



Title	骨形成促進薬テリパラチドによる骨粗鬆症性神経炎症抑制機構に関する薬理学的研究
Author(s)	庵, 敬
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15499号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15499
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94510
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Iori.pdf



博士論文

骨形成促進薬テリパラチドによる 骨粗鬆症性神経炎症抑制機構に関する薬理学的研究

令和5年3月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

庵 敬

緒言

骨粗鬆症患者の 80%以上に認められる腰背部痛に代表されるような、骨・関節の障害に由来する慢性疼痛は、骨格痛と呼ばれており、骨格痛による身体活動の制限は日常生活動作 (ADL) や生活の質 (QOL) を著しく低下させることになる^{1,2)}。この骨格痛は、椎体などの明らかな骨折の有無にかかわらず患者に発生する。骨格痛の原因機序として考えられるのは、エストロゲン欠乏による破骨細胞や単球、マクロファージの活性化により産生される酸や炎症性サイトカインによる骨膜内感覚神経系の慢性的な神経細胞の興奮であり、これが骨格痛に関与していると考えられている³⁾。このメカニズムは、骨転移を伴うがん関連骨痛患者にも関与していると考えられている⁴⁾。骨粗鬆症患者はまた、崩壊した椎体、変性した椎間板、および椎間関節に由来する痛みを経験することがある⁵⁾。骨粗鬆症性疼痛の慢性化には、セロトニン受容体の発現低下に伴う脊髄の上行性疼痛伝達を調節する下行性抑制神経系の低活性化が関与する⁶⁾。骨格痛が多様な疾患群で発生する主な理由は、構造的な支持や運動、内臓の保護、ミネラルや成長因子の貯蔵と放出、血液細胞の誕生と成熟において骨格が重要な役割を担っているためである。重要なことは、骨格の痛みが適切にコントロールされなければ、骨量や筋肉量の低下、心血管系の機能低下、認知機能低下を含む二次的な影響を及ぼし、これらすべてが患者の身体機能や QOL を著しく低下させる可能性があるということである³⁾。

脊髄後根神経節 (DRG) は、一次求心性線維の神経細胞体が集合する感覚神経節であり、皮膚や骨・関節および筋の体性感覚を担う。頭蓋顎顔面部においては、三叉神経節が主要な一次感覚神経節である。神経損傷による神経障害性疼痛や炎症性疼痛モデルなどの様々な慢性疼痛モデルでは、DRG におけるマクロファージの増加が報告されており⁷⁻⁹⁾、マクロファージが神経障害性疼痛や炎症性疼痛をさまざまなレベルで制御していることが明らかになってきている。DRG マクロファージの増加は、常駐マクロファージの増殖もしくは循環単球の浸潤によるものである。神経障害性疼痛時には、常駐マクロファージの増殖⁹⁾、変形性関節症 (OA) では循環単球の DRG への浸潤によって DRG マクロファージの増加が引き起こされるとの報告がある¹⁰⁾。マクロファージの表現型と機能は多様で可塑性に富み、周囲の微小環境によって制御されている¹¹⁾。DRG などの感覚神経節のマクロファージは、神経細胞やそれを囲むサテライトグリア細胞 (SGC) との相互作用によって恒常性維持や病態機能に関与する。炎症性に活性化されたマクロファージには、M1 および M2 といった 2 種類の古典的な分類がある¹²⁾。M1 に活性化されたマクロファージは、高レベルの iNOS を発現し、炎症性の機能的プロファイルを発現する。M2 マクロファージは高レベルの CD206 を発現し、M1 とは対照的に、組織再生を促す機能的プロファイルを有するが、腫瘍の成長をもサポートし得ることが報告されている^{13,14)}。げっ歯類の OA モデ

ルにおいては、神経細胞によって M1 の表現型に活性化されたマクロファージが DRG に浸潤しており、関節の損傷の程度とは無関係に、DRG マクロファージが OA 疼痛を維持することが示されている¹⁰⁾。一方で、DRG マクロファージが、疼痛解消に貢献するとの知見もある¹⁵⁻¹⁸⁾。M2 マクロファージを髄腔内に注入すると OA の痛みが抑制される一方、髄腔内に注入した M1 マクロファージは、痛みの過敏性を誘導する¹⁰⁾。M1 マクロファージがどのように痛みを促進するのかは完全には解明されていないが、様々な研究が、M1 マクロファージが感覚ニューロンを活性化する炎症性サイトカインを放出することで、痛みを促進するという考えを支持している^{19,20)}。例えば、神経障害性疼痛では、DRG のマクロファージは活性酸素種 (ROS) を放出するだけでなく、IL-1 β を放出し、疼痛の持続に寄与している^{9,21,22)}。マクロファージの機能制御を標的にすることで疼痛緩和を目指した薬理学的な基礎研究がいくつか報告されている。IL4-10 融合タンパク (IL4-10 FP) は、マクロファージによる炎症性メディエーターの放出を抑制することが知られている²³⁾。IL4-10 FP を DRG に局所投与することで、炎症性に活性化された M1 マクロファージを制限し、痛みの持続を抑制できることが示されている。また、抗炎症性のサイトカインである IL-13 でマクロファージをリプログラミングすると、M1 マクロファージが M2 の表現型にシフトし、神経障害性疼痛が回復することも報告されている²⁴⁾。さらに、M2 マクロファージは、自らのミトコンドリアを感覚ニューロンに移すことで痛みを解消するとの興味深い報告もある¹⁸⁾。IL4-10 FP は、大規模な動物モデルにおいて、直接的な鎮痛効果および軟骨保護効果を有することが、さらに示されている^{25,26)}。

当研究グループの田中らは、骨粗鬆症モデルラットを用いた薬理学的実験で、骨形成促進薬である PTH 製剤 (テリパラチド : TPTD) が骨量回復効果のみならず、骨粗鬆性の慢性疼痛を寛解させる効果があることを示している²⁷⁾。この実験系において、DRG における網羅的遺伝子発現の変動解析を行った結果、TPTD は神経細胞に作用して神経炎症を抑制していることが示唆された。上記の報告は、DRG マクロファージの機能制御が、骨格痛を制御するための重要な新規創薬戦略となっていることを示している。

