

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)
分担研究報告書

慢性脊髄圧迫モデルを用いた脊髄障害性疼痛の病態に関する基礎的研究

研究分担者 中嶋 秀明 福井大学整形外科助教
研究協力者 竹浦 直人 福井大学整形外科助教
杉田 大輔 福井大学整形外科助教

研究要旨 慢性圧迫脊髄モデル(*twy/twy*)を用いて、脊髄障害性疼痛発現の機序に関する基礎的研究を行った。圧迫程度が高度になるに伴い、血管脊髄関門が破綻し、骨髄由来細胞が慢性圧迫脊髄内に遊走することが、GFP chimeric *twy* mouseを用いた検討で確認された。さらにこれらが疼痛発現関連蛋白 MAP kinase (p38, ERK1/2)を発現していることが示された。慢性圧迫脊髄における疼痛発現に、hematogenous macrophage が関与している可能性が実験的に示唆された。

A. 研究目的

慢性脊髄圧迫の代表疾患である後縦靭帯骨化症の特定疾患医療受給者証交付件数(難病情報センター)は毎年増加しており、今後も患者数の増加が予想される。後縦靭帯骨化症のような圧迫性髄症の患者においては、約6割に神経障害性疼痛の訴えがあり、諸家の報告をみても慢性圧迫脊髄症の治療は、疼痛管理の側面からも難渋することが多い。慢性脊髄圧迫に起因する疼痛や感覚障害が残存し、日常生活動作や健康寿命に著しい影響がある患者は多く、疼痛発現の病態解明および有効な治療法の発展が切望されている。

急性脊髄損傷後疼痛発現の病態研究では、microglia/macrophageの関与が多く報告されている(Watanabe S, Uchida K, Nakajima H et al. Stem Cells 33, 2015)。一方、我々がこれまで解析してきたヒト頸髄症の病態をシミュレートする慢性脊髄圧迫モデル(*twy/twy* マウス)での検討では、圧迫に応じてニューロンは減少して、

microglia/macrophage発現が増加することを報告している(Hirai T, Uchida K, Nakajima H et al. PLoS One 8, 2013; Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, et al. Eur Spine J 21:490-497, 2012)。このため、慢性圧迫脊髄においても、その疼痛発現にmicroglia/macrophageが関与している可能性が考えられる。

本研究では、慢性圧迫脊髄におけるmicroglia/macrophageの動態を評価し、脊髄圧迫部位での脊髄障害性疼痛に関連する物質の発現変化について検討することを目的とした。

B. 研究方法

実験動物として、圧迫性頸髄モデルである*twy/twy* マウスを用いた。先行研究を参考にして、12週齢を軽度圧迫群、18週齢を中等度圧迫群、24週齢を高度圧迫群として経時的な圧迫程度を7T-MRI撮影で確認した。脊髄障害性疼痛発現の評価として、脊髄後角におけるMAP kinaseであるp-38、

ERK1/2 について免疫組織学的に検討した。CD11b (microglia/ macrophage)の脊髄圧迫部における発現変化を蛍光二重染色および flow cytometry で評価した。経時的な圧迫程度に応じた hematogenous macrophage の動態の評価として、EGFP マウス骨髄を尾静脈より移植した GFP chimeric twy mouse を作製した。更に、GFP 陽性細胞 (hematogenous macrophage)と MAP kinase との二重陽性細胞の定量的評価を行った。hematogenous macrophage の脊髄血液関門を介した動態の評価として PDGFR での免疫組織化学的検討を行った。

(倫理面での配慮)

本研究は動物を対象とするものであるが、実験動物に対する処置などの際の取り扱い方法、除痛処置については、福井大学動物実験委員会にて承認済みである。

C . 研究結果

twy マウス 12 週齢、18 週齢および 24 週齢の 7T-MRI 画像 (sagittal, axial view) および HE 染色 (axial view) による評価では、12 週齢では後環軸膜の石灰化はほとんどみられず、18 週齢で石灰化巣が徐々に出現し、24 週齢で石灰化によって脊髄が後方から圧迫されていることが確認できた。また Image-J で脊髄横断面積を定量化し、twy マウスの脊髄が経時的に圧迫されていることが示された。

