

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)

【序論】

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。In vivo ミクログリア活性化モデルとして、LPS (Lipopolysaccharide) の髄腔内投与する LPS モデルまたはラット坐骨神経部分結紮 (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 におけるミクログリア活性化に伴う ApoE 放出量変化

ミクログリア活性化と ApoE 放出との関連を調べるために、ラット初代培養ミクログリアを LPS で刺激し、培養上清中 ApoE 濃度を測定した。Vehicle または LPS (1, 10, 100, 1000 ng/mL) を処置し、4 時間後の microglia-conditioned medium (MCM) 中の ApoE 濃度は vehicle 群で最も高く、LPS 濃度依存的に減少した (Figure 1A)。LPS 刺激濃度は 100 ng/mL で頭打ち傾向が認められており、以後の試験は 100 ng/mL の LPS を用いた。ミクログリア活性化を抑制することが報告されているミノサイクリンまたはイブジラストを LPS と同時処置した結果、LPS 刺激による ApoE 放出量低下が各薬剤の濃度依存的に抑制された (Figure 1B)。

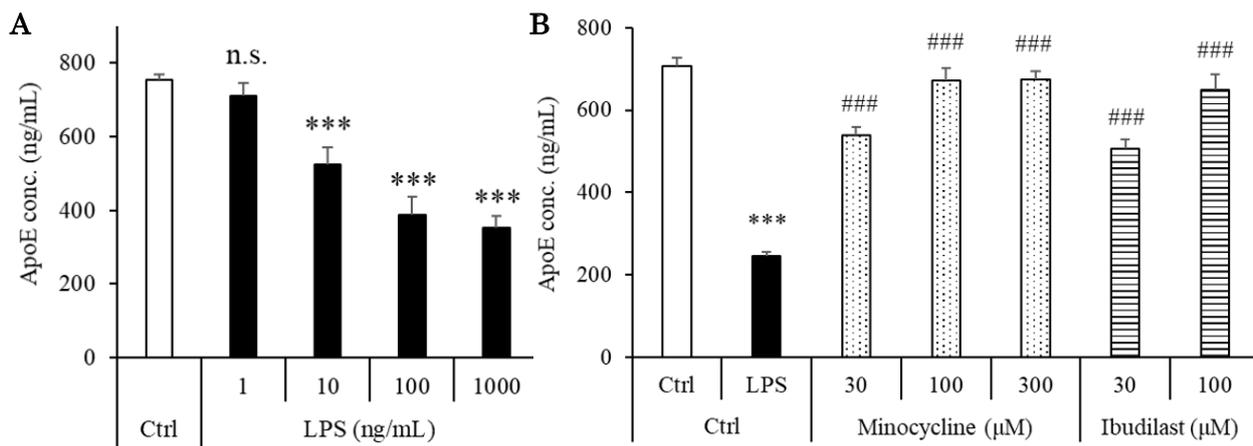


Figure 1 ミクログリアからの ApoE 放出

- A) ラット初代培養ミクログリアに対し、vehicle または LPS (1, 10, 100, 1000 ng/mL) を含む培地に置換し、4 時間後の培養上清中に放出された ApoE 濃度を測定 ($n = 4$, $***p < 0.001$, $###p < 0.01$ vs. Ctrl, Dunnett の多重比較検定。n.s. = not significant vs. Ctrl)。
- B) 初代培養ミクログリアに対し、LPS (100 ng/mL) にミノサイクリン (30, 100, 300 μ M) またはイブジラスト (30, 100 μ M) を含む培地に置換し、4 時間後の培養上清中に放出された ApoE 濃度を測定 ($n = 4$, $***p < 0.001$ vs. Ctrl, $###p < 0.001$ vs. LPS, Tukey の多重比較検定)。

結果 2. 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 2A)。この増加はミクログリアを LPS 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 2B)。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。

