

学位論文

「Elevation of microglial basic fibroblast growth factor contributes to development of neuropathic pain after spinal nerve ligation in rats (ラット神経障害性疼痛モデルにおけるミクログリア由来 bFGF は神経障害性疼痛の発症に関与する)」

DM13033 藤巻 寿子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 目

【はじめに】神経障害性疼痛は帯状疱疹後神経痛や糖尿病性神経障害に代表される神経損傷、機能障害によって生じる痛みであるが、その発症維持メカニズムは依然として不明であり治療に難渋する。

近年、脊髄におけるミクログリア細胞と神経栄養因子が、神経障害性疼痛の発症に関わることが明らかにされている。すでに、神経栄養因子の 1 つである塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が脊髄アストロサイトの活性化を通して慢性期の神経障害性疼痛の発現に関与することが報告され、神経障害慢性期において重要な役割を持つことが明らかになった。しかし脊髄ミクログリアにおけるその役割は明らかにされていない。本研究の目的は、ラット脊髄神経結紮モデルにおける bFGF のミクログリア細胞活性を介する神経障害性疼痛発現機構を明らかにすることである。

【方法】

動物モデル作製：脊髄神経を結紮して神経障害性疼痛モデル (Chung モデル) を作製した。麻酔下に 6 週齢 SD ラットの左第 5 腰髄神経を露出し、絹糸で結紮した。結紮直後から脊髄腔内に bFGF 中和抗体 50 μ g/40 μ l を週 2 回投与した群 (bFGF 中和群)、神経結紮のみの群 (神経結紮群)、および無処置群の比較を行った。

疼痛発現評価：ラットの患肢足底を、0.008~300 g の圧力を加えることができるフィラメントで刺激し、ラットが逃避反応を起こす閾値を測定する von Fray test を行った。

遺伝子発現評価：RT-PCR を用いて脊髄の遺伝子発現の検討を行った。Chung モデル作製 6 時間、1,3,7,14,28 日後にラット脊髄腰膨大部を採取した。トリゾル溶液を用いて RNA を抽出後、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。神経障害に伴う活性化グリア細胞および疼痛関連物質発現の検討を目的にミクログリアマーカー (Iba1)、炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-6、bFGF、および神経障害作用のあるミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase, MPO) の遺伝子発現を検討した。

組織学的評価：脊髄における Iba1、bFGF、MPO の局在を検討するために蛍光二重免疫組織化学染色を行った。

【結果】神経結紮群において結紮後 3 日に急激なアロデニアの進行を認めその発現は術後 4 週間まで持続した。また結紮後 6 時間の RT-PCR で脊髄における bFGF の有意な増加を認め、結紮後 3 日に Iba1、MPO の増加が認められた。免疫組織染色では脊髄後角に Iba1 陽性細胞の集積を認め、それらは bFGF、MPO 陽性であった。一方、bFGF 中和群では投与後 3 日からアロデニアが有意に抑制されその効果は術後 4 週まで持続した。また RT-PCR における MPO 発現抑制と脊髄後角での MPO 陽性細胞の有意な減少を認めた。

【考察】本研究では神経障害直後の脊髄においてミクログリア由来 bFGF が増加することが明らかになった。また bFGF の中和は、脊髄ミクログリア由来 MPO 発現抑制を通じてアロデニアの進行を抑制することが示された。MPO は活性酸素種を産生し、細胞障害作用を持つ事が報告されている。本実験の結果からミクログリア由来 bFGF は MPO 介して神経障害性疼痛の進行に関与する可能性が示唆された。神経障害初期の bFGF の制御は神経障害性疼痛治療のターゲットになるかもしれない。

目次

| | 頁 |
|---|----|
| 1. 序論 | 2 |
| 2. 方法 | |
| 2-1. ラット神経傷害性疼痛モデルの作製 | 2 |
| 2-2. bFGF 発現の検討 | 3 |
| 2-3. bFGF 中和抗体投与がアロデニア発症に与える影響 | 3 |
| 2-4. bFGF 中和抗体投与による活性化ミクログリアおよび 炎症性誘発因子遺伝子発現への影響 | 3 |
| 2-5. 免疫組織化学染色 | 4 |
| 2-6. 統計学的処理 | 4 |
| 3. 結果 | |
| 3-1. 神経障害性疼痛モデルにおける脊髄 bFGF 発現および局在 | 4 |
| 3-2. bFGF 中和抗体がアロデニア発現に及ぼす影響 | 4 |
| 3-3. bFGF 中和抗体がミクログリア活性および炎症誘発因子発現に及ぼす影響 | 5 |
| 3-4. 脊髄における MPO の局在 | 5 |
| 4. 考察 | 5 |
| 5. 総括 | 6 |
| 6. 今後の課題 | 6 |
| 7. 謝辞 | 7 |
| 8. 引用文献 | 8 |
| 9. 図表説明 | 10 |
| 10. 業績目録 | 11 |
| 11. 図表 | 15 |

本 文

1. 序論

神経障害性疼痛は末梢または中枢の体性感覚系の障害によって引き起こされる。軽度な痛みに対する感受性が亢進する痛覚過敏、刺激非依存性の自発痛、本来痛みとして認識されない軽度の刺激を激痛として認識するアロデニアに代表される症状を呈し、既存の鎮痛薬が奏功しない難治性の疾患である¹。

知覚神経の侵害受容器で感知された痛み刺激は、一次求心性線維を介して脊髄後角に伝達され、二次ニューロンを介して脊髄を上行して脳へ伝えられる。脊髄後角でのニューロンを介する痛み伝達は、脊髄に存在するグリア細胞の働きの影響を受けると考えられている²。さらに、グリア細胞は末梢神経障害後に活性化し、神経活動に影響を及ぼす物質を放出し神経障害性疼痛の発症と維持に関与することが報告されている²。神経損傷によって脊髄グリア細胞が活性化し、活性化したグリア細胞由来因子が神経障害性疼痛発現に関与する機序が想定されているが、グリア細胞の活性を制御する因子は十分に明らかになっていない。

