

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713054

研究課題名(和文) 知覚神経系と免疫系のクロストーク 免疫細胞に発現する痛み関連分子の役割

研究課題名(英文) Crosstalk between sensory nervous system and immune system

研究代表者

杉山 由紀 (SUGIYAMA, Yuki)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10468100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞と知覚神経系の相互作用を解明するため、重要な侵害受容体であるTRPV1に注目して解析を行った。全身性の炎症および炎症性の腹痛が生じるLPS腹膜炎モデルにおいて、腹部の痛覚過敏は、TRPV1ノックアウトマウスで有意に低下しており、脊髄の免疫染色においても痛み反応して活性化している神経細胞が少なかった。血清中の炎症性サイトカインにも差はなかったが、TRPV1ノックアウトマウスでは腹膜炎後に脾臓が腫大し、細胞数が増加していた。増加していた細胞は、骨髄系細胞およびCD4T細胞であった。以上から、LPS腹膜炎では痛みの違いが免疫系を制御するということが示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the relationship between sensory nervous system and immune system, we focused on TRPV1 which is known as very important multimodal nociceptor. In a mouse model of lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis, mechanical hyperalgesia and activation of spinal sensory neurons were less in TRPV1 knockout (KO) mice compared to wild type (WT) mice, even though same degree of systemic inflammation occurred in both WT and TRPV1 KO mice. In late phase of LPS-induced peritonitis, marked splenomegaly was found in TRPV1 KO mice, although TRPV1 is not expressed or very little expressed on the surface of splenocytes. The number of splenocytes in TRPV1 KO mice was significantly increased compared to that in WT mice, and increased populations in the spleen were neutrophils, macrophages and CD4 T cells. These results clearly demonstrated that the difference of the pain sensation LPS-induced peritonitis regulates the immune system.

研究分野：麻酔科学

キーワード：痛み関連受容体

1. 研究開始当初の背景

TRPV1 等に代表される痛み関連分子の研究が急速に進展していたが、これら痛み関連分子が免疫細胞でどのような生理的役割を担っているか明らかではなかった。また、痛みは、様々な疾患や病態が原因となって生じる不快な感覚であり、炎症により痛みは惹起されるが、逆に痛みにより免疫細胞も影響を受けることが指摘されるようになっていた。しかし、このような痛覚 免疫連関の詳細なメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、原疾患の進行・抑制、創傷治癒等、様々な生理的役割を持つ免疫細胞での痛み関連分子の機能と生理的役割、および免疫系と知覚神経系の相互作用を、TRPV1 を中心に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

免疫細胞における TRPV1 の役割を解明するため、当初、野生型マウスに放射線照射を行い、野生型 (WT) マウスまたは TRPV1 ノックアウト (KO) マウスに骨髄を移植し、骨髄キメラマウスを作成する予定であったが、マウスの繁殖数が予想より少なく、またマウスを大量に必要としたため、CFA の測定投与による炎症性痛覚過敏モデルに変更した。しかし、CFA モデルでは足底に浸潤する炎症細胞を分離すると細胞数が少なく、解析に必要な細胞数を得にくいという問題が生じた。同時に、TRPV1 の炎症細胞における発現変化を確認したところ、ヒトの炎症細胞では、TRPV1 が恒常的に発現しているものの、マウスでは恒常的には発現しておらず、刺激による発現上昇も認められなかった。

そのため、LPS 腹膜炎モデルを作成し、このモデルマウスの解析を開始した。

1) LPS 腹膜炎モデルの作成

LPS 腹膜炎は重症化すると、全身性の炎症によりマウスが死亡してしまうため、non-lethal dose の LPS 投与量を決定した。

2) LPS 腹膜炎による全身状態の変化

全身性の炎症によりマウスの活動性は著しく障害される。また血管拡張作用により体温が低下する。これらの評価として、マウスの体重変化と体温変化を経時的に測定した。

3) 痛覚過敏の行動評価

機械性痛覚過敏が生じると、小さい体表への刺激であってもマウスは逃避行動を示す。この程度を von-Frey Filament を用いて評価した。

4) 脊髄での知覚神経の活性化評価

神経活動が活性化すると、神経細胞内で c-Fos の発現が上昇する。LPS 腹膜炎マウスの脊髄を採取し、免疫組織学的染色を行い、c-Fos 陽性細胞の数を測定し、痛みの評価を行った。

5) LPS 腹膜炎による全身炎症の評価

LPS による炎症により、多くのサイトカインが産生される。LPS 腹膜炎時の腹腔マクロファージや血清を採取し、サイトカインの産生量を、ELISA や real time PCR で測定した。

