

41. 感覚センシングを制御する免疫細胞の動作原理解明

奈良県立医科大学医学部解剖学第2講座 講師

田中 達英

概要

近年の細胞解析技術や遺伝子改変動物を駆使することで、末梢のセンシング機構に関する理解が飛躍的に進展している。われわれは本研究で末梢神経細胞と免疫細胞との間のクロストークが痛覚において重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究で、Sorting nexin (SNX) 25 が疼痛調節遺伝子であること、神経近傍に局在する真皮マクロファージは SNX25 を介して NGF を産生・分泌することで神経とクロストークして痛覚の感受性を設定していること、SNX25-NGF シグナルは疼痛モデルにおける病理的な環境に加えて、正常時における弱い機械刺激に対する反応にも重要であることを明らかにした。

背景および目的

末梢組織に加わる侵害刺激は一次求心性神経で受容され、脊髄を経て脳に伝達される。これまでの痛み研究は痛覚伝導路に着目した解析が主流であったが、近年、神経細胞と空間的に近接する非神経細胞、特にグリア細胞が組織の炎症、神経系の障害に伴う慢性疼痛の発症と維持に重要な役割をもつことが数多く報告されている。一方で、末梢組織において正常時の痛覚に非神経細胞がどのように関わっているか今なお不明な点が多い。

われわれは生理的な機械刺激から病理的な疼痛にわたって感覚鈍麻の表現型を示す TG マウスを発見し、その候補遺伝子 SNX25 を同定、SNX25-KO マウスでも TG マウス同様の表現型であることを見出した。この KO マウスでは免疫系細胞に異常が認められることから、痛覚閾値を免疫系細胞が決めている可能性が考えられた。この KO マウスでさらに興味深いのは、疼痛モデルにおける痛み行動の減弱に加えて、正常時における弱い機械刺激に対する反応も減弱していることである。すなわち、皮膚のマクロファージは生理的な機械刺激から病理的疼痛までの感覚受容をシームレスに調節していることが示唆される。本研究では遺伝子変異マウス、遺伝子網羅解析、電気生理実験を駆使することで皮膚に局在する免疫細胞が SNX25 を介した如何なる分子機構によって痛覚、さらには微弱な機械刺激に対する感覚受容を制御するかを解明することを目的とした。

方法

SNX25 KO マウスは B6/N-Snx25tm1a/Nju を使用した。SNX25 cKO マウスは Snx25fl/fl マウスと各 Cre マウスを掛け合わせて作製した (Cx3cr1CreER; Snx25fl/fl, AvilCreER; Snx25fl/fl)。機械刺激に対する反応は von Frey フィラメントを足底部に押し当てた際の逃避行動で評価した。また、ニューロメーター用いた経皮的電気刺激により、各 fiber の知覚可能な最小強度の電流を測定し電流知覚閾値を計測した。真皮マクロファージの SNX25 を枯渇させるため、Cx3cr1CreER; Snx25fl/fl マウスに 4-OHT (40 ng/ul, 10 ul) を皮内注射で毎日 7 日間投与し、最後の注射から 8 日後に痛覚テストおよび触覚テストを実施した。組織化学実験には免疫染色、発現量解析には PCR 法および Western blot 法を用いた。骨髄移植のための骨髄は 5 週齢マウスの大腿骨と脛骨から採取し、100 万個の骨髄細胞を尾静脈注射によりレシピエントマウスに移植した。

結果および考察

われわれは、痛覚鈍麻の表現型を示す BAC トランスジェニック (TG) マウスを別の研究過程で見つけたことをきっかけとして、痛覚を制御するメカニズムを追求した。この TG マウスは、炎症性疼痛モデルや神経障害性疼痛モデルにおいて痛覚鈍麻の表現型を示したが、さらに興味深い点として、このマウスは正常時の機械刺激に対する反応も減弱していたことである。正常時の痛覚を制御する分子基盤を明らかにすることを目的として、TG マウスのゲノム解析を行ない、細胞内輸送に関わる Sorting nexin (SNX) ファミリーの一つ、SNX25 の発現制御が損なわれていることを見出した。SNX ファミリーの中には神経障害性疼痛において機能するものも報告されているが (1)、SNX25 に関する報告は少なくその機能は不明な点が多くあった。そこで、SNX25 KO マウスを導入して痛み行動を調べたところ、TG マウス同様、炎症性疼痛モデルや神経障害性疼痛モデルに加えて正常時における機械刺激に対しても鈍麻の表現型を示した。この結果を受けて、まず SNX25 KO による痛覚鈍麻の原因として一次求心性神経の機能が落ちているのではないかと考え、後根神経節 (DRG) ニューロン特異的に SNX25 を KO した cKO マウス (Snx25Avil-cKO) を作製して痛覚を評価したが、予想に反して異常はみられなかった。