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)は、22種類のFGFファミリーの一つである³。ラット神経障害性疼痛モデルにおいて、末梢神経障害から3週間後の脊髄でbFGFの発現が上昇すること⁴、このモデルにbFGF中和抗体を髄内投与するとアロデニア発症の抑制と、アストロサイト活性の抑制を認めることから、bFGFは脊髄アストロサイトの活性化を介してアロデニアの維持に関わる可能性が報告されている⁵。

一方、神経障害直後にミクログリアが活性化することもわかっている⁶。また通常ではミクログリアは突起をもつramified型として存在しているが、in vitro におけるbFGF刺激はramified型からameboid型への形態変化を促進することが明らかになっている⁷。しかし、ミクログリアがbFGFを介してアロデニアの発症に関わるか否かはわかっていない。

活性化ミクログリアはinterleukin1- β (IL1 β)、interferon- γ (IFN γ)、tumor necrosis factor- α (TNF α)、ミエロペルオキシターゼ (myeloperoxidase: MPO) など因子を産生し⁸、疼痛の発症に寄与すると考えられている。しかし、bFGFを介したこれらの炎症物質発現およびアロデニア発症の関係は明らかにされていない。

本研究では、脊髄ミクログリアはbFGFの発現を介して神経障害性疼痛の発症に関与するのではないかと仮説を立て、ラット神経障害性疼痛モデルの脊髄におけるbFGFの発現、および神経障害性疼痛への関与を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2-1. ラット神経障害性疼痛モデルの作製

全ての動物実験は北里大学医学部動物倫理委員会の承認を得て行った。本実験では6週齢のSprague Dawley rats (190–240 g)をラット神経障害性疼痛モデル作製に用いた⁹。全身麻酔下にラットを伏臥位にし、腸骨稜を確認し背側正中線を切開した。筋肉を剥離し、第6腰椎左横突起を除去した。直下にある左第5腰髄神経を露出し腰髄神経を6-0シルク糸で強固に結紮した(神経結紮=SpNL)。筋膜および皮膚を縫合しモデル作製を終了とした(N=6)。

2-2. bFGF 発現の検討

左第 5 腰髄神経の神経結紮前 (Pre) と、神経結紮後 6、12、24 時間、3 日後、7 日後の脊髄における bFGF mRNA 発現の検討を行った (各群 N=6)。

全身麻酔下にラットを伏臥位にし、背側正中線を切開した。棘突起を切除した後に脊柱管を縦割し脊髄腰膨大部を摘出した。トリゾル (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1000 μ l を加えホモジェナイズした後に RNA 層と有機溶媒層に分離させた。RNA 層にイソプロパノール、Ethachinmate (Wako Pharmaceutical, Japan)、エタノールを加えて RNA を抽出した。抽出した RNA は SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR の取扱説明書 (Invitrogen) のプロトコールに従って逆転写反応を行い cDNA を作製した。bFGF, GAPDH, TNF α および IL6 は過去に報告されている配列に従って作成した。配列は下記の通りである¹⁰ (表 1)。Iba1 と MPO のプライマー配列は Primer Blast software (National Center for Biotechnology Information) を用いて決定した。

Real Time PCR 法は Real-Time PCR Detection System のプロトコールに従って行った。作成した cDNA に、特異的プライマー、SYBER GREEN (Takara, , Japan) を加え、Real-Time PCR Detection System (CFX-96; Bio-Rad, CA, USA) を使用して PCR を行った。mRNA 発現量は GAPDH で標準化し評価した。

2-3. bFGF 中和抗体投与がアロデニア発症に与える影響

神経結紮モデルにおいて、bFGF 中和抗体がアロデニア発症に与える影響を検証した。ハミルトンシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) を用いて、bFGF 中和抗体 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 μ g/40 μ l を全身麻酔下に第 5、6 椎間から髄腔内に注射した (SpNL+Ab 群 N=6)。神経結紮直後から週 2 回の間隔で投与した。投与量、投与間隔は先行論文に従って決定した⁵。また過去に報告されている髄腔内注射手技として、髄腔内に液体が注入された際にラット尾部が反応性に動くことを、髄腔内投与成功の指標とした¹²。PBS (Phosphate Buffered Saline) 40 μ l を髄腔内に注射した群をコントロール群とした (SpNL 群 N=6)。アロデニア発現は、患肢足底へ von Frey filament による機械刺激を与え、刺激に対する患肢逃避閾値を up-down 法により評価した¹¹。ラットをメッシュ板の上に乗せ 30 分間、環境に順応させた後に、メッシュ板の床面下からフィラメントをラットの患肢足底部にフィラメントに接触させた。フィラメント刺激によりラットが患肢を持ち上げる行動の有無を観察した。評価はブラインド下に同一検者で行った。

2-4. bFGF 中和抗体投与による活性化ミクログリアおよび炎症誘発因子遺伝子発現への影響
神経結紮モデルに、bFGF 中和抗体 (SpNL+Ab 群) を投与後 1、3 日目に脊髄を採取し、ミクログリアマーカー Ionized calcium binding adapter molecule1 (iba1)、炎症性サイトカイン TNF α , IL6, および活性酸素の代謝酵素の MPO の遺伝子発現を RT-PCR を用いて検討した。PBS を投与した個体をコントロールとして用いた (SpNL 群)。

2-5. 免疫組織化学染色

脊髄における bFGF および炎症誘発因子発現の局在の検討を目的に免疫組織化学染色を行った。

全身麻酔下にラットを開胸し心臓より 4%paraformaldehyde を還流させ組織固定を行った。脊髄を摘出し 4℃で 24 時間 4%paraformaldehyde に浸漬固定後、20%スクロースを用いて 4℃で 24 時間固定後した。O.C.T.compound (Tissue Tek, Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に脊髄組織を包埋し凍結させた。20 μ m 厚の脊髄切片を薄切しスライドにはりつけた。

