

令和元年6月7日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11440

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるニューロン-グリア間情報伝達物質の役割に関する研究

研究課題名(英文) A study on the roles of neuron-glia interactions in neuropathic pain

研究代表者

寺山 隆司 (Terayama, Ryuji)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：60333689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では末梢神経損傷によって起こる痛覚異常に中枢神経系でのニューロンの興奮性の変化やグリア細胞の活性化がどのように関与しているのかを検討するとともに薬剤投与の効果を検討した。その結果、末梢神経損傷後に起こる中枢2次ニューロンの興奮性の変化に2次ニューロン周囲のグリア細胞の活性化が関与していること、神経損傷後に侵害情報伝達の様式に変化が認められることなどが明らかとなった。さらにアデノシンA3アゴニストの全身投与が神経損傷後の痛覚異常の程度を減少させること、その効果は中枢投射部位におけるミクログリアの活性化および異常な収斂投射を抑制することによることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の疼痛治療はニューロンの興奮性を抑制する一時的な対症療法が基本となっているが、ニューロンとグリア細胞の相互作用が明らかになったことで神経障害性疼痛の効果的な治療法につながる新しい概念を提供する可能性がある。病的疼痛のコントロールは歯科領域だけでなく普遍的な医療上の大問題である。本研究は新しい視点からこれにチャレンジして、解決方法や新たな治療法への糸口を開くものであり、これからの基礎研究だけでなく臨床応用を含めた広い波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the involvement of changes in the neuronal excitability and glial activation in the abnormal pain sensation after peripheral nerve injury. The effects of drug administration on neuropathic pain were also examined. We clarified that activation of glial cells surrounding secondary neurons in the CNS was involved in changes in the excitability of neurons and that modalities of nociceptive transmission were altered after nerve injury. Moreover, we found that the systemic administration of the A3AR agonist attenuates neuropathic pain states by suppressing enhanced microglial activation, and anomalous convergence of nociceptive inputs in the spinal dorsal horn from uninjured afferents after injury to the peripheral nerve.

研究分野：医歯薬学

キーワード：痛覚異常 神経損傷 収斂投射 ミクログリア アストロサイト ニューロン 脊髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は末梢あるいは中枢神経系の損傷または機能障害によって起こることが知られている。神経障害性疼痛の発症機序や治療法に関して様々な研究が行われてきた。その中で神経損傷や末梢組織の炎症による末梢神経の持続的な興奮によって、その1次ニューロン自身あるいはその神経が接続する2次ニューロン、さらにはより上位中枢の神経回路で形態的・機能的変化が起こることが証明された。しかしながら神経障害性疼痛の発症機序について十分に解明されたとは言えない。一方、最近の研究で中枢および末梢神経系の損傷後にニューロン以外の神経組織の構成要素であるアストログリアやミクログリアが脊髄において活性化することが示されてきた。グリア細胞はニューロンの位置や機能を単に支持するだけの細胞であるが、以前では考えられてきたが、グリア細胞の活性化がニューロンによる神経伝達を積極的に修飾していることが最近の研究で報告されてきている。神経障害性疼痛の発症や持続においては、活性化したアストログリアやミクログリアがニューロンの機能変化に関与しているものと考えられる。本申請者はこれまでに末梢神経損傷や末梢組織の炎症が中枢神経系の侵害情報処理機構に与える影響を研究テーマとして研究活動を行ってきた。今回これまでの研究を踏まえ、末梢神経損傷後の中枢2次ニューロンの興奮性の変化に関与する各グリア細胞の活性化や脊髄後角におけるシナプス回路網の変化を明らかにするとともに、これらの変化を抑制することで、神経障害性疼痛に対する効果的な治療法を見出すことを目的とする研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、神経障害性疼痛の各ステージで中枢神経系の各細胞間の相互作用がどのように起こり、それらが神経障害性疼痛の発症や持続にどのように関与しているのかを明らかにするとともに薬剤投与の効果調べを目的とした。具体的には、

