

表 題 末梢神経障害モデルにおいて M1 マクロファージ浸潤は筋・骨萎縮を増悪させる

論文の区分 博士課程

著 者 名 島田 宣弘

担当指導教員氏名 西村 智 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
血液・免疫疾患学 分野  
止血血栓学

2019年1月10日申請の学位論文

## 目次

	ページ
1. はじめに	2
2. 実験材料と方法	5
2-1 使用動物	
2-2 動物モデル	
2-3 筋重量の測定	
2-4 全骨密度の測定	
2-5 免疫組織染色	
2-6 生体イメージング	
2-7 フローサイトメトリー	
2-8 RT-PCR	
2-9 統計解析	
3. 結果	13
3-1 末梢神経障害後早期に筋・骨萎縮が生じる	
3-2 神経障害後に筋・骨に M1 マクロファージ浸潤が生じる	
3-3 神経障害後の M1 マクロファージ浸潤には TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$ , CCL2, CCR2 が関与する	
3-4 クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージの除去で, 神経障害後の筋・骨へのマクロファージ浸潤が抑制される	
3-5 M1 マクロファージの除去で神経障害後の筋・骨萎縮が抑制される	
3-6 神経障害後のデキサメタゾン, プレガバリン, ロキソプロフェン投与が筋・骨への M1 マクロファージ浸潤を抑制する	
3-7 神経障害後のデキサメタゾン投与が完全に, プレガバリン, ロキソプロフェン投与が部分的に筋・骨萎縮を抑制する	
4. 考察	32
5. おわりに	37
6. 参考文献	38
7. 謝辞	45

## 1. はじめに

神経障害性痛は、“体性感覚系の病変や疾患によって引き起こされる疼痛”と定義される。神経障害性痛は中枢神経，末梢神経のいずれの障害によっても起こり得るが，特に末梢神経障害性痛は日常臨床で遭遇する機会が多い。末梢神経障害性痛は罹患患者の生活の質を大幅に低下させるため，近年さまざまな治療手段が報告されている。しかし，実臨床上はそれらの治療効果は限定的であることが多い。例えば，神経障害性痛に対する薬物治療としては電位依存性Caチャンネル $\alpha 2\delta$ サブユニットリガンド（例：プレガバリン）や，三環系抗うつ薬（例：アミトリプチリン，イミプラミン），セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬（例：デュロキセチン）が第一選択とされているが，そのうち最も効果的とされている三環系抗うつ薬でも **Number Need to Treat**

（NNT）は3.6であり，患者の満足度は高くない<sup>1</sup>。末梢神経障害性痛は，障害された末梢神経局所のみを標的とした治療が困難なことから，中枢神経系の痛み修飾が注目され，心理療法やリハビリテーションを含めた集学的治療が行われている<sup>2</sup>。痛みの集学的治療は比較的高い効果を上げているが施行可能な施設は少なく，集学的治療の中の個々の治療根拠は十分でない。そのため，神経障害性痛の新たな治療戦略が望まれている。

神経障害性痛とそれによる慢性痛に対しては前述のようにリハビリテーションが推奨されている。その根拠として，運動療法により中枢神経系の痛み修飾を軽減させる効果に加えて，末梢神経障害性痛で障害四肢の筋・骨の萎縮が認められることから，廃用予防としての効果が挙げられる。四肢の筋・骨を生じる代表的な末梢神経障害性痛疾患としては，帯状疱疹後神経痛，腰椎変性疾患，複合性局所疼痛症候群，外傷性末梢神経損傷がある<sup>3</sup>。これらの疾患での筋・骨

萎縮は患者の機能予後を悪化させ、慢性痛への移行につながるが<sup>4,6</sup>,リハビリテーションに抵抗性の筋・骨萎縮も多い<sup>7,8</sup>. これまで、末梢神経障害患者の筋・骨萎縮は不動化など痛み行動の結果と考えられていた<sup>4,5</sup>. しかし、一方で神経障害後の筋・骨萎縮は痛みによる不動化のみでは説明できないとする報告も多く<sup>9,10</sup>, その病的意義は不明である.

近年、末梢神経障害に関連する局所炎症が痛みの増悪や慢性痛への移行に関与することが報告されており、神経原性炎症として注目されている<sup>11-13</sup> (図1). 神経原性炎症では、神経障害後に一次神経自由終末から substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP) などの炎症性ペプチドが放出され、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1) などのサイトカインや、肥満細胞から放出されるヒスタミンを介して、障害局所の血管拡張や血管透過性亢進が起こる. 血管から浸潤した白血球 (マクロファージ, 好中球, リンパ球) やそれらが放出したサイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , chemokine [C-C motif] ligand2 [CCL2], C-C chemokine receptor type2 [CCR2]) によって障害局所の細胞 (シュワン細胞やマクロファージ) が活性化し、末梢神経系へ集積することで一次知覚神経の閾値が低下し末梢神経感作を起こす. また、一次知覚神経の入力が反復、持続することで、脊髄後角の二次ニューロンの閾値が低下し、中枢性感作が起こり、慢性痛へ移行すると考えられている. 最近では、神経原性炎症には特に M1 マクロファージの関与が大きいと報告されており、痛みの増悪や慢性痛への移行につながる事が分かっている<sup>14-19</sup>.

本研究では、末梢神経障害後の神経原性炎症では、M1 マクロファージが痛みと同様に、筋・骨萎縮を引き起こす因子となると仮説を立てた. さらに障害局所で M1 マクロファージを抑制することで筋・骨萎縮や慢性痛への移行の回避

が可能となると考えた（図2）。本研究の目的は、末梢神経障害モデルマウスで、筋・骨萎縮へのM1マクロファージの関与を明らかにし、M1マクロファージの抑制により筋・骨萎縮を回避することである。

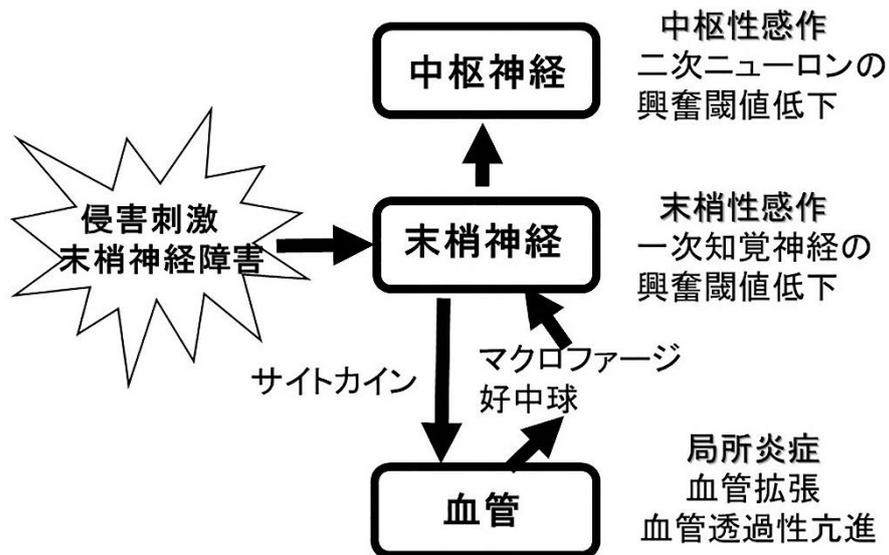


図1 神経原性炎症の模式図

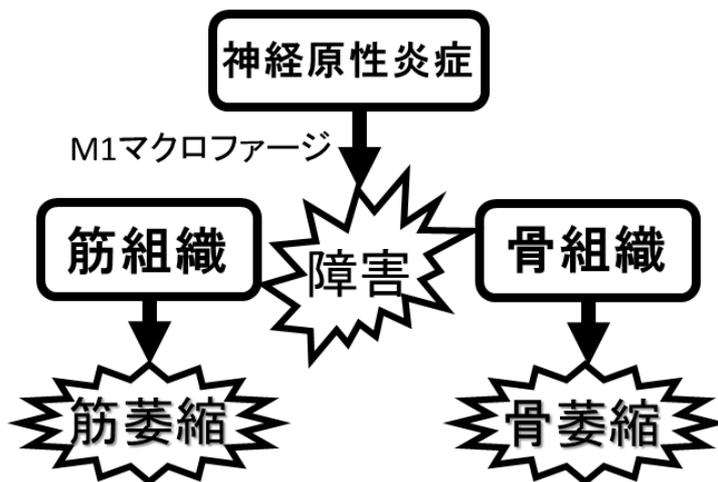


図2 本研究の仮説

## 2. 実験材料と方法

### 2-1 使用動物

6-7 週齢のオスの WT C57BL/6J マウス, C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス (いずれも SLC, Hamamatsu, Japan) , LysM Cre tandem TOMATO マウス (CLEA, Tokyo, Japan) を使用した. 実験動物は 12 時間ごとの明暗サイクルで適切な室温調整の上, 食餌と水は自由に摂取できるように管理した.

### 2-2 動物モデル

#### 神経障害モデル

神経障害モデルとしては, 末梢神経障害性痛モデルとして確立している絞扼性神経障害 (Chronic Constriction Injury: CCI) モデルを作成した<sup>20</sup>. マウスを 1.5%イソフルランで全身麻酔導入したのち, 右大腿骨直上で皮膚切開を加え, 大腿二頭筋間を分けて, 右坐骨神経を露出した. 坐骨神経を 5-0 モノクリルで 1 mm 間隔をあけて 4 回軽く結紮したのち, 筋層と皮膚を 5-0 絹糸で縫合した. コントロール手術としては, 同様に坐骨神経の露出は行うが, 結紮はせずに皮膚, 筋層を縫合した (図 3) . 当手術施行後には下肢の麻痺は起こらず, 摂食行動にも影響はなかった.

