

論文内容の要旨

論文提出者氏名 松岡 豊

論文題目 NLRP2 inflammasome in dorsal root ganglion as a novel molecular platform that produces inflammatory pain hypersensitivity.

論文内容の要旨

【背景】 パターン認識受容体にはToll-like receptorとNOD-like receptor(NLR)とがあり、これらが病原体関連分子パターン(PAMPs)、ダメージ関連分子パターン(DAMPs)を認識する。NLRがPAMPsやDAMPsを認識すると、インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を形成し、caspase1を活性化させる。活性化されたcaspase 1はinterleukin-1 β (IL-1 β)を活性化し、炎症カスケードが開始される。末梢神経においてもIL-1 β は多く生成されており、その活性化が痛覚過敏を引き起こす。NLRには多数の亜型が存在し、発現部位や受容シグナルは亜型により異なる。我々はインフラマソームが一次知覚神経においてcaspase 1を制御することでIL-1 β を活性化して疼痛を引き起こすという仮説のもと、一時知覚神経におけるNLRの同定と炎症性疼痛モデルにおける痛覚過敏の成立に果たす役割を調査した。

【方法】 雄性C57BL/6マウスを用い、後肢足底にComplete Freund's Adjuvant (CFA)を投与したもの(CFA群)またはインフラマソーム活性作用を持つセラミドを投与したもの(セラミド群)を炎症性疼痛モデルとした。対照群には生理食塩水を足底注射した。疼痛閾値はvon Freyフィラメントによる機械的刺激およびホットプレートによる熱刺激に対する逃避行動で決定し、深麻酔下に一時知覚神経の細胞体集合部の後根神経節(DRG)を採取し、免疫組織化学法(IHC法)、ウェスタンブロッティング法(WB法)、リアルタイムPCR法(qPCR法)を用いて、NLRP2およびIL-1 β の発現、caspase 1活性を評価した。caspase 1阻害薬またはNLRに対する遺伝子干渉法の効果を検証した。

【結果】 実験1. 一次知覚神経におけるインフラマソームの発現の確認: CFA群でcaspase 1 activityが上昇していることを確認した。IHC法で活性型IL-1 β は痛覚を伝達する小型神経細胞においてCFA群で多く発現し、WB法でも活性型IL-1 β の増加を確認した。qPCR法でNLR亜型のmRNA発現量を定量すると、CFA群において増加を認めたのはNLRP2だけであった。NLRP2は小型神経細胞で発現し、CFA群で優位に増加した。IHC法でNLRP2と活性型IL-1 β の共発現、NLRP2と神経細胞のマーカーであるNeuNとの共発現、NLRP2とC線維神経細胞マーカーであるペリフェリンとの共発現を認め、またNLRP2と熱受容体のTRPV1とが共発現しないことを確認した。

実験2. caspase1阻害薬の、CFA群に対する効果: 行動解析にてCFA群で機械的刺激と熱刺激に対する疼痛閾値の低下を確認し、次いでCFA群にcaspase 1阻害薬を髄腔注射し痛覚過敏への

効果を確認した。髄腔注射3～6時間後に疼痛閾値の改善を認めた。熱刺激に対しては疼痛閾値の改善は認めなかった。IHC法で活性型IL-1 β 発現量は、CFA群に比しcaspase 1阻害薬投与群で減弱した。

実験3. CFA群に対する、NLRP2遺伝子発現抑制の効果: 遺伝子干渉法を用いてNLRP2をノックダウンさせて、痛覚過敏への効果を観察した。NLRP2 siRNAまたはそのコントロールのscramble siRNAはアデノ随伴ウイルスに内包したものを髄腔内注射することでDRGニューロンに導入した。感染成立1週間後にCFAを足底注射したところ、NLRP2 siRNAを導入した群では機械的刺激の疼痛閾値は低下を認められなかった。熱刺激に対しては同様の効果は認められなかった。活性型IL-1 β の発現量はscramble siRNAを導入したマウスではCFA投与後の増加を認めたが、NLRP2 siRNAを導入した群では増加は認められなかった。

実験4. セラミド群に対する、NLRP2遺伝子発現抑制の効果: セラミド群でも同様の実験を施行した。セラミド足底注射では投与後2～5時間後に逃避閾値が低下し、痛覚過敏が観察された。この時DRGニューロンではNLRP2および活性型IL-1 β の発現の増加を認めた。予めNLRP2 siRNAを導入したマウスではセラミド投与による疼痛閾値の低下は減弱し、活性型IL-1 β の発現増加は認められなかった。

【考察】 DRGにNLRP2インフラマソームが存在し、炎症性疼痛時に発現増加し、caspase 1の活性増加を介してIL-1 β を活性化させることがわかった。caspase 1の薬理的阻害およびNLRP2の遺伝子発現抑制により疼痛閾値の改善を認めることから、NLRP2インフラマソームは炎症性疼痛時における痛覚過敏に重要な役割を果たしていると考えられる。IHC法での共染色の結果からNLRP2はC線維での痛覚伝達に働き、またNLRP2遺伝子発現抑制で熱刺激に対する疼痛閾値改善を認めなかったこと、熱受容体のTRPV1との共発現を認めなかったことからNLRP2は主に機械的痛覚過敏の成立に関わっていると推察される。

【結語】 我々は本実験において、DRGニューロンにNLRP2インフラマソームが存在すること、組織炎症によって活性化し痛覚過敏に関わっていることを発見した。NLRP2インフラマソームをターゲットとすることで痛みの治療につながる可能性を見出した。