PBS で洗浄後、1%スキムミルクで 20 分間ブロッキングした。一次抗体反応では抗 bFGF 抗体 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 MPO 抗体 (1:200; Santa Cruz)、抗 Iba1 抗体 (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA) を切片に添加し 4℃で 7 時間反応させた。二次抗体反応では AlexaFlour488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG、Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) を 1000 倍希釈して添加し室温で 1 時間反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

2-6. 統計学的処理

SPSS ソフト (version 11.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いてすべての解析を行った。一元配置分散分析後、Fisher の最小有意差法を用いて神経結紮前後での比較をおこなった。Levene 検定による等分散検定後、 $p < 0.05$ の場合は Kruskal-Wallis 検定、Mann-Whitney U 検定を用いて神経結紮群と bFGF 中和群間の比較を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 神経障害疼痛モデルにおける脊髄 bFGF 発現および局在

ラット第 5 腰髄神経を結紮した神経障害性疼痛モデルの脊髄腰膨大部における bFGF の mRNA 発現量を検証した。神経結紮から 6 時間で脊髄における bFGF mRNA の発現が有意に増加した ($p < 0.05$) (図 1)。

タンパク質レベルでの bFGF 発現を蛍光免疫組織染色で検証した。

神経結紮後 1 日目の脊髄後角においてミクログリアマーカーである iba1 と共染色する bFGF 陽性細胞の発現増加を認めた。(図 2 B)。一方、神経結紮前では bFGF 陽性細胞はほぼ認められなかった (図 2 A)。

3-2. bFGF 中和抗体がアロデニア発症に及ぼす影響

脊髄における bFGF 発現の増加がアロデニア発現に関与しているかを検討するために、bFGF 中和抗体を神経結紮後の脊髄腔内に投与した。

SpNL 群では神経結紮 1 日後から患肢逃避閾値の低下を認め、その低下は 28 日間持続した。

SpNL+Ab 群では投与後 1 日から閾値低下の抑制を認めその効果は 14 日間持続した(図 3)。

3-3.bFGF 中和抗体がミクログリア活性および炎症誘発因子発現に及ぼす影響

bFGF 中和抗体によりアロデニア発現が抑制された結果を踏まえ、神経障害時の脊髄内における炎症誘発因子の mRNA 発現を RT-PCR を用いて検討した。

PBS を投与した群(SpNL 群)において神経結紮後 3 日目に MPO mRNA 発現が増加したが、bFGF 中和抗体投与により有意に発現の抑制を認めた($p < 0.05$)。一方、SpNL 群では iba1、TNF α 、IL6 mRNA 発現上昇を認めたが、bFGF 中和抗体投与による抑制は認められなかった。

3-4.脊髄における MPO の局在

神経結紮後の脊髄に bFGF 中和抗体を投与すると、MPO mRNA の発現が抑制される可能性が示唆されたため、神経結紮後の脊髄における MPO タンパク質発現を蛍光免疫組織染色を用いて検討した。

SpNL 群では神経結紮後 1 日目の脊髄後角において MPO 発現の増加を認め、iba1 と共染色が認められた(図 5)。一方 SpNL+Ab 群では iba1 陽性細胞を認めるものの、MPO 陽性 iba1 陽性細胞の減少を認めた。

同様に SpNL 群では神経結紮後 3 日目では iba1、MPO 陽性細胞の増加を認めたが、SpNL+Ab 群では iba1 陽性細胞を認めるものの、MPO 陽性 iba1 陽性細胞の減少を認めた。

4. 考察

本研究では、ラット神経障害性疼痛モデルの脊髄において早期にミクログリア由来 bFGF 発現が増加することを明らかにした。さらに bFGF 中和抗体投与によってアロデニア発症の抑制を認めた。

また、神経結紮後に脊髄ミクログリアが MPO を発現し、bFGF 中和抗体により MPO 発現が抑制された。以上から bFGF はミクログリア由来 MPO 発現を通してアロデニア発症に関与する可能性が示唆された。

これまでに、神経障害後 1~3 週間で脊髄における bFGF の発現増加を認め、bFGF は活性化アストロサイトを介してアロデニア発症に関与することがラット神経障害性疼痛モデルを用いた実験で報告されている^{4,5}。また、髄内に bFGF を注入すると活性化アストロサイトマーカー発現上昇と痛覚過敏を認めたと報告されている¹³。bFGF の過剰な発現は侵害受容機能を活性化させる¹⁴とも報告されている。本実験でも神経結紮後 28 日で bFGF 発現の増加を認めていることからこれまでの報告と同様に bFGF はアロデニア発現の維持に関わる可能性が示された。さらに神経結紮から 6 時間と、早い段階で bFGF 発現の増加を認めていることから、早期の bFGF 発現はアロデニアの発症に重要な役割を持つ可能性が想定された。

本実験での蛍光免疫組織染色では、神経障害後早期に発現する bFGF はミクログリアマーカーである iba1 と共染色される結果であった。正常では脱髄に伴ってニューロン由来 bFGF mRNA が発現しているが、神経損傷時では bFGF の発現はミクログリア由来にシフトするといわれている¹⁵。