- 1) 末梢神経損傷後の脊髄後角におけるニューロンの興奮性の変化およびグリア細胞の活性化について、損傷を受けた神経が投射する部位とその周囲でどのように起こるのかを明らかにする。
- 2) 中枢2次ニューロンにおける侵害情報伝達の指標として用いている c-Fos タンパク誘発と ERK のリン酸化 (p-ERK の誘発) について神経損傷後にその誘発パターンを比較検討し、神経損傷後の特徴的な侵害情報伝達や脊髄後角におけるシナプス回路網の変化を明らかにする。
- 3) アデノシン A3 アゴニストの神経障害性疼痛に対する効果を詳細に検討する。

3. 研究の方法

1) 末梢神経損傷後の脊髄後角におけるニューロンの興奮性の変化およびグリア細胞の活性化

- (1) 神経損傷手術: SD ラットに深麻酔を施し、左側第5腰神経を露出し、椎間孔の遠位部を結紮・切断した。神経を露出し、結紮・切断を行わないラットを対照群とした (Sham 手術群)。
- (2) 後肢への侵害熱刺激による c-Fos 誘発: 神経損傷後 3、7、14、21 日、および Sham 手術を行った動物 (各群 n=5) に対し、再び麻酔を行い、左側後肢を 55 °C の熱水に 10 秒間浸漬した (侵害熱刺激)。熱刺激の 2 時間後に灌流固定し、脊髄を摘出した。第4から第6腰髄の厚さ 50 μm の連続凍結切片から一枚おきに切片を採取し、c-Fos タンパクの特異的抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。c-Fos の免疫反応の定量的分析は脊髄後角 I/II 層における陽性細胞数をカウントすることによって行った。各髄節を吻尾側的に 4 分割し (合計 12 区画) 各区画に含まれる 5 連続切片から 1 切片あたりの陽性細胞数を求めた。
- (3) OX-42 と GFAP の蛍光免疫染色: 神経損傷後 3、7、14、21 日、および Sham 手術を行った動物 (各群 n = 5) に対し、再び麻酔下にて灌流固定し、脊髄を摘出した。第4から第6腰髄の厚さ 10 μm の凍結切片を作製し、ミクログリアの細胞マーカーである OX-42 (CD11b) あるいはアストロサイトのマーカーである GFAP の特異的抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、蛍光強度を定量的に測定した。

2) 神経損傷後の中枢2次ニューロンにおける c-Fos 誘発と ERK のリン酸化 (p-ERK の誘発)

- (1) 神経損傷手術: SD ラットに深麻酔を施し、右側大腿部より坐骨神経および同神経の脛骨神経、総腓骨神経、腓腹神経への分岐部を露出し、その中の脛骨神経を結紮・切断した (脛骨神経損傷群)。神経を露出し、結紮・切断を行わないラットを対照群とした (Sham 手術群)。
- (2) 後肢への侵害熱刺激による c-Fos および p-ERK の誘発: 神経損傷後 3、7、14 日、および

Sham 手術を行った動物（各群 n = 5）に対し、再び麻酔を行い、左側後肢を 55 ° の熱水に 10 秒間浸漬した（侵害熱刺激）。熱刺激の 5 分後（p-ERK 発現分析用）あるいは 2 時間後（c-Fos 発現分析用）に灌流固定し、脊髄を摘出した。第 4 から第 5 腰髄の厚さ 50 μm の連続凍結切片から c-Fos および p-ERK タンパクの特異的抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。c-Fos および p-ERK の免疫反応の定量的分析は、脊髄後角 I/II 層における陽性細胞数をカウントすることによって行った。その際、脛骨神経と総腓骨神経の中樞投射部位に分けて分析した。

3) 神経障害性疼痛に対するアデノシン A3 アゴニストの効果

(1) 神経損傷手術とアデノシン A3 アゴニスト（IB-MECA）投与：SD ラット（6 週齢雄）に深麻酔を施し、右側大腿部より坐骨神経およびその分枝を露出し、脛骨神経を結紮・切断した（n = 24）。神経損傷の当日（手術 1 時間前）および神経損傷後 1-7 日に 1 日 1 回生理的食塩水あるいは IB-MECA（0.1 mg/kg）を腹腔内投与した（各群 n = 6）。また、神経損傷後 7-14 日に 1 日 1 回生理的食塩水あるいは IB-MECA（0.1 mg/kg）を腹腔内投与した（各群 n = 6）。

(2) 行動学的評価：各群のラットの手術前（baseline）および手術後 3、7、14 日に von Frey filament による足底への触覚刺激に対して逃避行動を示す閾値を計測し、アロディニア発症の検討を行った。