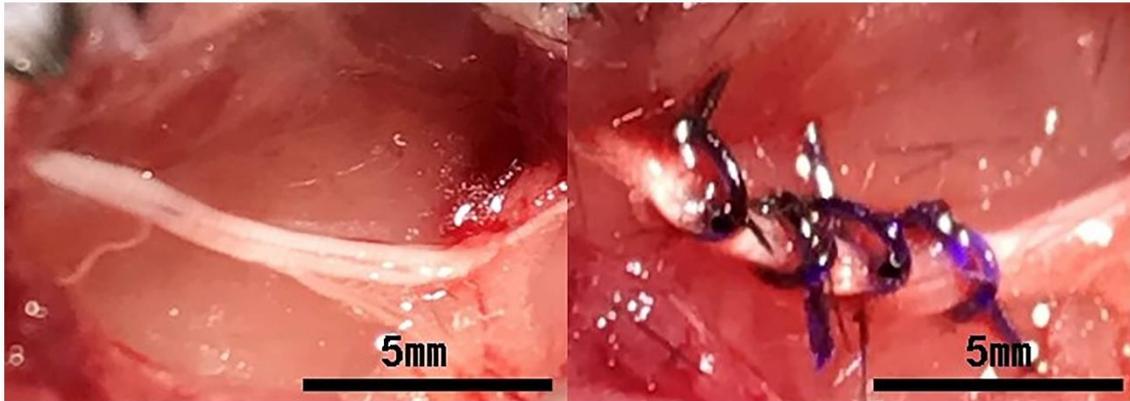


図3 絞扼性神経損傷モデル

左：マウス右坐骨神経      右 坐骨神経結紮後

#### 下肢固定モデル

これまで末梢神経障害後の筋・骨萎縮の原因としては、痛みによる不動化の影響が大きいと考えられていた。マウスの下肢の不動化の影響を調べるために下肢固定モデルを作成した。下肢不動化モデルとしては、シーネや弾性包帯による下肢固定が一般的である<sup>21</sup>。本研究でもこれらのモデルを作成したが、下肢の固定が不十分で容易に外れてしまう上に、咬傷による下肢の炎症のために正確な下肢の重量、骨密度の測定ができなかった。そこで、本研究では独自の下肢固定モデルとして、ultraviolet (UV) 硬化樹脂 (Kiyohara Co.,Ltd, Osaka, Japan) を使用してマウスの下肢を不動化した。マウスを 1.5%イソフルランで全身麻酔導入したのち、右股関節、膝関節、足関節を UV 硬化樹脂で固定した (図 4)。当処置の施行後にも摂食行動は通常通り行えていた。



図4 UV硬化樹脂によるマウスの右下肢固定モデル

#### マクロファージ除去モデル

筋・骨萎縮に対するマクロファージの影響を検討するためにマクロファージ除去モデルを作成した。マクロファージはクロドロン酸リポソーム (Xigieia Bioscience, Tokyo, Japan) で除去した。CCI 施行の直後にクロドロン酸リポソーム 100  $\mu$ g/匹をマウスの尾静脈から単回投与した。

#### 臨床で使用可能な薬剤の投与モデル

クロドロン酸リポソームによる体内からのマクロファージの完全な除去は臨床で行うことはできない。そこで、神経原性炎症の抑制として、抗炎症薬や神経障害性痛治療薬によって筋・骨萎縮の抑制が可能かを検討した。CCI 施行の直後にデキサメタゾン (2mg/kg, 皮下投与, Fuji Pharma Co., Ltd., Toyama, Japan), プレガバリン (30mg/kg, 経口投与, Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan), アミトリプチリン (10mg/kg, 経口投与, Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd., Toyama, Japan), ノイロトロピン (60NU/kg, 腹腔内投与, Nippon Zoki pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan), ロキソプロフェン (3mg/kg,

経口投与, Daiichi Sankyo, Ltd., Tokyo, Japan) を投与した。これらの薬剤は、1日1回を1週間連日投与した。

### 2-3 筋重量の測定

筋萎縮の評価として、C57BL/6J マウスで CCI 施行 1 週間後の筋重量を測定した。CCI 施行 1 週間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させたのち、右の大腿二頭筋と腓腹筋を採取し重量を測定した。

### 2-4 全骨密度の測定

骨萎縮の評価として、下肢の骨密度を Computed Tomography (CT) スキャンで測定した。C57BL/6J マウスを 1.5%イソフルランで麻酔導入し、下肢の CT スキャンを Latheta Laboratory CT (Hitachi, Tokyo, Japan) を使用して撮影した。これをコントロールとして記録したのち、マウスに CCI を行い、個別ケージで管理した。下肢の CT スキャンは 1 週ごとに 5 週間撮影した。撮影した画像は CT スキャンに付属したソフトウェアで解析し、大腿骨と脛骨の全骨密度を計測した。全骨密度は 0.5mm スライスごとに計測し、その平均値を比較した。

### 2-5 免疫組織染色

下肢骨の炎症細胞と破骨細胞を免疫組織染色で解析した。C57BL/6J マウスの CCI 施行 1 週間後に頸椎脱臼による安楽死処置を行い、右大腿骨を採取した。

骨標本の脱灰，切片の作成は共同病理株式会社（Kobe, Japan）に依頼し，TRAP 染色を TRAP/ALP 染色キット（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）を使用して行った．作成した病理標本は光学顕微鏡（FSX100, Olympus, Tokyo, Japan）で4倍対物レンズ（N.A.0.1）を用いて解析した．得られた画像は Fiji win64 ソフトウェア（Rasband, W.S, ImageJ; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）で解析した．1.5mm×2mm の視野中の破骨細胞をソフトウェア上で免疫染色の差から単色に分離し，その数を測定した．

## 2-6 生体イメージング

障害神経とその周囲組織の細胞反応を画像化するために，当教室で行っている手法<sup>22</sup>で生体二光子顕微鏡による検討を行った．はじめに，リソソーム産生細胞の動態を観察するために，LysM Cre Tandem TOMATO マウスを使用した．CCI 施行1週間後にウレタン（1.5g/kg）の腹腔内投与による麻酔を行い，下肢の皮膚を除去したのちに倒立顕微鏡（Eclipse Ti, Nikon, Tokyo, Japan）に設置した保温したピエゾドライブステージ（Tokai Hit; Nikon, Tokyo, Japan）に静置した．細胞動態と血流を可視化するために FITC dextran（5mg/匹, Merck KGaA, Darmstadt, Germany）と Hoechst 33342（3mg/匹, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を尾静脈より投与した．組織は Ti:sapphire レーザー（Vision II; Coherent, inc., Santa Clara, CA, USA）を使用して 920nm で励起し，XY 画像を A1R-MP システム（Nikon）で得た．対物レンズとしては 40 倍水浸レンズ（Nikon）（N.A.1.15）を使用した．1 画像当たりの描写時間は 0.1 秒に設定した．

続いて、神経障害急性期の細胞反応を観察するために、CAG-eGFP マウスを使用して生体二光子顕微鏡による観察を行った。CCI を施行した直後にマウスをウレタンの腹腔内投与で麻酔し、Rhodamine B dextran (5mg/匹, Thermo Fisher Scientific) , Hoechst33342 (3mg/匹) と F4/80 Alx647 (25  $\mu$  g/匹, BioLegend, San Diego, CA, USA) を尾静脈より投与した。生体二光子顕微鏡で坐骨神経と周囲組織を 3 時間連続観察した。

得られたデータは NIS-Elements に内蔵されている自動アルゴリズムと Fiji win64 ソフトウェアで画像化、解析した。マクロファージを 500  $\mu$  m  $\times$  500  $\mu$  m の視野で蛍光の差から単色に分離し、その数を測定した。マクロファージ数は CCI の前後で比較した。

## 2-7 フローサイトメトリー

筋に浸潤した細胞はフローサイトメトリーで定量した。C57BL/6J マウスを使用して、CCI 施行の 1 週間後に 1.5%イソフルランによる麻酔導入をした。血管内の血球成分を除去するために、生理食塩水を左心室より送液、下大静脈より脱血し、血液還流を行った。頸椎脱臼による安楽死処置の後に、右の大腿二頭筋と腓腹筋を採取した。採取した筋は剪刀で細かく切り刻んだのちに、コラゲナーゼ処理により細胞を単離した。単離した細胞は phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、溶血バッファーで 8.5 分処理したのち、最終的に PBS 中に浮遊させた。細胞に FcBlock 抗体 (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を加え 15 分氷上で静置したのちに、蛍光色素標識抗体 (CD45-FITC:25  $\mu$  g/ml, Ly6G-BV605:10  $\mu$  g/ml, F4/80-PE: 10 $\mu$ g/ml, CD11b-BV711: 2.5  $\mu$  g/ml, CD301-Alx647: 2.5  $\mu$  g/ml, Ly6C-BV421: 2.5  $\mu$  g/ml, いずれも BioLegend) を

加え, 45 分間反応させた. フローサイトメトリーは BD LSR Fortessa (BD Biosciences) を使用して行い, FlowJo V10 ソフトウェア (Tomy Digital Biology, Tokyo, Japan) で解析した. 死細胞の除去には DRAQ7 (BioLegend) を用いた.

## 2-8 RT-PCR

CCI 後の筋でのサイトカイン変化を調べるために, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った. C57BL/6J マウスを使用して, CCI 施行 1 週間後に頸椎脱臼による安楽死処置を行った. 右の大腿二頭筋と腓腹筋を採取し, Trizol (Thermo Fisher Scientific) を用いて筋組織より RNA を抽出した. Primscript 逆転写酵素 (Takara Bio, Kusatsu, Japan) により cDNA を合成し, RT-PCR には Taqman プローブ (TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , CCL2, CCR2, Thermo Fisher Scientific) を使用した. RT-PCR は 10ng の cDNA を使用して, Vii A real time PCR system (Thermo Fisher Scientific) で行った. 得られたデータは  $\Delta \Delta$ -Ct-method で解析した. mRNA の発現レベルはコントロール手術群との相対比で比較した.

## 2-9 統計解析

統計解析は Graphpad Prism 7 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った. 結果は平均±標準誤差で示した. 2 群の統計学的有意差は Mann-Whitney U test を用いて検定した. P 値<0.05 を統計学的に有意差ありと判断した. 事前に検討したデータに基づいた Power

analysis では, power=0.80,  $\alpha=0.05$  の条件では, 有意差を検出するために必要なサンプル数は各群で n=6 で十分と判断した.

本研究は自治医科大学動物実験委員会の承認を得た (17217-01) . 本研究のマウスの Categories of biomedical experiments based on increasing ethical concerns for non-human species (Scientists Center for Animal Welfare) の苦痛度は D と判断した. 侵襲的な処置は可能な限り全身麻酔下に行った. マウスに持続的な横たわり, 呼吸促拍, 努力呼吸, あえぎ, 7 日間に 25%以上の体重減少を認めた場合は全身麻酔下に頸椎脱臼による安楽死処置を行った.