6) LPS 刺激による ex vivo 刺激の評価

LPS 刺激による炎症細胞の活性化が、in vivo と ex vivo でどのような違いがあるかを検討するために、腹腔マクロファージや脾臓を採取した後に LPS 刺激を行い、ELISA や Real time PCR でサイトカイン産生量を測定した。

7) LPS 腹膜炎後の脾臓の解析

LPS 腹膜炎後に免疫系にどのような変化が生じるのかを、脾臓を採取し解析した。脾臓の評価は、細胞数の測定、Flowcytometry によ

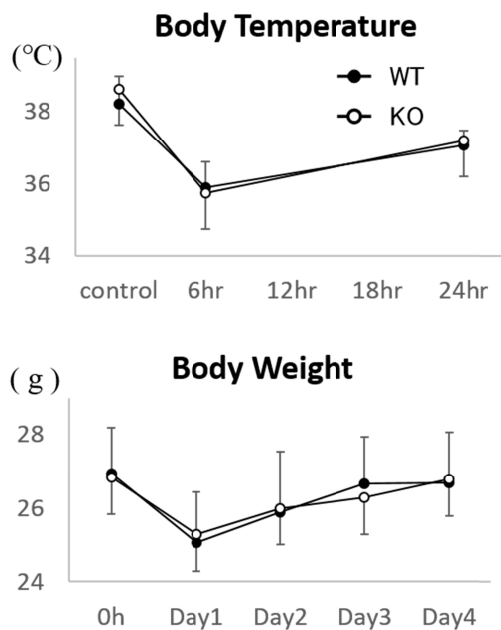
る細胞集団の分布、Real time PCR によるサイトカイン産生で行った。

4. 研究成果

1) LPS 腹膜炎による全身状態の変化

腹膜炎が誘発されるが、マウスは生存し、von-frey Filament の刺激にも反応する LPS の腹腔内投与量として、10 μg と決定した。WT マウス、TRPV1 KO マウスの両群とも LPS 投与 6 時間後には体温低下が生じ、24 時間後には回復傾向を示した。体重変化においても両群とも LPS 投与 1 日後には体重減少が生じたが 2 日後以降には回復傾向を示した。これらの変化に両群間に有意差はなかった(図 1)。

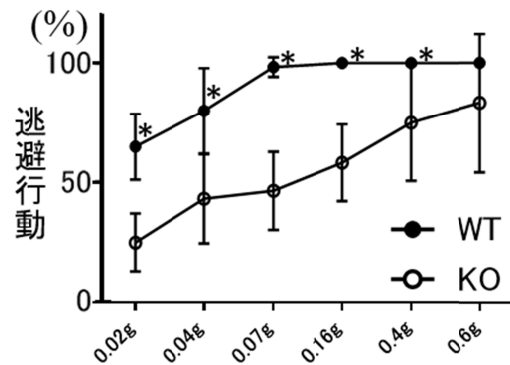
図 1 . LPS 腹膜炎による体温変化(上図)と体重変化(下図)。



2) LPS 腹膜炎による機械性痛覚過敏

WT マウスでは、LPS 腹膜炎により機械性痛覚過敏が生じたが、TRPV1 KO マウスでは生じなかった(図 2)。この機械性痛覚過敏は LPS 投与後 48 時間まで続き、72 時間後には消失した。

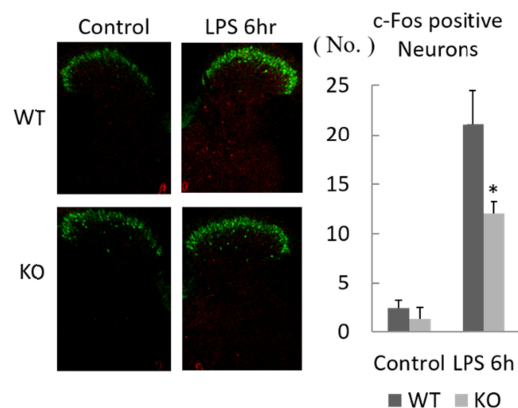
図 2 . LPS 投与 6 時間後の機械性痛覚過敏 . X 軸は von Frey-Filament による刺激強度、Y 軸は刺激に対する逃避行動割合を示す。(* $p < 0.05$ vs TRPV1 KO)



3) 脊髄での知覚神経の活性化評価

TRPV1 KO マウスでは、WT マウスと比較して LPS 投与 6 時間後の c-Fos 陽性細胞、すなわち活性化された神経細胞数が有意に少なかった(図 3)。

