

主論文の要旨

**GPR34 in spinal microglia exacerbates
neuropathic pain in mice**

脊髄後角のミクログリアにおける GPR34 はマウスにおいて
神経障害性疼痛を増大させる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

佐世 暁

【緒言】

神経障害性疼痛は知覚神経の損傷によって生じるが、効果的な治療法は未だ確立されていない。知覚神経伝導路である脊髄後角におけるミクログリアの炎症作用はこの発症や持続に重要であることが報告されている。ミクログリアの活性化の誘導には神経損傷を感知しミクログリア内にシグナルを伝えるミクログリア細胞膜上受容体が重要であると考えられるが、関与が解明されている分子は限られている。G-protein coupled receptor 34 (GPR34) は、我々の以前の研究において、神経損傷に応答して活性化ミクログリアで発現が上昇することが明らかになった7回膜貫通型Gタンパク共役受容体である。そのリガンドはリン脂質が加水分解することによって生じるLysophosphatidylserine (LysoPS) であると報告されている。GPR34 はミクログリアで発現が上昇していると考えられているが、神経損傷後のミクログリアの活性化における機能はこれまで解析されていない。そこで本研究では、神経障害性疼痛モデルを用いてミクログリアに発現する GPR34 の機能を解析した。

【方法】

8 から 12 週齢の C57BL/6 野生型 (WT) マウスと GPR34 ノックアウト (KO) マウスの第 4 腰神経 (L4) を切断し神経障害性疼痛モデルを作製した。GPR34 発現細胞の同定には *in situ* hybridization (ISH) と Interferon regulatory factor 8 (IRF8) 抗体による免疫組織化学染色 (IHC) を組み合わせた。ミクログリアの数と形態の解析には Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) 抗体を用いて、神経因性疼痛と関連する脊髄後角領域 Lamina I/II outer の識別には Protein kinase C gamma (PKC γ) 抗体を用いて IHC を行った。quantitative real-time PCR (qRT-PCR) にて脊髄後角における GPR34 および炎症性サイトカインの mRNA 発現量を定量した。Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)を用いて脊髄後角における LysoPS 量を測定した。神経損傷後に現れる疼痛は von Frey hair test により評価した。さらに神経損傷マウスに GPR34 拮抗薬を 14 日間連続で脊髄髄腔内に投与し、GPR34 機能阻害の効果を調べた。

【結果】

実験に先立ち、本研究でコントロールとして用いた Sham、Naive (non-operation)、非損傷側の脊髄後角における炎症性サイトカインおよび Iba1 mRNA の発現量と疼痛に違いがないことを確認した (Fig. S1-S2)。KO マウスに GPR34 mRNA が発現していないことを確認した後 (Fig. S3)、WT マウスの GPR34 mRNA を測定した。GPR34 mRNA は L4 神経損傷後 7 日目をピークに脊髄後角において発現が上昇していた (Fig. 1a)。GPR34 mRNA はミクログリア特異的転写因子である IRF8 陽性細胞に発現していたことから、ミクログリア特異的に GPR34 が発現していることが示された (Fig. 1d-f)。神経損傷に応答し活性化したミクログリアは増殖し集積することが知られている。神経因性疼痛と関連する脊髄後角領域 Lamina I/II outer におけるミクログリア数を Iba1 抗体と PKC γ 抗体を用いて定量した結果、損傷側において WT と KO マウス

間でミクログリア数に有意な差はなかった (Fig. 2k)。また活性化したミクログリアは突起が太く短くなることが知られている。Iba1 抗体で IHC を行った後、3D 形態解析ソフト Imaris にてミクログリアの形態を解析したところ、WT と KO マウス間で表面積、体積、突起の長さ、いずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 3a-g)。脊髄後角における炎症性サイトカインの発現を qRT-PCR で定量した結果、炎症性サイトカイン Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-6 が KO マウスの損傷側において有意に抑制されていた (Fig. 4a-c)。そこで von Frey hair test により神経損傷後の疼痛を評価したところ WT マウスに比べ KO マウスで疼痛が軽減されることが明らかになった (Fig. 5a-b)。GPR34 リガンドである LysoPS の脊髄後角における含有量を LC-MS/MS で解析したところ、損傷側で含有量が増加傾向にあった (Fig. S4)。最後に、神経損傷マウスに 14 日間連続で GPR34 の拮抗薬を髄腔内投与し、von Frey hair test にて疼痛を評価したところ、神経損傷 7 日、14 日後において疼痛が軽減されることが明らかになった (Fig. 6a-b)。

【考察】

神経障害性疼痛モデルの脊髄後角において GPR34 はミクログリア特異的に発現することが明らかになった。また GPR34 のリガンドである LysoPS が神経損傷後の脊髄後角において増加傾向にあったことから、GPR34 シグナルが神経損傷後のミクログリアの活性制御に関与する可能性が考えられた。神経損傷後のミクログリアの増殖や形態変化は WT と KO マウスに差がなかったことから GPR34 を介するシグナルは活性化ミクログリアにみられるこれらの現象に関与していない可能性が示唆された。しかし、KO マウスでは脊髄後角において炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の発現が低下していた。また神経損傷後の疼痛行動も損傷側で有意に軽減していた。さらに、GPR34 の拮抗薬は損傷側において疼痛を有意に軽減した。これらの結果より LysoPS は GPR34 を介してミクログリアの炎症性反応を惹起し、神経損傷後の疼痛を悪化させる可能性が示唆された。

【結語】

LysoPS を介するシグナルはミクログリア細胞膜上の GPR34 を活性化し、炎症性作用を惹起することにより疼痛を悪化させたことから、GPR34 は神経障害性疼痛の治療の標的になる可能性が示唆された。今後、脊髄後角における LysoPS 産生細胞の同定、その産生メカニズム、放出機序などを同定することにより、LysoPS/GPR34 シグナリングによるミクログリア活性化のメカニズムが解明されると期待される。