

神経障害性疼痛におけるミクログリア活性化と関連するバイオマーカー解析

米田, 聡介

<https://hdl.handle.net/2324/5068185>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 米田 聡介

論文題名 : 神経障害性疼痛におけるミクログリア活性化と関連するバイオマーカー解析

区 分 : 甲

論文内容の要旨

【背景】

神経障害性疼痛は神経の障害や機能不全によって引き起こされる慢性疼痛である。現在使用されている薬剤は有効性や副作用などの観点から治療満足度が低く、いまだアンメットニーズが残されている疾患である。その一因として、神経障害性疼痛が様々な病態メカニズムによって構成される複雑な疾患であることが挙げられており、病態メカニズムに応じて患者を層別化し、治療を選択する必要性が提唱されている。その病態メカニズムの一つとして、中枢の免疫担当細胞であるミクログリアの関与が知られているが、ミクログリア活性化を評価できる簡便なバイオマーカーは存在しない。そこで本研究では、ミクログリア活性化と関連して変動するバイオマーカーの解析を行った。

第一に、血中バイオマーカー候補として、脂質の一種である 24S-hydroxycholesterol (24OHC) に着目した。24OHC は、中枢神経系の神経細胞内特異的にコレステロールから変換され、blood brain barrier (BBB) を容易に通過し血中に移動する。コレステロールは ApoE というキャリアタンパクと結合しミクログリアから神経細胞に供給されるが、ミクログリアの活性化状態に応じて放出量が増加することが示唆されている。ミクログリア活性化と血中 24OHC との関係性を解析することで、24OHC の新規ミクログリア活性化バイオマーカーとしての可能性を検証した。

第二に、神経障害性疼痛患者では、内因性の疼痛制御機構である下行性抑制系が破綻しており、その破綻の程度を患者層別化マーカーとして活用することが提唱されている。本研究では下行性抑制系の評価で用いられる Diffuse noxious inhibitory control (DNIC) という現象に着目し、神経障害性疼痛モデルを用い、DNIC とミクログリア活性化との関連について検討した。

【方法】

初代培養神経細胞およびミクログリアは、それぞれ胎仔および新生仔ラットの脳から採取して用いた。ApoE は ELISA kit を用いて測定し、24OHC は LC-MS/MS と液体クロマトグラフィーによって測定した。神経障害性疼痛モデルはラットの坐骨神経部分結紮 (PSNL) モデルを用いた。ヒト血液試料は、National BioService, LLC から入手した。DNIC 評価は条件刺激としてカプサイシンを足裏投与した後、Randall-Selitto 法により、後肢の逃避閾値(PWT)の変化で評価した。