図 3 . 脊髄の免疫染色 . 緑は PKC- γ 陽性であり、脊髄の第 1, 2 層を示す。赤は c-Fos 陽性であり活性化神経細胞を示す(左図)。c-Fos 陽性細胞数の変化(右図) (* $p < 0.05$ vs WT)。



4) LPS 腹膜炎による全身炎症の評価

血清サイトカイン、腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン産生は、WT マウス、TRPV1

マウスで有意な差はなかった。

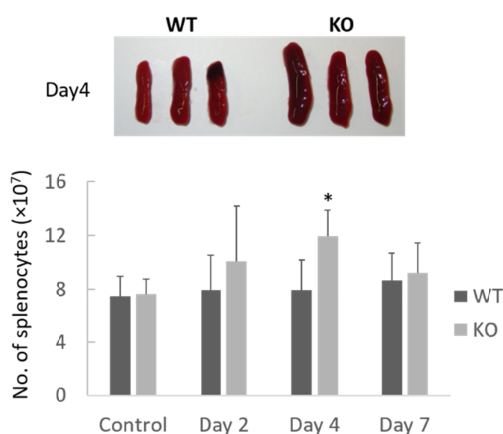
5) LPS 刺激による ex vivo 刺激の評価

Ex vivo での LPS 刺激において、腹腔マクロファージおよび脾臓のサイトカイン産生は、WT マウス、TRPV1 KO マウスの両群に有意差はなかった。

6) LPS 腹膜炎後の脾臓の解析

LPS 腹膜炎発症 4 日目に TRPV1 KO マウスで脾臓が生じていた (図 4 上)。脾臓の細胞数を計測したところ、TRPV1 KO マウスは WT マウスよりも LPS 腹膜炎 4 日後に有意に細胞数が増加していた (図 4 下)。

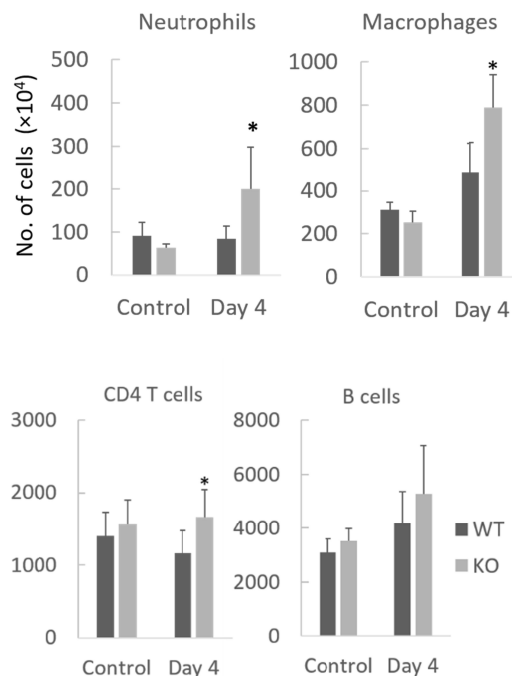
図 4 . LPS 腹膜炎後の脾臓の変化 . LPS 腹膜炎 4 日後の脾臓 (上図) と LPS 腹膜炎による脾臓の細胞数変化 (下図) (* $p < 0.05$ vs WT)



脾臓の細胞集団を Flowcytometry により解析した結果、LPS 腹膜炎の 4 日後には、TRPV1 KO マウスにおいて、骨髄系細胞、特に好中球とマクロファージの上昇が著しく、他に CD4T 細胞の細胞数も上昇していることが分かった (図 5)。

図 5 . 脾臓における各細胞集団の細胞数変化 . 好中球数 (上左図) マクロファージ (上右図) CD4T 細胞 (下左図) B 細胞 (下右図)

(* $p < 0.05$ vs WT)



まとめ

研究成果 1)~4)から、WT マウスと TRPV1 マウスの両群で LPS 腹膜炎により同程度の炎症が生じるが、痛みの程度が TRPV1 KO マウスで弱いといえる。研究成果 5)6)は、LPS 刺激に対する脾細胞の反応は in vivo でのみ WT と TRPV1 KO で有意差が生じたことを示している。以上から、LPS 腹膜炎では痛みの違いが免疫系を制御するということが示された。これにより、本研究のテーマである、免疫系と知覚神経系の相互作用を明らかにするという目的を達成できた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

1) Yuki Sugiyama, Yuki Yoshiyama, Satoshi Tanaka, Mikito Kawamata. TRPV1 is involved in abdominal hyperalgesia in a mouse model of lipopolysaccharide-induced peritonitis and influences the immune

response of splenocytes. IASP 16th World
congress of pain. 2016/9/26-30, Yokohama

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山 由紀 (SUGIYAMA, Yuki)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10468100