コントロール群および twy マウス 12 週齢では脊髄内に GFP 陽性細胞はほとんどなく、18 週齢および 24 週齢で脊髄内に GFP 陽性細胞の発現を認めた (図 1)。

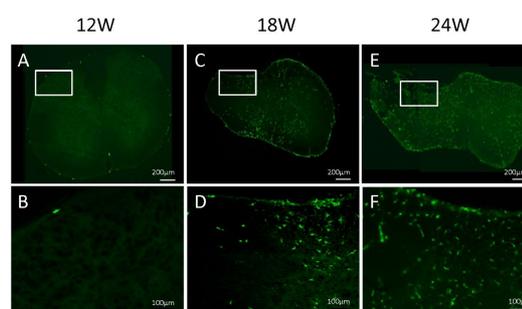


図 1. GFP chimeric twy mouse : 圧迫程度に応じた骨髄由来細胞の脊髄内遊走評価
microglia / macrophage のマーカーである CD11b 抗体と GFP との二重陽性細胞を定量化すると、圧迫に応じて CD11b/GFP 二重陽性の hematogenous macrophage の数および割合が増加していた (図 2)。

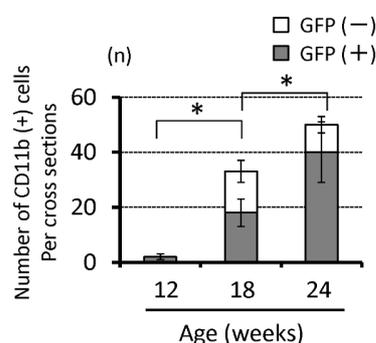


図 2. CD11b (+)/GFP (+)細胞 : hematogenous macrophage の変化

脊髄内に発現した GFP 陽性細胞をソーティングし、フローサイトメトリーを行うと、18 週齢よりも 24 週齢で GFP+/CD11b+/CD45+/GR-1- (macrophage) の細胞の割合が増加していた (図 3)。

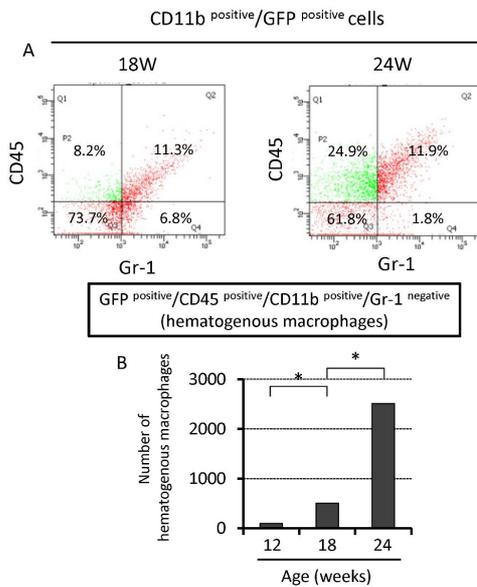


図 3. Hematogenous macrophage の動態 : flow cytometry による評価

twy マウス 12 週齢、18 週齢および 24 週齢の脊髄の Western blot を行うと、p-p38, p-ERK1/2 (MAPK) の発現が経時的に増加していた。GFP/ p-p38 二重陽性細胞、GFP/ p-ERK1/2 二重陽性細胞の割合も圧迫程度に応じて増加していた (図 4)。