また、ラット中枢神経損傷モデルあるいは脳脊髄炎モデルではミクログリア由来 bFGF 発現の上昇を認めることが報告されている^{15, 16}。加えて、bFGF mRNA の発現は脳損傷後 4 時間で認めるといわれている¹⁶。本実験では末梢神経結紮後の脊髄においてミクログリア由来 bFGF の発現上昇を明らかにした。中枢神経損傷および脳脊髄炎モデルだけではなく、神経障害性疼痛モデルにおいてもミクログリア由来 bFGF の発現が上昇することが明らかになった。このことから、神経結紮後早期のミクログリア由来 bFGF の発現はアロデニア発症に寄与する可能性が示唆された。

bFGF 中和によるアロデニア発症抑制のメカニズムを明らかにするために、われわれはミクログリア活性とミクログリア由来炎症誘発因子の発現を検証した。

ミクログリアは炎症誘発因子を産生し中枢性過敏を促進する^{8, 17, 18}ことから、bFGF は炎症誘発因子の発現制御を介してアロデニア発症に関与すると想定した。bFGF 中和抗体による iba1、IL6 および TNF α mRNA の発現に影響は認めなかったが、一方 iba1 と共染色される MPO のタンパク質および mRNA 発現は bFGF 中和抗体によって抑制される結果であった。活性酸素種は神経損傷に伴う痛みの発生に関与すると言われている¹⁹。MPO は活性酸素種の 1 つで、脳神経障害につながる酸化障害作用を持つ^{20, 21, 22}。正常な脳では発現しないが、神経変性疾患ではミクログリアが MPO を発現することが報告されている²³。一方、近年、bFGF が酸化還元反応を制御するともいわれている²⁴。以上から bFGF は活性化ミクログリアにおける MPO 発現を介して、アロデニア進行に関わる可能性が示された。

5. 総括

本研究では神経結紮後早期に脊髄ミクログリア由来 bFGF 発現が増加し、bFGF 中和抗体の投与はアロデニア進行を抑制することが明らかとなった。その機序としてミクログリア由来 MPO 発現抑制の関与が示唆された。

6. 今後の課題

本実験から神経障害後早期のミクログリア由来 bFGF 制御は神経障害性疼痛モデルにおけるアロデニア発症に重要な役割を持つことが示された。一方で、bFGF 中和が完全にアロデニアの発症を抑えられなかったことから、ミクログリア活性に関わる他因子を考慮したメカニズムの解明が必要と考え、細胞および動物モデルでの実験を予定している。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり始終御指導を賜りました、北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄准教授、内田健太郎講師に心から感謝いたします。

また多大なる御協力と御助言を賜りました 北里大学医学部整形外科学研究室の皆様深く感謝いたします。

8. 引用文献

- (1) Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 2013;154 Suppl 1:S10-28.
- (2) Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 2007;10:1361-8.
- (3) Woodbury ME, Ikezu T. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014;9:92-101.
- (4) Madias F, Hussain SR, Goettl VM, Burry RW, Stephens RL Jr, Hackshaw KV. Upregulation of FGF-2 in reactive spinal cord astrocytes following unilateral lumbar spinal nerve ligation. *Exp Brain Res* 2003;148:366-76.
- (5) Madias F, Goettl VM, Hussain SR, Clairmont AR, Stephens RL Jr, Hackshaw KV. Anti-fibroblast growth factor-2 antibodies attenuate mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *J Mol Neurosci* 2005;27:315-24.
- (6) Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 2004;45:397-407.
- (7) Di Pucchio T, Ennas MG, Presta M, Lauro GM. Basic fibroblast growth factor modulates in vitro differentiation of human fetal microglia. *Neuroreport* 1996;4:7:15-7.
- (8) Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res* 2013;6:803-814.
- (9) Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50:355-63.
- (10) Yamada T, Uchida K, Onuma K, Kuzuno J, Ujihira M, Inoue G, et al. Hydrogen supplementation of preservation solution improves viability of osteochondral grafts. *Scientific World Journal* 2014;2014:109876.
- (11) Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55-63.
- (12) Mestre C, Pelissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994;32:197-200.
- (13) Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Decosterd I. Possible role of spinal

- astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol* 2006;2:259-69.
- (14) Romero MI, Rangappa N, Garry MG, Smith GM. Functional regeneration of chronically injured sensory afferents into adult spinal cord after neurotrophin gene therapy. *J Neurosci* 2001;21:8408-16.
 - (15) Liu X, Mashour GA, Webster HF, Kurtz A. Basic FGF and FGF receptor 1 are expressed in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis: temporally distinct expression of midkine and pleiotrophin. *Glia* 1998;24:390-7.
 - (16) Frautschy SA, Walicke PA, Baird A. Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury. *Brain Res* 1991;553:291-9.
 - (17) Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 1996;16:2508-21.
 - (18) Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997;78:97-107.
 - (19) Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, et al. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 2011;152:844-52.
 - (20) Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598-625.
 - (21) Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000;7:53-8.
 - (22) Maki RA, Tyurin VA, Lyon RC, Hamilton RL, DeKosky ST, Kagan VE, et al. Aberrant expression of myeloperoxidase in astrocytes promotes phospholipid oxidation and memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2009;284:3158-3169.
 - (23) Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, et al. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1999;155:31-41.
 - (24) Farrell SM, Groeger G, Bhatt L, Finnegan S, O'Brien CJ, Cotter TG. bFGF-mediated redox activation of the PI3K/Akt pathway in retinal photoreceptor cells. *Eur J Neurosci* 2011;33:632-41.

9. 図表説明

図 1 神経結紮後の脊髄における bFGF mRNA 発現の検討

結紮前と比較して神経結紮後 6 時間で有意に発現の増加を認めた。

図 2 蛍光免疫組織染色を用いた脊髄における bFGF 発現の局在の検討

A. 神経結紮前では脊髄後角における bFGF 陽性細胞の発現をわずかに認めた。

B. 神経結紮後 1 日では bFGF 陽性 iba1 陽性細胞の発現増加を認めた。

(Scale bar=100 μ m)

図 3 bFGF 中和抗体が神経傷害性疼痛モデルのアロデニア発症に与える影響

神経結紮群では神経結紮から 28 日間、アロデニア発症および進行を認めた。

一方、bFGF 中和抗体群では神経結紮後 1~14 日の間アロデニア発現が有意に抑制された。

図 4 神経結紮、および bFGF 中和抗体が脊髄ミクログリアおよび炎症誘発因子の発現に与える影響

MPO mRNA は神経結紮後 3 日の間に増加したが bFGF 中和群では発現が抑制された。一方、神経結紮群では iba、TNF α 、IL6mRNA 発現の増加を認められたが、bFGF 中和群で発現抑制は認めなかった。