(3) 組織学的検討：行動学的評価終了後、深麻酔下にて灌流固定し、脊髄を摘出した。第 4 および第 5 腰髄の厚さ 10 μm の凍結切片を作製し、ミクログリアの活性化に対する IB-MECA の抑制効果を検討するために、OX-42（CD11b）およびリン酸化 p-38 MAP キナーゼに対する抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、蛍光強度を定量的に測定した。

(4) 収斂投射に対するアデノシン A3 アゴニストの効果：別のグループのラットを用いて、上記と同様の神経損傷および薬剤投与を行った（各群 n = 5）。神経損傷後 14 日で再び麻酔を行い、右側後肢を 55 ° の熱水に 10 秒間浸漬した（侵害熱刺激）。熱刺激後 1 時間 45 分から 55 分で再び脛骨神経を露出し双極電極を用いた C 線維興奮強度（5 mA）の電気刺激（5 Hz, 5 ms, 10 分間）を行った。熱刺激の 2 時間後（脛骨神経電気刺激の 5 分後）に灌流固定し、脊髄を摘出した。第 4 および第 5 腰髄の厚さ 10 μm の凍結切片を作製し、c-Fos タンパクおよび p-ERK の特異的抗体を用いた蛍光 2 重免疫染色を同一切片上で行った。c-Fos タンパクに対してはウサギ由来、p-ERK に対してはマウス由来の抗体を用い、Alexa-568（赤色に発色）標識した抗ウサギ IgG と Alexa-488（緑色に発色）標識した抗マウス IgG を 2 次抗体として用いた。この染色法により c-Fos 陽性、p-ERK 陽性、c-Fos/p-ERK の 2 重陽性細胞が区別できた。得られた組織切片から脊髄後角における陽性細胞の分布および陽性細胞数を比較した。陽性細胞の計測は、I/II 層における各陽性細胞数を脛骨神経投射領域と総腓骨神経投射領域に分けて行った。

4. 研究成果

1) 末梢神経損傷後の脊髄後角におけるニューロンの興奮性の変化およびグリア細胞の活性化

神経損傷後の各時間経過で後肢への侵害熱刺激に対する侵害 2 次ニューロンでの c-Fos タンパクの誘発を検討した。Sham 手術群において侵害熱刺激によって誘発される c-Fos 陽性ニューロンは、後肢を支配する神経の中樞投射部位と一致して脊髄後角の内側 2/3 に多く認められた。後大腿皮神経の投射部位である脊髄後角の最外側では陽性細胞はほとんど認められなかった。吻尾側方向における陽性細胞の分布では第 4 と第 5 腰髄の移行部周囲に特に多くの陽性細胞が認められた。神経損傷後の脊髄後角においても侵害熱刺激によって多くの c-Fos 陽性ニューロンが認められたが、髄節のレベルと神経損傷後の時間経過によってその分布に変化が生じた。神経損傷後 3 日で第 4 腰髄の尾側半における c-Fos 陽性ニューロンの有意な増加が認められたが、神経損傷後 7-21 日では Sham 手術群と同程度の誘発となった（図 1）。一方、神経損

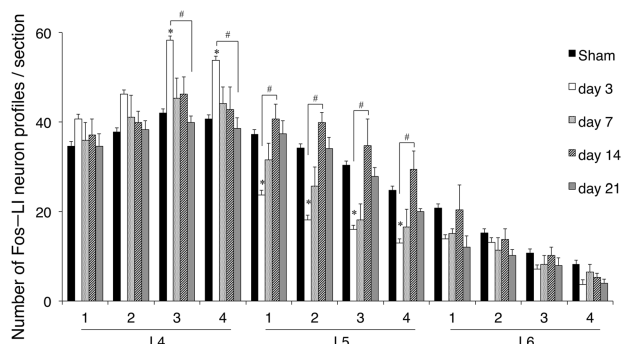


図 1. 第 5 腰神経損傷後の各時間経過における脊髄後角 I/II 層における 1 切片あたりの c-Fos 陽性ニューロン数。各髄節を吻尾側的に 4 分割し、各区画に含まれる切片の平均値を算出し、吻尾側的に配列した。