### 3. 結果

#### 3-1 末梢神経障害後早期に筋・骨萎縮が生じる

近年、神経障害後の神経原性炎症で、末梢神経への M1 マクロファージの浸潤が痛みの増悪に重要な役割を果たし、その機序として TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, CCR2 などのサイトカインが関わっていることが分かっている<sup>11-19</sup>。本研究では神経障害後の筋・骨萎縮にも M1 マクロファージが関わっていると考え、神経障害モデルマウスで神経障害後の筋・骨萎縮への M1 マクロファージの関与と、M1 マクロファージの抑制による筋・骨萎縮の回避の可能性について検証した。本研究では神経障害モデルとして CCI モデルを作成した。はじめに、CCI 後の筋・骨萎縮の程度を明らかにするために、CCI 後の筋重量と全骨密度を測定した。

C57BL/6J マウスの CCI 施行 1 週間後に大腿二頭筋と腓腹筋を採取し、筋重量を測定した。CCI 施行 1 週間後の大腿二頭筋の重量はコントロール手術群 (218 $\pm$ 14 [範囲 160-260] mg, n=8) と比較して CCI 群 (121 $\pm$ 13 [80-189] mg, n=8) で有意に低下した (P<0.05)。同様に、腓腹筋重量もコントロール手術群 (195 $\pm$ 8 [160-233] mg, n=8) と比較して CCI 群 (105 $\pm$ 11 [64-160] mg, n=8) で有意に低下した (P<0.05) (図 5)。

下肢の全骨密度を CT スキャンで測定した。CT スキャンは CCI 施行後 5 週間まで毎週測定した。大腿骨で、全骨密度は CCI 施行前 (469 $\pm$ 8 [350-643] mg/cm<sup>3</sup>) と比較して、CCI 施行 2 週間後 (417 $\pm$ 6 [264-572] mg/cm<sup>3</sup>) に有意に低下した (n=8, P<0.05)。脛骨でも同様に、全骨密度は CCI 施行前 (598 $\pm$ 9 [320-783] mg/cm<sup>3</sup>) と比較して、CCI 施行 2 週間後 (561 $\pm$ 68 [253-796]

mg/cm<sup>3</sup>) に有意に低下した (n=8, P<0.05) . コントロール手術群では大腿骨, 脛骨のいずれでも CCI 施行前後で全骨密度に差はなかった (図 6) .

末梢神経障害後の筋・骨萎縮の原因として, これまで痛みによる不動化の影響が大きいと考えられていた<sup>4,5</sup>. 筋・骨萎縮に対する不動化の影響を調べるために, UV 硬化樹脂による下肢固定モデルで筋重量・骨密度を測定した.

下肢固定群では大腿二頭筋で, CCI 施行 1 週間後の筋重量 (188±8 [157-212] mg, n=8) はコントロール手術群と比較して有意差はなかった (P=0.12) . 腓腹筋でも, CCI 施行 1 週間後の筋重量 (167±10 [122-207] mg, n=8) はコントロール手術群と比較して有意差はなかった (P=0.10) (図 7) .

大腿骨の全骨密度は下肢固定前 (501±6 [403-666] mg/cm<sup>3</sup>) と比較して, 固定 2 週間後 (499±6 [264-572] mg/cm<sup>3</sup>) で有意差はなかった (n=8, P=0.60) . 脛骨でも同様に, 全骨密度は下肢固定前 (659±5 [403-797] mg/cm<sup>3</sup>) と比較して, 固定 2 週間後 (561±68 [406-697] mg/cm<sup>3</sup>) で有意差はなかった (n=8, P=0.15) (図 8) .

CCI 施行 1 週間後に筋萎縮が, 2 週間後に骨萎縮がおこることが分かった. 筋・骨萎縮への下肢不動化の影響は少ないと考えられた. CCI モデルは神経障害後の痛みモデルとしてのみでなく, 筋・骨萎縮のモデルとしても有用であると考えられた.

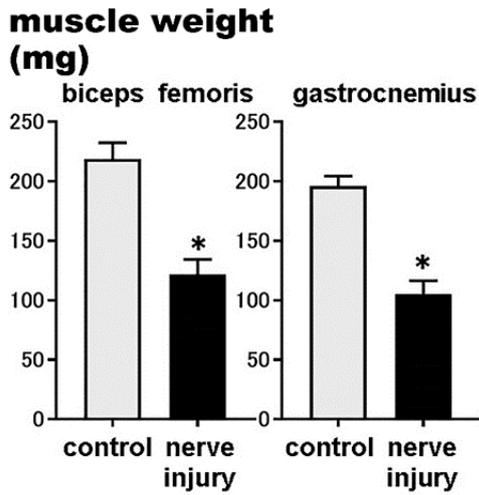


図5 下肢筋重量 神経障害群

神経障害群で、コントロール手術群と比較して1週間後に下肢の筋重量が有意に低下した (n=8, \*P<0.05) .

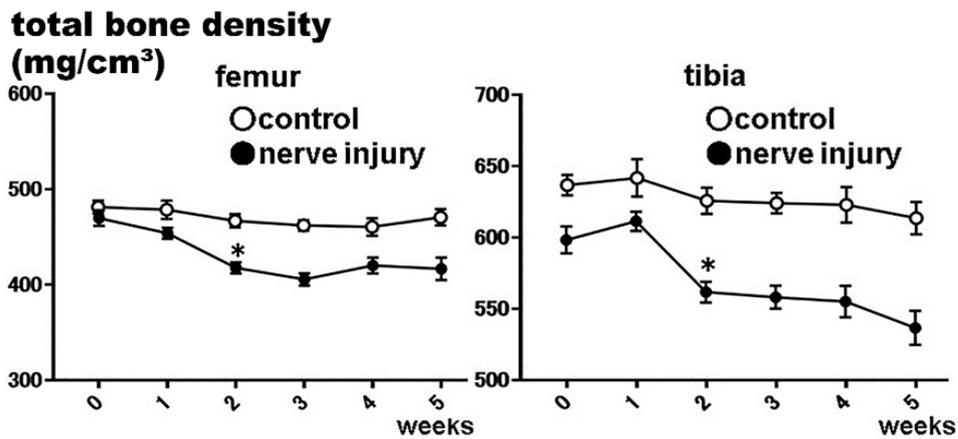


図6 下肢全骨密度 神経障害群

神経障害群で、神経障害前と比較して2週間後に下肢骨密度が有意に低下した (n=8, \*P<0.05) .

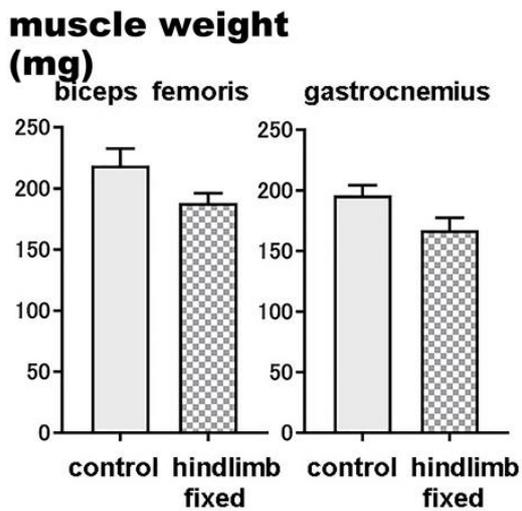


図7 下肢筋重量 下肢固定群

下肢固定モデルではコントロール手術群と比較して、1週間後の下肢筋重量に有意差はなかった (n=8) .

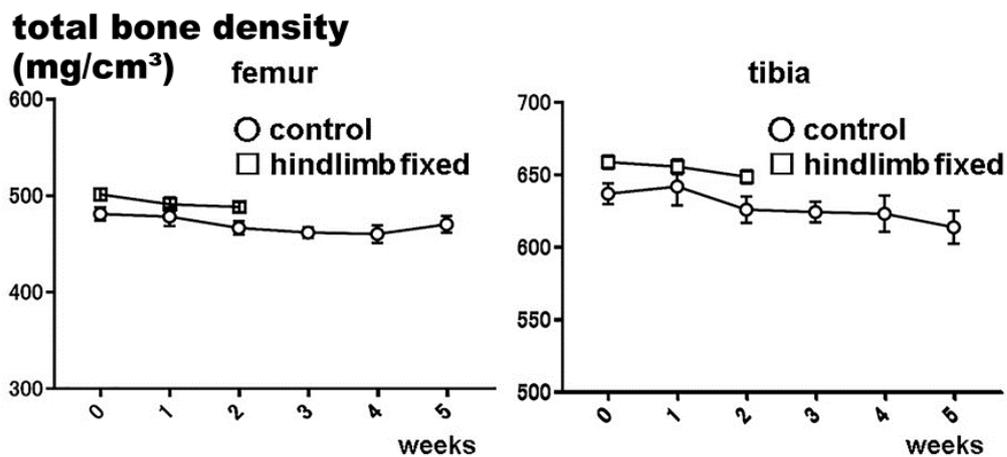


図8 下肢全骨密度 下肢固定群

下肢固定モデルでは固定前と比較して2週間後の下肢全骨密度に有意差はなかった (n=8) .