頭蓋顎顔面部からの末梢性侵害刺激は、主に三叉神経によって伝達される。この末梢性侵害刺激に応じて、三叉神経節 (TG) の神経細胞は、サブスタンス P やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) などの神経ペプチドを産生する。神経ペプチドの産生以外にも、TG の上顎ニューロンと下顎ニューロンの間には、独特の非シナプス性相互作用系が存在する²⁸⁾。TG の神経細胞は SGC に囲まれており、SGC は TG の神経細胞からの信号を最初に受け取る²⁹⁾。この活性化された SGC は、隣接する SGC や TG ニューロンを活性化する ATP を放出する。TG では、ミクログリア/マクロファージ様細胞 (MLC) が、TG ニューロンまた

は SGC から ATP を取り込むことによって活性化される^{30,31)}。このような TG ニューロン-SGC-MLC 間のコミュニケーションにより、異所性疼痛、知覚過敏、アロディニアなどの反応が引き起こされると考えられるが、さらなる研究が必要である。

骨粗鬆症治療薬は、臨床的にも実験的にも骨粗鬆症性疼痛に対して有効であることが報告されている。ビスフォスフォネート系薬剤（BP 製剤）は、破骨細胞、単球、マクロファージの活動を抑制して酸や炎症性サイトカインの産生を抑制することで疼痛調節作用を発揮する³²⁾。また、BP 製剤の 1 つであるミノドロネートは、プリン作動性 P2X2/3 受容体を阻害することで疼痛調節作用を示すことが報告されている³³⁾。カルシトニンは破骨細胞表面受容体に作用して骨吸収や破骨細胞活性を抑制する。また、カルシトニンは破骨細胞を抑制し、下行性疼痛抑制系の活性低下を引き起こすセロトニン受容体活性の低下を是正することで、疼痛調節作用を発揮することが報告されている^{6,34,35)}。骨粗鬆症治療薬の抗侵害受容体効果を調べるために、骨粗鬆症動物モデルとして広く利用されている卵巣摘出動物（OVX）がよく用いられている。OVX 動物は骨密度の低下だけでなく、熱や機械的刺激に対する痛覚過敏を示すことがよく知られている^{32,34-37)}。エストラジオールが OVX で誘発される疼痛関連行動を改善することが報告されており、エストロゲン不足が熱や機械的刺激に対する反応に影響を与えていることが示唆されている³⁵⁻³⁷⁾。また、OVX による疼痛関連行動は、BP やカルシトニンだけでなく、プレガバリンやモルヒネによっても改善されることが報告されている^{32,34,35,38)}。

テリパラチド（TPTD；ヒト副甲状腺ホルモン（PTH）の 1-34 フラグメント）は、骨芽細胞系細胞の PTH1 受容体（PTH1R）に作用し、骨形成性骨芽細胞の増殖、分化、生存を促進することで骨同化作用を発揮する、臨床的に有効な骨粗鬆症治療薬であり、その適用条件は「骨折の危険性の高い骨粗鬆症」となっている。蓄積された疫学研究により、TPTD 治療は骨粗鬆症患者における腰痛の発症や悪化を抑制することが報告されている³⁹⁻⁴⁴⁾。また、TPTD 治療は、BP 治療を受けている骨粗鬆症患者の椎体骨折後の疼痛⁴⁵⁻⁴⁷⁾や難治性腰痛⁴⁸⁾に対しても有効であった。TPTD による腰痛の改善は、カルシトニン治療よりも治療の初期段階で観察されるようであった。しかし、上記のように複数の臨床報告があるにもかかわらず、TPTD の抗骨粗鬆症性疼痛効果の薬理学的機序は明らかにされていなかった。

当研究室の田中らは、薬理学的な研究およびトランスクリプトーム解析から、骨粗鬆症性の慢性疼痛には神経炎症が関与していることを世界で初めて明らかにした²⁷⁾。本研究では、骨粗鬆症モデル動物である OVX ラットを用いて蛍光免疫染色による蛍光イメージング定量解析を行い、骨粗鬆症性の慢性疼痛の組織・細胞レベルでの発症機序を解明することを目的とした。

材料と方法

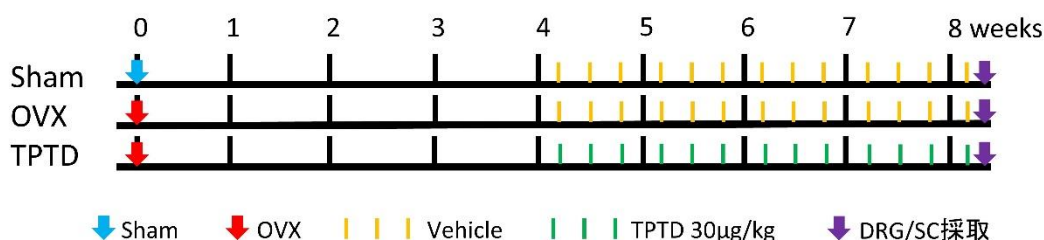
・実験動物

10 週齢の雌の Sprague-Dawley ラットを用いた(日本チャールス・リバー、神奈川、日本)。ラットは明暗サイクル(12-12 時間)で飼育し、水道水と餌(CRF-1; オリエンタル酵母工業、東京、日本)を無制限に摂取させた。ケージには巣材(Enviro-dri; Shepherd Specialty Papers, Watertown, TN, USA)を入れた。ラットは実験開始前に 10 日間環境に慣れさせた。実験研究は、LSI メディエンス株式会社および旭化成ファーマ株式会社の実験動物倫理委員会の承認を得て、実験動物の管理および取り扱いに関する確立されたガイドラインに従って実施した。

・実験計画

12 週齢のラットを、OVX 群 (n=20) と Sham 群 (n=10) の 2 群に無作為に割り付けた。両側の OVX または偽手術は麻酔下で行った。偽手術では、卵巣は露出させたが摘出はしなかった。手術の 4 週間後、OVX 群ラットをさらに 2 群に無作為化した: OVX-vehicle 群 (n=8) および OVX-TPTD 群 (n = 8)。8 匹のラットを Sham 群 (n=10) から選択し、sham-vehicle 群と定義した。OVX-TPTD 群には TPTD (旭化成ファーマ、東京、日本、30 μ g/kg 体重)を、Sham-vehicle 群、OVX-vehicle 群には溶媒である生理食塩水を、週 3 回の間隔で 4 週間に渡り皮下投与した。実験期間終了時にイソフルラン麻酔下で腹部大動脈からの瀉血により全てのラットを犠牲にした。その後、第 4 および第 5 腰椎部 DRG (L4-5DRG) および脊髄 (SC) を採取し、分析を行った (図 1)。

