

論文要旨

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma アゴニスト
Rosiglitazone のマクロファージを介した鎮痛効果

大納哲也

【序論および目的】

炎症や侵害刺激による疼痛の過敏化は手術時の切開創周囲にみられ、術後痛の主因である。創周囲には早期に単球から分化したマクロファージが浸出し、炎症性である M1 型と抗炎症性である M2 型に誘導され炎症や組織修復に関わっている。Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) は核内ホルモン受容体ファミリーの1つで、様々な代謝、内分泌、心血管系疾患に関与していると考えられているが、マクロファージの極性を M2 型へと強力に導くことによって脳虚血や脊髄損傷時の神経保護や神経回復効果を生じることも報告されている。さらに坐骨神経結紮モデルでは触アロディニア抑制作用を発揮し、鎮痛にも関与していることが報告されている。今回我々は、足底切開モデルを用い末梢組織での急性痛に対する PPAR γ のマクロファージを介した鎮痛効果のメカニズムを研究した。

【材料および方法】

動物は 8-10 週令のオスのマウス C57BL6 を用い、足底切開モデル (マウス後肢に 5 mm の切開を加え 2 針縫合) を作成した。足底切開直後に PPAR γ アゴニストの Rosiglitazone を 3、10 μ g 注入し (R3, R10 群)、対照群は (V 群: vehicle) は DMSO : PBS を注入し、足底に切開を加えない正常群 (I 群: intact) と比較した。鎮痛効果は行動実験で評価し、熱逃避行動を Paw Thermal Stimulator で測定し、触アロディニアは von Frey filament を用い Updown method で測定して 50% 逃避閾値を算出した。マウスは灌流固定したのち足底皮膚を採取し、免疫染色 (1 次抗体 F4/80, iNOS, CD206)、定量 PCR (測定項目 MIP, Arginase, interleukin-1 β , integrin α X, IL-10, HO-1, FIZZ1, G3PDH)、Western Blotting (測定項目 nuclear factor- κ B, phospho-NF- κ B) を行った。また、マウスに 4% チオグリコレート 3cc を腹腔内投与し、3 日後に腹腔内洗浄して腹腔内マクロファージを採取し、Rosiglitazone を含む培地に 72 時間培養し、PKH26 で蛍光染色したのち切開部位に移植し行動実験で鎮痛効果を調べた。

【結 果】

① Rosiglitazone の局所投与が早期に痛覚過敏を改善する。

熱逃避行動は R 群で切開 48 時間後の潜時が最も延長し、72 時間で V 群と同レベルになった。触アロディニアは R 群で 6 時間から 72 時間後まですべて閾値が上昇した。切開後の浮腫による足底厚は R 群で 6 時間後有意に小さかった。R 群は炎症細胞の浸潤の抑制も観察でき、NF- κ B のリン酸化も 6 時間後が有意に抑制されていた。

② Rosiglitazone は炎症部位でマクロファージの極性を変える。

炎症部位のマクロファージは切開後より増加したが、R 群では 24 時間後で有意に少なかった。全マクロファージに対する M1 マクロファージの割合は、R 群で V 群と比較し有意に低く I 群と同レベルであった。炎症性疼痛や痛覚過敏に関与する好中球誘導因子 MIP2 α と炎症メディエーターの IL-1 β は R 群で抑制された。M1 のマーカーである ItgaX や単球を M1 に分化させる leptin は R 群で低下し、M2 で発現する Arg1 や Fizz1、抗炎症性サイトカインの IL-10、HO-1 は R 群で増加した。

③ Rosiglitazone がマクロファージを介して痛覚過敏を改善する。

切開部に移植した腹腔内マクロファージは 72 時間後も残存しているのが確認された。Rosiglitazone で前処置された腹腔内マクロファージを創部に移植されたマウスは、24 時間後の触アロディニアの閾値が上昇し、熱逃避行動の潜時が延長した。

【結論及び考察】

切開創の周囲に PPAR γ アゴニストの Rosiglitazone を注入することで創部痛が軽減され、同時に浸潤するマクロファージの極性が変化することが判明した。また、Rosiglitazone で前処置したマクロファージを創部に注入すると痛みが軽減されることも確認された。これらの結果は、Rosiglitazone がマクロファージの極性を創部で制御することにより鎮痛効果を発揮することを示唆している。

Rosiglitazone は全マクロファージの割合で M1 を減少させ M2 を増加させたが、このことは、Rosiglitazone がマクロファージの総量を減らすのではなく、M1 から M2 へと極性を制御することで抗炎症作用をもたらしたことを示している。