### 3-2 神経障害後に筋・骨への M1 マクロファージ浸潤が生じる

続いて、CCI 後の筋・骨萎縮の分子メカニズムについて検討を進めた。分子メカニズムとしては、神経原性炎症、特に近年神経障害性痛への関与が注目されている M1 マクロファージに着目した<sup>14-19</sup>。CCI モデルでの障害神経の周囲組織の現象を明らかにするために、骨の免疫組織染色と、筋の生体イメージングを行った。

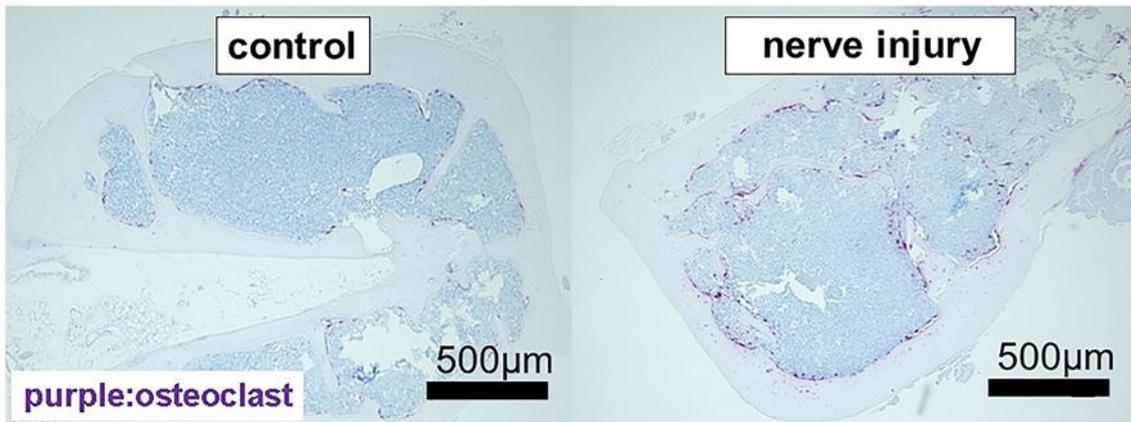
大腿骨の炎症細胞と破骨細胞を免疫組織染色で解析した。C57BL/6J マウスの CCI 施行 1 週間後に大腿骨を採取し、TRAP 染色を行った。破骨細胞数を CCI 群とコントロール手術群で比較した。手術 1 週間後に、コントロール手術群 ( $32 \pm 9$  [4-67] 個/mm<sup>2</sup>, n=8) と比較して、CCI 群 ( $61 \pm 9$  [33-90] 個/mm<sup>2</sup>, n=8) で破骨細胞数が有意に増加した ( $P < 0.05$ ) (図 9)。

LysM Cre tandem TOMATO マウスで、CCI 施行 1 週間後の障害神経と周囲の筋の細胞動態を生体イメージングを使って解析した。坐骨神経周囲へのリソソーム産生細胞の浸潤が CCI 群で認められた。コントロール手術群ではリソソーム産生細胞の浸潤は軽度だった。続いて、神経障害急性期の細胞動態を明らかにするために、CCI 施行直後に CAG-eGFP マウスの下肢組織を観察した。CCI 群で、神経障害 2 時間後よりマクロファージの血管内から筋への浸潤が観察された。コントロール手術群では神経障害急性期にマクロファージの筋への浸潤は観察されなかった (図 10)。

生体イメージングで観察された筋へのマクロファージの浸潤をフローサイトメトリーで定量した。マクロファージのサブタイプは組織により表面抗原の発現に差がありその定義が異なるが、筋組織では CD301 陰性細胞を M1 マクロファージ、CD301 陽性細胞を M2 マクロファージと定義する報告が多く<sup>23, 24</sup>,

本研究でもこの定義を採用した。CCI 施行 1 週間後に大腿二頭筋と腓腹筋を採取し、細胞を単離したのちにフローサイトメトリーで解析した。大腿二頭筋で、手術 1 週間後に M1 マクロファージ (Ly6c+, F4/80+, CD301-/CD11b+) 数はコントロール手術群 ( $3 \pm 0.4$  [1.7-5.5]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) と比較して、CCI 群 ( $9.3 \pm 0.9$  [5.7-13.9]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。腓腹筋でも同様に、M1 マクロファージ数がコントロール手術群 ( $0.7 \pm 0.2$  [0.2-1.5]  $\times 10^5$  個/muscle, n=8) と比較して、CCI 群 ( $1.6 \pm 0.3$  [0.7-3.5]  $\times 10^5$  個/muscle, n=8) で有意に増加した ( $P < 0.05$ ) (図 11)。

CCI 施行後に M1 マクロファージが筋・骨に浸潤することが明らかになった。この M1 マクロファージ浸潤が CCI 施行後の筋・骨萎縮につながることが示唆された。



**osteoclasts  
(number/mm<sup>2</sup>)**

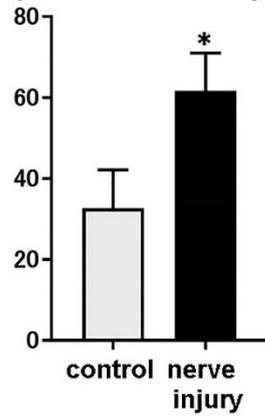


図9 大腿骨免疫組織染色 神経障害群

神経障害モデルでは、コントロール手術群と比較して、大腿骨の破骨細胞数が有意に増加していた（紫：破骨細胞, n=8, \*P<0.05）。

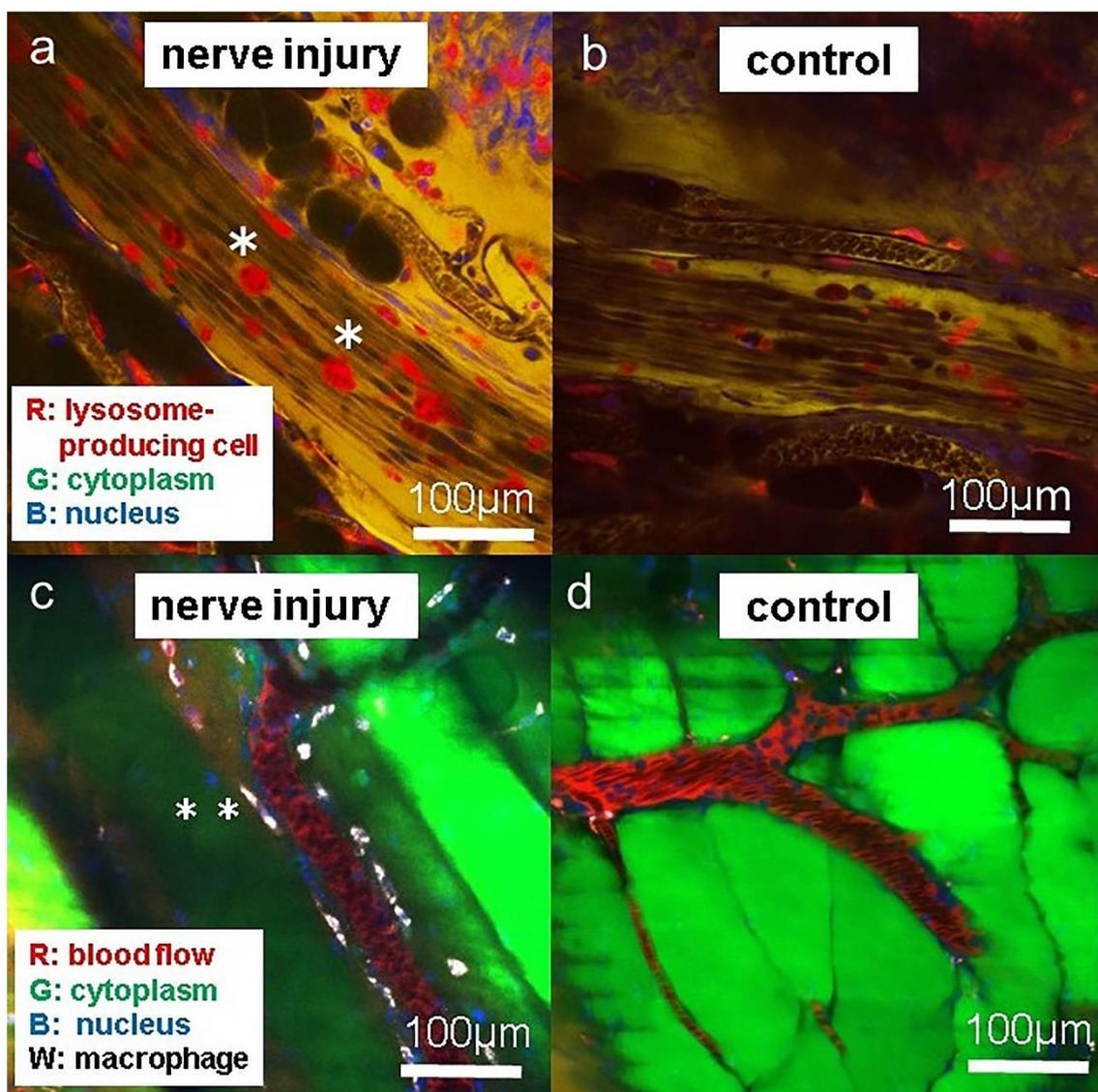


図 10 坐骨神経・大腿二頭筋 生体イメージング

神経障害群では神経障害 1 週間後に神経周囲組織にリソソーム産生細胞 (\*) が増加していた (a: 神経障害群, b: コントロール手術群, 赤: リソソーム産生細胞, 緑: 細胞質, 青: 核)。神経障害急性期では, 神経障害 2 時間後から神経周囲の血管から筋へのマクロファージ (\*\*) の浸潤が観察された (c: 神経障害群, d: コントロール手術群, 赤: 血流, 緑: 細胞質, 青: 核, 白: マクロファージ)。

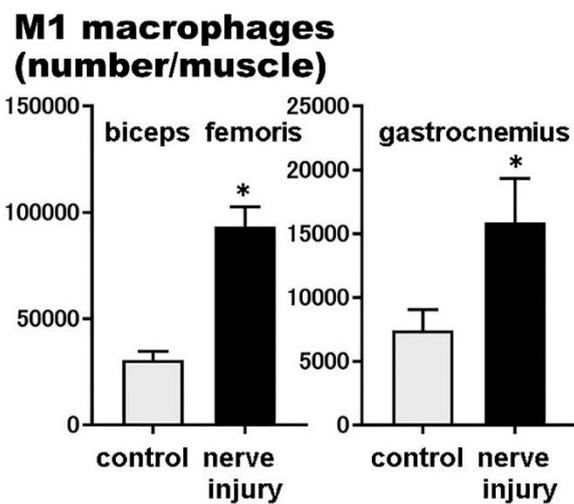
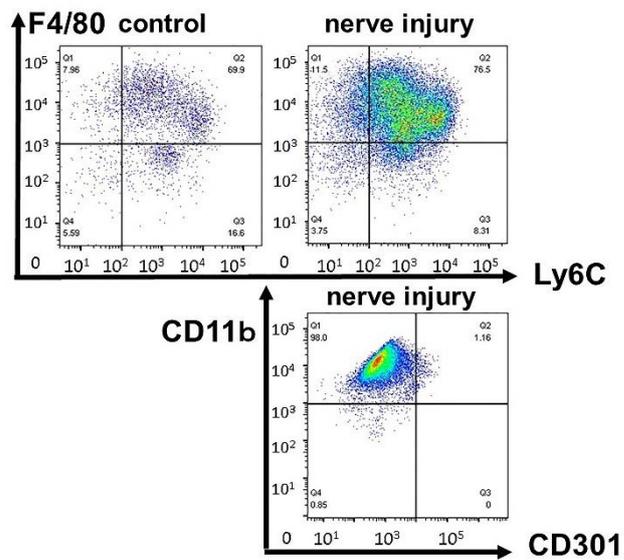


図 11 下肢筋フローサイトメトリー 神経障害群

神経障害群では、コントロール手術群と比較して下肢の M1 マクロファージ (Ly6C+ /F4/80+, CD301- /CD11b+) が有意に増加していた (n=8, P<0.05) .