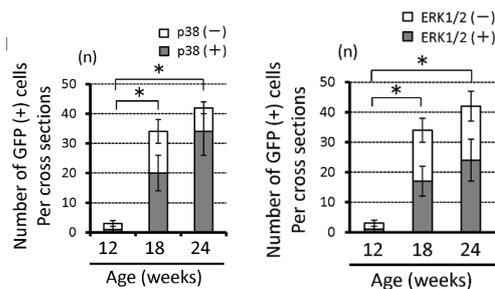


図 4. GFP 陽性細胞における MAP kinase 発現

PDGFR- を用いた脳脊髄関門の評価では、18 週をピークに血管脊髄関門の破綻がみられた (図 5)。

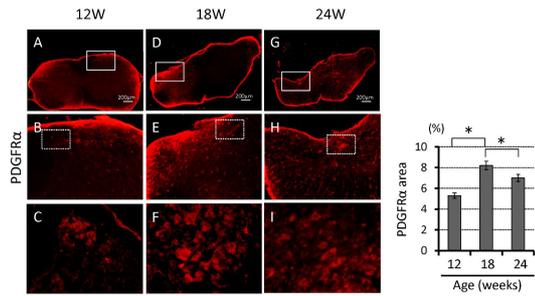


図 5. 脳脊髄関門評価 (PDGFR-)

D. 考察

microglia/macrophage は急性脊髄損傷では急性期から亜急性期にかけて発現が上昇し、その後の二次損傷を引き起こすことが知られている。一方、慢性圧迫脊髄では圧迫に応じたグリア系細胞の発現上昇がみられることが報告されているが、本研究の結果からは、resident microglia のみならず、hematogenous macrophage もその発現上昇に関与していることが示唆された。神経変性疾患や虚血性疾患では、microglia/macrophage による neuroinflammation という概念・メカニズムが解明されてきており (Glass CK, Saijo K, Winner B, et al. Cell 140, 2010)、慢性圧迫脊髄でも生じている可能性が考えられる。

急性脊髄損傷と血管脊髄関門の関係に関する報告は散見され、Fehlings らは、脊髄損傷後のグリア瘢痕内での血管新生早期で血管脊髄関門の破綻が生じ、静脈還流障害により損傷部局所の血管内圧、浸透圧が上昇すると報告している (Figley SA, Khosravi R, Fehlings MG et al. J Neurotrauma 3, 2014)。一方、慢性圧迫脊髄と血管脊髄関門の関係についての報告はほとんどなく、小澤らの頸髄症造影 MRI 評価では、慢性圧迫

でも血管脊髄関門の破綻がみられるものの除圧術による改善がみられ、急性脊髄損傷とは異なり可逆的な変化である可能性を報告している (Ozawa H, Sato T, Kokubun S, et al. Spinal Cord 48, 2010)。

E . 結論

本研究の結果から、慢性圧迫脊髄においても圧迫程度に応じた血管脊髄関門の破綻・透過性の亢進が生じていることが示唆され、それにより脊髄内に遊走してきた hematogenous macrophage が脊髄障害性疼痛の病態のひとつとして働いている可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. Stem Cells 33: 1902-1914, 2015
2. Nakajima H, Uchida K, Honjoh K, et al. Surgical treatment of low lumbar osteoporotic vertebral collapse: a single-institution experience. J Neurosurg Spine 24: 39-47, 2015

2. 学会発表

1. 杉田大輔、内田研造、中嶋秀明、他.

ヒト頸椎 OPLL におけるメカニカルストレスが骨化前線部の内軟骨骨化に与える転写因子に与える影響の検討. 第 44 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 (2015.4) 福岡

2. 内田研造、中嶋秀明、渡邊修司、他. 脊髄損傷に対する間葉系幹細胞移植後の脊髄再生. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会(シンポジウム、2015.10) 富山
3. 竹浦直人、中嶋秀明、高橋藍、他. 圧迫性頸髄症に伴う慢性疼痛における血液脊髄関門を介した macrophage の動態. 第 8 回日本運動器疼痛学会 (2015.12) 名古屋

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし