27G 注射針 (NN-2725R、テルモ) を先端に付けたカテーテル (Intramedic® Cray Adams® PE10, Becton, Dickinson and Company) をハミルトンシリンジ (Hamilton 1710 LT, Hamilton Company, Nevada, USA) に装着し、L3 と L4 の棘突起中間の椎間関節に脊髄を傷つけないように挿入し、薬物を 4 あるいは 5 µL/mouse で投与した。

1 1) 統計解析

図中の数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。有意差検定は、無処置 C57BL/6J および C3H/He 間での機械刺激や熱刺激感受性の検討、および骨髄キメラマウスのアロディニア測定には Student's t-test を、それ以外は two-way analysis of variance (ANOVA) に続く Bonferroni's *post hot* test を用いて、Prism 6 software (GraphPad) により解析した。危険率 5 % 未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

C3H/He マウスにおける神経障害性疼痛の低感受性

4系統の近交系マウスにおける神経障害性疼痛感受性の違いを検討するため、坐骨神経部分結紮モデル (pSNL) を作製し、処置側後肢の機械的アロディニアを測定した。C57BL/6J および A/J マウスでは4週間にわたる持続的な神経障害性疼痛が惹起され、C3H/He マウスでは C57BL/6J や A/J マウスと比べると神経障害性疼痛は低感受性であった。DBA/2 マウスでは損傷7日後までは C57BL/6J や A/J マウスと類似の機械的アロディニアを示したが、14日以降においては C57BL/6J と C3H/He マウスの中間程度の機械的アロディニアであった。また、反対側の触刺激に対する逃避行動閾値にマウスストレイン間における有意な差は認められなかった (図 3-1A)。この結果に基づき、C57BL/6J および C3H/He マウスをそれぞれ、神経障害性疼痛高感受性あるいは低感受性マウスとした。次に、無処置 C57BL/6J および C3H/He マウスの触刺激 (von Frey フィラメント) や熱刺激 (放射熱およびホットプレート) に対する応答性について検討を行ったが、各刺激に対する応答性に両系統間で有意な差は認められなかった (図 3-1B)。

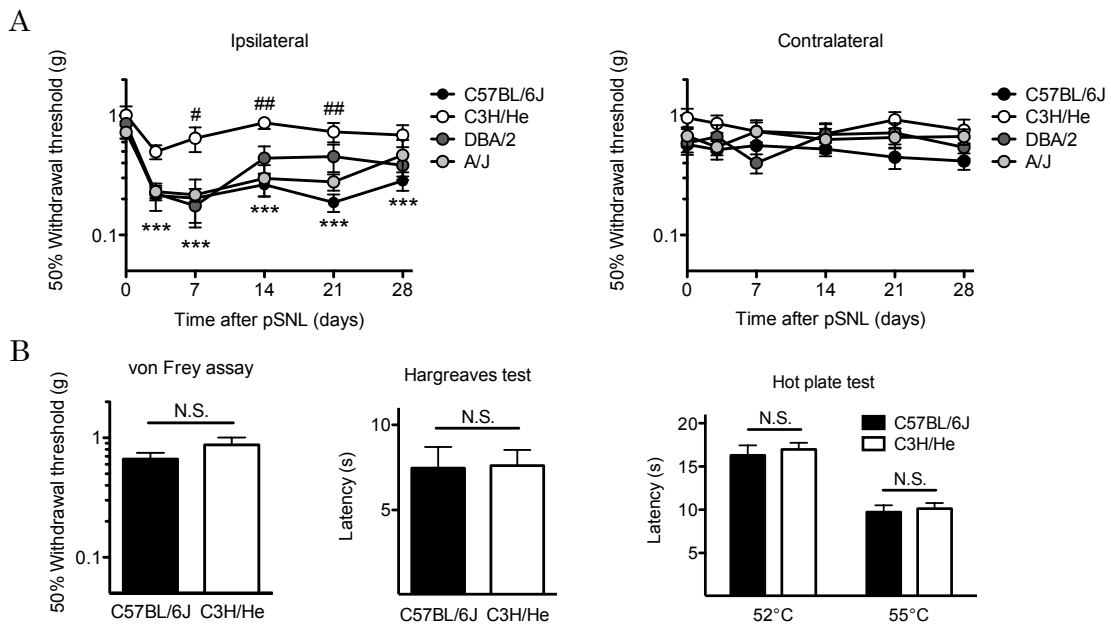


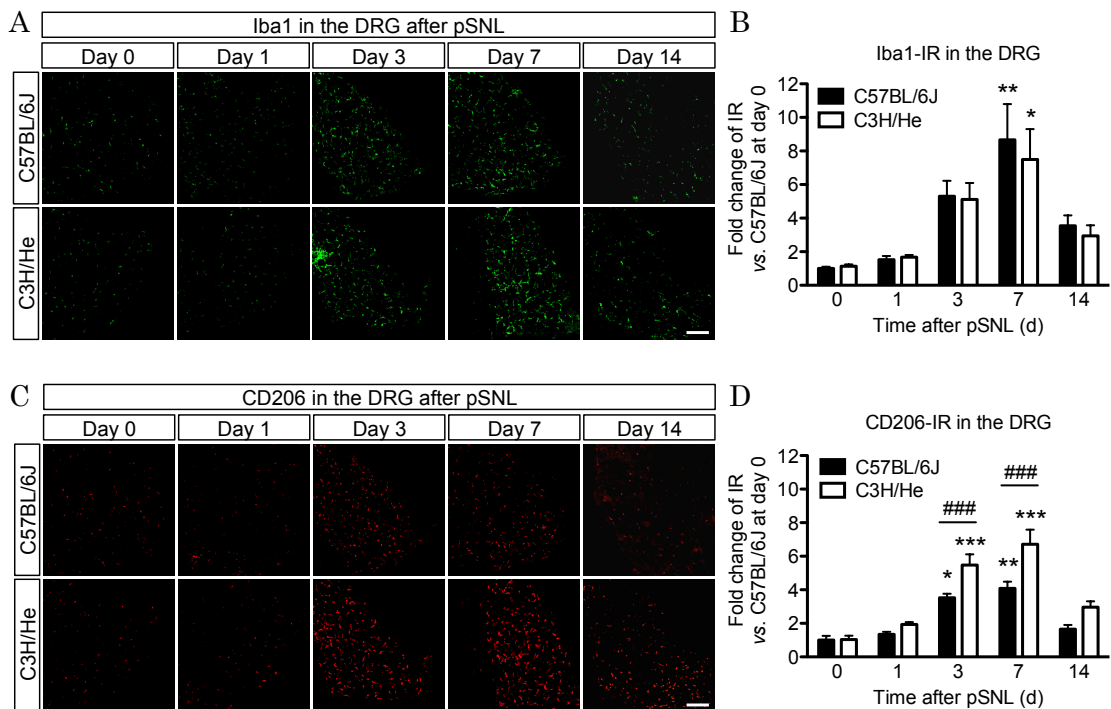
図 3-1 マウス系統間における神経障害性疼痛感受性差

(A) 各マウス系統の機械的アロディニアは von Frey フィラメントで測定した。 $n = 7$ 。 $***p < 0.001$, vs. C57BL/6J on day 0. $\#p < 0.05$; $\#\#p < 0.01$, vs. C57BL/6J.

(B) C57BL/6J と C3H/He マウスの正常時の機械刺激に対する 50%逃避行動閾値を von Frey フィラメントにより ($n = 14$)、熱刺激に対する反応潜時を Hargreaves テスト ($n = 6$) とホットプレートテスト ($n = 7-8$) により測定した。

神経損傷に伴う C3H/He 特異的な DRG マクロファージの M2 フェノタイプ

C57BL/6J と C3H/He マウス間における神経障害性疼痛感受性差を明らかにするため、遺伝的相違による末梢および中枢免疫系の違いに着目し、L4 腰髄由来 DRG および L4 腰髄周辺の脊髄を、マクロファージやグリア細胞の指標を用いて免疫染色を行った。ミクログリアおよび末梢マクロファージの指標である Iba1 免疫活性強度は神経損傷側の DRG において、神経損傷 3 から 14 日にかけて上昇しており、神経損傷 7 日後には有意な免疫活性の増大が認められた。この Iba1 免疫活性は両系統間で同程度に認められた (図 3-2A, B)。また、同一 DRG 切片において、Iba1 標識された細胞が、抗炎症性 M2 マクロファージの指標である CD206 免疫活性を示すことも明らかになり、特に神経損傷 3 から 7 日後にかけて免疫活性の有意な上昇が認められたが、C57BL/6J に比べ C3H/He マウスでは CD206 免疫活性が有意に強いことが明らかになった (図 3-2C, D)。末梢神経損傷 3 日後の DRG では、炎症性 M1 マクロファージの指標である TLR4 の免疫活性も、Iba1 標識された細胞で有意に上昇することが確認されたが、C57BL/6J と C3H/He マウス間で免疫活性に有意な差は認められなかった (図 3-2E, F)。