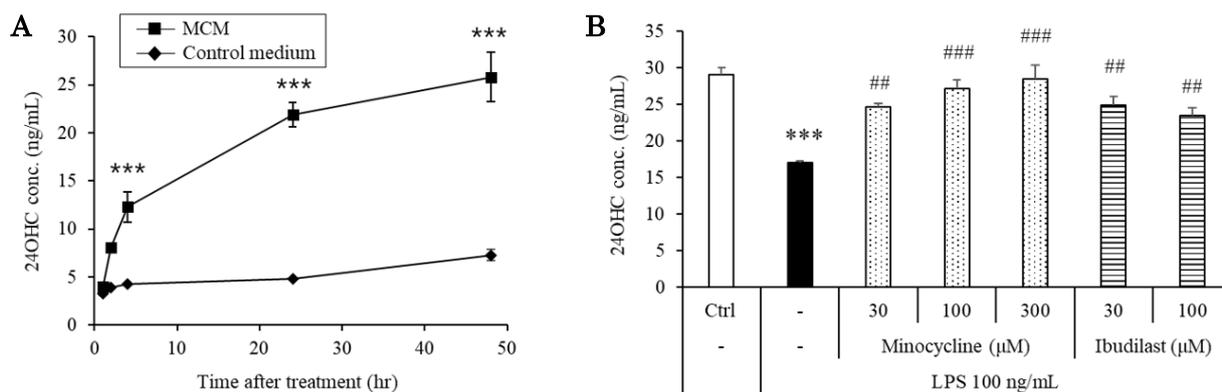


Figure 2 Microglia-conditioned medium によるラット初代培養神経細胞からの 24OHC 放出量変化

- A) 神経細胞用の培地に置換し 4 時間後の Microglia-conditioned medium (MCM) または神経細胞用の培地 (Control medium) を用い、培養中の神経細胞の培地を半量交換し、その後の培養上清中 24OHC 放出量を測定。処置後 1, 2, 4, 24, 48 時間後の培養上清中の 24OHC 濃度 ($n = 3$, $***p < 0.001$ vs. Control medium, Bonferroni の多重比較検定)。
- B) 神経細胞用の培地に vehicle、LPS、または LPS とミノサイクリン/イブジラストを溶解させミクログリアの培地に置換し 4 時間後の MCM を用い、神経細胞の培地を半量交換した際の培養上清中の 24OHC 濃度。培養上清は MCM 処置後 48 時間後に回収 ($n = 4$, $***p < 0.001$ vs. Ctrl, $##p < 0.01$, $###p < 0.001$ vs. LPS, Tukey の多重比較検定)。

結果 3. 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 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 の減少が認められた (Figure 3A, B)。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 の増加が認められ (Figure 3C)、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ことによって血漿中 24OHC が増加することが示唆された。

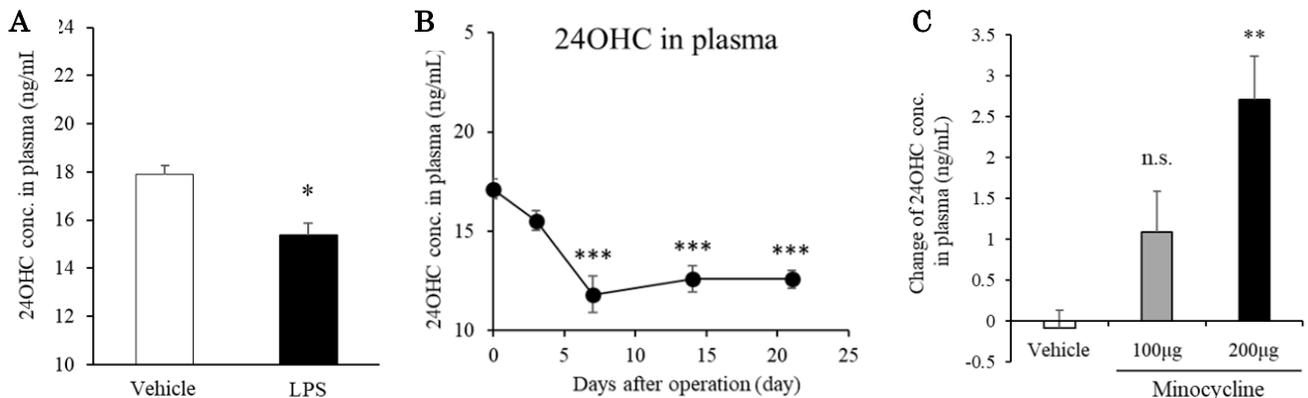


Figure 3 LPS モデルおよび PSNL モデルにおける血漿中 24OHC 濃度変化

- A) Vehicle または LPS の髄腔内投与 3 日後の血漿中 24OHC 濃度 (n = 3, *p < 0.05 vs. Vehicle, t 検定)。
 B) PSNL モデルにおける血漿中 24OHC 濃度の経日変化 (n = 4-5, ***p < 0.001 vs. day 0, Dunnett の多重比較検定)。
 C) PSNL モデル 14 日目のラットに対し、vehicle またはミノサイクリン (100 µg または 200 µg/rat) の髄腔内投与前から投与 8 時間後における血漿中 24OHC 濃度変化 (n = 10-11, **p < 0.01 vs. Vehicle, Dunnett の多重比較検定)。

結果 4. 末梢性神経障害性疼痛患者における血漿中 24OHC 測定

ヒトにおいても末梢神経障害によって血漿中 24OHC が変化するか調べるために、糖尿病性神経障害性疼痛 (DNP) 及びヘルペス後疼痛患者 (PHN)、健常者 (HC) の血漿中 24OHC 濃度を測定した結果、健常者に対し、各患者群で有意に血漿中 24OHC が減少した (Figure 8A)。疼痛重症度別に中等度 (NRS 4-6) と重度 (NRS 7-10) で分類すると、痛みの重症度が高いほど 24OHC が減少する傾向が認められ (Figure 8B)、ヒトにおいても末梢神経障害によって、血漿中 24OHC が減少することが示された。