### 3-3 神経障害後の M1 マクロファージ浸潤には $TNF\alpha$ , $IL-1\beta$ , $CCL2$ , $CCR2$ が関与する

神経障害性痛で,  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $CCL2$ ,  $CCR2$  などの炎症性サイトカインが神経原性炎症の発生に関わっている<sup>11-13</sup>. 本研究ではこれらのサイトカインが CCI 後の筋・骨への M1 マクロファージ浸潤や筋・骨萎縮にも関与しているのではないかと考えた. そこで, CCI 施行後の筋のサイトカインの変化を RT-PCR で検討した. C57BL/6J マウスの CCI 施行 1 週間後に, 大腿二頭筋と腓腹筋を採取し, RT-PCR を行った. mRNA の発現レベルはコントロール手術群との相対比で比較した. 大腿二頭筋で, 手術 1 週間後に mRNA 発現比は CCI 群で増加していた ( $TNF\alpha$ : relative expression;  $6.1\pm 0.2$  [5.3-6.8],  $IL-1\beta$ :  $3.8\pm 0.2$  [3.0-4.3],  $CCL2$ :  $2.6\pm 0.2$  [2.3-3.2],  $CCR2$ :  $3.3\pm 0.2$  [2.7-3.8], n=8). 同様に, 腓腹筋でも mRNA 発現比が CCI 群で増加していた ( $TNF\alpha$ :  $2.5\pm 0.2$  [2.1-3.1],  $IL-1\beta$ :  $2.9\pm 0.3$  [2.1-3.7],  $CCL2$ :  $2.4\pm 0.1$  [2.1-3.0],  $CCR2$ :  $2.3\pm 0.1$  [2.0-2.8], n=8) (図 12).

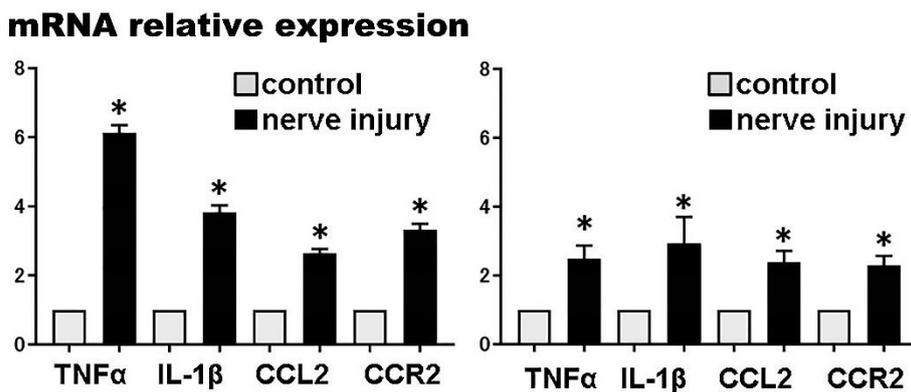


図 12 下肢筋 RT-PCR 神経障害群

神経障害群で, コントロール手術群と比較して 1 週間後に  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $CCL2$ ,  $CCR2$  の mRNA が増加していた (n=8, \*p<0.05).

### 3-4 クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージの除去で、神経障害後の筋・骨へのマクロファージ浸潤が抑制される

本研究の第 2 の目的は、M1 マクロファージの抑制によって神経障害後の筋・骨萎縮が抑制できるかを検討することである。近年、クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージの除去が、神経原性炎症と神経障害性痛を軽減することが報告されている<sup>14</sup>。本研究では CCI 施行後に M1 マクロファージをクロドロン酸リポソームで除去した。M1 マクロファージ除去の効果を検討するために、CCI 施行後の骨の免疫組織染色と、筋のフローサイトメトリーを行った。

クロドロン酸リポソームによる生体からの M1 マクロファージの除去率を脾臓組織のフローサイトメトリーで検討した。脾臓組織のフローサイトメトリーでは、M1 マクロファージ数は CCI 群で  $13.8 \pm 1.4$  ( $9.1-18.8$ )  $\times 10^5$  個/脾 ( $n=8$ ) に対して、クロドロン酸リポソーム投与群では  $1.0 \pm 0.2$  ( $0.4-1.4$ )  $\times 10^5$  個/脾 ( $n=8$ ) であり、クロドロン酸リポソームの投与で 90%以上の M1 マクロファージを除去できた。

免疫組織染色では、CCI 施行 1 週間後に未治療群と比較して、マクロファージ除去群 ( $30 \pm 9$  [ $6-52$ ] 個/ $\text{mm}^2$ ,  $n=8$ ) で破骨細胞数が有意に減少していた ( $P < 0.05$ ) (図 13)。

フローサイトメトリーでは、CCI 施行後 1 週間後に大腿二頭筋で、未治療群と比較してマクロファージ除去群 ( $0.4 \pm 0.1$  [ $0.1-13.9$ ]  $\times 10^5$  個/筋,  $n=8$ ) で M1 マクロファージ数が有意に低下していた。腓腹筋でも、CCI 施行後 1 週間後に未治療群と比較して、マクロファージ除去群 ( $0.4 \pm 0.1$  [ $0.1-10.5$ ]  $\times 10^5$  個/筋,  $n=8$ ) で M1 マクロファージ数が有意に低下していた ( $P < 0.05$ ) (図 14)。

CCI 後の M1 マクロファージの筋・骨への浸潤はクロドロン酸リポソームによるマクロファージ除去で抑制された。この結果から、CCI 後の筋・骨萎縮もマクロファージの除去によって回避できる可能性が示唆された。

**osteoclasts  
(number/mm<sup>2</sup>)**

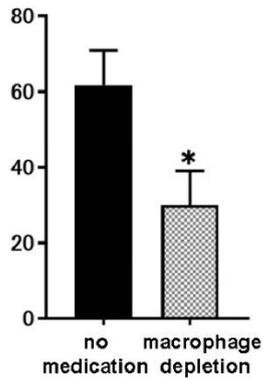


図 13 大腿骨免疫組織染色 神経障害 1 週間後 マクロファージ除去群

マクロファージ除去群で、未治療群と比較して神経障害 1 週間後の大腿骨の破骨細胞数が有意に減少した (n=8, \*P<0.05)。

**M1 macrophages  
(number/muscle)**

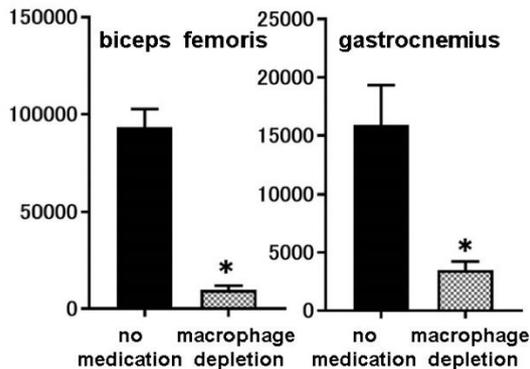


図 14 下肢筋フローサイトメトリー 神経障害 1 週間後  
マクロファージ除去群

マクロファージ除去群で、未治療群と比較して神経障害 1 週間後の下肢筋の M1 マクロファージ数が有意に減少した (n=8, \*p<0.05)。

### 3-5 M1 マクロファージの除去で神経障害後の筋・骨萎縮が抑制される

続いて、マクロファージ除去による筋・骨萎縮への影響を調べるために、マクロファージ除去群の筋重量と全骨密度を測定し、未治療群と比較した。

大腿二頭筋重量は、CCI 施行 1 週間後に未治療群と比較して、マクロファージ除去群 ( $204 \pm 11$  [161-230] mg, n=8) で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。同様に腓腹筋重量も CCI 施行 1 週間後に未治療群と比較して、マクロファージ除去群 ( $230 \pm 12$  [189-264] mg, n=8) で有意に増加した ( $P < 0.05$ ) (図 15)。

マクロファージ除去群では、大腿骨の全骨密度は CCI 施行前 ( $467 \pm 4$  [309-647] mg/cm<sup>3</sup>) と、CCI 施行 2 週間後 ( $476 \pm 4$  [335-644] mg/cm<sup>3</sup>) で有意差はなかった (n=8,  $P = 0.09$ )。脛骨の全骨密度も同様に、CCI 施行前 ( $613 \pm 6$  [270-871] mg/cm<sup>3</sup>) と施行後 ( $611 \pm 46$  [329-797] mg/cm<sup>3</sup>) で有意差はなかった (n=8,  $P = 0.70$ ) (図 16)。

これらの結果から、M1 マクロファージが CCI 後の筋・骨萎縮に関与していることが明らかになった。さらに、M1 マクロファージの抑制による神経障害後の筋・骨萎縮の回避の可能性が示唆された。

### muscle weight (mg)

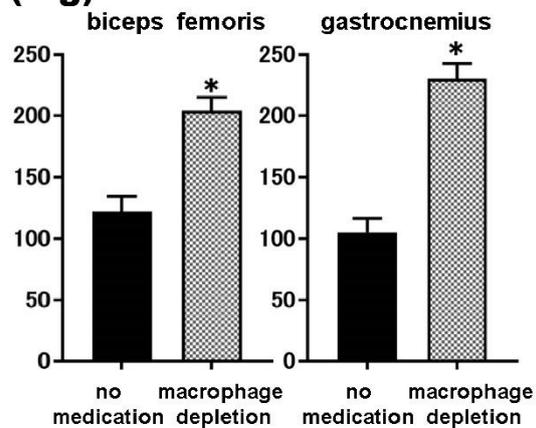


図 15 下肢筋重量 神経障害 1 週間後 マクロファージ除去群

マクロファージ除去群で、未治療群と比較して神経障害 1 週間後の下肢筋重量が有意に増加した (n=8, \*P<0.05) .