A. mRNA は神経結紮前と比較して結紮後 1.3 日で有意に増加した。

B. 神経結紮群は bFGF 中和群と比較して有意に発現が増加した。

図 5 蛍光免疫組織染色を用いた脊髄における MPO 発現の局在の検証

A-C, 神経結紮前ではわずかに認める MPO 陽性細胞は iba1 と共染色された。

D-F, 神経結紮 1 日後、MPO 陽性 iba1 陽性細胞発現の増加を認めた。

J-L, 神経結紮 3 日後、MPO 陽性 iba1 陽性細胞発現の増加を認めた。

G-I, M-O, bFGF 中和群では神経結紮 1.3 日後ともに MPO 陽性 iba1 陽性細胞発現の抑制を認めた。

(Scale bar=100 μ m)

10. 業績目録

(I) 主学術論文 (英文原著)

- ◎1. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Sato A, Takaso M :
Elevation of Microglial Basic Fibroblast Growth Factor Contributes to
Development of Neuropathic Pain after Spinal Nerve Ligation in Rats.
Spine,41(3):108-115,2016.

(II) 主学術論文以外の論文

1. Inoue G, Uchida K, Matsushita O, Fujimaki H, Saito W, Miyagi M, Sekiguchi H, Nishi N, Ohtori S, Yogoro M, Takaso M : Effect of Freeze-Dried Allograft Bone with Human Basic Fibroblast Growth Factor Containing a Collagen-Binding Domain From Clostridium Histolyticum Collagenase on Bone Formation After Lumbar Posterolateral Fusion Surgery in Rats. Spine, in press
2. Minatani A, Uchida K, Inoue G, Takano S, Aikawa J, Miyagi M, Fujimaki H, Iwase D, Onuma K, Matsumoto T, Takaso M : Activation of calcitonin gene-related peptide signaling through the prostaglandin E2-EP1/EP2/EP4 receptor pathway in synovium of knee osteoarthritis patients. J Orthop Surg Res,11:117,2016.
3. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Fujimaki H, Aikawa J, Iwase D, Minatani A, Iwabuchi K, Takaso M : Nerve Growth Factor Regulation by TNF-alpha and IL-1beta in Synovial Macrophages and Fibroblasts in Osteoarthritic Mice. J Immunol Res,5706359,2016.
4. Fujimaki H, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Nemoto N, Saku T, Isobe Y, Inage K, Matsushita O, Yagishita S, Sato J, Takano S, Sakuma Y, Ohtori S, Takahashi K, Takaso M : Oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor promote peripheral nerve regeneration in a 15 mm sciatic nerve defect rat model. J Biomed Mater Res A,2016
5. Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Saito W, Aikawa J, Tanaka K, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M : Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(pro-hyp-gly)10 and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from Clostridium histolyticum collagenase. J Biomed Mater Res A,104:1372-1378,2016.
6. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Aikawa J, Fujimaki H, Minatani A,

- Sato M, Iwabuchi K, Takaso M : Synovial macrophage-derived IL-1beta regulates the calcitonin receptor in osteoarthritic mice. Clin Exp Immunol,183:143-149,2016.
7. Yamada T , Uchida K , Onuma K , Inoue G , Aikawa J , Takano S , Sekiguchi H , Fujimaki H , Miyagi M , Takaso M : Hyaluronic Acid (800 kDa) Supplementation of University of Wisconsin Solution Improves Viability of Osteochondral Grafts and Reduces Matrix Metalloproteinase Expression during Cold Preservation. Scientific World Journal,631369, 2015.
 8. Saito W , Uchida K , Matsushita O , Inoue G , Sekiguchi H , Aikawa J , Fujimaki H , Takaso M : Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. J Orthop Surg Res,10:59,2015.
 9. Onuma K , Shintani R , Fujimaki H , Sukegawa K , Kenmoku T , Uchida K , Takahira N , Takaso M : Total wrist arthrodesis with wrist fusion rod in patients with rheumatoid arthritis. Eklem Hastalik Cerrahisi,26:41-48,2015.
 10. Onuma K , Fujimaki H , Kenmoku T , Sukegawa K , Takano S , Uchida K , Takahira N , Takaso M : Bilateral carpal tunnel syndrome due to gouty tophi: conservative and surgical treatment in different hands of the same patient.Mod Rheumatol,25:298-302,2015.
 11. Saito W , Uchida K , Ueno M , Matsushita O , Inoue G , Nishi N , Ogura T , Hattori S , Fujimaki H , Tanaka K , Takaso M : Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from Clostridium histolyticum collagenase. J Biomed Mater Res A,102:3049-3055,2014.
 12. Fujimaki H , Nakazawa T , Ueno M , Imura T , Saito W , Takahira N , Takaso M : Spinal subarachnoid hematoma in a woman with HELLP syndrome: a case report. J Med Case Rep, 6:152,2012.

(Ⅲ) 抄録

1. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Takaso M. Nerve reconstruction with oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor. 43rd Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine 2016.
2. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Sekiguchi H, Jun Aikawa J, Saito W, Takaso M: Transforming Growth Factor-Activated Kinase 1 induces an