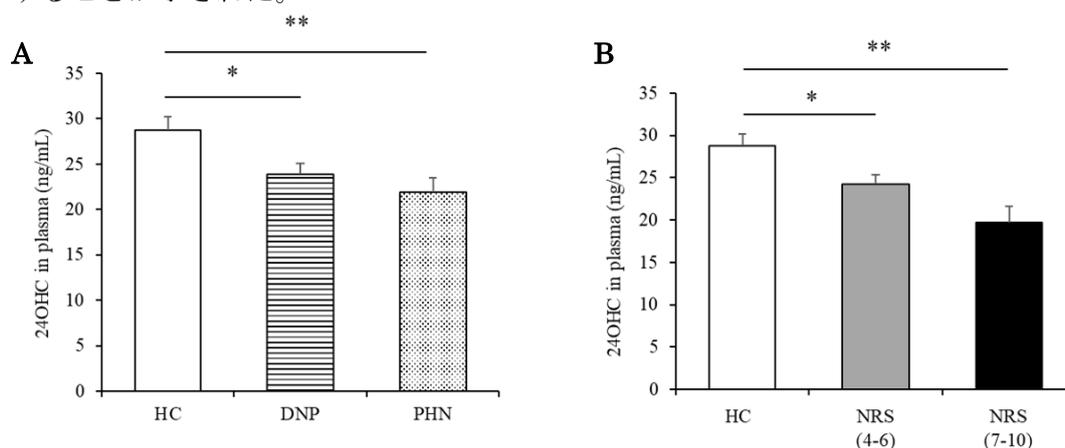


Figure 3 末梢性神経障害性疼痛患者における 24OHC 濃度

- A) 健常者 (HC)、糖尿病性神経障害性疼痛患者 (DNP) およびヘルペス後疼痛患者 (PHN) の血漿中 24OHC 濃度 (n = 40 (HC), 20 (DNP と PHN), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. HC, Dunnett の多重比較検定)。
 B) 健常者、中等度の疼痛患者 (NRS 4-6) および重症の疼痛患者 (NRS 7-10) の血漿中 24OHC 濃度 (n = 40 (HC), 28 (NRS 4-6), 12 (NRS 7-10), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. HC, 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た (Figure 4B)。以上の結果から、PSNL モデルにおける DNIC 低下に脊髄で活性化したミクログリアが関与している可能性が示唆された。

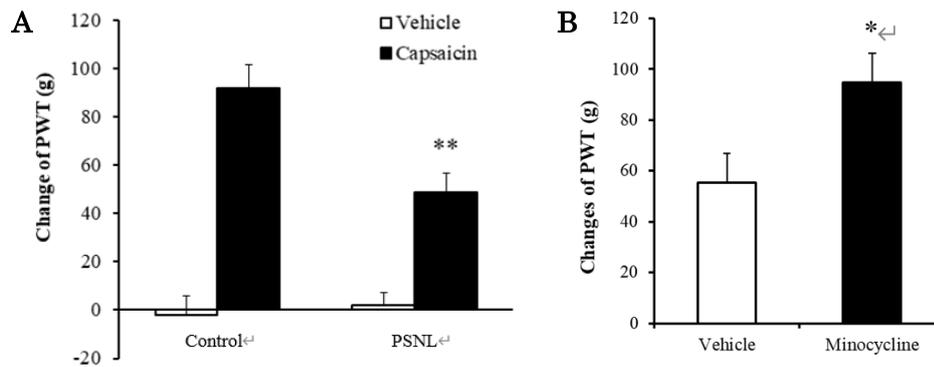


Figure 4 PSNL モデルにおける DNIC 異常とミノサイクリンによる改善効果

A) カプサイシン (100 μ g) を PSNL モデルラットの四肢に投与し、20 分後に後肢の PWT を測定 (n = 8-14, ** p < 0.01 vs. Control, Bonferroni の多重比較検定)。

B) ミノサイクリン (200 μ g/rat) を PSNL モデル 14 日目のラットに髄腔内投与し、30 分後に PWT を測定 (n = 16, * p < 0.05 vs. Vehicle, t 検定)。

【結論】

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。

【発表論文】

1. **Sosuke Yoneda**, Erika Kasai, Midori Matsuo, Ryuta Tamano, Yusuke Sakurai, Toshiyuki Asaki, Masahide Fujita
Duloxetine ameliorates the impairment of diffuse noxious inhibitory control in rat models of peripheral neuropathic pain and knee osteoarthritis pain.
Neurosci Lett. 2020 Jun 11;729:134990.
2. **Sosuke Yoneda**, Tatsuya Yanagawa, Shigeki Omachi, Tatsuya Ikehara, Sayaka Fujita, Ryuta Tamano, Atsushi Obata, Erika Kasai
Evaluation of plasma 24(S)-Hydroxycholesterol as a novel biomarker of microglial activation.
(Manuscript in preparation)