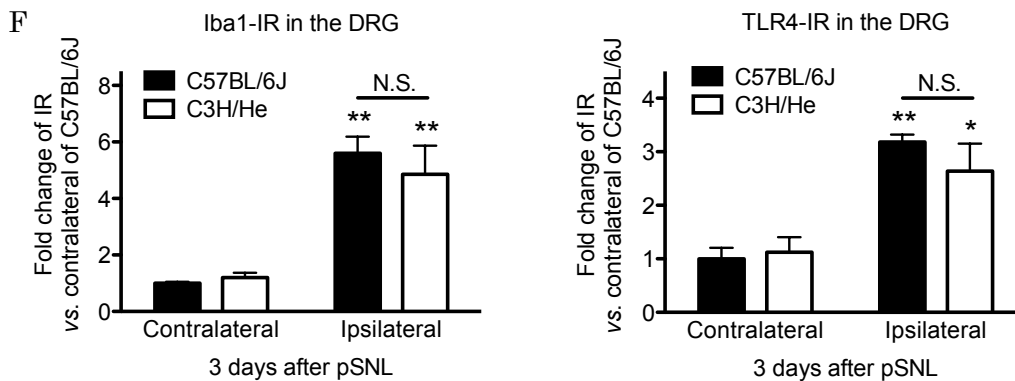
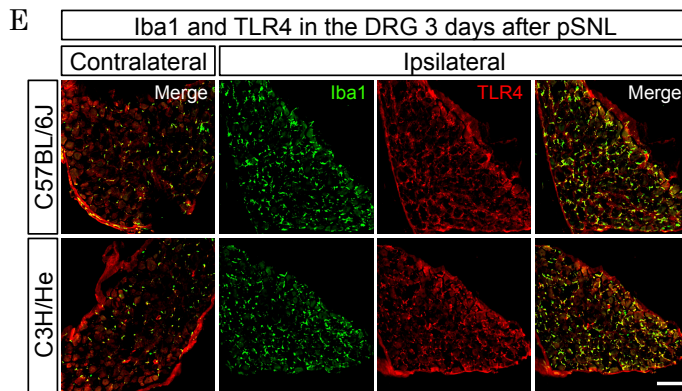


図 3-2 神経損傷に伴うストレイン特異的な DRG マクロファージフェノタイプ

(A-D) 神経損傷後の DRG における Iba1 (A; 緑) および CD206 (C; 赤) の免疫染色画像と各染色画像における免疫活性強度の定量結果 (B; Iba1、D; CD206)。免疫活性強度は反対側の DRG を基準とし、神経損傷前 (day 0) の C57BL/6J の免疫活性強度に対する相対値として算出した。 $n = 4-10$ 。 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. data of corresponding strains on day 0. ### $p < 0.001$, vs. C57BL/6J. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

(E, F) 神経損傷 3 日後の DRG における Iba1 (緑) および TLR4 (赤) の免疫染色画像 (E) と各染色画像における免疫活性強度の定量結果 (F)。免疫活性強度は C57BL/6J の反対側を基準とした相対値として算出した。 $n = 3$ 。 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs. contralateral side of C57BL/6J. N.S., not significant. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

神経損傷後の C3H/He における脊髄ミクログリアの低活性化

続いて、神経損傷後の中枢神経感作に非常に重要である脊髄免疫応答について C57BL/6J と C3H/He マウス間で比較検討を行った。C57BL/6J および C3H/He 両系統において、神経損傷 3 から 14 日後にかけて Iba1 を指標としたミクログリア活性化が認められ、神経損傷 7 日後に最も顕著であることが確認されたが、神経損傷 7 および 14 日後の Iba1 免疫活性は、C3H/He では C57BL/6J マウスに比べ有意に弱いことが明らかになった (図 3-3A, B)。一方で、損傷側の脊髄後角において、GFAP を指標としたアストロサイトの活性化も、神経損傷 7 および 14 日後に認められたが、GFAP 免疫活性は両系統間で同程度であった (図 3-3C, D)。

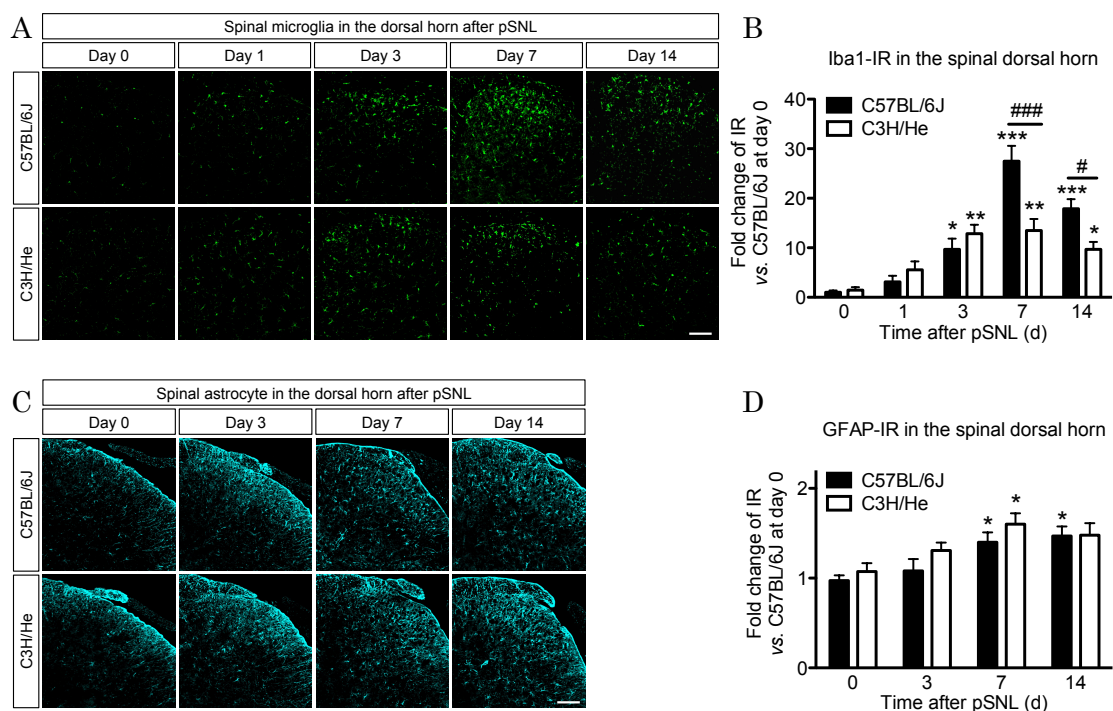


図 3-3 神経損傷に伴うストレイン特異的な脊髄グリア細胞活性

(A-D) 神経損傷後の脊髄後角における Iba1 (A; 緑) および GFAP (C; シアン) の免疫染色画像と各染色画像における免疫活性強度の定量結果 (B; Iba1, $n = 3-6$; D; GFAP, $n = 3-4$)。免疫活性強度は反対側の脊髄後角を基準とし、神経損傷前 (day 0) の C57BL/6J の免疫活性強度に対する相対値として算出した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. data of corresponding strains on day 0. # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$, vs. C57BL/6J. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

神経損傷に伴うミクログリア活性化因子の DRG および脊髄での発現変動

脊髄ミクログリア応答性の違いのメカニズムを明らかにするため、ミクログリア活性化に関連する DRG 神経由来炎症性メディエーターの、神経損傷後の発現変動の違いについて、C57BL/6J と C3H/He マウス間で比較を行った。リアルタイム PCR による mRNA の定量的解析により、神経損傷 7 日後の DRG において C57BL/6J では炎症性サイトカイン (IL1 β , IL6) やフラクタルカイン (CX3CL1) の発現量が無処置 C57BL/6J マウス由来 DRG に比べ有意に上昇することが明らかになったが、神経損傷後の C3H/He 由来 DRG ではこれら炎症性メディエーターの有意な発現上昇は認められなかった (図 3-4A, B, C)。一方で、神経損傷 7 日後の脊髄における、上記炎症性メディエーターの受容体 mRNA 発現変動についても検討を行ったところ、C57BL/6J 由来脊髄では IL6 α (IL6 受容体) と CX3CR1 (CX3CL1 受容体) mRNA が有意に増加したのに対し (図 3-4E, F)、C3H/He 由来脊髄では CX3CR1 mRNA のみ有意な発現上昇が認められた (図 3-4E)。また IL1R1 (IL1 β 受容体) mRNA は両系統で各無処置マウス由来脊髄に比べ、有意な発現変動は認められないことが確認された (図 3-4D)。

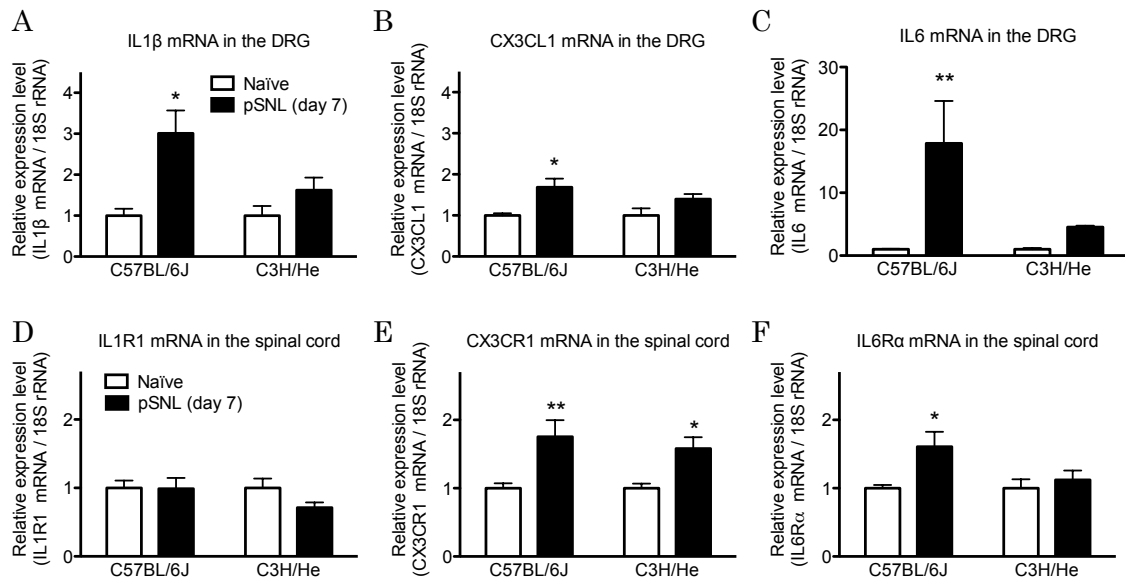


図 3-4 神経損傷後の DRG および脊髄における mRNA 発現変動

(A-F) 定量的リアルタイム PCR による、神経損傷 7 日後の DRG における IL1 β (A)、CX3CL1 (B)、IL6 (C) mRNA の発現変動、および脊髄における IL1R1 (D)、CX3CR1 (E)、IL6 α (F) mRNA の発現変動解析 (A-C; $n = 3-4$, D-F; $n = 7-8$)。各 mRNA 発現量は 18S rRNA を基準とし、各ストレインの無処置マウス由来の DRG あるいは脊髄における発現量に対する相対値として算出した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs. data of corresponding naïve strains.

