

## Peripheral Role of Cathepsin S in Th1 Cell-dependent Transition of Nerve Injury-induced Acute Pain to a Chronic Pain State

張, 鑿文

---

<https://hdl.handle.net/2324/1441136>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



KYUSHU UNIVERSITY

区分	<input checked="" type="radio"/> 甲	乙
----	------------------------------------	---

## 論文題目 Peripheral Role of Cathepsin S in Th1 Cell-dependent

### Transition of Nerve Injury-induced Acute Pain to a Chronic Pain State

(神経障害性疼痛の慢性化におけるカテプシンSの役割)

氏名 張 馨文

### 論文内容の要旨

神経障害性疼痛に代表される慢性疼痛は微小の触刺激が激痛に転換される疾患と考えられる。口腔顔面領域では、抜歯、インプラント術後に伴う末梢神経の損傷に起因するもの、または三叉神経痛、帶状疱疹後神経痛などの病因によるものも挙げられる。未だ有効な治療法が存在しない事から多くの患者が疾患に苦しんでいるのが現状である。そのため新規治療法の確立が社会的に急務の課題である。DBAマウスL4脊髄神経切断により神経障害性疼痛モデルを作成し、von Freyフィラメントを用いてマウスの足裏を刺激することで疼痛閾値を測定する。野生型マウス神経切断側では神経障害後1日目より疼痛閾値の低下が起り、痛みは2週間持続した。神経障害後3日目までは、疼痛の発症段階、3日目以降は疼痛の維持段階であると考えている。これまで、脊髄ミクログリアの活性化が神経障害性疼痛の発症においてキーファクターであることが数多く報告されている。ところで、神経障害性疼痛の維持・慢性化に関しては不明な点が多く残っている。最近、神経障害性疼痛の維持期において、末梢T細胞が脊髄後角へ浸潤すること、T細胞機能がしないマウスでは疼痛に抵抗性を示すことを報告され、T細胞の関与が強く示唆されている。このことから、私はT細胞脊髄までの浸潤は疼痛の慢性化に関与していると考えている。しかしながら、末梢T細胞の活性化機構、そして活性化されたT細胞はどのようなメカニズムにより疼痛の慢性化に関与しているとはまだ明らかとなっていない。そこで私はこれらの問題点を注目して、詳細な解析を行った。T細胞を活性化させる最もよく知られている仕組みとして抗原提示が挙げられる。抗原提示に際し、抗原を抗原提示細胞に取り込まれ、エンドソームにおいてカテプシン群の働きにより、二段階プロセッシングされる。まず、抗原ペプチドへのプロセッシングはカテプシンEに関与していると本研究室で明らかにしてきた。次に、MHCクラスII分子の抗原結合に必須なインバリアント鎖切断(lip10からCLIPへのプロセッシング)を担うリソソーム性システインプロテアーゼであるカテプシンS(CatS)を介する抗原提示を行い、T細胞受容体依存的にT細胞を活性化させる。もし、抗原提示によるT細胞活性化が疼痛の維持に関与しているならば、抗原提示を抑えることで、疼痛の維持が見られなくなるはず。そこで、私はインバリアント鎖のCLIPへのプロセッシングに非常に重要な役割を果たしているCatSに着目した。脳移行性のないCatS阻害剤Z-FL-COCHO(Z-FL)の腹腔内投与により疼痛の発症には影響することなく慢性化を有意に抑制した。CatS欠損マウスを用いて同様に疼痛の慢性化を抑制したが、発症期である3日目においても疼痛閾値の低下が抑えられた。したがつ