傷後3日および7日で第5腰髄の吻尾側の全区画におけるc-Fos陽性ニューロンの有意な減少が認められた。しかしながら、神経損傷後14日および21日ではc-Fos陽性ニューロンが再び増加し、神経損傷後3日のものと比較すると有意な増加となった(図1)。

末梢神経損傷後の脊髄後角におけるグリア細胞の活性化を検討するため、OX-42とGFAPの蛍光免疫染色を行った。神経損傷後3日で第5腰髄後角におけるOX-42の有意な染色性の増加が認められ、7日でさらに増加していた。その後、14日および21日ではSham手術群と同程度にまで減少した。第5腰髄後角におけるGFAPの有意な増加は神経損傷後7日で認められ21日まで持続していた(図2)。

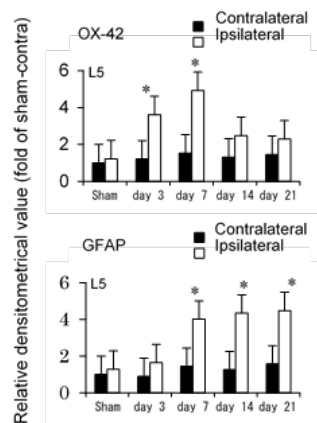


図2. 第5腰神経損傷後の各時間経過における第5腰髄後角におけるOX-42およびGFAPの染色性の変化。OX-42は神経損傷後3および7日で、GFAPは7-21日で有意な増加が認められた。

2) 神経損傷後の中枢2次ニューロンにおけるc-Fos誘発とERKのリン酸化(p-ERKの誘発)

神経損傷後の各時間経過で後肢への侵害熱刺激に対する侵害2次ニューロンでのc-Fosおよびp-ERKタンパクの誘発を検討した。Sham手術群において侵害熱刺激によって誘発されるc-Fos陽性反応はニューロンの核に認められ、c-Fos陽性ニューロンは、後肢を支配する坐骨神経の中核投射部位と一致して脊髄後角の内側2/3に多く認められた。陽性ニューロンの多くは脊髄後角のI/II層に認められたが、III/IV層にも少数の陽性ニューロンが認められた。後大腿皮神経の投射部位である脊髄後角の最外側では陽性細胞はほとんど認められなかった。一方、侵害熱刺激によって誘発されるp-ERK陽性反応はニューロンの核、細胞体および樹状突起に認められ、陽性ニューロンはc-Fos陽性ニューロンと同様に脊髄後角の内側2/3に多く認められた。陽性ニューロンの大多数は脊髄後角のI/II層に認められ、III/IV層にはほとんど認められなかった。神経損傷後の脊髄後角においても侵害熱刺激によって多くのc-Fosおよびp-ERK陽性ニューロンが認められたが、神経損傷後の時間経過によってその分布に変化が生じた。神経損傷後3日で脊髄後角I/II層の内側1/3(脛骨神経領域)でc-Fosおよびp-ERK陽性ニューロンの有意な減少が認められた。一方、神経損傷後7日では脛骨神経領域におけるc-Fos陽性ニューロン数は3日と比較して増加傾向が認められたが、p-ERK陽性ニューロン数は3日と同様であった(図3,4)。