C3H/He 由来ミクログリアの CX3CL1 に対する低感受性

次に疼痛関連因子に対するミクログリアの応答性について、C57BL/6J と C3H/He マウス由来培養ミクログリアを用いて比較を行った。ただし、新生仔マウスの脊髄からは、初代培養を確立するのに十分な数のミクログリアを採取することが非常に困難であるため、ここでは新生仔マウスの全脳よりミクログリアを採取し初代培養を行った。ミクログリアの活性化因子である LPS (100 ng/mL、12 時間)、ATP (1 mM、2 時間) および IL6 (30 ng/mL、2 時間) 処置は、両系統由来培養ミクログリアにおいて、炎症性メディエーターである IL1 β や CCL2、TNF α の mRNA 発現量を、vehicle 処置群に比べ同程度に有意に増加させた。(ただし ATP 処置は、どちらの系統由来ミクログリアにおいても IL1 β mRNA 発現の有意な上昇は確認されなかった。) (図 3-5A, B, C) これらの結果は、両系統由来のミクログリアが正常に機能することを示すと考えられる。同様に、CX3CL1 処置 (100 ng/mL、2 時間) によっても、IL1 β 、CCL2 および TNF α mRNA の有意な発現上昇が両系統由来のミクログリアで認められたが、C3H/He 由来ミクログリアでは各メディエーターの発現上昇の程度が、C57BL/6J 由来ミクログリアに比べ有意に低下していることが明らかになった (図 3-5D)。

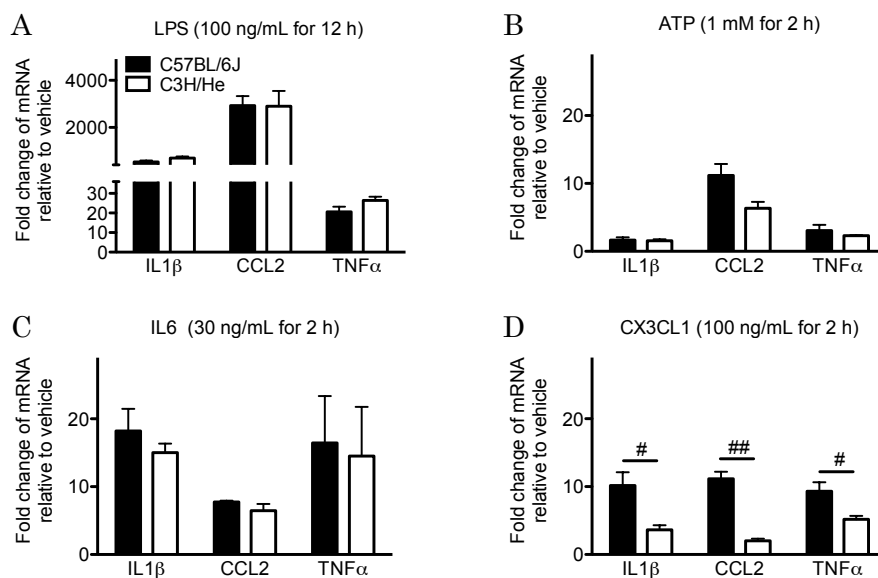


図 3-5 炎症性メディエーターに対するミクログリア応答性の違い

(A-D) C57BL/6J あるいは C3H/He 新生仔マウス全脳由来培養ミクログリアに、LPS (100 ng/mL、12 時間)、ATP (1 mM、2 時間)、IL6 (30 ng/mL、2 時間)、CX3CL1 (100 ng/mL、2 時間) を処置し、IL1 β 、CCL2、TNF α mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR により解析した。各 mRNA 発現量は 18S rRNA を基準とし、各群の vehicle に対する相対値として算出した。 $n = 3$. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, vs. C57BL/6J.

C3H/He における CX3CL1 誘発機械的アロディニア

上記検討結果を踏まえ、CX3CL1 の髄腔内投与によって誘発される機械的アロディニアについて検討を行った。C57BL/6J マウスでは、CX3CL1 髄腔内投与(100 ng/5 μ L) 2 時間後において、機械的アロディニアおよび脊髄ミクログリアの活性化が引き起こされた。しかしながら、C3H/He マウスでは CX3CL1 髄腔投与による機械的アロディニアが認められず(図 3-6A)、ミクログリア活性化も C57BL/6J に比べ有意に弱いことが明らかになった(図 3-6B)。この結果は、ミクログリア初代培養を用いた検討と関連すると考えられる。一方、ミクログリア初代培養で同程度の応答性が認められた IL6 (1 pmol/5 μ L) を髄腔内投与したところ、両系統で同程度の機械的アロディニアが認められた(図 3-6C)。脊髄ミクログリアの活性化は顕著でなかったものの、こちらについても両系統間で Iba1 免疫活性は同程度に認められた(図 3-6D)。

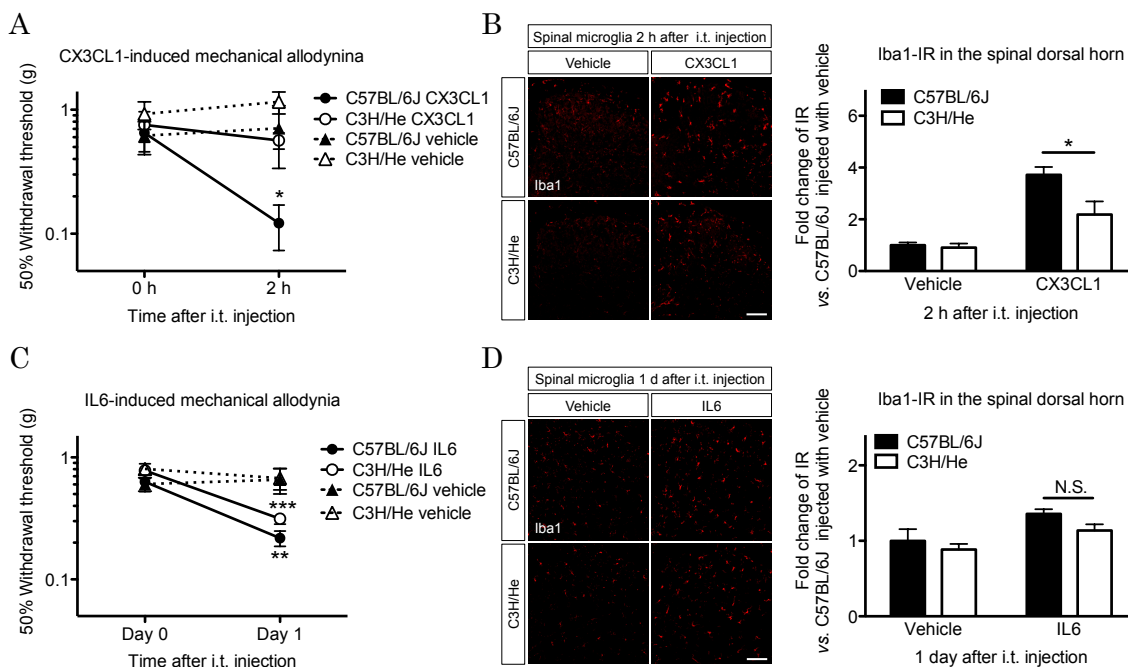


図 3-6 CX3CL1 および IL6 髄腔内投与誘発アロディニアとミクログリア活性化

(A, C) CX3CL1 (100 ng/5 μ L) あるいは IL6 (1 pmol/5 μ L) 髄腔内投与後の機械的アロディニアを von Frey フィラメントにより測定した。A; $n = 3-5$, C; $n = 6-9$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. data of corresponding strains on 0 h or 0 day. i.t., intrathecal. (B, D) 脊髄後角における Iba1 (赤) の免疫染色画像と Iba1 免疫活性強度の定量結果。B; $n = 3-7$, D; $n = 3-7$, * $p < 0.05$, vs. C57BL/6J. N.S., not significant. IR, immunoreactivity. i.t., intrathecal. スケールバーは 100 μ m を表す。

骨髄移植の至適ガンマ線量検討

神経障害性疼痛形成における免疫応答の時空間的寄与についてさらなる検討を行うため、神経障害性疼痛高感受性の C57BL/6J と低感受性の C3H/He マウス間で骨髄キメラマウスを作製した。近年、骨髄キメラマウスの作製時のガンマ線照射が、血液脊髄関門の破綻を引き起こし、脊髄への血液由来細胞の血管外漏出が生じることが報告されている (83)。そこでまず、神経損傷後に血液由来細胞の脊髄内浸潤が生じずかつ骨髄細胞が適切に置換される、至適ガンマ線照射量について検討を行うべく、C57BL/6J マウスをレシピエントマウスとして 8 Gy あるいは 10 Gy のガンマ線を照射し、C57BL/6GFP マウス由来骨髄由来細胞を移植した骨髄キメラマウスを作製した。フローサイトメトリー解析より、8 Gy あるいは 10 Gy を照射したどちらの骨髄キメラマウスも、骨髄移植 6 週間後には血液由来細胞の 90%以上が GFP 陽性細胞に置換されており、骨髄移植が成功したことが確認された (図 3-7A)。そこで、これらの骨髄キメラマウスの脊髄神経切断モデル (SNT) を作製し、神経損傷後に脊髄内に浸潤する GFP 陽性骨髄由来細胞の浸潤について検討を行った。神経損傷 7 日後の損傷側の脊髄後角において、10 Gy を照射した骨髄キメラマウスでは GFP 陽性細胞の著しい浸潤が認められたのに対し、8 Gy を照射した骨髄キメラマウスでは GFP 陽性細胞の浸潤はほとんど認められなかった (図 3-7B)。この結果より、8 Gy のガンマ線照射が、レシピエントマウスの骨髄由来細胞を適切に置換でき、かつ神経損傷に伴う骨髄由来細胞の浸潤が生じない至適照射量となることを確認した。