図1



(図 1) 本研究における Sham、OVX、Vehicle 投与、TPTD 投与、サンプル採取のスケジュールを示す。

・免疫組織化学、顕微鏡システムおよび蛍光イメージング解析

脊髄と DRG を含む腰椎 (L5) を解剖し、2 日間 4℃で 4%パラホルムアルデヒドで固定を行った。腰椎サンプルの脱炭は、10%EDTA-2Na 溶液 (武藤化学、東京、日本) で 4℃で 2 週間行った。パラフィン包埋後、パラフィン組織ブロック

クを厚さ 5 μ mのスライスに切断した。パラフィン包埋切片を脱パラフィン化し、10mM クエン酸緩衝液中で 95℃、30 分間電気圧力鍋 SR-MP300（パナソニック、大阪、日本）を用いて抗原賦活化を行った。組織切片を、5%ウシ血清アルブミン（BSA）（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）、Tween 20（TBS-T）（タカラバイオ、滋賀、日本）を添加したトリス緩衝生理食塩水中で室温で 30 分間インキュベートした後、洗浄した。ついで、抗 NF200（1:200 ; Sigma-Aldrich）、抗 Iba-1（1:1000 ; 富士フイルム和光純薬、大阪、日本）、抗 CGRP（1:800 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA）、抗 GFAP（1:200 ; Cell Signaling Technology）、および抗 IL-11（1:50; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）中で、4℃で 15 時間インキュベートした。洗浄後、スライドを、抗マウス IgG Alexa Fluor 488（1:1000; Thermo Fisher Scientific）、抗ウサギ IgG Alexa Fluor 568（1:1000; Thermo Fisher Scientific）、抗ウサギ IgG Alexa Fluor 647（1:1000; Thermo Fisher Scientific）、および DAPI（1:1000; 同仁化学研究所、熊本、日本）で 1 時間インキュベートし、ついで最終洗浄した。最後に、スライドを、Prolong Gold antifade mounting medium（Thermo Fisher Scientific）を用いてカバースリップでマウントした。

組織切片の蛍光像は、ECLIPSE Ni（ニコン、東京、日本）に対物レンズ Plan Apo λ $\times$ 20（数値絞り[NA]=0.75、ニコン）を装着して取得した。

蛍光信号は、以下のフィルターセットを用いて得た。DAPI（励起 : 340~380 nm、ダイクロイックミラー(DM) : 400 nm、発光 : 435~485 nm、ニコン）、FITC（励起 : 460~500 nm、DM : 510 nm、発光 : 510~560 nm、ニコン）、TxRed（励起 : 540~580 nm、DM : 595 nm、発光 : 600~660 nm、ニコン）、Cy5（励起 : 590~640 nm、DM : 660 nm、発光 : 662.5~737.5 nm、ニコン）を用いた。1 回のスキャンのフレームサイズは、8 ビットの色深度で 1280 $\times$ 1024 ピクセルであった。蛍光画像ピクセルサイズが 0.64 μ m のものを取得した。画像処理は、イメージングソフトウェアプログラム NIS-Elements AR（ニコン）を用いて行った。

Iba-1 陽性細胞、CGRP 陽性細胞、GFAP 陽性細胞、IL-11 陽性細胞の蛍光イメージング解析は、イメージングソフトウェアプログラム NIS-Elements AR（ニコン）を用いて行った。

・統計解析

すべてのデータは、平均値 $\pm$ SEM として示されている。

蛍光イメージング解析において、Sham-vehicle 群と OVX-vehicle 群とを、および OVX-vehicle 群と OVX-TPTD 群とを比較し、Student's t-test を用いて群間差を解析した。

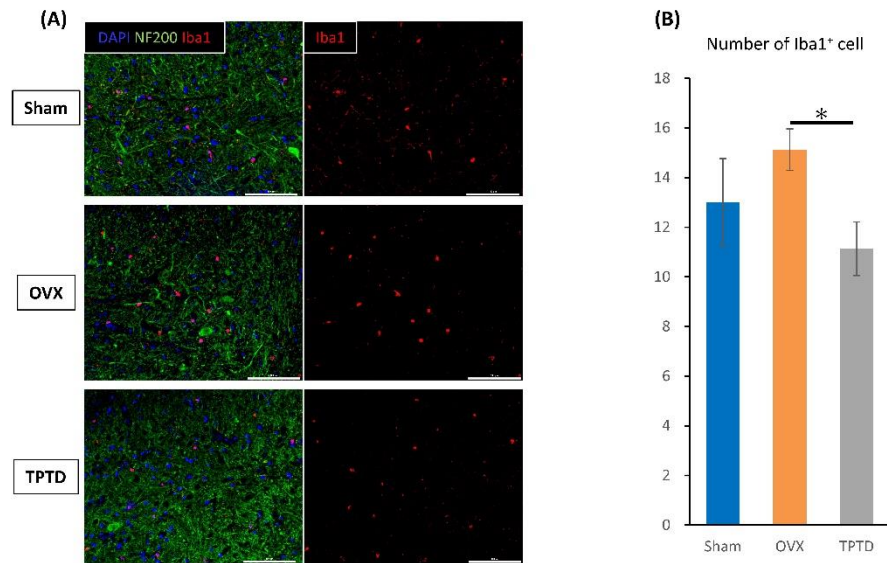
p<0.05 の場合に統計学的に有意であると判定した。

結果

1. 脊髄後角におけるミクログリアの数は、OVXにより増加し、TPTD投与で減少する

活性化ミクログリアのマーカーである抗 Iba1 抗体を用いて、脊髄後角のミクログリア数を計測した(図 2A)。OVX によりミクログリアは活性化する傾向を示し、ミクログリアの活性は TPTD の投与により有意に低下した (図 2B)。