て、中枢の CatS は疼痛の発症にも関与していると考えられる。一般的に、T 細胞は二次リンパ系器官で活性化されると知られている。神経障害後に、T 細胞が活性化される場所は脾臓であると考えられるため、疼痛維持における脾臓の役割を検討した。脾臓摘出マウスでは疼痛の慢性化が起こらないことにより、脾臓で活性化した T 細胞が疼痛維持に重要な役割を果たしていると予想される。神経障害 14 日後、野生型マウス脾臓が肥大し、CD4 陽性 T 細胞ならびに T 細胞活性化の指標となる IFN- $\gamma$  陽性細胞の増大ならびに CD4 陽性細胞から IFN- $\gamma$  を分泌することが認められた。一方、CatS 阻害剤を投与したマウス及び CatS 欠損マウスではこのような変化は見られなかった。更に、神経障害に伴い野生型マウス脾臓では IFN- $\gamma$  発現量の増加が認められたが、CatS 欠損により認められなかつた。神経障害に伴う脾臓 IFN- $\gamma$  の産生は CatS に依存することが分かった。抗原提示の際に、CatS はインバリアント鎖の Lip10 を CLIP までのプロセシングに必須な分子であると知られている。神経障害性疼痛維持期においても、CatS は Lip10 切断と CLIP 産生に関与することで抗原提示を促している可能性がある。疼痛維持期において CatS 欠損マウス脾臓では Lip10 の蓄積が見られたが、野生型マウスでは見られなかつた。したがって、疼痛維持期の脾臓では CatS を介する抗原提示により T 細胞の活性化を促進している。疼痛モデルマウス脾臓の CatS、または CatS 内因性阻害分子であるシスタチン C(CysC)をウェスタン法で検出したところ、野生型では CatS 発現量の増加、CysC 発現量の低下が認められた。このことから、疼痛維持期の脾臓では CatS 酵素活性によりインバリアント鎖の Lip10 を CLIP までのプロセシングを行い、抗原提示が促進される。では、末梢で活性化された T 細胞は疼痛を起こすかについて検討した。まず、MACS 法を用いて、神経障害 14 日目の野生型マウス脾臓より調整した脾臓細胞または脾臓 CD4 陽性 T 細胞を疼痛が抑制された脾臓摘出疼痛マウスならびに CatS 欠損疼痛マウスに腹腔内投与すると一過性疼痛が誘発された。一方、脾臓マクロファージ細胞の腹腔内投与では疼痛が誘発されなかつた。したがって、活性化された脾臓 CD4 陽性 T 細胞は神経障害性疼痛維持に重要な役割を果たしていると考えられる。次は、末梢で活性化された T 細胞は疼痛の慢性化に関与するメカニズムについて調べた。神経障害後 14 日目に、神経切断側では IFN- $\gamma$  陽性 CD3 陽性細胞が見られたことによって、末梢活性化 T 細胞の脊髄までの浸潤ならびに IFN- $\gamma$  を分泌することが分かつた。一方、CatS 欠損、および阻害剤により末梢 T 細胞の脊髄後角への浸潤および IFN- $\gamma$  の分泌を抑えられた。脊髄後角における浸潤してきた T 細胞から分泌された IFN- $\gamma$  が IFN- $\gamma$ R 活性に依存するリン酸化された STAT1 をミクログリア特異的に発現されたことから、IFN- $\gamma$  が脊髄ミクログリアの活性化を深化させることによって、疼痛の慢性化に関与していると考えられる。神経障害 14 日後、脊髄レベルにおいて、野生型マウス神経切断側ではミクログリアの数の増加が認められたが、CatS 欠損、阻害剤ならびに脾臓摘出によりミクログリア数の増加を抑制された。このことから、IFN- $\gamma$  が脊髄ミクログリアの活性化を深化させると明らかとなつた。次は、疼痛の発症における脊髄 CatS の役割について調べた。神経障害 3 日後、神経切断側における CatS の染色性の増加、脊髄ミクログリアとの局在が特異的に一致すること、発現量も持続的に増加することが認められたが、CysC の変化が認められなかつた。更に、CatS 欠損により脊髄レベルでの p38 のリン酸化ならびに IL-1 $\beta$  の産生が有意に抑えられたことから、脊髄 CatS は神経障害性疼痛の発症にも役割を果たしていると考えられる。以上の結果により、末梢の神経障害により、脊髄 CatS を介して、脊髄後角におけるミクログリアが活性化され、疼痛因子を放出することで、神経障害性疼痛が発症すると考えられる。更に、脾臓において CatS 依存的に活性化された CD4 $^+$ T 細胞の脊髄後角への浸潤ならびに IFN- $\gamma$  を介したミクログリアの活性化の深化が、急性痛が慢性状態への移行することが明らかとなつた。今回の結果は神経障害に伴う T 細胞の異常な活性化を抑制することにより神経障害性疼痛が治療できることを示唆されている。今後、更に経口投与可能な CatS 阻害剤は神経障害性疼痛の治療に応用する可能性が強く示唆されている。