

Microglial Cathepsin B Contributes to the Initiation of Peripheral Inflammation-induced Chronic Pain

孫, 麗

<https://doi.org/10.15017/1441135>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（学術）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



区 分	① 甲 乙
-----	-------

論文題目

Microglial Cathepsin B Contributes to the Initiation of Peripheral Inflammation-induced Chronic Pain
(慢性疼痛発症におけるミクログリアの産生するカテプシンBの役割)

氏 名 孫 麗

論文内容の要旨

慢性疼痛とは発症原因で分けると炎症性疼痛ならびに神経障害性疼痛が知られています。現在、世界中の国々が高齢社会を迎え、高齢者 QOL 向上が注目されています。関節リュウマチに伴う痛みが代表的な慢性炎症性疼痛として知られています。世界中高齢者の2割人が慢性炎症性疼痛に苦しんでいます。治療薬としては、主に非ステロイド性抗炎症薬が使用されています。しかし、消化性潰瘍など副作用のため、長期使用ができません。一方、抗がん剤、糖尿病など末梢神経障害によって生じる神経障害性疼痛により世界で2200万人以上の患者が苦しんでいます。非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬が奏効しがたく、有効な治療薬が確立していません。これらのことから、慢性疼痛に新しい治療薬が求められています。

IL-1 β ならびに IL-18 は重要な疼痛メディエーターとして注目されています。カスパーゼ-1は IL-1 β ならびに IL-18 の成熟型へのプロセッシングならびに分泌が必要であることが知られています。しかし、プロカスパーゼ-1の活性化メカニズムについてはまだ不明でした。私たちの研究室では、ミクログリアにおけるプロカスパーゼ-1の活性化にリソソーム性プロテアーゼであるカテプシンBが関与することを明らかにしました。このことから、カテプシンBが疼痛の発症に関与するのではないかと仮説を立てました。そこで、私はカテプシンB欠損マウスあるいはカテプシンB特異的阻害剤を用い、カテプシンBの慢性疼痛における関与について解析しました。

まず始めに、炎症性疼痛モデルを作成するCFAは完全フロインドアジュバントと呼ばれ、結核菌加熱死菌・ミネラルオイル懸濁液です。CFAをマウス後足裏皮内投与三日後、野生型ならびにカテプシンB欠損マウスにおける末梢炎症程度を調べました。その結果、野生型ならびにカテプシンB欠損マウスにおいては同様な足腫れ程度を示しました。また、CD11bはマクロファージ陽性マーカー、CD4はT細胞陽性マーカーとして知られています。これらの免疫染色結果により、野生型ならびにカテプシンB欠損マウスにおいては有意な差が認められませんでした。さらに、足組織を用いて、Western blot 法により成熟型 IL-1 β あるいは COX-2 の発現量は有意な差が認められませんでした。このことから末梢ではカテプシンB欠損により IL-1 β の産生が影響しませんでした。

CFAをマウス後足に注入することで炎症性疼痛を引き起こしました。野生型マウスではCFA注入に伴い長時間の痛みが生じました。ところが驚いたことに、カテプシンB欠損マウスでは痛みが全く生じませんでした。また、カテプシンB特異的阻害剤を野生型マウス髄腔内一回投与すると炎症性疼痛が有意に抑制されました。一方、非常に興味深いことにカテプシンB欠損マウスでは野生型と同様の神経障害性疼痛が発症しました。このことから、カテプシンBは炎症性疼痛の発症に関与することが明らかになりました。カテプシンB欠損マウスでは疼痛に関与する IL-1 β 並びに IL-18 の産生が抑制される可能性が考えられます。

炎症性疼痛モデルにおいて、脊髄レベルで、野生型マウスと比較すると、カテプシンB欠損マウスは IL-1 β な

らびに IL-18 の産生が有意に低下していることが明らかになりました。一方、神経障害性疼痛モデルでは、IL-1 β ならびに IL-18 の産生はカテプシンB欠損の影響が認められませんでした。次に、免疫染色を用いて、炎症性疼痛モデルにおいて脊髄で増大したカテプシンBならびに IL-1 β の産生細胞の同定を行いました。その結果、カテプシンBと IL-1 β は共に活性化した脊髄ミクログリアに発現しています。

次に、カテプシンB依存的に IL-1 β 並びに IL-18 を産生する特徴を手掛に、脊髄ミクログリアを活性化する内因性物質の探索を行いました。

ミクログリアの内因性活性化物質として、3つの物質が考えられます。クロモグラニンA (CGA) は酸性の糖タンパク質で、リュウマチ関節炎時に血液中の濃度が増加し、ミクログリアを活性化することが知られています。アデノシンミリン酸 (ATP) は痛み伝達物質として神経障害性疼痛に関与することが知られています。リゾホスファチジン酸(LPA)は脂質メディエーターとして神経障害性疼痛に関与することが知られています。

培養ミクログリアを用いて、CGA、ATP、あるいはLPAを刺激すると、CGAで刺激した場合のみ、カテプシンB阻害剤を投与すると IL-1 β ならびに IL-18 の産生が抑制されました。このことから、CGAによって活性化されるミクログリアではカテプシンBに依存した IL-1 β 並びに IL-18 の産生が生じることが考えられます。

さらに、これらを脊髄腔内に一回投与すると、野生型ではCGA、ATP、あるいはLPA全てにおいて、長時間の痛みが誘発されました。ところが、カテプシンB欠損マウスでは、CGA投与においてのみ痛みの発症が有意に軽減されました。このようにCGA注入により誘発される疼痛は炎症性疼痛と同様の特徴を示しました。また、脊髄可溶性分画結果により、同じにカテプシンB欠損マウスではCGA投与のみ成熟型 IL-1 β の産生は有意に減少されました。さらに、免疫染色法を用いて確認すると、同様な結果が得ました。このことから、CGAは炎症性疼痛における脊髄ミクログリアの内因性活性化物質であることが強く示唆されました。

そこで最後にCGAが炎症性疼痛における脊髄ミクログリアの内因性活性化物質である可能性についてさらに検討しました。Western blot 法並びに免疫染色法を用いて、脊髄後角におけるCGAの発現を調べました。炎症性疼痛に伴ってCGAの発現量が増える傾向が認められました。また免疫染色により、CGAは神経終末における局在が見られました。さらにDRGでは、CGAは神経細胞に発現し、その発現量が末梢炎症に伴って有意に増大しました。このことからCGAは炎症性疼痛における脊髄ミクログリアの内因性活性化物質であると考えられます。

以上より、末梢炎症によりCGAはDRGで増加し、一次侵害ニューロン軸索末端から分泌され、脊髄ミクログリアを活性化して、カテプシンB依存的にプロカスペーゼ-1活性化を介して IL-1 β 並びに IL-18 の産生分泌を促進します。脱抑制による脊髄ニューロンの過剰興奮を引き起こし、炎症性疼痛を発症すると考えられます。さらに、本研究からカテプシンB阻害剤は炎症性疼痛の新たな治療薬になることが強く示唆されました。今後経口投与可能なカテプシンB阻害剤を開発し、その有効性を検討したいと考えています。