図2

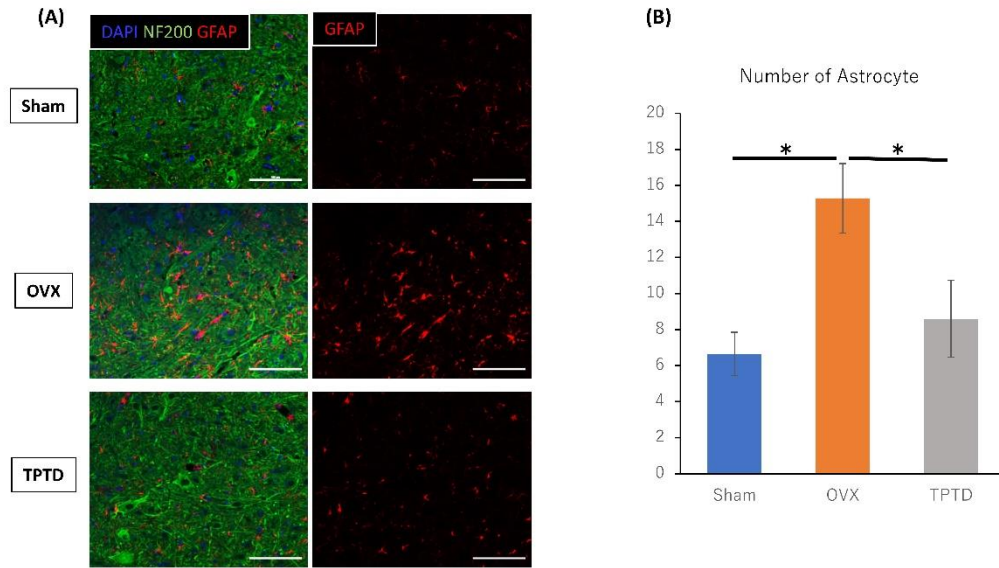


(図 2) 脊髄後角ミクログリアに対する TPTD の効果。(A)Iba1 陽性ミクログリア細胞を蛍光免疫組織化学で検出した。3 つの実験群からの代表的な標本を示す。(B)Iba1 シグナル数をスコア化して比較した。n=8。スケールバー：100 μ m。有意差：*p < 0.05。データは平均値 $\pm$ SEM として示す。

2. 脊髄後角において、アストロサイトの数は OVX により増加し、TPTD 投与で減少する

次に、活性化アストロサイトのマーカーである抗 GFAP 抗体を用いて、脊髄後角のアストロサイトを計測した (図 3A)。OVX によりアストロサイト数は有意に増加し、TPTD 投与により有意に減少した (図 3B)。

図3

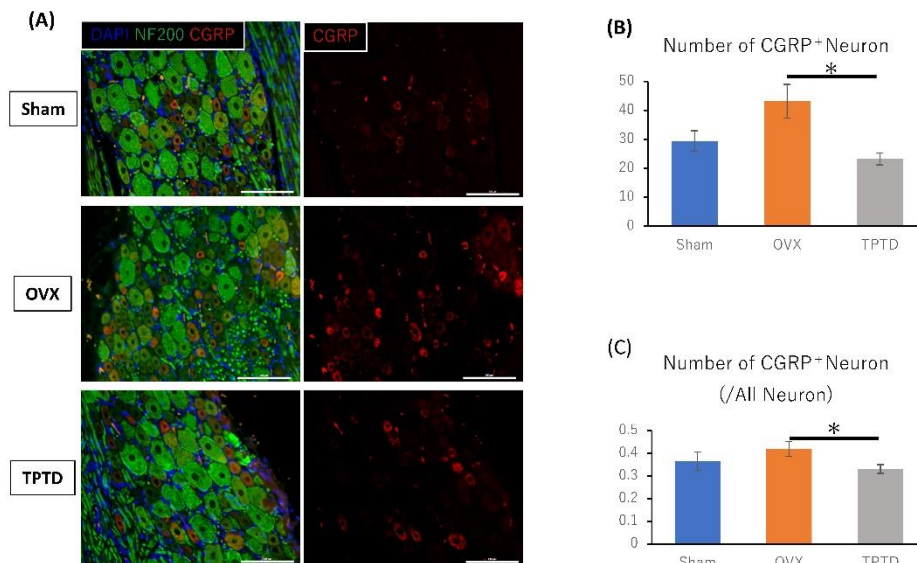


(図 3) 脊髄後角アストロサイトに対する TPTD の効果。(A)アストロサイトを蛍光免疫組織化学で検出した。3 つの実験群からの代表的な標本を示す。(B)アストロサイト数をスコア化して比較した。n=14。スケールバー：100μm。有意差：*p < 0.05。データは平均値±SEM として示す。

3. DRG ニューロンの CGRP 陽性ニューロン数は OVX により増加し、TPTD 投与で減少する

次に、抗 CGRP 抗体を用いて、DRG において慢性疼痛へ関与している可能性がある CGRP 陽性ニューロン数を計測した (図 4A)。CGRP 陽性ニューロン数は OVX により増加する傾向を示し、TPTD 投与により有意に減少した (図 4B, C)。

図4

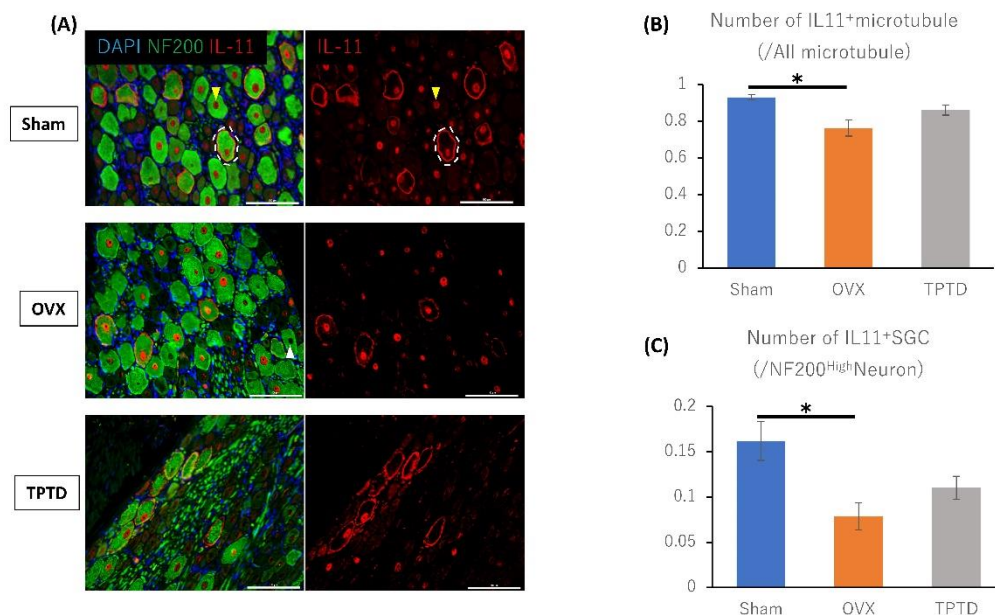


(図 4) DRG ニューロンに対する TPTD の効果。(A)CGRP 陽性 DRG ニューロンを蛍光免疫組織化学で検出した。3 つの実験群からの代表的な標本を示す。(B)CGRP 陽性ニューロン数をスコア化して比較した。(C)サンプル毎に ROI のニューロン数が異なるため、CGRP 陽性ニューロン数を全ニューロン数で除して正規化し、比較した。 $n=12$ 。スケールバー：100 μ m。有意差：* $p < 0.05$ 。データは平均値 $\pm$ SEM として示す。