- inflammatory response in spinal microglia in vitro. 43rd Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine 2016.
3. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Takaso M. Usefulness of oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor for the treatment of large peripheral nerve defect. The International Association for the Study of Pain 2016.
 4. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Takaso M. Microglial basic fibroblast growth factor contributes neuropathic pain via myeloperoxidase production. 第 45 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2016.
 5. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、高相晶士. TAK1 による脊髄ミクログリア活性制御機構の解明. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016
 6. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、大鳥精司、高相晶士. 細胞配向性コラーゲンチューブによる末梢神経再生—ナーブリッジ®との比較検討—. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016
 7. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、高相晶士. TAK1 を介した脊髄ミクログリア活性メカニズムの解明. 第 9 回日本運動器疼痛学会 2016
 8. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Sekiguchi H, Aikawa J, Saito W, Takaso M. Role of bFGF released from microglia on neuropathic pain. 42rd Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine 2015.
 9. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、相川淳、齋藤亘、関口裕之、高相晶士. 神経障害性疼痛における塩基性線維芽細胞増殖因子の役割. 第 37 回日本疼痛学会 2015.
 10. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、高相晶士. 細胞配向性コラーゲン人工神経と塩基性線維芽細胞増殖因子を組み合わせた新規人工神経による末梢神経再生の試み. 第 34 回日本運動器移植・再生医学研究会 2015.
 11. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、相川淳、齋藤亘、関口裕之、高相晶士. 神経障害性疼痛におけるミクログリア由来塩基性線維芽細胞増殖因子の役割. 第 30 回日本整形外科基礎学術集会 2015.
 12. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、相川淳、齋藤亘、関口裕之、高相晶士. コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた人工神経による末梢神経再生. 第 30 回日本整形外科基礎学術集会 2015
 13. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、宮城正行、高相晶士. 細胞配向性コラーゲン人工神経に塩基性線維芽細胞増殖因子を組み合わせた人工神経移植による末梢神経再生の試み. 第 8 回日本運動器疼痛学会 2015
 14. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Sekiguchi H, Ueno M, Takahira N, Takaso M. Effect of anti-bFGF neutralizing antibody on neuropathic pain

- induced by spinal nerve ligation in rats. 41rd Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine. 2014.
15. Fujimaki H, Inoue G, Uchida K, Miyagi M, Saito W, Sekiguchi H, Takahira N, Takaso M. Effect of anti-bFGF neutralizing antibody on neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. Changes of microglia activity by basic fibroblast growth factor on neuropathic pain. Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting. 2014.
 16. 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、上野正喜、齋藤亘、中澤俊之、井村貴之、高平尚伸、高相晶士. 神経障害性疼痛における塩基性線維芽細胞増殖因子の役割と効果 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014.