### total bone density (mg/cm<sup>3</sup>)

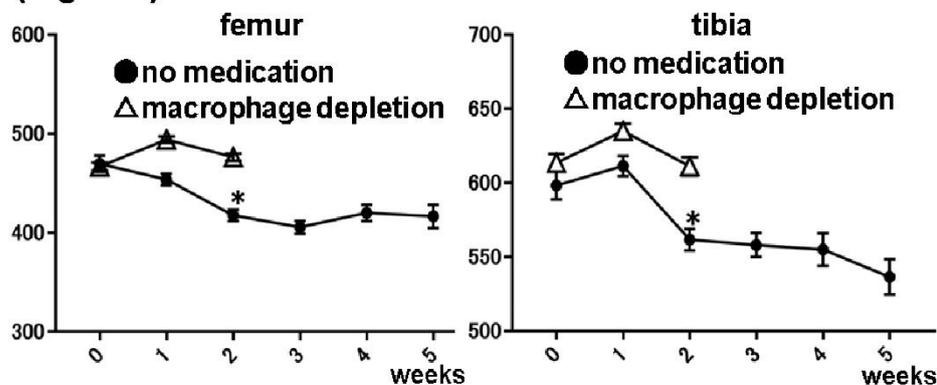


図 16 下肢全骨密度 神経障害後 マクロファージ除去群

マクロファージ除去群では、神経障害前と比較して神経障害 2 週間後の全骨密度に有意差はなかった (n=8, \*P<0.05) .

### 3-6 神経障害後のデキサメタゾン, プレガバリン, ロキソプロフェン投与が筋・骨への M1 マクロファージ浸潤を抑制する

クロドロン酸リポソームによる体内からの完全な M1 マクロファージ除去は, 臨床で行うことはできない. 本研究の第 3 の目的は, 臨床研究につなげるために, 臨床で使用可能な薬剤で M1 マクロファージの筋・骨への浸潤の抑制や筋・骨萎縮の回避が可能かを明らかにすることである. 抗炎症薬としてデキサメタゾンとロキソプロフェンを, 神経障害性痛治療薬としてプレガバリン, ノイロトロピン, アミトリプチリンを検討した. 近年, 神経原性炎症とそれにつづく痛みに, 末梢性感作に加えて中枢性感作が関わっていることが報告されている<sup>11-13</sup>. 本研究では, デキサメタゾン, ロキソプロフェン, プレガバリンを主に末梢神経系に作用する薬剤として, ノイロトロピンとアミトリプチリンを中枢神経系に作用する薬剤として検討した. これらの薬剤は CCI 施行後に 1 週間連日投与した. これらの薬剤の M1 マクロファージ浸潤への効果を明らかにするために, CCI 施行後に骨の免疫組織染色と, 筋のフローサイトメトリーを行った. 薬剤投与群で得られた結果を未治療群と比較した.

CCI 施行 1 週間後に, 大腿骨の免疫組織染色で, 未治療群と比較してデキサメタゾン群 ( $26 \pm 9$  [9-58] 個/mm<sup>2</sup>, n=8), プレガバリン群 ( $31 \pm 4$  [18-40] 個/mm<sup>2</sup>, n=8) とロキソプロフェン群 ( $32 \pm 5$  [19-50] 個/mm<sup>2</sup>, n=8) で破骨細胞数が有意に低下した ( $P < 0.05$ ). ノイロトロピン群 ( $65 \pm 7$  [43-91] 個/mm<sup>2</sup>, n=8,  $P = 0.81$ ) とアミトリプチリン群 ( $58 \pm 6$  [33-79] 個/mm<sup>2</sup>, n=8,  $P = 0.94$ ) は, 未治療群と比較して破骨細胞数に有意差はなかった (図 17).

大腿二頭筋のフローサイトメトリーでは, CCI 施行 1 週間後にデキサメタゾン群 ( $3.1 \pm 0.4$  [1.8-4.7]  $\times 10^5$  個/筋, n=8), プレガバリン群 ( $5.4 \pm 0.9$  [2.7-

9.5]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) , ロキソプロフェン群 (5.2 $\pm$ 1.1 [2.2-9.9]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) で未治療群と比較して M1 マクロファージ数が低下した (P<0.05) . ノイロトロピン群 (8.1 $\pm$ 1.5 [4.4-11.9]  $\times 10^5$  個/筋; n=8, P=0.57) とアミトリプチリン群 (10.4 $\pm$ 2.3 [6.8-17.6]  $\times 10^5$  個/筋; n=8, P>0.99) では未治療群と比較して M1 マクロファージ数に有意差はなかった. 腓腹筋のフローサイトメトリーでは, CCI 施行 1 週間後にデキサメタゾン群 (0.9 $\pm$ 0.2 [0.3-1.4]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) , プレガバリン群 (1.6 $\pm$ 0.9 [0.6-3.2]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) , ロキソプロフェン群 (1.3 $\pm$ 0.2 [1.0-2.1]  $\times 10^5$  個/筋, n=8) で未治療群と比較して M1 マクロファージ数が低下した (P<0.05) . ノイロトロピン群 (2.6 $\pm$ 0.6 [1.1-4.1]  $\times 10^5$  個/筋; n=8, P=0.37) とアミトリプチリン群 (2.5 $\pm$ 0.4 [1.8-3.6]  $\times 10^5$  個/筋; n=8, P=0.11) では未治療群と比較して M1 マクロファージ数に有意差はなかった (図 18) .

CCI 施行後のデキサメタゾン, プレガバリン, ロキソプロフェンの投与が筋・骨への M1 マクロファージ浸潤を抑制した. 予想に反して, 中枢神経系を介する効果が主であるアミトリプチリンとノイロトロピンは筋・骨への M1 マクロファージ浸潤を抑制できなかった. これらの結果から, デキサメタゾン, プレガバリン, ロキソプロフェンで CCI 施行後の筋・骨萎縮も抑制できる可能性が示唆された.

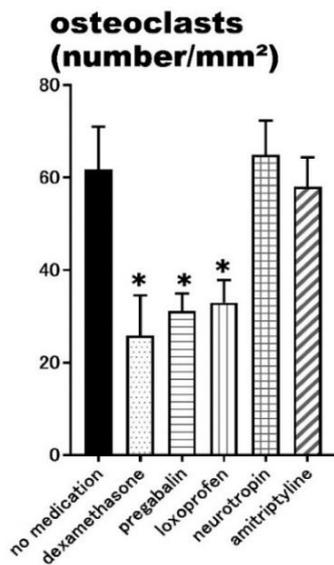


図 17 免疫組織染色 神経障害 1 週間後 薬剤投与群

デキサメタゾン、プレガバリン、ロキソプロフェン投与群で、未治療群と比較して神経障害 1 週間後に大腿骨の破骨細胞数が有意に低下した (n=8, \*P<0.05)。

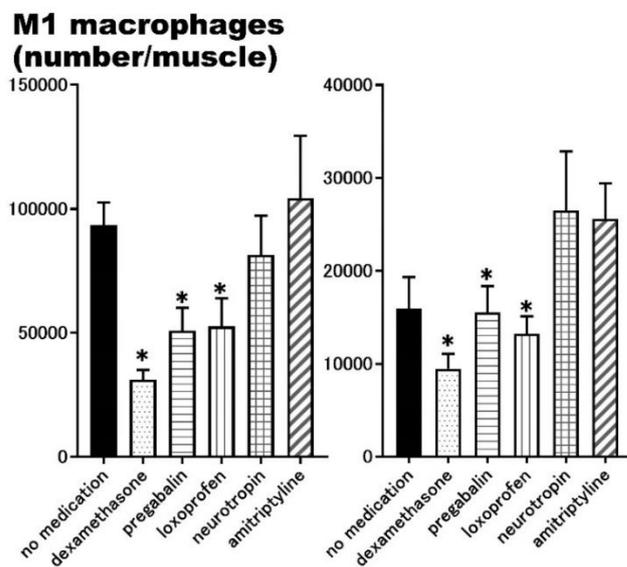


図 18 下肢筋フローサイトメトリー 神経障害 1 週間後 薬剤投与群

デキサメタゾン、プレガバリン、ロキソプロフェン投与群で、未治療群と比較して下肢筋の M1 マクロファージ数が有意に減少した (n=8, \*P<0.05)。

### 3-7 神経障害後のデキサメタゾン投与が完全に、プレガバリン、ロキソプロフェン投与が部分的に筋・骨萎縮を抑制する

続いて、薬剤投与の筋・骨萎縮に対する効果を調べるために、薬剤投与群の筋重量と全骨密度の結果を未治療群と比較した。

未治療群と比較して、大腿二頭筋重量は CCI 施行 1 週間後にデキサメタゾン群 ( $274 \pm 15$  [213-331] mg, n=8), プレガバリン群 ( $166 \pm 15$  [108-212] mg, n=8), ロキソプロフェン群 ( $186 \pm 28$  [125-261] mg, n=8) で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。腓腹筋重量は未治療群と比較して、CCI 施行 1 週間後にデキサメタゾン群 ( $253 \pm 14$  [192-291] mg, n=8), プレガバリン群 ( $169 \pm 19$  [88-244] mg, n=8) で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。ロキソプロフェン群では腓腹筋重量は未治療群と有意差はなかった ( $175 \pm 30$  [93-267] mg, n=8,  $P = 0.10$ ) (図 19)。

大腿骨の全骨密度は、デキサメタゾン群で CCI 施行前 ( $484 \pm 5$  [348-642]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , n=8) と比較して CCI 施行 2 週間後 ( $470 \pm 4$  [345-619]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) で有意差はなかった ( $P = 0.10$ )。プレガバリン群 (CCI 前:  $502 \pm 7$  [332-676] vs. 2 週間後:  $462 \pm 6$  [31-627]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) , ロキソプロフェン群 ( $494 \pm 7$  [329-670] vs.  $441 \pm 6$  [282-611]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) では全骨密度が CCI 施行 2 週間後に低下した (n=8,  $P < 0.05$ )。脛骨の全骨密度は、CCI 施行前と比較して、CCI 施行 2 週間後でいずれの群でも有意差はなかった (デキサメタゾン群:  $606 \pm 5$  [309-832] vs.  $606 \pm 6$  [275-825]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , n=8,  $P = 0.35$ , プレガバリン群:  $600 \pm 9$  [333-785] vs.  $605 \pm 10$  [270-714]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , n=8,  $P = 0.43$ , ロキソプロフェン群:  $601 \pm 9$  [321-782] vs.  $605 \pm 11$  [279-853]  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , n=8,  $P = 0.22$ ) (図 20)。