4. DRG において、IL-11 の発現は OVX により低下する

次に、抗 IL-11 抗体を用いて、DRG における IL-11 の組織発現の局在を解析した (図 5A)。その結果、IL-11 は、一部のニューロンの微小管で発現していた。そこで、IL-11 陽性微小管数を計測したところ、OVX により IL-11 陽性微小管数は有意に減少し、TPTD 投与によりその減少は部分的に回復する傾向を示した (図 5B)。また、IL-11 は、NF200 での染色性が高いニューロンを取り囲む一部のサテライトグリア細胞(SGC)でも発現していた。IL-11 陽性 SGC 数を計測すると、OVX により IL-11 陽性 SGC 数は有意に減少し、TPTD 投与によりその減少は部分的に回復する傾向を示した (図 5C)。

図5



(図 5) DRG における IL-11 発現に対する TPTD の効果。(A)DRG での IL-11 発現を蛍光免疫組織化学で検出した。3つの実験群からの代表的な標本を示す。黄色矢頭：IL-11 陽性微小管、白色矢頭：IL-11 陰性微小管、白色破線：IL-11 陽性サテライトグリア細胞。(B)IL-11 陽性微小管数をスコア化し比較した。(C)IL-11 陽性サテライトグリア細胞数をスコア化し比較した。n=12。スケールバー：100 μ m。有意差：* $p < 0.05$ 。データは平均値 $\pm$ SEM として示す。

考察

本研究では、OVX ラットを用いて、TPTD の骨粗鬆症性神経炎症抑制機構を、組織・細胞レベルでの評価により解明することを目的とした。

脊髄ミクログリアの活性化は、神経損傷により誘発される神経障害性疼痛に関与しており、ミクログリアの増殖および形態学的肥大、ミクログリア分子の発現亢進が特徴である⁴⁹⁻⁵²)。当研究室の田中らは、脊髄ミクログリアの形態学的解析から、神経障害性疼痛モデルで観察されているように、OVX 誘発性痛覚過敏にはミクログリアの数の増加と肥大が関与していることを初めて報告している²⁷)。田中らの研究と同様に、我々の研究でも TPTD 投与は OVX による脊髄ミクログリアの増加を有意に減少させた。

慢性疼痛において、脊髄では、活性化したミクログリアやアストロサイトから放出される TNF- α や IL-1 β がシナプス伝達を亢進させ、慢性疼痛につながることが報告されている⁵³)。神経炎症において、ミクログリアとアストロサイトの相互作用が重要な役割を果たすことが知られている。ミクログリア切除が実質

的なサイトカインストームを引き起こすことが報告されており⁵⁴⁾、サイトカインストームの主な発生源は活性化されたアストロサイトであると考えられている⁵⁵⁾。つまり、活性化したグリア細胞から放出される炎症性サイトカインが慢性疼痛を引き起こす⁵⁶⁾。本研究では、OVXにより活性化されたアストロサイトが TPTD 投与により抑制されることが明らかになった。これらの知見は、閉経後骨粗鬆症性の神経炎症において、ミクログリアのみならずアストロサイトの活性化による増殖が関与する可能性を示していた。

CGRP は OVX による痛覚過敏に関与していると考えられている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。CGRP は CGRP 受容体を介して痛覚過敏を誘導すると報告されており、CGRP の発現亢進が疼痛を誘発することが示唆されている⁶⁰⁾。化学療法、脊髄損傷、末梢神経への高頻度刺激などの慢性疼痛モデル動物において、脊髄後角の CGRP の発現が増加することが明らかにされている⁶¹⁻⁶³⁾。OVX マウスにおいて、CGRP が脊髄後角で増加するという変化は C 線維を介したシナプスの増強や慢性疼痛過敏と並行していることが重要であり、DRG ニューロンにおいて CGRP は p-p65、TNF- α 、IL-1 β と共局在しており、神経炎症を抑制する L-TAMS の経口投与により CGRP の増加が大幅に抑制されることが報告されている⁶⁴⁾。また、神経障害性疼痛モデル動物において、脊髄後角の CGRP 陽性介在ニューロンが無害な機械的刺激で活性化することが示されている⁶⁵⁾。さらに、脊髄後角におけるミクログリアの活性化の開始と持続には、CGRP 陽性 C 線維末端が関与しているという報告もある⁶³⁾。これらの知見は、CGRP の発現亢進が神経炎症に関与している可能性を示している。また、慢性疼痛下において、DRG では Sox2 陽性サテライト細胞から CGRP 陽性ニューロンの新生が生じるという報告がある⁶⁶⁾。本研究における我々の解析では、OVX 群において CGRP 陽性ニューロン数が増加傾向にあり、TPTD 投与によって有意にその数が減少していた。このことは、閉経後骨粗鬆症性慢性疼痛および神経炎症の発症においても CGRP 陽性細胞の増加が関与し、TPTD 投与による慢性疼痛軽減および神経炎症抑制作用の一部が、CGRP の発現抑制によるものであることを示唆していた。

本研究では、DRG において、IL-11 の発現は OVX により低下し、TPTD 投与により部分的に上昇した。IL-11 は IL-6 ファミリーに属するサイトカインであり、抗炎症作用を有する。IL-11 を投与すると、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにおいて抗炎症効果が得られることが報告されている⁶⁷⁾。IL-11 は、神経新生性サイトカインとも呼ばれ、DRG ニューロンの生存に影響を与えることが知られている⁶⁸⁾。田中らは、本研究と同様の実験系において、OVX 群由来 DRG では Sham 群と比較して、IL-11 の遺伝子発現レベルが減少傾向にあり、OVX-TPTD 群では、その発現が有意に上昇することを報告している²⁷⁾。本研究において、DRG における一次感覚神経細胞体の IL-11 陽性微小管数を計測したところ、OVX により IL-11 陽性微小管数は有意に減少し、TPTD 投与によりそ

