

研究種目：学術創成研究費  
研究期間：2006～2010  
課題番号：18GS0319  
研究課題名（和文） 神経因性疼痛発症メカニズムの解明  
研究課題名（英文） Research for the mechanism of the expression of neuropathic pain  
研究代表者  
井上 和秀（INOUE KAZUHIDE）  
九州大学・大学院・薬学研究院・教授  
研究者番号：80124379

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔蘇生学

キーワード：脳神経疾患、痛み、シグナル伝達、ミクログリア、アストロサイト

### 1. 研究計画の概要

(1)世界にはモルヒネも効きがたい痛み「神経因性疼痛」等に罹患する患者が千数百万人以上も存在し苦しんでいるが、知覚神経損傷後に起こること以外詳細なメカニズムは不明である。本研究の目的は、この「最悪の痛みを引き起こす張本人」がグリアであること、ならびにその発症メカニズムを明らかにする事である。

(2)そのために、グリア細胞がいつ、どこで、どのようにして神経損傷情報を受け取り、その結果何を介して、痛み情報伝達を変調させ、神経因性疼痛を引き起こすのかを、3次元空間および時間軸を正確に把握した4D解析と行動薬理的解析により明らかにする。

### 2. 研究の進捗状況

(1)脊髄ミクログリア活性化の時空解析

L5 脊髄神経損傷モデルで、ミクログリアの活性化をOX42をマーカーとして経時的に確認したところ、痛みの経時変化と一致して、術後7,14日をピークにL5脊髄後角にて活性化が認められた。後角では表層と深層では活性化の程度が異なり、内側では外側よりも活性化が顕著であった。加えて、術後7日目では、L5のみならず、L2～L4およびL6後角でもミクログリアの活性化が確認され、神経損傷の影響が3次元的に敷衍していることが分かった。次に、形態学的特徴から活性化を検討した結果、脊髄ミクログリアは、神経損傷後12時間後から、突起の退縮・肥大化が起こり、24時間後には典型的な活性化型へと変化した。細胞増殖は、末梢神経損傷後28時間後から32時間後にかけて急激に始まり、3.5日後までに終わった。

サイトカインの一種であるインターフェロン(IFN) $\gamma$ が神経障害の後に脊髄後角で増

加し、それがミクログリアを活性化させ、Lyn活性化とP2X<sub>4</sub>過剰発現、痛み惹起という一連のメカニズムを明らかにした。

(2)活性化ミクログリア由来疼痛因子解析

①P2X<sub>4</sub>受容体過剰発現メカニズム：フィブロネクチンはインテグリン-Lyn-PI3KおよびERK情報伝達系を介して、ミクログリアにおけるP2X<sub>4</sub>受容体過剰発現に重要な役割を担っていることを明らかにした。

②P2X<sub>7</sub>受容体とCCL3放出：細胞外ATPはP2X<sub>7</sub>受容体を介しNFATを活性化させ、ケモカインの一種CCL3の発現上昇と放出を誘発する。

③P2Y<sub>12</sub>受容体と神経因性疼痛発症：ミクログリアに発現するP2Y<sub>12</sub>受容体は走化性に関与しているが、神経因性疼痛とも深く関わっていることを明らかにした。

④P2Y<sub>6</sub>受容体と貪食作用：神経因性疼痛モデルラットでは、P2Y<sub>6</sub>受容体も術後経時的に高度な発現を呈したので、痛みとの関係について研究を開始したが、思いがけずに、P2Y<sub>6</sub>受容体刺激によりミクログリアは強度の貪食作用を示すことが明らかになった。

⑤カンナビノイドCB<sub>2</sub>受容体と神経因性疼痛発症：末梢神経損傷により脊髄内でCB<sub>2</sub>受容体の発現が亢進し、これがアロディニアの抑制に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。また、思いもよらない成果も得られて、全体の達成度は非常に高いと考えられる。