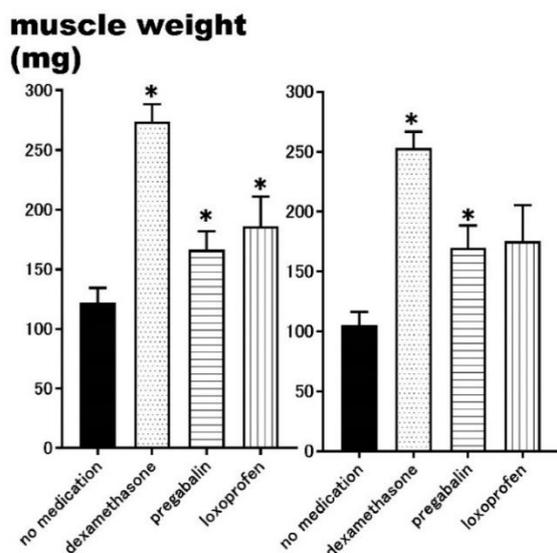


図 19 下肢筋重量 神経障害 1 週間後 薬剤投与群

大腿二頭筋では、デキサメタゾン、プレガバリン、ロキソプロフェン投与群で、腓腹筋ではデキサメタゾン、プレガバリン投与群で、未治療群と比較して筋重量が増加した (n=8, \*P<0.05) .

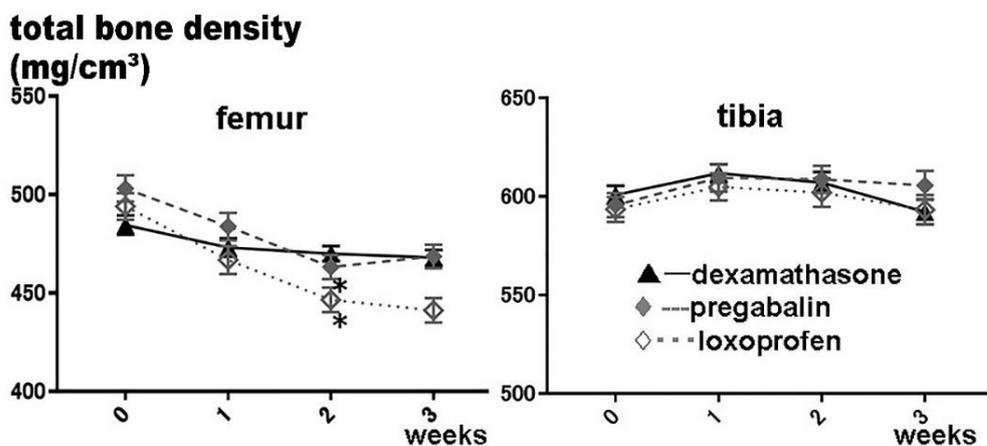


図 20 下肢全骨密度 神経障害後 薬剤投与群

大腿骨では、デキサメタゾン投与群で、脛骨ではデキサメタゾン、プレガバリン、ロキソプロフェン投与群で、神経障害前と比較して神経障害 2 週間後の全骨密度に有意差はなかった (n=8, \*P<0.05)

#### 4. 考察

本研究により, M1 マクロファージの浸潤が末梢神経障害後の筋・骨萎縮を増悪させることが明らかになった. これまで, 神経障害後の筋・骨萎縮は痛み行動や不動化の結果と考えられていた<sup>4,5</sup>. 神経障害後の筋・骨萎縮は不動化のみでは説明できないという報告も多い<sup>9,10</sup>が, その詳細な機序は不明だった. 本研究では神経障害後の筋・骨萎縮の原因として M1 マクロファージに着目した. 近年, M1 マクロファージは神経原性炎症に伴う神経障害性痛の原因として注目されている<sup>14-19</sup>. これまで, M1 マクロファージは神経障害時の痛みのみに着目されていたが, 本研究は M1 マクロファージが筋・骨萎縮にも関与することを明らかにした.

神経原性炎症では, 周囲の血管から浸潤した M1 マクロファージにより末梢神経のワーラー変性が起こり, 痛覚過敏を起こすと報告されている<sup>14</sup>. 障害された神経に M1 マクロファージが誘導される機序としては,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{CCL2}$ ,  $\text{CCR2}$  などの炎症性サイトカインが関与する<sup>9,12</sup>. 本研究でも同様に筋組織での  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{CCL2}$ ,  $\text{CCR2}$  が増加した. また, 生体イメージングで, M1 マクロファージが筋・骨組織内でなく, 周囲の血管壁に浸潤する様子が観察できた. これらの結果からは, サイトカインに誘導された M1 マクロファージが筋・骨組織を障害する機序としては, 貪食作用ではなくサイトカインなどのメディエーターを介するものであると考えられた. 近年, 慢性閉塞性肺疾患や, 関節リウマチ, 炎症性筋炎などの炎症性疾患で, 筋・骨萎縮が起こることが分かっている<sup>25</sup>. これらの疾患では,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  などの炎症性サイトカインが増加しており, インスリン抵抗性の増加や活性酸素の増加,

虚血を通して筋萎縮を起こすと報告されている<sup>26-28</sup>。神経障害後の筋萎縮も同様の機序で起こっている可能性がある。同様に、脳や末梢神経に存在する vasoactive intestinal peptide (VIP) と calcitonin gene-related peptide (CGRP) が骨の神経系調節に関わっている<sup>29</sup>。これらのペプチドは骨形成を促進し、骨吸収を抑制する。VIP は TNF $\alpha$ , IL-6 を抑制し<sup>30</sup>, CGRP は TNF $\alpha$  を抑制する<sup>31</sup>。VIP と CGRP は神経障害での骨萎縮にも炎症性サイトカインを介して関与している可能性がある。加えて、IL13 や IL-4 などの M2 マクロファージが関与するサイトカインが神経障害後の痛み反応を抑制すると報告されている<sup>15,19</sup>。今後は、神経障害後の筋・骨萎縮の詳細な機序を明らかにするために、M2 マクロファージの誘導や抗サイトカイン治療を通じた神経障害治療の研究が必要と考えられる。一方で、中枢性感作が神経原性炎症やそれに伴う痛みに関わることが分かっている<sup>11-13</sup>。しかし本研究では、予想に反して中枢神経系に主に作用するアミトリプチリンとノイロトロピンは、神経障害後の M1 マクロファージ浸潤や筋・骨萎縮を抑制できなかった。この結果からは、神経障害後の筋・骨萎縮に中枢神経系の影響は少ないと考えられた。

本研究では、筋・骨へのマクロファージ浸潤を抑制するためにクロドロン酸リポソームの投与を行った。予備実験として M1 マクロファージ除去のための適切なクロドロン酸リポソームの投与量を検討したところ、本研究より少量の投与では、脾臓組織で十分な M1 マクロファージの除去はできず、筋・骨への M1 マクロファージの浸潤も抑制できなかった。本研究での投与量が筋・骨への M1 マクロファージ浸潤の抑制が可能な最小量だった。しかし、本研究での投与量でもクロドロン酸リポソームによるマクロファージの除去では、マウスが感染症や除去されたマクロファージ隗による塞栓症のために処置 2 週間後から全身状態が悪化したので、4 週間以内にすべて安楽死させた。クロドロン酸リ

ポソームの投与は神経障害後の筋・骨萎縮への M1 マクロファージの影響を検討する上では有用だったが、安全に臨床使用が可能な投与量ではビスホスホネート製剤の神経障害後の筋・骨萎縮の予防効果は示せなかった。一方で、近年、神経障害後の骨代謝異常に伴う痛みが神経原性骨痛として報告されている。この病態は複合性局所疼痛症候群で議論されることが多いが、この病態に対しては骨痛のみでなく、神経障害性痛に対してもビスホスホネート製剤が有用であると報告されており<sup>32</sup>、ビスホスホネート製剤が神経障害後の筋・骨萎縮の予防にも有効である可能性は残されている。本研究では、クロドロン酸リポソームの臨床使用が可能な投与量では神経障害後の筋・骨萎縮に対して十分な予防効果が示せなかったが、今後もビスホスホネート製剤の筋・骨萎縮の抑制にも着目した適切な投与量の検討が必要である。ビスホスホネート製剤に加えて、本研究では臨床研究に直結する薬剤として、抗炎症薬としてデキサメタゾンとロキソプロフェンを、神経障害性痛治療薬としてプレガバリン、アミトリプチリン、ノイロトロピンを使用した。CCI 施行後早期からのデキサメタゾン投与が筋・骨萎縮を完全に、プレガバリンとロキソプロフェンの投与が部分的にマクロファージの浸潤と筋・骨萎縮を抑制した。臨床でも、神経障害後早期のステロイドや非ステロイド性抗炎症薬、抗けいれん薬の投与が筋・骨萎縮の抑制や慢性痛への移行予防に有効である可能性がある。特に本研究では、ステロイドが筋・骨萎縮の予防に高い効果を示した。しかし、現在の臨床では、神経障害性痛に対するステロイドの使用は痛みに対する効果だけでなく、副作用の観点からも議論の余地が大きい<sup>33</sup>。今後は神経障害性痛のみでなく、筋・骨萎縮もターゲットとした神経障害後早期の短期間のステロイド使用の臨床研究が望まれる。また、今後は臨床研究として、薬剤による筋・骨萎縮の抑制に加えて、神経障害性痛の診断や治療効果判定としての筋・骨萎縮の評価が必要で