の減少は部分的に回復する傾向を示した。これは、DRG ニューロンにおける IL-11 の発現が OVX により低下することが、閉経後骨粗鬆症性慢性疼痛および神経炎症の発症に関与すること示唆していた。すなわち、DRG ニューロンにおいて神経保護的に作用していると考えられる IL-11 の発現減少が、これらの病態に関与していることが考えられた。また、本研究において、OVX により DRG における IL-11 陽性 SGC 数は有意に減少し、TPTD 投与によりその減少は部分的に回復する傾向を観察した。DRG の SGC は、感覚神経と直接交信し、神経調節因子を放出したり軸索の形成を刺激したりすることで、慢性疼痛の発生に関与することが報告されている^{69,70)}。したがって、DRG の SGC が OVX により抗炎症性のプロファイルを喪失し、TPTD 投与によりその抗炎症作用を一部回復する可能性が示唆された。本研究の成果から、ニューロンでの IL-11 の発現調節および SGC における IL-11 の発現調節が、閉経後骨粗鬆症性慢性疼痛および神経炎症の発症、さらには TPTD の薬理作用に関与することが示唆された。

結論

我々の研究成果から、骨粗鬆症モデル動物において、脊髄後角ミクログリアの活性化、脊髄後角アストロサイトの活性化、DRG ニューロンの CGRP 発現亢進、DRG における IL-11 発現の低下が生じることが、骨粗鬆症性神経炎症の発症に関与していると考えられた。また、TPTD 投与により、脊髄後角ミクログリアの活性化抑制、脊髄後角アストロサイトの活性化抑制、DRG ニューロンの CGRP 発現抑制、DRG における IL-11 発現の部分的な回復が確認された。これらの結果は、閉経後骨粗鬆症誘導性の慢性疼痛の発症機序には、一次感覚神経節である DRG における CGRP 陽性ニューロンを介した脊髄後角での神経炎症誘導が関与することが考えられた。また、この病態には抗炎症性サイトカインである IL11 のニューロンおよび SGC における発現低下が関与することが示唆された。さらに、TPTD による疼痛軽減効果には、CGRP 陽性ニューロンの減少が神経炎症抑制効果の一端を担っている可能性が示唆された。

謝辞

指導教官の北海道大学大学院歯学研究院薬理学教室飯村忠浩教授には、本研究の構想からデータ解析、論文作成に至るまで、終始熱心なご指導とご鞭撻を賜りました。この場をお借りして、深謝の意を表します。同研究室の李智媛助教には、本研究の遂行にあたりたくさんの有益な助言をいただきました。深く感謝いたします。また、大学院在学中を通じて、懇篤なるご指導を頂きました北海道大学大学院歯学研究院口腔診断内科学教室 北川善政教授に、深謝の意を表します。

同様に、歯学研究院薬理学教室および口腔診断内科学教室の皆様に御礼申し上げます。

本研究の実験やデータ解析、考察にご協力いただき、細部にわたるご助言をいただいた、旭化成ファーマ株式会社高尾亮子博士、高倉綾博士ならびに田中智哉博士に感謝の意を表します。また、ここに記しきれない多くの方々の学恩、ご支援によって本研究が成立していることを銘記し、深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Scharla S, Oertel H, Helsberg K, Kessler F, Langer F, Nickelsen T: Skeletal pain in postmenopausal women with osteoporosis: prevalence and course during raloxifene treatment in a prospective observational study of 6 months duration. *Curr Med Res Opin*, 22: 2393-2402, 2006.
- 2) Silverman SL, Piziak VK, Chen P, Misurski DA, Wagman RB: Relationship of health related quality of life to prevalent and new or worsening back pain in postmenopausal women with osteoporosis. *J Rheumatol*, 32: 2405-2409, 2005.
- 3) Mantyh PW: The neurobiology of skeletal pain. *Eur J Neurosci*, 39: 508-519, 2014.
- 4) Yoneda T, Hiasa M, Nagata Y, Okui T, White FA: Acidic microenvironment and bone pain in cancer-colonized bone. *Bonekey Rep*, 4: 690, 2015.
- 5) Ryan PJ, Evans P, Gibson T, Fogelman I: Osteoporosis and chronic back pain: a study with single-photon emission computed tomography bone scintigraphy. *J Bone Miner Res*, 7: 1455-1460, 1992.
- 6) Ito A, Kumamoto E, Takeda M, Shibata K, Sagai H, Yoshimura M: Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT_{1A}-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *J Neurosci*, 20: 6302-6308, 2000.
- 7) Ghasemlou N, Chiu IM, Julien JP, Woolf CJ: CD11b+Ly6G⁺ myeloid cells mediate mechanical inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E6808-6817, 2015.
- 8) Raoof R, Willemen H, Eijkelkamp N: Divergent roles of immune cells and their mediators in pain. *Rheumatology (Oxford)*, 57: 429-440, 2018.
- 9) Yu X, Liu H, Hamel KA, Morvan MG, Yu S, Leff J, Guan Z, Braz JM,

- Basbaum AI: Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat Commun*, 11: 264, 2020.
- 10) Raoof R, Martin Gil C, Lafeber F, de Visser H, Prado J, Versteeg S, Pascha MN, Heinemans ALP, Adolfs Y, Pasterkamp J, Wood JN, Mastbergen SC, Eijkelkamp N: Dorsal Root Ganglia Macrophages Maintain Osteoarthritis Pain. *J Neurosci*, 41: 8249-8261, 2021.
 - 11) Gordon S, Plüddemann A: Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*, 15: 53, 2017.
 - 12) Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM: M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164: 6166-6173, 2000.
 - 13) Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M: Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*, 10: e0145342, 2015.
 - 14) Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L: Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*, 30: 36-50, 2019.
 - 15) Willemen HL, Eijkelkamp N, Garza Carbajal A, Wang H, Mack M, Zijlstra J, Heijnen CJ, Kavelaars A: Monocytes/Macrophages control resolution of transient inflammatory pain. *J Pain*, 15: 496-506, 2014.
 - 16) Ji RR, Chameissian A, Zhang YQ: Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*, 354: 572-577, 2016.
 - 17) Bang S, Xie YK, Zhang ZJ, Wang Z, Xu ZZ, Ji RR: GPR37 regulates macrophage phagocytosis and resolution of inflammatory pain. *J Clin Invest*, 128: 3568-3582, 2018.
 - 18) van der Vlist M, Raoof R, Willemen H, Prado J, Versteeg S, Martin Gil C, Vos M, Lokhorst RE, Pasterkamp RJ, Kojima T, Karasuyama H, Khoury-Hanold W, Meyaard L, Eijkelkamp N: Macrophages transfer mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain. *Neuron*, 110: 613-626.e619, 2022.
 - 19) Arango Duque G, Descoteaux A: Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5: 491, 2014.
 - 20) Atri C, Guerfali FZ, Laouini D: Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, 19, 2018.
 - 21) Hackel D, Pflücke D, Neumann A, Viebahn J, Mousa S, Wischmeyer E, Roewer N, Brack A, Rittner HL: The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain. *PLoS One*, 8: e63564, 2013.
 - 22) Kallenborn-Gerhardt W, Hohmann SW, Syhr KM, Schröder K, Sisignano