C57BL/6J と C3H/He 間の骨髄キメラマウス作製

C57BL/6J あるいは C3H/He をレシピエントマウスとし、8 Gy のガンマ線を照射後、C57BL/6GFP 由来の GFP 陽性骨髄由来細胞を移植した各キメラマウス (C57BL/6J^{C57BL/6GFP-BM}、C3H/He^{C57BL/6GFP-BM}) では、骨髄移植 6 週間後において、血液由来細胞のうち 90%以上が GFP 陽性細胞に置換されていることを確認した (図 3-8D, E)。逆に、C57BL/6GFP あるいは C3H/He をレシピエントマウスとし、8 Gy のガンマ線を照射後、C3H/He 由来の GFP 陰性骨髄由来細胞を移植した各キメラマウス (C57BL/6GFP^{C3H/He-BM}、C3H/He^{C3H/He-BM}) においては、骨髄移植 6 週間後において、血液由来細胞のうち 90%以上が GFP 陰性細胞に置換されていることを確認した (図 3-8F, G)。これらの検討より、マウス系統の異なる骨髄移植であっても、8 Gy のガンマ線照射により適切に骨髄移植が行えることを確認できた。

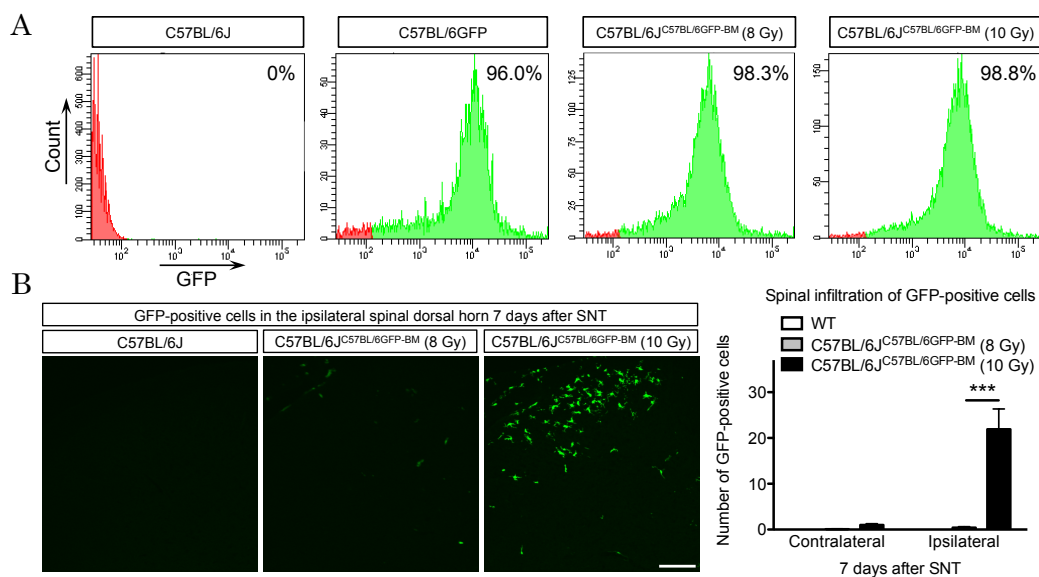


図 3-7 ガンマ線照射が GFP 陽性骨髄由来細胞の脊髄内浸潤に与える影響

(A) 各ヒストグラムはフローサイトメトリー解析結果であり、C57BL/6J、C57BL/6GFP、C57BL/6J^{C57BL/6GFP-BM} (8 Gy)、C57BL/6J^{C57BL/6GFP-BM} (10 Gy)の血液中における GFP 陽性細胞の割合を表す (赤は GFP 陰性細胞、緑は GFP 陽性細胞を表す)。

(B) 神経損傷 7 日後の脊髄後角での GFP 蛍光画像と GFP 陽性細胞の定量結果。n = 4. ***p < 0.001, vs. C57BL/6J^{C57BL/6GFP-BM} (8 Gy). スケールバーは 100 μm を表す。

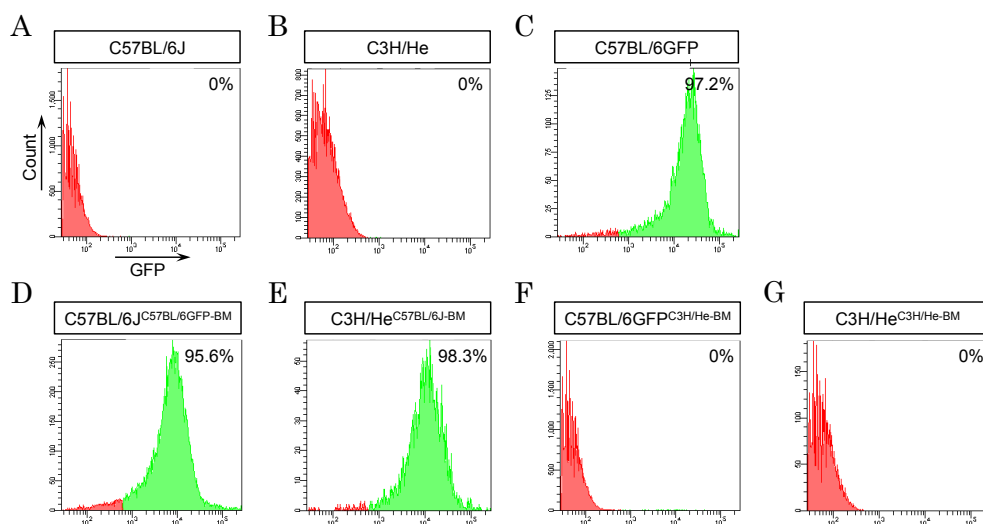


図 3-8 骨髄キメラマウスにおける血中 GFP 陽性細胞のフローサイトメトリー解析

(A-G) 各ヒストグラムはフローサイトメトリー解析結果であり、C57BL/6J (A)、C3H/He (B)、C57BL/6GFP (C)、C57BL/6J^{C57BL/6GFP-BM} (D)、C3H/He^{C57BL/6GFP-BM} (E)、C57BL/6GFP^{C3H/He-BM} (F)、C3H/He^{C3H/He-BM} (G) の血液中における GFP 陽性細胞の割合を表す (赤は GFP 陰性細胞、緑は GFP 陽性細胞を表す)。

DRG マクロファージのフェノタイプが神経障害性疼痛形成に与える影響

ここでは、C57BL/6J あるいは C3H/He をレシピエントマウスとし、C57BL/6J あるいは C3H/He をドナーマウスとした 4 種類の骨髄キメラマウス (C57BL/6J^{C57BL/6J-BM}、C57BL/6J^{C3H/He-BM}、C3H/He^{C57BL/6J-BM}、C3H/He^{C3H/He-BM}) を用いて検討を行っている。

まず、C57BL/6J をレシピエントとした両骨髄キメラマウス (C57BL/6J^{C57BL/6J-BM}、C57BL/6J^{C3H/He-BM}) において、神経損傷 3 から 14 日後において神経損傷側の後肢で機械的アロディニアが認められた。しかしながら、神経損傷 3 日後において、C57BL/6J^{C3H/He-BM} では C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} マウスに比べ、機械的アロディニアが有意に減弱しており、反対側では各キメラマウス間で有意な差は認められなかった (図 3-9A)。図 3-2B の検討結果を踏まえ、神経損傷側の DRG の免疫染色を行ったところ、C57BL/6J^{C3H/He-BM} では C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} マウスに比べ、Iba1 標識細胞における CD206 免疫活性が神経損傷 3 日後において有意に増大していることが明らかになった (図 3-9B)。一方で、Iba1 を指標とした損傷側脊髄後角におけるミクログリア活性化は、神経損傷 3 および 14 日後において、両系統間で同程度に上昇することが確認された (図 3-9C, D)。これらの結果は、C3H/He 骨髄由来細胞による末梢免疫系応答が、C57BL/6J^{C3H/He-BM} マウスでの神経障害性疼痛形成の遅延に関与し、脊髄ミクログリアが末梢免疫系応答とは非依存的に活性化することを示唆する。

反対に、C3H/He をレシピエントとした両骨髄キメラマウス (C3H/He^{C57BL/6J-BM}、C3H/He^{C3H/He-BM}) では、神経損傷 3 日後において、C3H/He^{C57BL/6J-BM} では C3H/He^{C3H/He-BM} マウスに比べ、機械的アロディニアが有意に増悪していたが、損傷 7 および 14 日後では有意な差は認められなかった (図 3-10A)。さらに、神経損傷 3 日後の DRG において、C3H/He^{C57BL/6J-BM} では Iba1 標識細胞における CD206 免疫活性が C3H/He^{C3H/He-BM} に比べ有意に弱いことが明らかになり (図 3-10B)、神経損傷 3 および 14 日後において脊髄ミクログリアの活性化増大の程度に両キメラマウス間で有意な差が認められないことが確認された (図 3-10C, D)。