### 4. 今後の研究の推進方策

神経因性疼痛モデル（Chung変法）ラットの脊髄での遺伝子発現を検討した結果、異痛

症（アロディニア）の発現に平行して、様々なATP受容体サブタイプ(P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12)の mRNA が増加した。これらは、ミクログリアの化学走性や貪食作用などの運動能と密接に関係している事が明らかになると共に、我々の研究により、それらがそれぞれ異なったメカニズムで神経因性疼痛を発症させる可能性が明確になってきた。今後は、運動能の変化を *in vivo* の状況でリアルタイムに確認しつつ神経因性疼痛発症メカニズムに迫る必要が出てきた。そこで、*in vivo* イメージング技術によるミクログリア活性化の時空解析に二光子励起顕微鏡によるリアルタイム解析を導入する。ミクログリアのマーカーである Iba1 タンパク質と高感度緑色蛍光タンパク質 EGFP が共発現するように遺伝子改変させたトランスジェニックマウス (Hirasawa et al., J. Neurosci. Res. 2005) の大脳皮質および脊髄内ミクログリアを二光子励起顕微鏡により可視化し、活性化のプロセスを *in vivo* 下リアルタイムに観察する。大脳皮質は、痛みの認知、情動等を司る中枢であるが、そこでのミクログリアの役割はなお不明であるため、次なる神経因性疼痛メカニズム解明のために、上位脳でのミクログリアやアストロサイトの役割を生きた動物から情報を得る。これは、神経因性疼痛発症メカニズム解明のブレークスルーとなる。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 66 件)

(1) M. Tsuda, T. Masuda, J. Kitano, H. Shimoyama, H. Tozaki-Saitoh, K. Inoue. IFN- $\gamma$  receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. **Pro.Natl.Acad.Sci.USA** (査読有り)、in press

(2) M.Tsuda, H.Tozaki-Saitoh, T.Masuda, E. Toyomitsu, T. Tezuka, T. Yamamoto, K. Inoue. Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Glia**. (査読有り) 56:50-58, 2008.

(3) H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, H. Miyata, K. Ueda, S. Kohsaka, K. Inoue. P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. **J.Neurosci**. (査読有り) 28:4949-56, 2008

(4) S.Koizumi, Y.Shigemoto-Mogami, K. Nasu-Tada, Y.Shinozaki, K.Ohsawa, M. Tsuda, B.V. Joshi, K.A.Jacobson, S.Kohsaka, K.Inoue. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. **Nature** (査読有り) 446, 1091-1095, 2007

〔学会発表〕(計 102 件)

(1) 井上和秀. 神経因性疼痛とミクログリア

活性化. 第 38 回日本慢性疼痛学会、特別講演、2009 年 2 月 27 日、神戸

(2) 井上和秀. 神経因性疼痛でのミクログリアと ATP 受容体の役割. 日本ペインクリニック学会第 42 回大会、特別講演、2008 年 7 月 19 日、福岡

(3) K.Inoue. Microglia listening to neurons through purinergic receptors. Purines 2008. **Plenary lecture**, invited, International Scientific Advisory Bord. 2008 年 7 月 1 日、Copenhagen

(4) K.Inoue. Neurons talk with microglia through nucleotides. 7<sup>th</sup> Dutch Endo-Neuro- Psycho Meeting. **Plenary lecture**, invited, 2008 年 6 月 4 日、Doorwerth、オランダ

〔図書〕(計 7 件)

(1) K. Inoue, S. Koizumi, A. Kataoka, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda. P2Y6-evoked microglial phagocytosis. *In International Review of Neurobiology* vol.85: Advances in Neuropharmacology, ed. by G.Bagetta, M.T.Corasaniti, T. Sakurada and S.Sakurada, Elsevier, in press

(2) Inoue K. ATP receptors in the pain signaling: Glial contribution in neuropathic pain. *In Interaction between neurons and glia in aging and disease*. ed by J.O.Malva. p.461-474, Springer, 2007

(3) Inoue K. ATP receptors of microglia involved in pain. *In Purinergic signaling in neuron-glia interaction* (Novartis Foundation Symposium 276), p.263-281, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester 2006

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: ジアゼピンジオン誘導体

発明者: 井上和秀 他

権利者: 日本ケミファ株式会社

種類: 特許出願

番号: 特願 2009-022242

出願年月日: 2009 年 2 月 3 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

(1) 2007 年の Nature 論文は、NHK、毎日新聞、読売新聞や、共同通信社、西日本新聞などで紹介され、社会的なインパクトを与えた。

(2) 2008 年 2 月 19 日に共同通信社が、我々の研究成果「抗うつ薬が動物でもヒトでも神経因性疼痛を抑制すること」を発信した。

(3) 2009 年の Proc.Natl.Acad.Sci.USA 論文は、NHK、朝日新聞、毎日新聞、読売新聞、共同通信社、西日本新聞などで紹介され、社会的なインパクトを与えた。