- M, Weigert A, Lorenz JE, Lu R, Brüne B, Brandes RP, Geisslinger G, Schmidt A: Nox2-dependent signaling between macrophages and sensory neurons contributes to neuropathic pain hypersensitivity. *Pain*, 155: 2161-2170, 2014.
- 23) Steen-Louws C, Hartgring SAY, Popov-Celeketi J, Lopes AP, de Smet MBM, Eijkelkamp N, Lafeber F, Hack CE, van Roon JAG: IL4-10 fusion protein: a novel immunoregulatory drug combining activities of interleukin 4 and interleukin 10. *Clin Exp Immunol*, 195: 1-9, 2019.
 - 24) 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.
 - 25) Steen-Louws C, Popov-Celeketi J, Mastbergen SC, Coelevelt K, Hack CE, Eijkelkamp N, Tryfonidou M, Spruijt S, van Roon JAG, Lafeber F: IL4-10 fusion protein has chondroprotective, anti-inflammatory and potentially analgesic effects in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 26: 1127-1135, 2018.
 - 26) van Helvoort EM, Popov-Celeketi J, Eijkelkamp N, Coelevelt K, Tryfonidou MA, Wijne CD, Hack CE, Lafeber F, Mastbergen SC: Canine IL4-10 fusion protein provides disease modifying activity in a canine model of OA; an exploratory study. *PLoS One*, 14: e0219587, 2019.
 - 27) Tanaka T, Takao-Kawabata R, Takakura A, Shimazu Y, Nakatsugawa M, Ito A, Lee JW, Kawasaki K, Iimura T: Teriparatide relieves ovariectomy-induced hyperalgesia in rats, suggesting the involvement of functional regulation in primary sensory neurons by PTH-mediated signaling. *Sci Rep*, 10: 5346, 2020.
 - 28) Goto T, Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A: Neuropeptides and ATP signaling in the trigeminal ganglion. *Jpn Dent Sci Rev*, 53: 117-124, 2017.
 - 29) Pannese E, Ledda M, Cherkas PS, Huang TY, Hanani M: Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anat Embryol (Berl)*, 206: 337-347, 2003.
 - 30) Scholz J, Woolf CJ: The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*, 10: 1361-1368, 2007.
 - 31) Ton BH, Chen Q, Gaina G, Tucureanu C, Georgescu A, Strungaru C, Flonta ML, Sah D, Ristoiu V: Activation profile of dorsal root ganglia Iba-1

- (+) macrophages varies with the type of lesion in rats. *Acta Histochem*, 115: 840-850, 2013.
- 32) Abe Y, Iba K, Sasaki K, Chiba H, Kanaya K, Kawamata T, Oda K, Amizuka N, Sasaki M, Yamashita T: Inhibitory effect of bisphosphonate on osteoclast function contributes to improved skeletal pain in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*, 33: 125-134, 2015.
- 33) Kakimoto S, Nagakura Y, Tamura S, Watabiki T, Shibasaki K, Tanaka S, Mori M, Sasamata M, Okada M: Minodronic acid, a third-generation bisphosphonate, antagonizes purinergic P2X(2/3) receptor function and exerts an analgesic effect in pain models. *Eur J Pharmacol*, 589: 98-101, 2008.
- 34) Shibata K, Takeda M, Ito A, Sagai H: Ovariectomy-induced hyperalgesia and antinociceptive effect of elcatonin, a synthetic eel calcitonin. *Pharmacol Biochem Behav*, 60: 371-376, 1998.
- 35) Ito A, Takeda M, Furue H, Shibata K, Hori M, Sagai H, Sakurada T, Yoshimura M: Administration of estrogen shortly after ovariectomy mimics the anti-nociceptive action and change in 5-HT_{1A}-like receptor expression induced by calcitonin in ovariectomized rats. *Bone*, 35: 697-703, 2004.
- 36) Li LH, Wang ZC, Yu J, Zhang YQ: Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. *PLoS One*, 9: e94312, 2014.
- 37) Forman LJ, Tingle V, Estilow S, Cater J: The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat. *Life Sci*, 45: 447-454, 1989.
- 38) Suzuki M, Millecamps M, Naso L, Ohtori S, Mori C, Stone LS: Chronic Osteoporotic Pain in Mice: Cutaneous and Deep Musculoskeletal Pain Are Partially Independent of Bone Resorption and Differentially Sensitive to Pharmacological Interventions. *J Osteoporos*, 2017: 7582716, 2017.
- 39) Genant HK, Halse J, Briney WG, Xie L, Glass EV, Krege JH: The effects of teriparatide on the incidence of back pain in postmenopausal women with osteoporosis. *Curr Med Res Opin*, 21: 1027-1034, 2005.
- 40) Miller PD, Shergy WJ, Body JJ, Chen P, Rohe ME, Krege JH: Longterm reduction of back pain risk in women with osteoporosis treated with teriparatide compared with alendronate. *J Rheumatol*, 32: 1556-1562, 2005.
- 41) Langdahl BL, Rajzbaum G, Jakob F, Karras D, Ljunggren O, Lems WF, Fahrleitner-Pammer A, Walsh JB, Barker C, Kutahov A, Marin F:

Reduction in fracture rate and back pain and increased quality of life in postmenopausal women treated with teriparatide: 18-month data from the European Forsteo Observational Study (EFOS). *Calcif Tissue Int*, 85: 484-493, 2009.