【結果と考察】

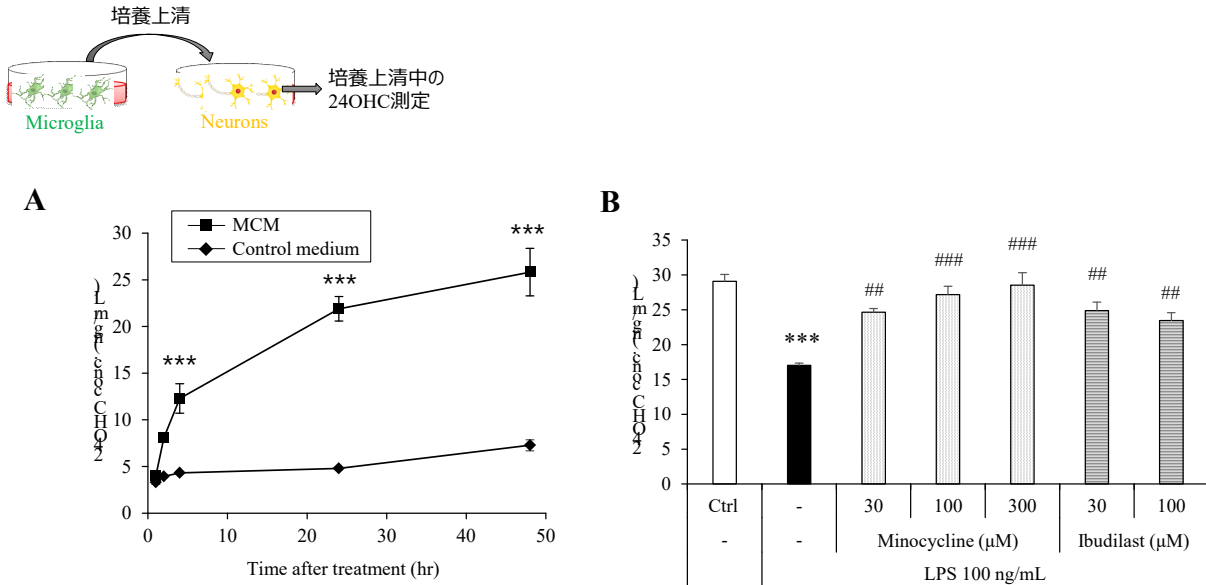
1 章 新規ミクログリア活性化マーカーとしての血中 24OHC の解析

結果 1. *In vitro* において、ミクログリア由来の因子で神経細胞からの 24OHC が制御

ミクログリアの培養上清を神経細胞に添加した結果、通常の培地のみを添加した場合と比較して、顕著な 24OHC 放出量の増加が認められた (Figure 1A)。この増加はミクログリアを LPS (Lipopolysaccharide) で活性化させた場合には抑制され、一方で活性化ミクログリア抑制効果があるミノサイクリンやイブジラストを LPS と共処置した際の培養上清を神経細胞に添加すると、LPS 刺激による 24OHC 放出量低下が抑制された (Figure 1B)。同様に LPS 刺激によってミクログリア

の ApoE 放出量の低下と、ミノサイクリンやイブジラスト処置でその抑制がキャンセルされたことから、ミクログリアの活性化に伴い ApoE-コレステロール放出が減少し、神経細胞からの 24OHC 量が低下する可能性が示唆された。

Figure 1



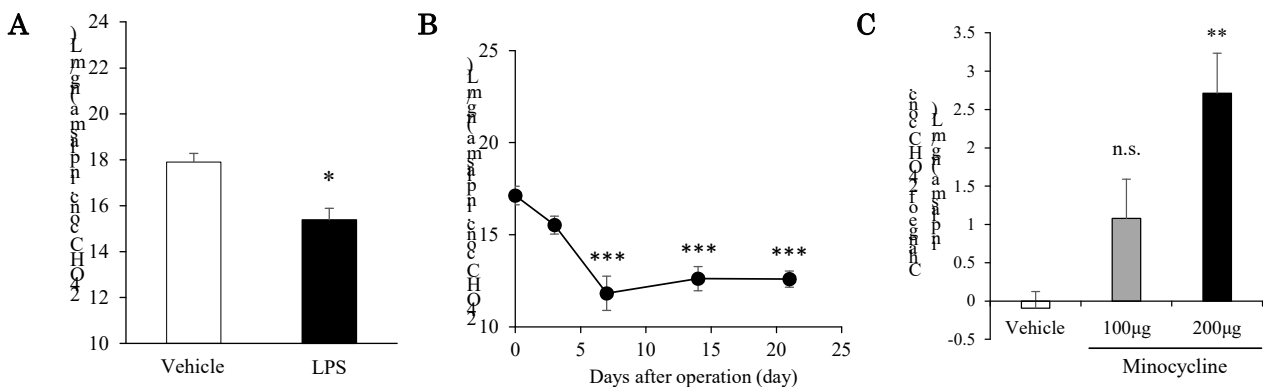
A) n = 3, ***p < 0.001 vs. control medium, two-way ANOVA 後に Bonferroni の多重比較検定

B) n = 4, ***p < 0.001 vs. Ctrl, ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs. LPS, one-way ANOVA 後に Tukey の多重比較検定

結果 2. *In vivo* におけるミクログリア活性化と血漿中 24OHC との関係

LPS を髄腔内に投与してミクログリアを活性化させる LPS モデルおよび PSNL モデルを用い、血漿中 24OHC を測定した結果、両モデルにおいて、コントロール群と比較し、有意な血漿中 24OHC の減少 (Figure 2A, B) と脳脊髄液 (CSF) 中の ApoE の減少が認められた。PSNL モデルに対し、ミノサイクリンの髄腔内投与を行うと、投与量依存的に血漿中 24OHC と CSF 中 ApoE の増加が認められ (Figure 2C)、ミクログリアの活性化によって血漿中 24OHC が減少し、ミクログリア活性化を制御する薬剤によって血漿中 24OHC が増加することを示した。