最近の研究では、PPAR γ シグナリングの活性化により、酸化ストレスや炎症の抑制と組織の再構築や損傷部位の修復といった組織保護作用が生じることが示されている。本研究でも Rosiglitazone により IL-10 と HO-1 が増加したことから、Rosiglitazone もこの作用を有することが推測される。また、Rosiglitazone を前処置したマクロファージを切開創に移植すると痛覚過敏の改善がみられたが、このことは Rosiglitazone の作用が M2 マクロファージを誘導することによって得られた鎮痛効果であることを示している。

以上のことからマクロファージの PPAR γ シグナリングは、急性痛から進展する痛みに対する治療のターゲットとなり得ると考えられた。

論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医研第 697 号	氏名	大納 哲也
審査委員	主 査	乾 明夫	
	副 査	桑木 共之	武田 泰生

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma アゴニスト rosiglitazone のマクロファージを介した鎮痛効果)

炎症や侵害刺激による疼痛の過敏化は、術後痛の遷延化をもたらす。手術部位には早期からマクロファージが浸潤し、炎症性型である M1 型と抗炎症性型である M2 型マクロファージのバランスが炎症や創傷治癒に重要である。

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)は核内受容体ファミリーの 1 つでマクロファージの極性を M2 型へ誘導することによって、炎症を抑制し組織修復を促進することが報告されている。学位申請者らは PPAR γ シグナルがマクロファージの極性を制御することにより疼痛反応を修飾するものと仮定し、研究をおこなった。本研究では術後痛モデルマウスを作成し、PPAR γ アゴニスト rosiglitazone を手術直後に足底投与した。熱逃避行動や機械的刺激に対する疼痛反応を評価し、手術部位における rosiglitazone による M1/M2 バランスの修飾を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) 術直後に rosiglitazone を局所投与することにより、痛覚閾値を上昇させた。熱逃避行動は手術 48 時間後の潜時が延長し、機械的刺激に対する 50% 閾値は手術 6 時間後から 72 時間後にわたって上昇した。
- 2) 手術部位では rosiglitazone 投与により炎症細胞の浸潤が減少し、浮腫が抑制された。また PPAR γ シグナルの下流である NF- κ B のリン酸化が抑制された。
- 3) Rosiglitazone 投与群では手術部位のマクロファージの極性は M2 優位であった。炎症部位の F4/80⁺ 総マクロファージ数は rosiglitazone により減少し、F4/80⁺ iNOS⁺ M1 型の減少と F4/80⁺ CD206⁺ M2 型の増加が確認された。
- 4) 手術部位に rosiglitazone で処理した腹腔マクロファージを移植したところ、手術 24 時間後の機械的刺激に対する 50% 閾値が上昇し、熱逃避行動の潜時が延長した。

以上の結果から、PPAR γ アゴニスト rosiglitazone はマクロファージを介して術後痛を軽減し、マクロファージの極性を M1 型から M2 型へ誘導することによって鎮痛効果が得られたことが示唆された。

本研究は、マクロファージの極性と疼痛制御の関連を明らかにし、新たな疼痛治療のターゲットを提示した意義深い知見である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有すると判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第	697	号	氏名	大納 哲也
審査委員	主査	乾 明夫			
	副査	桑木 共之		武田 泰生	
<p>主査および副査の3名は、平成25年1月7日、学位請求者 大納哲也 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 損傷で浸潤してくるマクロファージ全体量は rosiglitazone に影響されないのではないかと？ 回答) 術後早期にマクロファージが血管から創部へ組織浸潤しマクロファージ数が増加することが報告されている。このマクロファージは主に M1 型であり、rosiglitazone の局所投与により創部からマクロファージ遊走因子や炎症性メディエーターの産生を抑制することにより、M1 マクロファージの浸潤を抑制し、総数が減少したと考える。</p> <p>質問2) 実際に鎮痛に関わるのは、M1、M2 どちらのマクロファージか？ 回答) M1 マクロファージのマーカーである C-C chemokine receptor type 2(CCR2) 欠損マウスで炎症性疼痛を抑制したとの報告がある。また M2 マクロファージでは heme oxygenase-1(HO-1) の発現が増加するが、HO-1 遺伝子改変動物を用いた研究から HO-1 は抗炎症作用のみでなく鎮痛効果を有することが報告されている。そのため M1 が発痛、M2 が鎮痛作用を有すると考えられる。</p> <p>質問3) Rosiglitazone で抗がん剤による痛覚過敏は抑えられるものなのか？ 回答) 坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルで rosiglitazone を早期に投与することにより、鎮痛効果が得られたが、病態が完成された後期では効果は見られなかった。抗がん剤による神経傷害の早期であれば、鎮痛効果はあるのではないかと考えられる。</p> <p>質問4) 全身投与で検討はしているのか？ 回答) 今回は、全身投与での検討をしていないが、坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルでは rosiglitazone の早期全身投与により鎮痛効果を得られたとの報告がある。そのため全身投与でも鎮痛効果は得られると予測する。</p> <p>質問5) 移植したマクロファージの極性を確認しているのか？ 回答) 学位申請者の共同研究者らは以前の研究において、腹腔マクロファージを rosiglitazone で処理することにより、M1 型マーカーである iNOS、CCR2 の誘導が抑制されることを明らかにしたが、M2 型への分化は不明であり、今後検討が必要である。</p> <p>質問6) 今回の局所での使用量で血中への移行量、全身への副作用は？ 回答) 局所投与としては、ヒトで換算すると内服量の 3~4 倍であり、副作用の可能性は十分にある。しかし rosiglitazone の心血管系への副作用は長期内服している患者でおこっており、本研究では、急性期の単回使用のため、副作用の発現の可能性は低いと考える。</p> <p>質問7) 無菌状態での傷害には M1 マクロファージは必要ないのではないかと？ 回答) 生理学的には侵襲防御のために超急性期に痛みを生じさせる機能は必要と考えられる。また壊死細胞などの排除のために M1 マクロファージの有する貪食機能は不可欠である。</p> <p>質問8) 創傷治癒に関しての評価・観察はしているのか？ 回答) 今回は創部の観察を3日間で終了しているため創傷治癒の評価はできていない。今後 wound healing assay により M1/M2 バランスが創傷治癒に及ぼす影響を検討する予定である。</p>					