- 42) Langdahl BL, Ljunggren Ö, Benhamou CL, Marin F, Kapetanios G, Kocjan T, Lespessailles E, Napoli N, Nikolic T, Petto H, Moll T, Lindh E: Fracture Rate, Quality of Life and Back Pain in Patients with Osteoporosis Treated with Teriparatide: 24-Month Results from the Extended Forsteo Observational Study (ExFOS). *Calcif Tissue Int*, 99: 259-271, 2016.
- 43) Nevitt MC, Chen P, Dore RK, Reginster JY, Kiel DP, Zanchetta JR, Glass EV, Krege JH: Reduced risk of back pain following teriparatide treatment: a meta-analysis. *Osteoporos Int*, 17: 273-280, 2006.
- 44) Nevitt MC, Chen P, Kiel DP, Reginster JY, Dore RK, Zanchetta JR, Glass EV, Krege JH: Reduction in the risk of developing back pain persists at least 30 months after discontinuation of teriparatide treatment: a meta-analysis. *Osteoporos Int*, 17: 1630-1637, 2006.
- 45) Lyritis G, Marin F, Barker C, Pfeifer M, Farrerons J, Brixen K, del Pino J, Keen R, Nickelsen TN: Back pain during different sequential treatment regimens of teriparatide: results from EUROFORs. *Curr Med Res Opin*, 26: 1799-1807, 2010.
- 46) Hadji P, Zanchetta JR, Russo L, Recknor CP, Saag KG, McKiernan FE, Silverman SL, Alam J, Burge RT, Krege JH, Lakshmanan MC, Masica DN, Mitlak BH, Stock JL: The effect of teriparatide compared with risedronate on reduction of back pain in postmenopausal women with osteoporotic vertebral fractures. *Osteoporos Int*, 23: 2141-2150, 2012.
- 47) Tsuchie H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Nishi T, Abe H, Segawa T, Shimada Y: The effect of teriparatide to alleviate pain and to prevent vertebral collapse after fresh osteoporotic vertebral fracture. *J Bone Miner Metab*, 34: 86-91, 2016.
- 48) Jakob F, Oertel H, Langdahl B, Ljunggren O, Barrett A, Karras D, Walsh JB, Fahrleitner-Pammer A, Rajzbaum G, Barker C, Lems WF, Marin F: Effects of teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis pre-treated with bisphosphonates: 36-month results from the European Forsteo Observational Study. *Eur J Endocrinol*, 166: 87-97, 2012.
- 49) Tsuda M, Beggs S, Salter MW, Inoue K: Microglia and intractable chronic pain. *Glia*, 61: 55-61, 2013.

- 50) Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ: Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*, 13: 533-548, 2014.
- 51) Inoue K, Tsuda M: Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*, 19: 138-152, 2018.
- 52) Masuda T, Iwamoto S, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Nishiyama A, Mak TW, Tamura T, Tsuda M, Inoue K: Transcription factor IRF5 drives P2X4R+-reactive microglia gating neuropathic pain. *Nat Commun*, 5: 3771, 2014.
- 53) Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR: Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol*, 14: 217-231, 2014.
- 54) Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, Klein M, Blank T, Yona S, Wolf Y, Mack M, Pinteaux E, Müller W, Zipp F, Binder H, Bopp T, Prinz M, Jung S, Waisman A: Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*, 43: 92-106, 2015.
- 55) Konishi H, Okamoto T, Hara Y, Komine O, Tamada H, Maeda M, Osako F, Kobayashi M, Nishiyama A, Kataoka Y, Takai T, Udagawa N, Jung S, Ozato K, Tamura T, Tsuda M, Yamanaka K, Ogi T, Sato K, Kiyama H: Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *Embo j*, 39: e104464, 2020.
- 56) Donnelly CR, Andriessen AS, Chen G, Wang K, Jiang C, Maixner W, Ji RR: Central Nervous System Targets: Glial Cell Mechanisms in Chronic Pain. *Neurotherapeutics*, 17: 846-860, 2020.
- 57) Orita S, Ohtori S, Koshi T, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K: The effects of risedronate and exercise on osteoporotic lumbar rat vertebrae and their sensory innervation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 35: 1974-1982, 2010.
- 58) Sarajari S, Oblinger MM: Estrogen effects on pain sensitivity and neuropeptide expression in rat sensory neurons. *Exp Neurol*, 224: 163-169, 2010.
- 59) Zheng XF, Li B, Zhang YH, Yang YH, Meng XY, Jiang SD, Jiang LS: Blockade of substance P receptor attenuates osteoporotic pain, but not bone loss, in ovariectomized mice. *Menopause*, 20: 1074-1083, 2013.
- 60) Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, Yan JY, Lin Q, Willis WD: Calcitonin gene-

related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol*, 92: 2859-2866, 2004.

- 61) Xu T, Li D, Zhou X, Ouyang HD, Zhou LJ, Zhou H, Zhang HM, Wei XH, Liu G, Liu XG: Oral Application of Magnesium-L-Threonate Attenuates Vincristine-induced Allodynia and Hyperalgesia by Normalization of Tumor Necrosis Factor- α /Nuclear Factor- κ B Signaling. *Anesthesiology*, 126: 1151-1168, 2017.
- 62) Hou S, Duale H, Rabchevsky AG: Intrasprouting of unmyelinated pelvic afferents after complete spinal cord injury is correlated with autonomic dysreflexia induced by visceral pain. *Neuroscience*, 159: 369-379, 2009.
- 63) Zhou LJ, Peng J, Xu YN, Zeng WJ, Zhang J, Wei X, Mai CL, Lin ZJ, Liu Y, Murugan M, Eyo UB, Umpierre AD, Xin WJ, Chen T, Li M, Wang H, Richardson JR, Tan Z, Liu XG, Wu LJ: Microglia Are Indispensable for Synaptic Plasticity in the Spinal Dorsal Horn and Chronic Pain. *Cell Rep*, 27: 3844-3859.e3846, 2019.
- 64) Zhang J, Mai CL, Xiong Y, Lin ZJ, Jie YT, Mai JZ, Liu C, Xie MX, Zhou X, Liu XG: The Causal Role of Magnesium Deficiency in the Neuroinflammation, Pain Hypersensitivity and Memory/Emotional Deficits in Ovariectomized and Aged Female Mice. *J Inflamm Res*, 14: 6633-6656, 2021.
- 65) Löken LS, Braz JM, Etlin A, Sadeghi M, Bernstein M, Jewell M, Steyert M, Kuhn J, Hamel K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum A: Contribution of dorsal horn CGRP-expressing interneurons to mechanical sensitivity. *Elife*, 10, 2021.
- 66) Zhang L, Xie R, Yang J, Zhao Y, Qi C, Bian G, Wang M, Shan J, Wang C, Wang D, Luo C, Wang Y, Wu S: Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from Sox2-positive satellite cells. *Glia*, 67: 1062-1075, 2019.
- 67) Walmsley M, Butler DM, Marinova-Mutafchieva L, Feldmann M: An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis. *Immunology*, 95: 31-37, 1998.
- 68) Thier M, Hall M, Heath JK, Pennica D, Weis J: Trophic effects of cardiotrophin-1 and interleukin-11 on rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Brain Res Mol Brain Res*, 64: 80-84, 1999.

- 69) Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I: Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist*, 16: 519-531, 2010.
- 70) Ji RR, Berta T, Nedergaard M: Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154 Suppl 1: S10-s28, 2013.