ある。加えて、筋・骨萎縮を抑制することによって慢性痛への移行が予防できるかの検討も必要である。

本研究の限界として、CCI 後の筋・骨萎縮が痛みによる不動化などの環境因子によって起こっていることが否定できない。CCI モデルでは、明らかな下肢の麻痺や歩行障害は起こらないが<sup>20</sup>、痛みによる運動量低下の程度や、その筋・骨萎縮への影響は報告されていない。本研究でも、CCI 後の運動量の変化は検討していない。本研究では不動化の筋・骨萎縮への影響を検討するために、代替法として UV 硬化樹脂による下肢不動化モデルを作成した。その結果、1~2 週間の下肢の固定では下肢の筋・骨萎縮は起こらなかった。下肢不動化モデルでは腓腹筋重量が 1 週間あたり 22%低下すると報告されており<sup>34</sup>、本研究での CCI 後の筋重量低下よりも軽度である。また、ヒトでの臨床研究では、脊髄損傷後の不動化患者の筋量低下は 0.5%/日<sup>35</sup>、骨量低下は 3-6%/月<sup>10,36</sup>と報告されている。本研究での筋・骨萎縮に対する不動化の影響は小さいと考えられるが、より正確に M1 マクロファージの筋・骨萎縮への影響を明らかにするためには、CCI モデルでの運動量の変化を検討するべきだった。そのためには定点カメラによる運動量の継続的な観察や、結紮した神経支配領域以外の筋重量測定が有用であると考えられる。

また、本研究では M1 マクロファージの筋・骨への浸潤とそれに続く筋・骨萎縮をいくつかの臨床使用可能な薬剤で抑制することができた。しかし、本研究ではそれらの薬剤が M1 マクロファージを抑制する機序は明らかにできておらず、筋・骨萎縮の抑制に M1 マクロファージの抑制以外の機序が関与している可能性は否定できない。また各薬剤の投与量もヒトで一般的に使用されてい

る用量と異なっている。本研究の主目的は末梢神経障害後の筋・骨萎縮と M1 マクロファージの関連を明らかにすることであり、本研究の結果のみでこれらの薬剤を臨床に応用することはできない。今後は臨床研究に応用するために、本研究で効果があった薬剤が M1 マクロファージの筋・骨への浸潤と筋・骨萎縮を抑制する詳細な機序と、有効な投与量の検討が望まれる。

## 6. おわりに

本研究の結果のまとめを図 21 に示した. M1 マクロファージの浸潤が末梢神経障害後の筋・骨萎縮を増悪させることが明らかになった. M1 マクロファージの誘導には炎症性サイトカイン ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{CCL2}$ ,  $\text{CCR2}$ ) が関与していた. クロドロン酸リポソーム, デキサメタゾン, プレガバリン, ロキソプロフェンによる障害神経局所での M1 マクロファージの抑制により筋・骨萎縮を予防することができた. 今後臨床でも M1 マクロファージの抑制により神経障害後の筋・骨萎縮の予防が可能になると期待される.

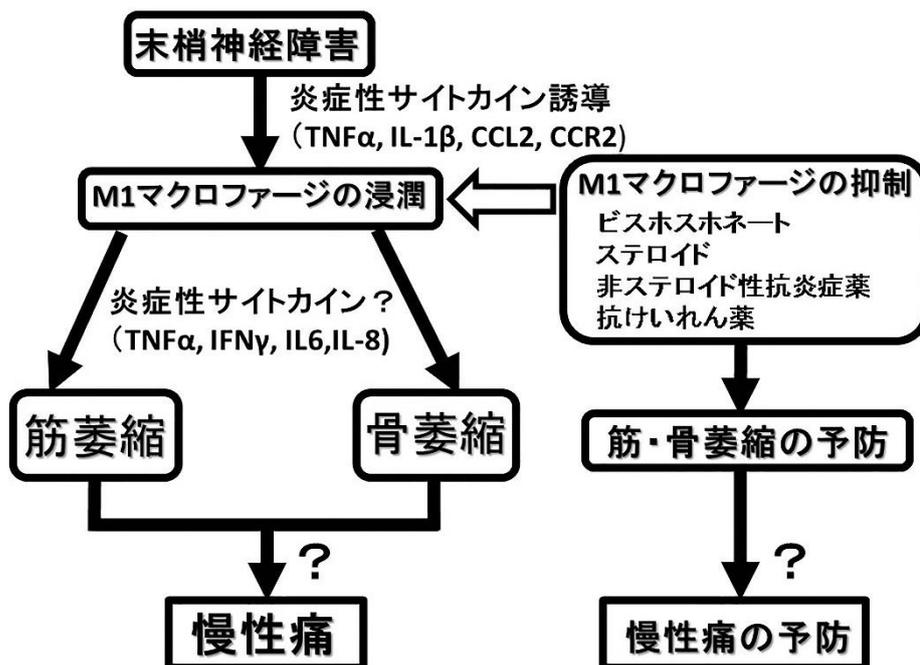


図 21 本研究の結果の模式図

## 7. 参考文献

1. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *The Lancet Neurology* .14: 162-173, 2015.
2. Scascighini L, Toma V, Dober-Spielmann S, Sprott H: Multidisciplinary treatment for chronic pain: a systematic review of interventions and outcomes. *Rheumatology (Oxford)* .47: 670-678, 2008.
3. Said G, Examination and clinical care of the patient with neuropathy. In: Said G, Krarup C editors. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol 115(3rd series) Peripheral Nerve Disorders. Amsterdam: Elsevier B.V. 234-244, 2013.
4. Vlaeyen JWS, Linton SJ: Fear-avoidance and its consequences in chronic musculoskeletal pain: a state of the art. *Pain*. 85:317–332, 2000.

5. van Wilgen CP, Dijkstra PU, Versteegen GJ, Fleuren MJ, Stewart R, van Wijhe M. Chronic pain and severe disuse syndrome: long-term outcome of an inpatient multidisciplinary cognitive behavioural programme. *J Rehabil Med.* 41: 122-128, 2009.

6. Verbunt JA, Seelen HA, Vlaeyen JW, van de Heijden GJ, Heuts PH, Pons K, Knottnerus JA. Disuse and deconditioning in chronic low back pain: concepts and hypotheses on contributing mechanisms. *Eur J Pain.* 7: 9–21, 2003.

7. Akyuz G, Kenis O. Physical therapy modalities and rehabilitation techniques in the management of neuropathic pain. *Am J Phys Med Rehabil.* 93: 253-9, 2014.

8. Akyuz G, Ozkok O. Evidence based rehabilitation in chronic pain syndromes. *Agri.* 24: 97-103, 2012.

9. Hulsman NM, Geertzen JH, Dijkstra PU, van den Dungen JJ, den Dunnen WF. Myopathy in CRPS-I: disuse or neurogenic? *Eur J Pain.* 13: 731-736, 2009.

10. Bergmann P, Heilporn A, Schoutens A, Paternot J, Tricot A. Longitudinal study of calcium and bone metabolism in paraplegic patients.

*Paraplegia* .15: 147-159, 1977.

11. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*. 229: 26-50, 2010.

12. Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol* .11: 629-642, 2012.

13. Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* .12: 55-61, 2012.

14. Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain* .86: 25-32, 2000.

15. Kiguchi N, Sakaguchi H, Kadowaki Y, Saika F, Fukazawa Y, Matsuzaki S, Kishioka S. Peripheral administration of interleukin-13 reverses

inflammatory macrophage and tactile allodynia in mice with partial sciatic nerve ligation. *J Pharmacol Sci* .133: 53-56, 2017.

16. Komori T, Morikawa Y, Inada T, Hisaoka T, Senba E. Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. *Neuroreport* .22: 911-917, 2011.

17. Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. Macrophage inflammatory protein-1alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1beta up-regulation. *Pain*. 149: 305-315, 2000.

18. Kobayashi Y, Kiguchi N, Fukazawa Y, Saika F, Maeda T, Kishioka S. Macrophage-T cell interactions mediate neuropathic pain through the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor ligand system. *J Biol Chem*. 290: 12603-12613, 2015.

19. Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain*. 156: 684-693, 2015.

20. Bennett G.J, Xie Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33:87-107, 1988.

21. Park CH, Ju TJ, Kim YW, Dan JM, Kim JY, Kim YD, Seo JS, Park SY. Hemin, heme oxygenase-1 inducer, attenuates immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice. *Life Sci*. 92: 740-746, 2013.

22. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest*. 118: 710-721, 2008.

23. Wang H, Melton DW, Porter L, Sarwar ZU, McManus LM, Shireman K. Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol*. 184: 1167-1184, 2014.

24. Prokop S, Heppner FL, Goebel HH, Stenzel W. M2 polarized macrophages and giant cells contribute to myofibrosis in neuromuscular sarcoidosis. *Am J Pathol*. 178:1279-1286, 2011.

25. Londhe P, Guttridge DC. Inflammation induced loss of skeletal muscle. *Bone*. 80: 131-142, 2015.
26. Byun MK, Cho EN, Chang J, Ahn CM, Kim HJ. Sarcopenia correlates with systemic inflammation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 12: 669-675, 2017.
27. Dayer JM/ Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis? *J Rheumatol Suppl*. 65:10-15, 2002.
28. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:4854-4858, 1994.
29. Lerner UH. Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2, 440-447, 2002.
30. Ganea D, Delgado M. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Arch Immunol Ther Exp*. 49: 101-110, 2001.

31. Millet I, Vignery A. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide inhibits TNF $\alpha$  but poorly induces IL-6 production by fetal rat osteoblasts. *Cytokine*. 9: 999-1007, 1997.
32. Yanow J, Pappagallo M, Pillai L. Complex regional pain syndrome (CRPS/RSD) and neuropathic pain: role of intravenous bisphosphonates as analgesics. *Scientific World Journal*. 8: 229-236, 2008.
33. Rijsdijk M, van Wijck AJ, Kalkman CJ, Yaksh TL. The effects of glucocorticoids on neuropathic pain: a review with emphasis on intrathecal methylprednisolone acetate delivery. *Anesth Analg*. 118: 1097-1112, 2014.
35. Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CL, Verdijk LB, van Loon LJ. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 210: 628-641, 2014.
36. Demulder A, Guns M, Ismail A, Wilmet E, Fondu P, Bergmann P. Increased osteoclast-like cells formation in long-term bone marrow cultures from patients with a spinal cord injury. *Calcif Tissue Int*. 63:396-400, 1998.

## 8. 謝辞

本論文作成にあたり，ご指導ご鞭撻を賜りました，自治医科大学分子病態研究センター分子病態研究部 西村智教授，現奈良県立医科大学小児科 坂田飛鳥助教，およびスタッフの皆様方，自治医科大学麻酔科学・集中治療医学講座 竹内護教授，五十嵐孝准教授に謹んで感謝申し上げます。