TG マウスおよび SNX25 KO マウスでは炎症性物質を皮下に投与した時の細胞浸潤が低下していること、また SNX25 KO マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植するとレシピエントマウスで痛覚鈍麻の表現型になったことから、次に骨髄由来の免疫系細胞に着目した。骨髄由来細胞も様々あるが、皮膚の免疫細胞を詳細に解析すると真皮マクロファージの大部分は骨髄由来であることが分かった。最近の single-cell RNA sequencing では、マクロファージはいくつかのポピュレーションに分かれることが報告されており、特に CX3CR1 や MHC class II を高発現するマクロファージは神経と相互作用し、神経機能に影響することが報告されている (2, 3)。そこで次に末梢神経に associate する CX3CR1 hi の真皮マクロファージに着目し、タモキシフェン依存的に CX3CR1 陽性マクロファージで SNX25 を KO した cKO マウス (Snx25Cx3cr1-cKO) を作製して痛み行動を調べたところ、痛覚刺激、触覚刺激に対して鈍麻の表現型を示すことが分かった。

次に、真皮マクロファージの SNX25 がどのようにして痛覚や微弱な機械刺激に対する制御に関わるのか、そのメカニズム解明に着手した。痛覚を制御する様々な因子を調べたところ、SNX25 KO マウスではマクロファージで神経成長因子 NGF (nerve growth factor) の発現が減弱することを見出した。神経障害性疼痛モデルや炎症性疼痛モデルでは SNX25 KO マウスで様々な遺伝子の発現低下がみられたが、NGF 発現は生理的環境においても発現が低下していたことは意義深い。

NGF に着眼することに先行して、われわれは SNX25 KO マウスの DRG では疼痛関連因子である TRPV1 や Na チャネルの遺伝子発現が低下していることを見出していた。これらの疼痛関連因子の発現は NGF とその受容体 TrkA が複合体を形成して感覚神経内を逆行性に DRG まで輸送され、遺伝子レベルで制御されることが報告されている (4)。これらの事を考え合わせると SNX25 KO マウスの痛覚、触覚鈍麻の表現型は NGF の発現低下とそれに伴う下流シグナルの減弱に起因すると想定された。この仮説を証明する目的で SNX25 KO マウスの坐骨神経における結紮後の NGF-TrkA 複合体の逆行性輸送を評価したところ (5)、予想通り野生型マウスに比べて TrkA 蓄積量は有意に低下していた。すなわち、SNX25 KO マウスでは、末梢のマクロファージでの NGF 発現が低下することで、逆行性輸送が減弱し DRG における疼痛関連遺伝子の発現が低下した結果、感覚鈍麻になることが示唆された。また、NGF をマウスの後肢皮下に投与すると痛覚および触覚の閾値が低下することも明らかになった。

最後に、後肢皮膚の真皮マクロファージにおける SNX25 を局所で KO する目的でタモキシフェンの代謝物、4-OHT を Cx3cr1Cre; Snx25fl/fl マウスの足に局所投与して真皮マクロファージ特異的に SNX25 を KO したところ、機械刺激に対して鈍麻の表現型となった。一方で、Vehicle 投与マウスでは正常な感覚が保持されていた。また、ニューロメーターを用いた経皮的電気刺激により、c-fiber の知覚可能な最小強度の電流を測定したところ、足に 4-OHT を局所投与した cKO マウスでは電流知覚閾値が上昇することも明らかにした。

また、最近になり、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて DRG マクロファージが重要という報告があるため (6)、DRG マクロファージの影響についても検討した。Cx3cr1Cre; Snx25fl/fl マウスの DRG (L4、5) に 4-OHT を局所投与して痛覚に対する影響を調べたが、痛み行動には影響しなかった。つまり、SNX25 を介した機械刺激に対する痛覚は、DRG マクロファージではなく、真皮マクロファージが担っていることが示唆された。皮膚の真皮マ

クロファージと DRG マクロファージでは痛みの調節機構が異なる可能性があり、特に皮膚ではマクロファージの SNX25 や NGF を介した痛覚制御機構が重要なかもしれない。

以上総合すると、皮膚の真皮層に局在する神経 associate 型マクロファージは SNX25 を介して組織の NGF 含量を一定の割合に保つことで機械刺激に対する反応を制御する働きがあると考えられる。SNX25 がいないとこのシステムが破綻し外界からの機械刺激に対する痛覚が鈍麻になることがわれわれの一連の研究で明らかになった。
(完)

発表論文

- 1) Tanaka T*, Isonishi A, Banja M, Yamamoto R, Sonobe M, Okuda-Ashitaka E, Furue H, Okuda H, Tatsumi K and Wanaka A. Dermal macrophages control tactile perception under physiological conditions via NGF signaling. Sci. Rep. 14 27192 2024

引用文献

- 1) Lin T Bin, Lai CY, Hsieh MC. et al. VPS26A-SNX27 interaction-dependent mGluR5 recycling in dorsal horn neurons mediates neuropathic pain in rats. J Neurosci. 2015; 35: 14943.
- 2) Kolter J, Feuerstein R, Zeis P, et al. A Subset of Skin Macrophages Contributes to the Surveillance and Regeneration of Local Nerves. Immunity. 2019; 50: 1482.
- 3) Chakarov S, Lim HY, Tan L. et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. Science. 2019; 363: eaau0964.
- 4) Hefti FF, Rosenthal A, Walicke PA. et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27: 85.
- 5) Chaumette T, Delay L, Barbier J. et al. c-Jun/p38MAPK/ASIC3 pathways specifically activated by nerve growth factor through TrkA are crucial for mechanical allodynia development. Pain. 2020; 161: 1109.
- 6) Yu X, Liu H, Hamel KA. et al. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. Nat Commun. 2020; 11: 1.