Figure 2



A) n = 3, *p < 0.05 vs. Vehicle, Student の t 検定

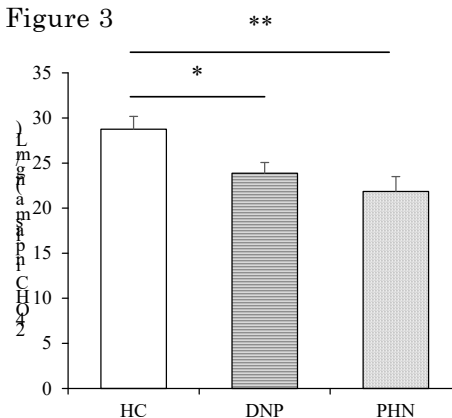
B) n = 4-5, ***p < 0.001 vs. day 0, one-way ANOVA 後に Dunnett の多重比較検定

C) n = 10-11, **p < 0.01 vs. Vehicle, one-way ANOVA 後に Dunnett の多重比較検定

結果 3. 末梢性神経障害性疼痛における 24OHC 測定

末梢性神経障害性疼痛患者においても、非臨床モデルと同様に血漿中 24OHC の減少が認められるか検討するために、健常者(HC)、糖尿病性神経障害性疼痛患者 (DNP) およびヘルペス後神経障害性疼痛患者 (PHN) から採取した血液を用いて、24OHC を測定した。その結果、健常者と比較し、末梢神経障害性疼痛患者において、有意な血漿中 24OHC の減少が認められ(Figure 3)、ヒトにおいても末梢神経障害性疼痛病態において、血漿中 24OHC が減少することが示された。

Figure 3



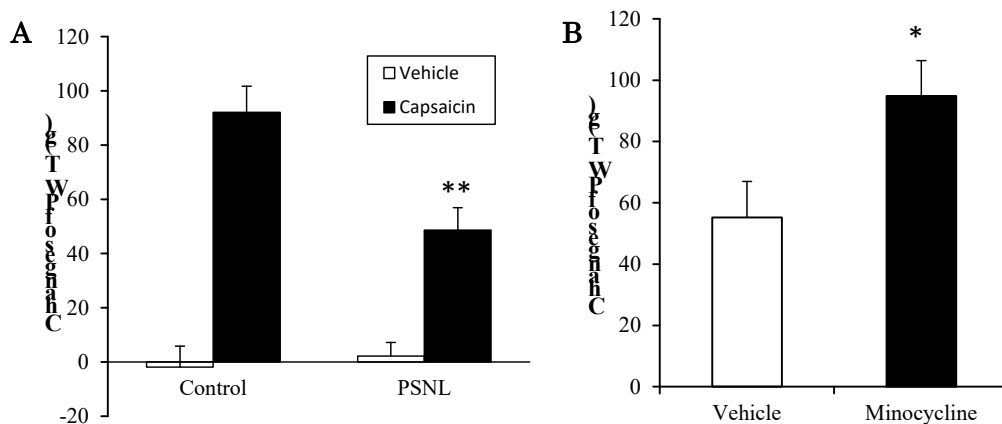
n = 40 (HC), 20 (DNP と PHN), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. HC, one-way ANOVA 後に Dunnett の多重比較検定

2章 ミクログリア活性化と関連するメカニスティックバイオマーカーとして DNIC の解析

PSNL モデルにおける DNIC の異常とミノサイクリンによる改善効果

PSNL モデルを作製し、DNIC を評価した結果、コントロール群と比較し、DNIC 現象の低下が生じていることが認められた(Figure 4A)。この PSNL モデルにおける DNIC の低下に対し、ミノサイクリンを髄腔内投与した結果、DNIC 低下の改善効果が認められ(Figure 4B)、PSNL モデルにおける DNIC 低下にミクログリアが関与していることが示唆された。

Figure 4



A) n = 8-14, ** p < 0.01 vs. Control, two-way ANOVA 後に Bonferroni の多重比較検定

B) n = 16, * p < 0.05 vs. Vehicle, Student の t 検定

【総括】

本研究では、ミクログリア活性化と関連した 2 種類のバイオマーカーの検討を行い、ミクログリア活性化と連動し、各マーカーの変動が起こることを示した。24OHC は末梢性神経障害性疼痛患者で変動があることを確認し、DNIC はヒトでも評価可能であることから、臨床においても応用できる可能性が期待される。これまでヒトで簡便に中枢神経系のミクログリア活性化状態や疼痛への関与の有無を評価するバイオマーカーは報告されておらず、今後本研究で検討したバイオマーカーを用い、ミクログリアを標的とした薬剤による有効性の検証から、神経障害性疼痛患者におけるミクログリア活性化を評価できる有望なマーカーとなる可能性がある。それによって将来的に慢性疼痛患者の原因を診断し、適切な治療法を選択するための一助となることを期待する。