11. 図表

図1

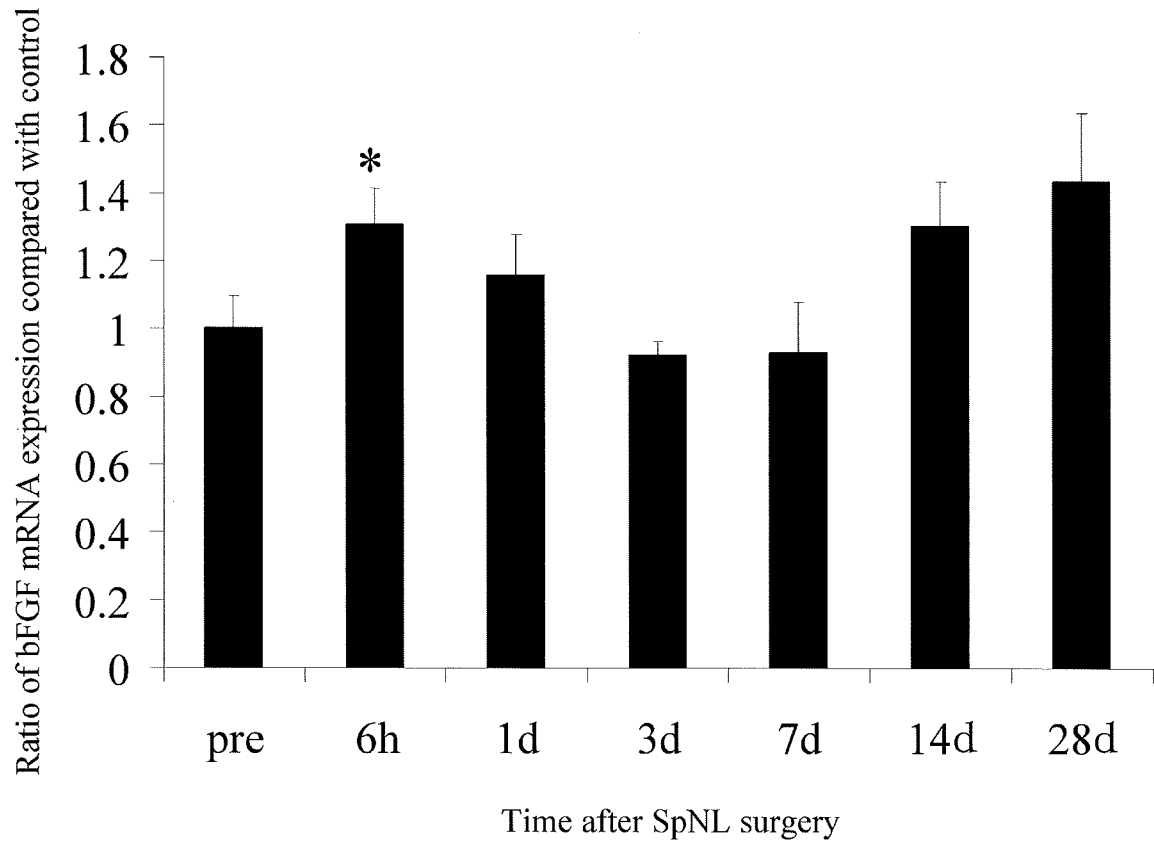
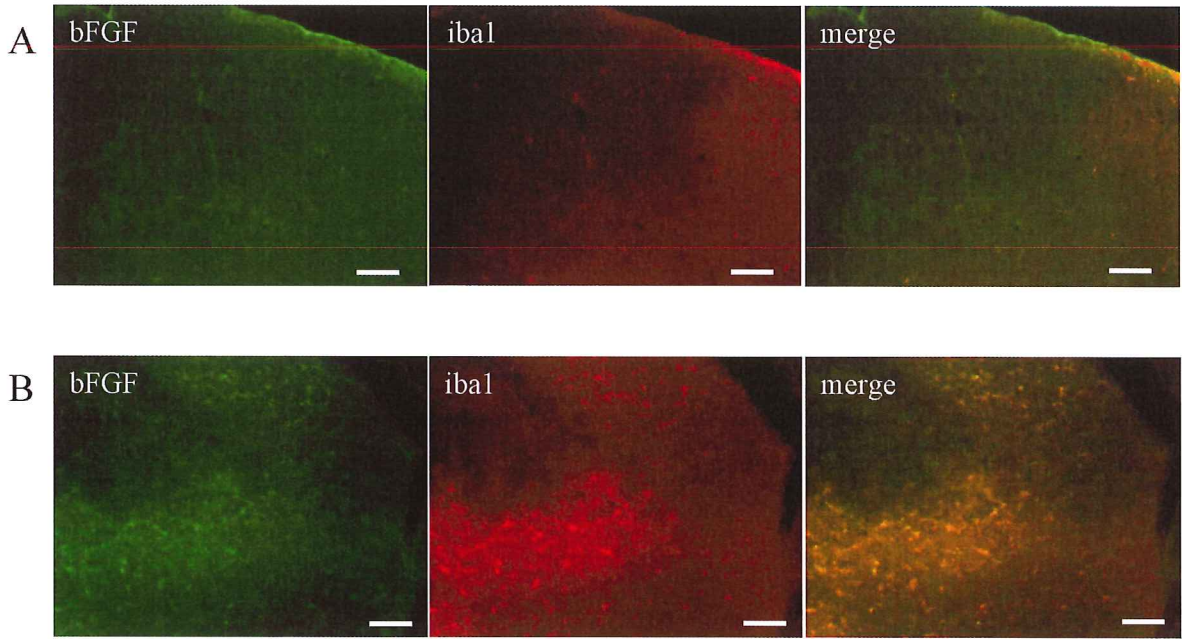
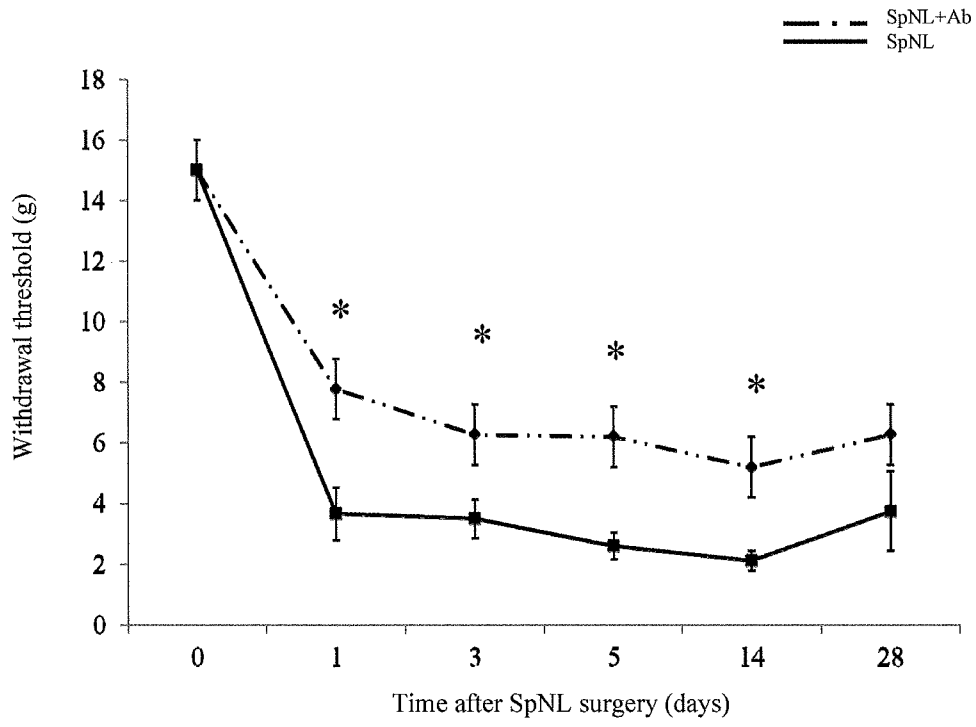