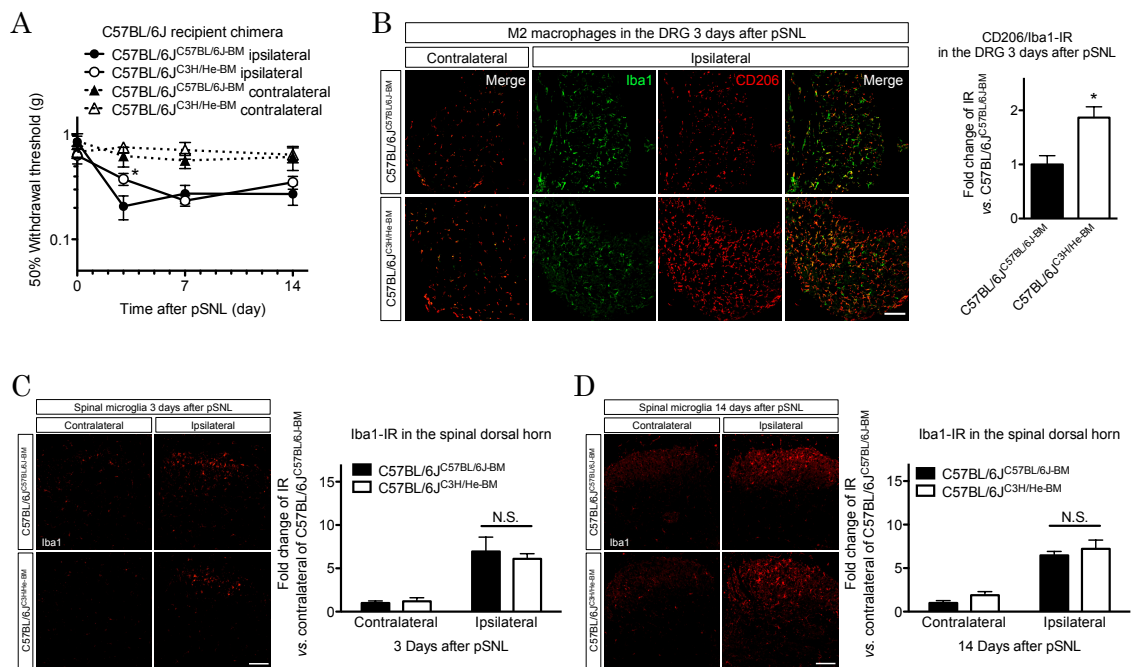


図 3-9 C3H/He 由来 DRG マクロファージが神経障害性疼痛形成に与える影響

(A) 各骨髄キメラマウス (C57BL/6J^{C57BL/6J-BM}、C57BL/6J^{C3H/He-BM}) における神経損傷後の機械的アロディニアは von Frey フィラメントにより測定した。n = 6-10. *p < 0.05, vs. C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} on day 3.

(B) 神経損傷 3 日後の DRG における Iba1 (緑) および CD206 (赤) の免疫染色画像と免疫活性強度の定量結果。免疫活性強度は各キメラマウス反対側の DRG を基準とし、C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} の免疫活性強度に対する相対値として算出した。n = 4-7. *p < 0.05, vs. C57BL/6J^{C57BL/6J-BM}. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

(C, D) 神経損傷 3 日後 (C) および 14 日後 (D) の脊髄後角における Iba1 (赤) の免疫染色画像と免疫活性強度の定量結果 (C; n = 4-7, D; n = 6-9)。免疫活性強度は C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} の反対側脊髄後角の免疫活性強度に対する相対値として算出した。N.S., not significant. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

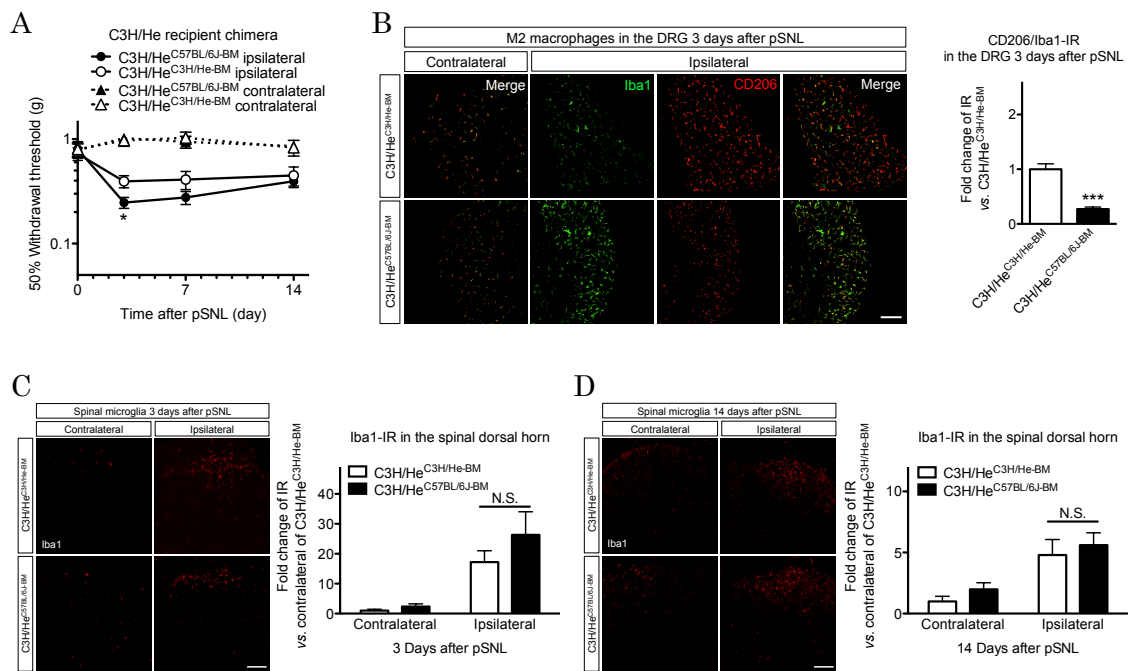


図 3-10 C57BL/6J 由来 DRG マクロファージが神経障害性疼痛形成に与える影響

(A) 各骨髄キメラマウス (C3H/He^{C3H/He-BM}、C3H/He^{C57BL/6J-BM}) における神経損傷後の機械的アロディニアは von Frey フィラメントにより測定した。n = 7-9. *p < 0.05, vs. C3H/He^{C3H/He-BM} on day 3.

(B) 神経損傷 3 日後の DRG における Iba1 (緑) および CD206 (赤) の免疫染色画像と免疫活性強度の定量結果。免疫活性強度は各キメラマウス反対側の DRG を基準とし、C3H/He^{C3H/He-BM} の免疫活性強度に対する相対値として算出した。n = 5-7. ***p < 0.001, vs. C3H/He^{C3H/He-BM}. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

(C, D) 神経損傷 3 日後 (C) および 14 日後 (D) の脊髄後角における Iba1 (赤) の免疫染色画像と免疫活性強度の定量結果 (C; n = 5-6, D; n = 7-9)。免疫活性強度は C3H/He^{C3H/He-BM} の反対側脊髄後角の免疫活性強度に対する相対値として算出した。N.S., not significant. IR, immunoreactivity. スケールバーは 100 μm を表す。

考察

本研究より、神経損傷に伴う DRG マクロファージのフェノタイプやミクログリア応答性の違いが C57BL/6J と C3H/He マウスにおける神経障害性疼痛感受性差に影響を与えており、それぞれ神経障害性疼痛の形成および維持に寄与することが示唆された。

疾患の重症度や進行度といった神経障害性疼痛の臨床的特徴は、一人ひとり大きく異なっており (84, 85)、遺伝的変異による免疫応答の違いが関与していると考えられている。一方で、近年報告された近交系マウスの全ゲノム解析の結果より、一塩基多型や挿入欠失といったストレイン特異的な遺伝的変異が一万以上存在することが明らかになった (86)。さらにストレイン間の遺伝的変異が、疼痛制御における、下降性セロトニン抑制系や ATP 受容体である P2X7 受容体の機能、オピオイド鎮痛薬の感受性に影響を与えることが報告されている (87, 88, 89)。そのため、特定の遺伝子改変マウスや遺伝子欠損マウスを用いる代わりに、遺伝的背景の異なる複数の近交系マウスを用いて、免疫応答の観点から神経障害性疼痛を比較することは、一人ひとり異なる神経障害性疼痛感受性の多様性を理解するために重要であると考えられる。本研究では最初に、4 系統の近交系マウス (C57BL/6J、C3H/He、DBA/2、A/J) の坐骨神経部分結紮モデルを作製し、神経障害性疼痛に高感受性あるいは低感受性を示すマウス系統を検討し、ストレイン特異的な神経障害性疼痛感受性差について明らかにした。神経損傷後、4 系統のなかで C57BL/6J マウスが 4 週間にわたる最も重度の機械的アロディニアを示したのに対し、C3H/He マウスは神経障害性疼痛に対し最も低感受性を示した。これら 2 系統のマウス間には、正常時における触刺激や熱刺激に対する反応性に有意な差は認められなかったことから、神経障害性疼痛感受性差は両系統における生得的な機械刺激や熱刺激に対する反応性の違いに基づくものではないと考えられる。

数々の過去の報告により、遺伝的変異によってもたらされる免疫応答のフェノタイプが、様々な疾患の臨床的特徴に非常に大きな影響を与えることが示唆されており (77-79, 90, 91)、本研究でも、神経障害性疼痛感受性が異なるマウス系統間で DRG マクロファージフェノタイプや脊髄ミクログリア応答性が異なることが明らかになった。