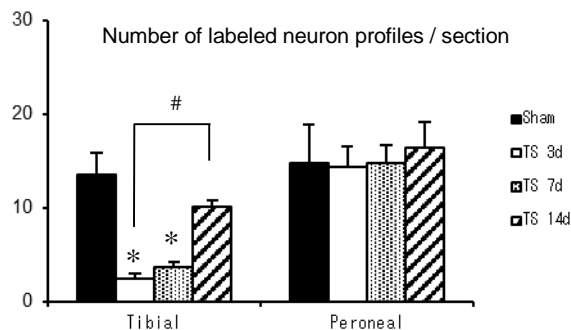


図3.脛骨神経損傷後の各時間経過における後肢への侵害熱刺激による脊髄後角でのc-Fosタンパク陽性ニューロン数の変化。

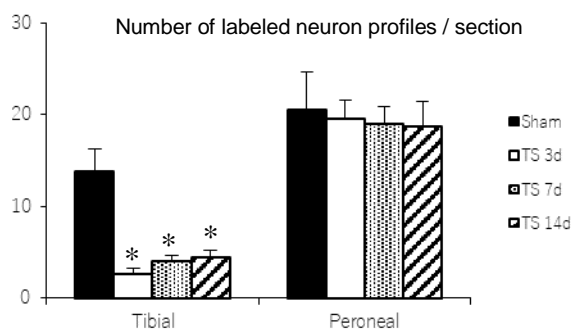


図4.脛骨神経損傷後の各時間経過における後肢への侵害熱刺激による脊髄後角でのp-ERKタンパク陽性ニューロン数の変化。

神経損傷後14日において、脛骨神経領域におけるc-Fos陽性ニューロン数はSham手術群と同程度にまで回復し、3日と比較して有意な増加が認められた。一方p-ERKにおいては3日、7日と比較して増加傾向は認められるもの、有意な増加は認められなかった(図3,4)。総腓骨神経領域では神経損傷後の全期間においてc-Fosおよびp-ERK陽性ニューロンともにSham手術群と比較して有意な変化は認められなかった。

3) 神経障害性疼痛に対するアデノシン A3 アゴニストの効果

神経損傷後のアロディニアに対する IB-MECA の効果について行動学的指標を用いて評価した。生理的食塩水投与群では脛骨神経損傷後 3 日で触刺激に対する一時的な知覚鈍麻が見られたが、7 日ではほぼ損傷前のレベルに戻り、14 日でアロディニアの発症が認められた。これに対し IB-MECA を神経損傷当日から 8 日間投与したラットでは 14 日におけるアロディニアは認められなかった。また、IB-MECA を神経損傷後 7 日目から投与したラットでも、神経損傷後 14 日でアロディニアは認められなかった。(図 5)

末梢神経損傷後の中枢投射部位におけるミクログリアの活性化に対する IB-MECA の抑制効果を検討するために、各実験群の脊髄の切片においてミクログリアの細胞マーカーである OX-42 (CD11b) およびリン酸化 p-38 MAP キナーゼに対する抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。生理的食塩水投与群では神経損傷後 14 日で損傷側の脊髄後角における OX-42 の染色性の増加が認められ、ミクログリアの活性化が起こっていることが示された。IB-MECA を投与したラットでは投与開始時期に関係なく、神経損傷後 14 日でミクログリアの活性化および p-38 MAP キナーゼが有意に抑制された。

これまでの報告で、後肢への熱刺激によって誘発される c-Fos 陽性細胞は、脛骨神経損傷後 3 日で有意に減少し、14 日で損傷前と同程度に増加し、その増加には収斂投射が関与していることが明らかとなっている。そこでアデノシン A3 アゴニスト投与による収斂投射の抑制効果を検討した。生理的食塩水投与群では神経損傷後 14 日で多くの c-Fos および p-ERK に対する 2 重陽性細胞が損傷を受けた脛骨神経の中枢投射部位で認められ、収斂投射が起こっていることが示された。IB-MECA を投与したラットでは、投与開始時期に関わらず、神経損傷後 14 日で熱刺激によって誘発される c-Fos 陽性細胞および 2 重陽性細胞数の有意な減少が認められた。このことは IB-MECA 投与によって収斂投射が抑制され、熱刺激に対する c-Fos の過剰発現が抑制されたことを示している (図 6)。

以上の結果から、末梢神経損傷によって中枢投射部位でミクログリアの活性化が起こり、それが 2 次ニューロンへの収斂投射を引き起こしてアロディニアなどの痛覚異常の発症に関与していることが示されるとともにアデノシン A3 アゴニスト投与が神経損傷後の痛覚異常の発症を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4 件)

1. Tabata M, Terayama R, Maruhama K, Iida S, Sugimoto T, Differential induction of c-Fos and phosphorylated ERK by a noxious stimulus after peripheral nerve injury, *Int J Neurosci*. 2018 Mar;128(3):208-218. 査読有