图 2



☒ 3



☒ 4

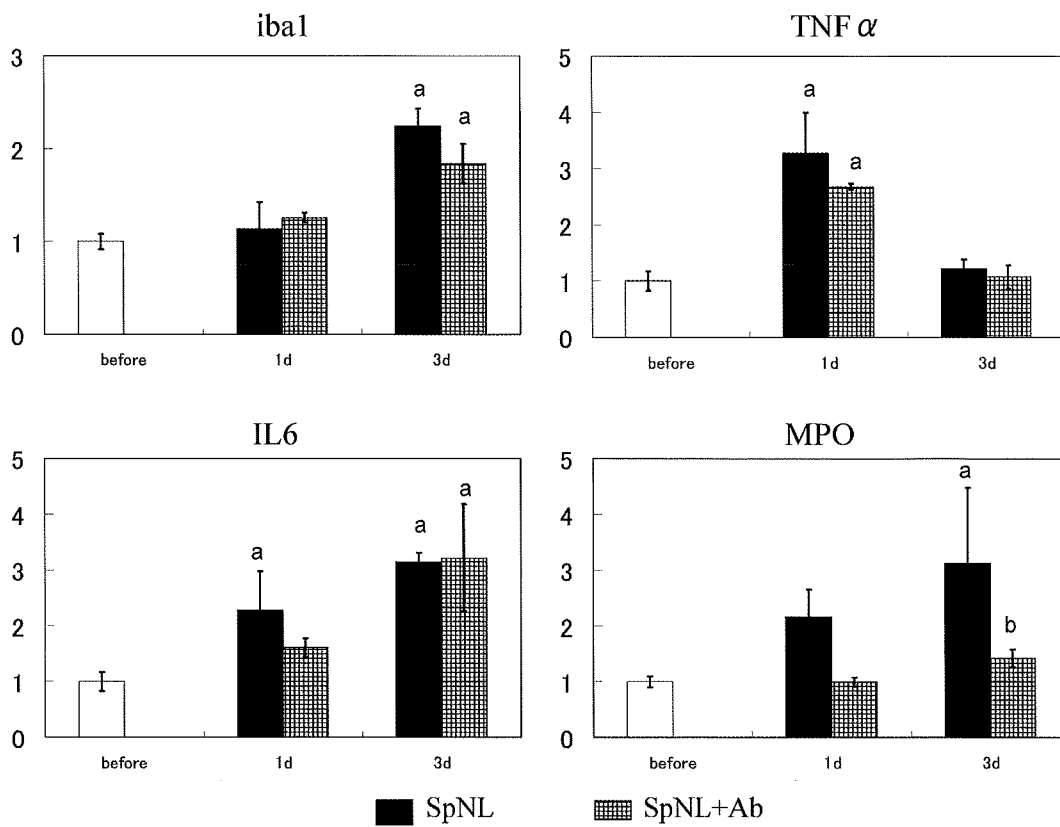


图 5

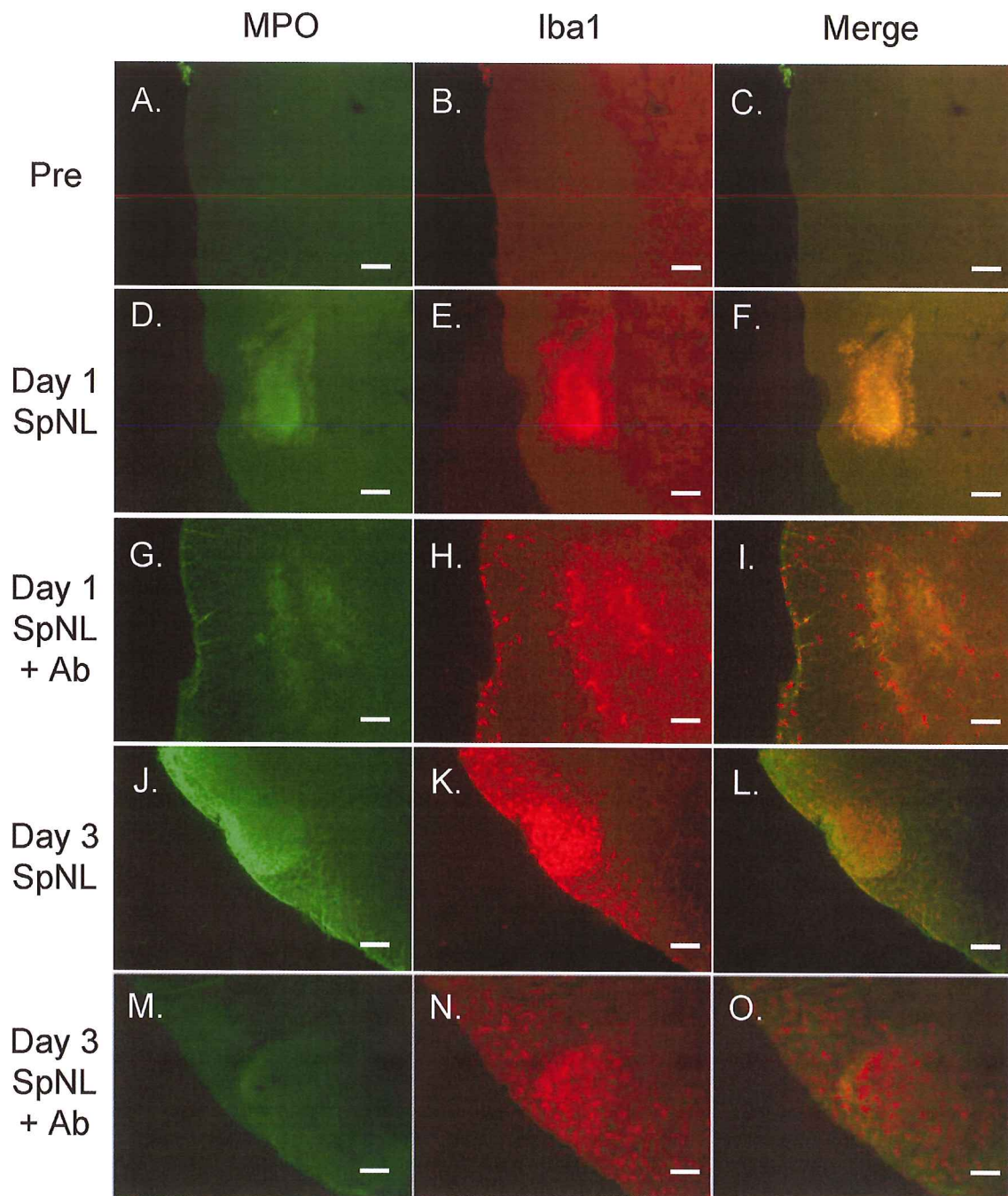


表1. プライマーの塩基配列

| Gene | Direction | Primer Sequence (5'-3') | Product Size (bp) |
|--------------|-----------|-----------------------------|-------------------|
| bFGF | F | TCC AAG CAG AAG AGA GAG GA | 205 |
| | R | TGC CCA GTT GGT TTC AGT G | |
| Iba1 | F | ATG CTG GAG AAA CTT GGG GTT | 191 |
| | R | CCA GTT GGC TTC TGG TGT TCT | |
| TNF α | F | CTCTTCTCATTCCCGCTCGT | 104 |
| | R | GGGAGCCCATTTGGGAACTT | |
| IL6 | F | CCAGTTGCCTTCTTGGGACT | 224 |
| | R | TCTGACAGTGCATCATCGCT | |
| MPO | F | GCCATGCTTCAGACTTCCAC | 120 |
| | R | CCGCTCCTTGTAGGCTTTGT | |
| GAPDH | F | TGC CAC TCA GAA GAC TGT GG | 129 |
| | R | TTCAGCTCTGGGATGACCTT | |