神経損傷後の DRG における Iba1 陽性細胞では、M2 マクロファージの指標である CD206 の免疫活性が増強していたが、C3H/He では C57BL/6J マウスに比べ、損傷 3 および 7 日後において CD206 免疫活性が有意に強いことが明らかになった。一方、M1 マクロファージの指標である TLR4 の免疫活性増大は両系統間で同程度であった。DRG マクロファージは循環血液中の単球由来であり、微小環境シグナルに応答した局所的な増殖により維持され (34)、TLR リガンドや IFN γ 刺激により炎症型 M1 フェノ

タイプ、あるいはIL4やIL13刺激により抗炎症性M2フェノタイプに成熟する(92, 93)。一般的に、中枢神経系への痛み伝達の感作は神経損傷後のDRGにおける、炎症性および抗炎症性マクロファージの複雑なバランスによって制御されると考えられている。例えば、IL6やTNF α といった炎症性メディエーターによって誘導されたM1マクロファージのDRGへの集積は、一次感覚神経を介して末梢から中枢神経系への痛み伝達を促進し(34)、反対に、DRGや神経損傷部位に集積するM2マクロファージは、抗炎症性サイトカインであるIL10やIL4、あるいはMet-エンケファリンやダイノルフィンA、 β エンドルフィンなどの内在性オピオイドを放出することで、炎症を抑制し疼痛を減弱すると考えられている(34, 94, 95)。これらの報告を踏まえると、神経損傷に伴うC3H/HeのDRGにおける抗炎症性M2マクロファージが、末梢から脊髄への侵害性入力の抑制に寄与したと考えられる。

一方で、ミクログリアやアストロサイトなどの脊髄グリア細胞が、難治性神経障害性疼痛に関与する侵害受容性シグナルの伝達や中枢神経感作に重要な役割を担うことも知られている(74, 96)。本研究でも、C57BL/6Jマウスの神経損傷側の脊髄後角において、損傷14日後にかけて脊髄ミクログリアの活性化が認められたが、C3H/HeではC57BL/6Jマウスに比べミクログリアの活性化が弱いことが明らかになった。しかしながら、ミクログリアと同じく、神経損傷に伴う脊髄での中枢神経感作に重要な役割を担うアストロサイトに関しては、神経損傷後に活性化の有意な増大は認められたものの、両マウス系統間で有意な差は認められなかった。IL6やIL1 β 、CX3CクラスのケモカインであるCX3CL1は神経損傷後のDRGにおいて発現が上昇し、DRG神経脊髄終末から放出され、それぞれの受容体であるIL6R α やIL1R1、CX3CR1を介して脊髄ミクログリアを活性化することが知られている(74, 97-99)。今回の検討においても、神経損傷7日後のC57BL/6Jでは、DRGにおけるIL6やIL1 β 、CX3CL1、また脊髄におけるIL6R α やCX3CR1の発現上昇を確認している。一方で、C3H/Heでは神経損傷に伴う、DRGでの炎症性メディエーターや脊髄でのIL6R α の有意な発現上昇は認められず、これらの結果は、C3H/Heにおける神経-ミクログリア相互連関がC57BL/6Jマウスに比べ減弱していることを示すと考えられ、この現象は、マウス全脳由来のミクログリア初代培養を用いた*in vitro*検討からも示唆されている。ミクログリアへのCX3CL1処置による、IL1 β 、CCL2、TNF α の発現上昇の程度はC57BL/6J由来のミクログリアに比べC3H/He由来のミクログリアでは有意に弱いことが示された。さらに、CX3CL1髄腔内投与2時間後には、C57BL/6Jマウスでは機械的アロディニアおよび脊髄ミクログリアの活性化が惹起されることを示したが、C3H/Heでは機械的アロディニアや脊髄ミクログリアの活性化は認められず、ミクログリア初代培養における検討結果

と相関することが示唆された。これらの結果より、神経障害性疼痛への異なる感受性は、ストレイン間の免疫系フェノタイプの違いによるものだと考えることができる（図3-11）。しかしながら、両系統間の膨大な遺伝子変異の中から（86）、今回の検討で認められた神経損傷に伴う免疫応答性の違いを引き起こす、遺伝的決定因子を明らかにすることはできなかった。

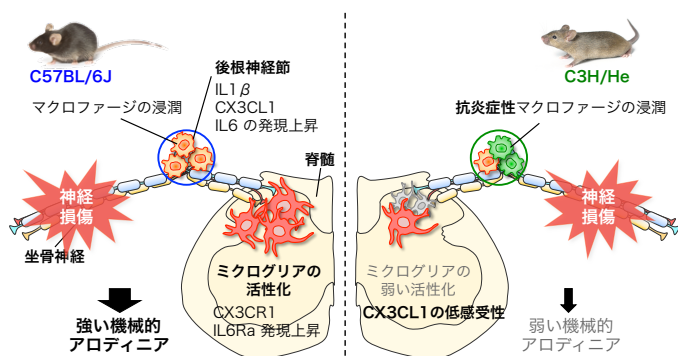


図 3-11 マウス系統間の末梢と中枢における免疫応答の違い

神経損傷後 C57BL/6J に比べ、C3H/He では DRG マクロファージが抗炎症性フェノタイプを示し、脊髄ミクログリア活性化が弱いことが確認された。

最後に、ストレイン間の末梢および中枢の免疫応答フェノタイプが神経障害性疼痛形成に与える影響について、C57BL/6J と C3H/He マウス間での骨髄移植により、4種類の骨髄キメラマウスを作製し検討を行った。本検討では、ガンマ線照射による血液脊髄関門の破綻や血液由来細胞の脊髄内浸潤を抑制するため、レシピエントマウスには 8 Gy のガンマ線を照射した。C57BL/6J^{C3H/He-BM} マウスでは C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} に比べ、神経損傷後の DRG マクロファージの抗炎症性フェノタイプ（CD206/Iba1 免疫活性）が強く、C3H/He マウスの神経損傷モデルで認められた DRG マクロファージのフェノタイプと同じ傾向を示すことが確認された。一方で、神経損傷後の脊髄後角におけるミクログリアの活性化は両骨髄キメラマウス間で同じ程度に認められた。これらの結果は、神経障害性疼痛低感受性 C3H/He ドナー由来 DRG マクロファージと神経障害性疼痛高感受性 C57BL/6J レシピエント由来ミクログリアが、神経損傷後の C57BL/6J^{C3H/He-BM} マウスにおいて、それぞれ非依存的な免疫応答を示すことを示唆する。また C57BL/6J^{C3H/He-BM} マウスでは、C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} に比べ神経損傷 3 日後においてのみ、機械的アロディニアが減弱しており、7 日以降には両キメラマウス間で有意な差は認められなかった。反対に、神経障害性疼痛高感受性 C57BL/6J ドナー由来骨髄細胞を移植した C3H/He^{C57BL/6J-BM} マウスでは、C3H/He^{C3H/He-BM} マウスに比べ、神経損傷 3 日後において機械的アロディニアが有意に増悪しており、また DRG マクロファージの抗炎症性フェノタイプが有意に減弱していたが、この結果は C57BL/6J をレシピエントとしたキメラマウスの検討と相関している。この骨髄キメラマウスを用いた一連の検討から、ストレイン依存的なマクロファージフェノタイプは、神経障害性疼痛の初期の形成

に寄与するものの、神経障害性疼痛の慢性化にはほとんど影響しないことが示唆された。

一方で、これまでの研究より、脊髄ミクログリアを含むグリア細胞が脊髄可塑性や神経系の適応応答に伴う疼痛の維持に重要な働きをすることが明らかになっている (74, 100-102)。今回の骨髄キメラマウスを用いた検討からも、C57BL/6J^{C3H/He-BM} マウスの神経損傷 7 日以降の機械刺激に対する逃避行動閾値は、C57BL/6J^{C57BL/6J-BM} マウスと同程度であることが確認されており、さらに、免疫染色より神経損傷 14 日後まで持続する脊髄ミクログリアの活性化が確認されている。以上の結果をまとめると、ストレイン特異的な脊髄ミクログリアのフェノタイプは、神経障害性疼痛の形成よりも疼痛の慢性化により寄与すると考えられる。

本研究より、今回使用した 4 系統の近交系マウスのうち神経障害性疼痛への感受性は C3H/He マウスが最も低く、C57BL/6J マウスが最も高いことが明らかになった。また、C3H/He マウスにおけるストレイン特異的な神経障害性疼痛低感受性に、DRG の抗炎症性 M2 マクロファージ、DRG における炎症性因子の低産生性、および CX3CL1 に対する低応答性によって特徴づけられる、脊髄ミクログリア-感覚神経間の相互関連の減弱が寄与することを初めて明らかにした。さらに、C3H/He と C57BL/6J マウス間の骨髄移植により作製した骨髄キメラマウスの一連の検討より、ストレイン依存的な DRG マクロファージおよび脊髄ミクログリアのフェノタイプがそれぞれ、神経障害性疼痛の形成および疼痛の慢性化に関与することが明らかになった (図 3-12)。こうした免疫応答の違いをもたらすメカニズムの解明にはさらなる検討が必要ではあるものの、今回の結果は、神経障害性疼痛の個人差に関する理解を深め、神経障害性疼痛の病態における免疫系の時間空間的な役割についての新たな発見となった。