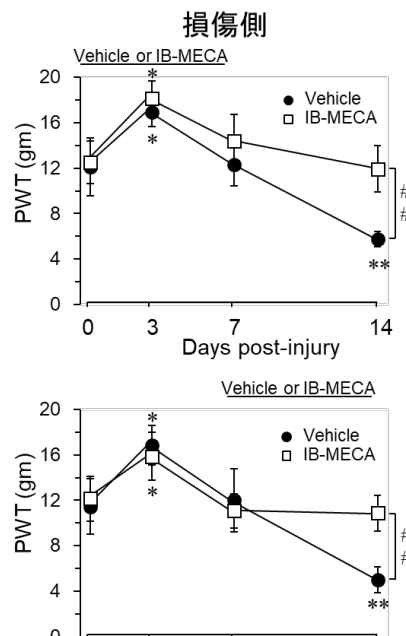


図 5. 逃避行動を起こす閾値に対する IB-MECA 投与の効果。神経損傷当日から 8 日間投与した場合、神経損傷後 7 日から投与を開始した場合ともに損傷後 14 日における閾値の低下が回避された。

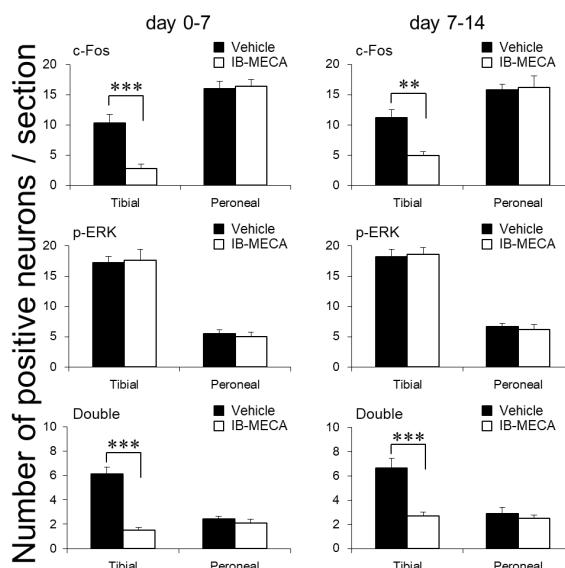


図 6. 後肢への熱刺激によって誘発される c-Fos タンパク発現細胞数、脛骨神経への電気刺激によって誘発される p-ERK 発現細胞数および収斂投射を受けていると考えられるこれらの 2 重陽性細胞数 (脛骨神経損傷後 14 日)。IB-MECA 投与により c-Fos タンパク発現細胞数と 2 重陽性細胞数が有意に減少した。

2. Terayama R, Tabata M, Maruhama K, Iida S, A₃ adenosine receptor agonist attenuates neuropathic pain by suppressing activation of microglia and convergence of nociceptive inputs in the spinal dorsal horn, *Exp Brain Res*. 2018 Dec;236(12):3203-3213. 査読有
3. 寺山隆司, 神経障害性疼痛におけるシナプス異常の新知見, 月刊「細胞」50(14), 33-36, 2018. 査読無
4. Terayama R, Yamamoto Y, Kishimoto N, Tabata M, Maruhama K, Iida S, Sugimoto T, Differential Changes in Neuronal Excitability in the Spinal Dorsal Horn After Spinal Nerve Ligation in Rats, *Neurochem Res*. 2016 Nov;41(11):2880-2889. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 寺山隆司, 丸濱功太郎, 脊髄後角における c-Fos および p-ERK 誘発の末梢神経損傷後の変化について, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018 年 9 月 5 日 - 7 日, 福岡市
2. 田畑光康, 寺山隆司, 丸濱功太郎, 飯田征二, 杉本朋貞, 末梢神経損傷後の侵害刺激に対する脊髄後角での c-Fos および p-ERK の誘発変化について, 日本解剖学会第 72 回中国・四国支部学術集会, 2017 年 10 月 28 日 - 29 日, 広島市
3. 寺山隆司, 末梢神経損傷による脊髄後角ニューロンの興奮性の変化について, 第 43 回岡山脳研究セミナー, 2017 年 1 月 29 日, 岡山市
4. 寺山隆司, 山本裕也, 岸本宜子, 田畑光康, 丸濱功太郎, 飯田征二, 杉本朋貞, 末梢神経損傷後の脊髄後角ニューロンの興奮性における時間空間的变化, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016 年 8 月 24 日 - 26 日, 札幌市
5. Ryuji Terayama, Mechanisms of orofacial nociception and neuropathic pain, *Oral Neuroscience* 2016, 2016 年 10 月 1 日, 大阪市

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 丸濱 功太郎

ローマ字氏名: (MARUHAMA kotaro)

研究協力者氏名: 田畑 光康

ローマ字氏名: (TABATA mitsuyasu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。