質問 9) 糖尿病で **rosiglitazone** を内服している患者で手術を行ったという場合に痛みが少なかった、という報告などはないのか？

回答) 糖尿病患者は神経障害性疼痛を有している場合もあり、疼痛評価が困難なこともあるのか、鎮痛効果があるとの報告はない。

質問 10) 創部の組織染色で M1・M2 マクロファージの割合が合計して 100%にならない理由は？

回答) M1 もしくは M2 へ分化していない non-iNOS⁺M1、non-CD206⁺M2 マクロファージが存在すると考えられる。ただし、機能が明確でない未分化マクロファージを検討するよりも M1 と M2 のバランスが大きく変化していることの方が重要と考える。また M2 にはいくつかのサブタイプが存在することが近年報告されているため、今後 CD206⁺M2 の局所浸潤、機能的意義を検索したい。

質問 11) Rosiglitazone の鎮痛効果に関しては、M1 マクロファージの抑制と M2 マクロファージの誘導どちらがより重要なのか？

回答) 最終的な鎮痛効果としては、M2 マクロファージの割合が高いことから M2 マクロファージが鎮痛に大きく関与していると考ええる。ただし、M1 マクロファージにおいて NFκB を抑制し iNOS、IL-1β などの疼痛物質の放出を抑制していることも直接的な鎮痛作用となる。

質問 12) Rosiglitazone の局所投与量が 3μg と 10μg であるが、それ以外の投与量は調べていないか？

回答) 実際には、0.3、1、3、10、30μg で検討した結果、1μg と 3μg、また 10μg と 30μg で鎮痛効果が同等であったため 3μg と 10μg の間で投与をおこなった。

質問 13) Rosiglitazone の全身投与でも局所投与と同様の鎮痛効果や、他の鎮痛効果があるのか？

回答) 全身投与はおこなっていないが、坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルにおいて、初期の全身投与で長期間の鎮痛が得られたことから、局所投与と同様に鎮痛効果があると予測する。また、全身投与を継続すると骨髄レベルで M1 マクロファージの抑制がみられ、結果的に総マクロファージが減り鎮痛効果をもたらすものと考察する。

質問 14) PPARγ アゴニストが直接鎮痛効果をもたらすという臨床報告はあるか？

回答) マウスでは坐骨神経結紮モデルで pioglitazone の経口投与により鎮痛効果が得られたとの報告はあるが、臨床報告に関しては確認できていない。

質問 15) PPARγ アゴニストの中でも rosiglitazone を選択した理由は？

回答) マクロファージの極性と鎮痛効果を末梢組織レベルで調べるためには、血液脳関門を通過しない rosiglitazone が最適であった。Pioglitazone は血液脳関門を通過して、神経を直接抑制する作用があり末梢レベルでの鎮痛作用をみるのは不適である。

質問 16) PPARγ の発現はマクロファージに限局しているのか？

回答) マクロファージ以外にも脊髄後角、後根神経節、末梢神経周囲のアディポサイト、グリア細胞で発現している。

質問 17) M1 マクロファージの炎症性メディエーターは脂肪細胞のグルコース輸送体に影響するのか？

回答) Glucose transporter type 4(GLUT4)を欠損したマウスに rosiglitazone を投与することにより 血中 retinol binding protein 4 (RBP4)量が低下してインスリン感受性が正常化する。血中RBP4量を増加させると耐糖能異常を起し、逆に、マウスでRBP4遺伝子を欠失させるとインスリン感受性は高まることから rosiglitazone は GLUT4-RBP4 を介してインスリン抵抗性を改善しているものと考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。