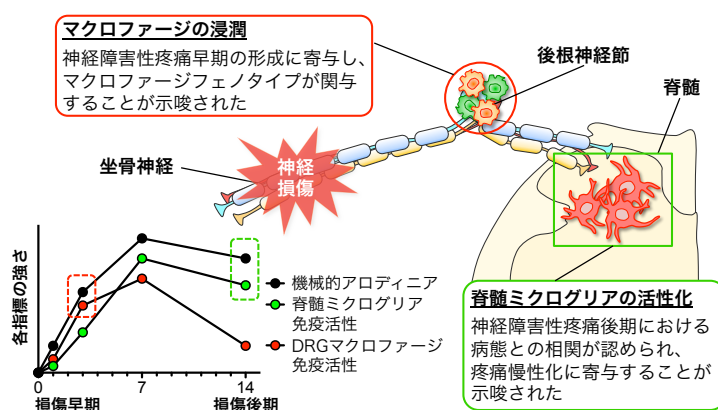


図 3-12 末梢と中枢における免疫応答が神経障害性疼痛に与える影響

神経損傷後早期に後根神経節に浸潤するマクロファージは疼痛形成に、後期における脊髄ミクログリア活性化は疼痛慢性化に重要な役割を担う。

総括および結論

本研究では、マウス足底切開による術後痛モデルおよび坐骨神経部分結紮による神経障害性疼痛モデルを用いて、各病態の疼痛形成における末梢および中枢の炎症性細胞の時空間的役割について検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章では、術後痛モデルを用いた検討より、術後痛には術部位周辺に早期より浸潤する好中球の寄与が大きいことが明らかになった。また、好中球の早期浸潤に伴う炎症応答は、引き続き浸潤するマクロファージの分化に関与しており、さらに好中球が組織修復にも重要な役割を担うことが明らかになった。

第二章では、野生型と TRPM2 ノックアウトマウス間の骨髄移植により作製した骨髄キメラマウスを用いて、脊髄ミクログリアや末梢炎症性細胞に発現する TRPM2 がそれぞれ、神経障害性疼痛に寄与することが明らかになった。また、今回用いた骨髄キメラマウスでは、常在性の脊髄ミクログリア活性化よりやや遅れて GFP 陽性細胞の脊髄内浸潤が認められ、TRPM2 を欠損した各骨髄キメラマウスでは Iba1 陽性/GFP 陽性マクロファージの浸潤が有意に抑制されていたことから、神経損傷後の末梢炎症性細胞の脊髄内浸潤には TRPM2 が関与し、また脊髄内浸潤した末梢炎症性細胞が神経障害性疼痛の慢性化に寄与することが明らかになった。

第三章では、複数のマウス系統を用いて神経障害性疼痛の検討を行い、神経障害性疼痛に対し C3H/He が C57BL/6J マウスに比べ低感受性を示すこと、さらに DRG や脊髄における免疫応答性の違いが神経障害性疼痛感受性差に寄与することを明らかにした。また、C57BL/6J と C3H/He マウス間の骨髄移植により作製した骨髄キメラマウスを用いて、DRG マクロファージは神経障害性疼痛早期の形成に寄与すること、また慢性期の感受性には脊髄ミクログリア応答性の違いが寄与することを明らかにした。

以上、著者は、術後痛および神経障害性疼痛形成に関与する各炎症性細胞の時空間的な役割として、損傷早期の疼痛の惹起には損傷部位や DRG に浸潤する炎症性細胞が寄与するが、損傷組織の修復にも関与することを明らかにした。また、脊髄内グリア細胞の活性化や、引き続き脊髄内浸潤する末梢炎症性細胞が痛みの慢性化に関与することを明らかにし、治療標的となる TRPM2 の役割と細胞種を同定した。これらの知見は、臨床問題となる術後痛や神経障害性疼痛の創薬に繋がることが期待される。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、終始多くの有益な御助言を頂きました京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長・准教授 中川貴之 先生、講師 今井哲司 先生、並びに終始多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、特定助教 永安一樹 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました名古屋大学大学院創薬科学研究科教授 赤池昭紀 先生、京都大学大学院薬学研究科准教授 久米利明 先生、助教 泉安彦 先生に深く感謝致します。本研究の遂行に当たり、TRPM2 遺伝子欠損マウスを提供下さいました京都大学大学院工学研究科教授 森泰生 先生、並びに実験技術の御指導および有益な御助言を頂きました九州大学大学院薬学研究院教授 津田誠 先生、フライブルグ大学神経病理学研究所研究員 増田隆博 先生に深く感謝致します。研究生活を始めるに当たり、多大なる御指導と御助言を頂きました、持田製薬株式会社 原口佳代 修士、並びに前田早苗 博士、金野真和 博士、崎元伸哉 博士、趙萌 博士をはじめ、諸先輩方に心から感謝致します。本研究に御協力頂きました京都大学薬学研究科生体機能解析学分野の朝倉佳代子 学士、助石有沙美 さん、京都大学医学部附属病院薬剤部の中里唯 さんに心から感謝致します。そして日々の研究生活において切磋琢磨し合えた京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の土岸広治 博士、宗可奈子 博士、榊山実 学士、都築徹教 学士、宗像将也 修士、三宅崇仁 修士、西谷直也 学士、宮之原遵 修士、浅岡希美 学士、川原田宗一 修士、長島卓也 学士、並びに京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野、京都大学医学部附属病院薬剤部、京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝致します。最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださった、父 猛之、母 治子、姉 尚子、伯母 大江秋子そして妻 佳緒里に心から感謝致します。

発表論文目録

本研究は以下の論文にて公表済みおよび公表予定である。

第一章

Suppression of neutrophil infiltration alleviates postoperative pain, but delays wound repair in mice

(好中球浸潤抑制が術後痛および創傷治癒に与える影響)

Asami Sukeishi, Koichi Isami, Satoshi Imai, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko

英文雑誌に投稿予定

第二章

Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model

(神経損傷に伴う骨髄由来炎症性細胞脊髄内浸潤における TRPM2 の関与)

Koichi Isami, Kayo Haraguchi, Kanako So, Kayoko Asakura, Hisashi Shirakawa, Yasuo Mori, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko

平成 25 年 7 月発行 PLOS ONE 第 8 巻第 7 号 e66410 に掲載

第三章

Differential immune responses depending on genetic heterogeneity contribute to the phenotype of neuropathic pain among mouse strains

(マウス系統間の神経障害性疼痛感受性差における炎症性細胞の関与)

Koichi Isami, Satoshi Imai, Asami Sukeishi, Yui Nakazato, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Kazuo Matsubara, Shuji Kaneko

英文雑誌に投稿予定

参考文献

1. Liu SS, Wu CL. Effect of postoperative analgesia on major postoperative complications: a systematic update of the evidence. *Anesth Analg*. 2007 Mar;104(3):689-702.
2. American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. *Anesthesiology*. 2012 Feb;116(2):248-73.
3. Dolin SJ, Cashman JN, Bland JM. Effectiveness of acute postoperative pain management: I. Evidence from published data. *Br J Anaesth*. 2002 Sep;89(3):409-23.
4. Wu CL, Raja SN. Treatment of acute postoperative pain. *Lancet*. 2011 Jun 25;377(9784):2215-25.
5. Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain--clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2007 Mar;21(1):3-13.
6. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996 Mar;64(3):493-501.
7. Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology*. 2003 Oct;99(4):1023-7.
8. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75.
9. Carreira EU, Carregaro V, Teixeira MM, Moriconi A, Aramini A, Verri WA Jr, Ferreira SH, Cunha FQ, Cunha TM. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur J Pain*. 2013 May;17(5):654-63.
10. Ghasemlou N, Chiu IM, Julien JP, Woolf CJ. CD11b+Ly6G- myeloid cells mediate mechanical inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 8;112(49):E6808-17.
11. Goren I, Allmann N, Yogev N, Schürmann C, Linke A, Holdener M, Waisman A, Pfeilschifter J, Frank S. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol*. 2009 Jul;175(1):132-47.
12. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2454-62.
13. Nishio N, Okawa Y, Sakurai H, Isobe K. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. *Age (Dordr)*. 2008 Mar;30(1):11-9.
14. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):787-95.
15. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013 Jun;93(6):875-81.
16. Kodelja V, Müller C, Tenorio S, Schebesch C, Orfanos CE, Goerdts S. Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. *Immunobiology*. 1997 Nov;197(5):478-93.
17. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012 Nov;43(11):3063-70.
18. Chen F, Wu W, Millman A, Craft JF, Chen E, Patel N, Boucher JL, Urban JF Jr, Kim CC, Gause WC. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat Immunol*. 2014 Oct;15(10):938-46.
19. Cronstein BN, Terkeltaub R. The inflammatory process of gout and its treatment. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 1:S3. Epub 2006 Apr 12.

20. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods*. 1994 Sep 14;174(1-2):83-93.
21. Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Mar;30(3):459-73.
22. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004 Jan 1;9:283-9.
23. Doukas J, Blease K, Craig D, Ma C, Chandler LA, Sosnowski BA, Pierce GF. Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle. *Mol Ther*. 2002 May;5(5 Pt 1):517-27.
24. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519-31.
25. Sachs D, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*. 2002 Mar;96(1-2):89-97.
26. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Nov;72(21):4111-26.
27. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2013 May;14(5):454-60.
28. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1):56-65.
29. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3964-77.
30. Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, Brachvogel B, Hammerschmidt M, Nagy A, Ferrara N, Pasparakis M, Eming SA. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012 Jul 19;120(3):613-25.
31. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):176-85.
32. Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol*. 2003 Apr;73(4):448-55.
33. Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR. Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol*. 2003 Jul 1;13(13):1122-8.
34. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010 Nov;16(11):1267-76.
35. Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol*. 2012 Jul;11(7):629-42.
36. Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther*. 2010 Apr;126(1):56-68.
37. Sweitzer SM, Hickey WF, Rutkowski MD, Pahl JL, DeLeo JA. Focal peripheral nerve injury induces leukocyte trafficking into the central nervous system: potential relationship to neuropathic pain. *Pain*. 2002 Nov;100(1-2):163-70.
38. Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun*. 2007 Jul;21(5):599-616.

39. Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, Mogil JS, De Koninck Y, Rivest S. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci*. 2007 Nov 7;27(45):12396-406.
40. Cao L, DeLeo JA. CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. *Eur J Immunol*. 2008 Feb;38(2):448-58.
41. Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M. T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci*. 2009 Nov 18;29(46):14415-22.
42. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*. 2002 Jan;9(1):163-73.
43. Buelow B, Song Y, Scharenberg AM. The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):24571-83.
44. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):595-9.
45. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K. Immuncyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*. 2001 Aug 17;293(5533):1327-30.
46. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Jan;286(1):C129-37.
47. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*. 2008 Jul;14(7):738-47.
48. Wehrhahn J, Kraft R, Harteneck C, Hauschildt S. Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2386-93.
49. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 24;109(17):6745-50.
50. Magnone M, Bauer I, Poggi A, Mannino E, Sturla L, Brini M, Zocchi E, De Flora A, Nencioni A, Bruzzone S. NAD⁺ levels control Ca²⁺ store replenishment and mitogen-induced increase of cytosolic Ca²⁺ by Cyclic ADP-ribose-dependent TRPM2 channel gating in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2012 Jun 15;287(25):21067-81.
51. Melzer N, Hicking G, Göbel K, Wiendl H. TRPM2 cation channels modulate T cell effector functions and contribute to autoimmune CNS inflammation. *PLoS One*. 2012;7(10):e47617.
52. Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci*. 2012 Mar 14;32(11):3931-41.
53. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997 May 5;407(3):313-9.
54. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990 Nov;43(2):205-18.

55. Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998 May;76(1-2):215-22.
56. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994 Jul;53(1):55-63.
57. Callahan BL, Gil AS, Levesque A, Mogil JS. Modulation of mechanical and thermal nociceptive sensitivity in the laboratory mouse by behavioral state. *J Pain*. 2008 Feb;9(2):174-84.
58. Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1980;20:441-62.
59. Brok HP, Heidt PJ, van der Meide PH, Zurcher C, Vossen JM. Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Immunol*. 1993 Dec 1;151(11):6451-9.
60. Kielian T, Barry B, Hickey WF. CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4634-43.
61. Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J. Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *J Neurosci*. 2011 Jul 27;31(30):10819-28.
62. Beggs S, Liu XJ, Kwan C, Salter MW. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol Pain*. 2010 Nov 2;6:74.
63. Yuan H, Gaber MW, McColgan T, Naimark MD, Kiani MF, Merchant TE. Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res*. 2003 Apr 18;969(1-2):59-69.
64. Morganti JM, Jopson TD, Liu S, Gupta N, Rosi S. Cranial irradiation alters the brain's microenvironment and permits CCR2+ macrophage infiltration. *PLoS One*. 2014 Apr 2;9(4):e93650.
65. Moore AH, Olschowka JA, Williams JP, Paige SL, O'Banion MK. Radiation-induced edema is dependent on cyclooxygenase 2 activity in mouse brain. *Radiat Res*. 2004 Feb;161(2):153-60.
66. Marchettini P, Lacerenza M, Mauri E, Marangoni C. Painful peripheral neuropathies. *Curr Neuropharmacol*. 2006 Jul;4(3):175-81.
67. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008 Jun;136(3):380-7.
68. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1361-8.
69. Khan N, Smith MT. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules*. 2015 Jun 9;20(6):10657-88.
70. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):1017-21.
71. Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*. 2008 May 14;28(20):5189-94.
72. Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, Park JY, Lind AL, Ma Q, Ji RR. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4096-108.
73. Miyoshi K, Obata K, Kondo T, Okamura H, Noguchi K. Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J Neurosci*. 2008 Nov 26;28(48):12775-87.

74. Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, James Okano H, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. *Brain*. 2013 Mar;136(Pt 3):828-43.
75. Zorina-Lichtenwalter K, Meloto CB, Khoury S, Diatchenko L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience*. 2016 Dec 3;338:36-62.
76. Tregoning JS, Yamaguchi Y, Wang B, Mihm D, Harker JA, Bushell ES, Zheng M, Liao G, Peltz G, Openshaw PJ. Genetic susceptibility to the delayed sequelae of neonatal respiratory syncytial virus infection is MHC dependent. *J Immunol*. 2010 Nov 1;185(9):5384-91.
77. Imai S, Atarashi K, Ikeshue K, Akiyama K, Tokura Y. Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. *J Dermatol Sci*. 2006 Feb;41(2):127-36.
78. Cavalli G, Hayashi M, Jin Y, Yorgov D, Santorico SA, Holcomb C, Rastrou M, Erlich H, Tengesdal IW, Dagna L, Neff CP, Palmer BE, Spritz RA, Dinarello CA. MHC class II super-enhancer increases surface expression of HLA-DR and HLA-DQ and affects cytokine production in autoimmune vitiligo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 2;113(5):1363-8.
79. Flesch BK, Matheis N, Alt T, Weinstock C, Bux J, Kahaly GJ. HLA class II haplotypes differentiate between the adult autoimmune polyglandular syndrome types II and III. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jan;99(1):E177-82.
80. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992 Sep;50(3):355-63.
81. DeLeo JA, Rutkowski MD, Stalder AK, Campbell IL. Transgenic expression of TNF by astrocytes increases mechanical allodynia in a mouse neuropathy model. *Neuroreport*. 2000 Feb 28;11(3):599-602.
82. Ikeda-Matsuo Y, Ikegaya Y, Matsuki N, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microglia-specific expression of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 contributes to lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production. *J Neurochem*. 2005 Sep;94(6):1546-58.
83. Tashima R, Mikuriya S, Tomiyama D, Shiratori-Hayashi M, Yamashita T, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M. Bone marrow-derived cells in the population of spinal microglia after peripheral nerve injury. *Sci Rep*. 2016 Mar 23;6:23701.
84. Smith MT, Muralidharan A. Pharmacogenetics of pain and analgesia. *Clin Genet*. 2012 Oct;82(4):321-30.
85. Kim H, Clark D, Dionne RA. Genetic contributions to clinical pain and analgesia: avoiding pitfalls in genetic research. *J Pain*. 2009 Jul;10(7):663-93.
86. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, Heger A, Agam A, Slater G, Goodson M, Furlotte NA, Eskin E, Nellåker C, Whitley H, Cleak J, Janowitz D, Hernandez-Pliego P, Edwards A, Belgard TG, Oliver PL, McIntyre RE, Bhomra A, Nicod J, Gan X, Yuan W, van der Weyden L, Steward CA, Bala S, Stalker J, Mott R, Durbin R, Jackson IJ, Czechanski A, Guerra-Assunção JA, Donahue LR, Reinholdt LG, Payseur BA, Ponting CP, Birney E, Flint J, Adams DJ. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature*. 2011 Sep 14;477(7364):289-94.
87. Wijnvoord N, Albuquerque B, Häussler A, Myrczek T, Popp L, Tegeder I. Inter-strain differences of serotonergic inhibitory pain control in inbred mice. *Mol Pain*. 2010 Oct 26;6:70.
88. Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin JS, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M, Herbert TA, Yarkoni-Abitbul M, Tichauer D, Livneh J, Gershon E, Zheng M, Tan K, John SL, Slade GD, Jordan J, Woolf CJ, Peltz G, Maixner W, Diatchenko L, Seltzer Z, Salter MW, Mogil JS. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med*. 2012 Mar 25;18(4):595-9.

89. Shi R, Lamb SS, Zakeri B, Proteau A, Cui Q, Sulea T, Matte A, Wright GD, Cygler M. Structure and function of the glycopeptide N-methyltransferase MtfA, a tool for the biosynthesis of modified glycopeptide antibiotics. *Chem Biol.* 2009 Apr 24;16(4):401-10.
90. Tregoning JS, Yamaguchi Y, Wang B, Mihm D, Harker JA, Bushell ES, Zheng M, Liao G, Peltz G, Openshaw PJ. Genetic susceptibility to the delayed sequelae of neonatal respiratory syncytial virus infection is MHC dependent. *J Immunol.* 2010 Nov 1;185(9):5384-91.
91. Rosenblum Lichtenstein JH, Molina RM, Donaghey TC, Brain JD. Strain differences influence murine pulmonary responses to *Stachybotrys chartarum*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Oct;35(4):415-23.
92. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010 Oct;11(10):889-96.
93. Lee WJ, Tateya S, Cheng AM, Rizzo-DeLeon N, Wang NF, Handa P, Wilson CL, Clowes AW, Sweet IR, Bomsztyk K, Schwartz MW, Kim F. M2 Macrophage Polarization Mediates Anti-inflammatory Effects of Endothelial Nitric Oxide Signaling. *Diabetes.* 2015 Aug;64(8):2836-46.
94. Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. *Mol Pain.* 2006 Feb 17;2:6.
95. Pannell M, Labuz D, Celik MÖ, Keye J, Batra A, Siegmund B, Machelska H. Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. *J Neuroinflammation.* 2016 Oct 7;13(1):262.
96. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep 15;716(1-3):106-19.
97. Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med.* 2008 Mar;14(3):331-6.
98. DeLeo JA, Colburn RW, Nichols M, Malhotra A. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res.* 1996 Sep;16(9):695-700.
99. Clark AK, Malcangio M. Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Front Cell Neurosci.* 2014 May 7;8:121.
100. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 2001 Aug;24(8):450-5.
101. McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol.* 2005 Apr;192(2):444-62.
102. Maeda S, Kawamoto A, Yatani Y, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Gene transfer of GLT-1, a glial glutamate transporter, into the spinal cord by recombinant adenovirus attenuates inflammatory and neuropathic pain in rats. *Mol Pain.* 2008 Dec 24;4:65.