

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07078

研究課題名(和文) GABA伝達シグナルを介した神経障害性疼痛治療への挑戦

研究課題名(英文) Investigation of the therapeutics for neuropathic pain through GABAergic transmission

研究代表者

高山 千利 (Takayama, Chitoshi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60197217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：坐骨神経痛などの神経障害性疼痛は、罹患率が高く難治性であることから、世界的健康問題であり、有効な治療法の開発が待たれている。治療法開発の突破口の1つとして、アミノ酸(GABA)の機能異常を介する痛みの発生機序を明らかにし、その治療法に迫ることを目的として研究を行った。その結果、疼痛モデルマウス、遺伝子改変マウスにおいて、ミクログリアの活性化が持続し、K、Cl共輸送体(KCC2)の発現量が減少したままの状態が続くため、GABAによる抑制力が低下しており、この抑制力の低下が痛みの持続を生み出していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は、神経の損傷が修復後も長く続き、難治性である。本研究では、GABAの抑制性の低下が、疼痛を起こすこと、その上流にはKCC2の発現低下、さらに、ミクログリアの活性化があることを突き止めた。これにより、いくつかの治療法の糸口が見えた。1つ目は、脊髄後角においてKCC2の機能を上げ、GABAの抑制性を強めることである。KCC2には複数の作用薬が知られており、その上流のミクログリアの働きを弱める方法も知られている。2つ目は、GABA作用薬を強くすることで、痛みを軽減させることである。実際にこれらの治療法が有効かを解析し、慢性疼痛に苦しむ患者への福音としたい。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain, including chronic lumbar pain, is a serious problem worldwide.

To reveal the mechanisms underlying the neuropathic pain through changes in GABAergic action, and to establish the treatments for neuropathic pain, we examined neuropathic pain model mice and gene-targeted mice. We found that neuropathic pain may be caused by reduced GABAergic synaptic inhibition, resulting from elevated the intracellular chloride ion concentration after the reduction of KCC2 by activated microglia.

研究分野：神経科学

キーワード：慢性疼痛 GABA伝達機構 K、Cl共輸送体(KCC2) ミクログリア モデルマウス 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

-アミノ酪酸 (GABA) は、成熟動物中枢神経系における抑制性神経伝達物質である。一方、発達期や運動神経損傷後、GABA は興奮性作用を示す事が知られている。この作用の違いは、細胞内 Cl^- 濃度 ($[Cl^-]_i$) に依存しており、 Cl^- を細胞外に排出する K^+-Cl^- 共輸送体 (KCC2) の発現量によって調節されている。

坐骨神経痛をはじめとする神経障害性疼痛は、罹患者が多く、長期化することから、世界的な健康問題である。有効な薬剤が開発され始めてはいるが、依然として治療は難渋しており、その発症機序の解明と根本的な治療法の開発が待たれている。近年、神経障害性疼痛の発症原因の1つとして、GABA の機能異常が注目されている。しかしながら、神経障害性疼痛の発生・持続と GABA の作用変化との因果関係を明確に示した報告は少ない。GABA の機能に関する薬剤は数多く知られており、GABA と慢性疼痛との明確な関連を明らかにすることが出来れば、治療法開発の突破口となる。

2. 研究の目的

疼痛行動評価の変化に差を呈する「脛骨神経結紮マウス」と「坐骨神経切断マウス」2種類のモデル動物を用い、GABA 伝達に関係する分子の動き、その上流にあるミクログリアの変化と、痛覚閾値との時間的・空間的關係を解析し、GABA 作用の変化を介する神経障害性疼痛の発生・持続機序を明らかにすることを目的とした。さらに、GABA 伝達に関与する分子の発現量が半減する遺伝子改変マウスにおいて疼痛行動評価を行い、これらの分子の動きと疼痛閾値との直接の關係を解析して、上記の機序の妥当性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスを用いた解析

10 - 12 週齢 C57BL/6J 雄マウスを用いて、脛骨神経の直径が半分になるように結紮した「結紮モデル」と、脛骨神経を切断した「切断モデル」2種類を作製し、以下の解析を行った。疼痛行動評価では von Frey 線維を用いて、足底外側部 (腓腹神経支配) での機械刺激の閾値を測定した。坐骨神経を介する感覚情報が入力する第4・5 腰髄後角における GABA 伝達ならびにその上流シグナルに関する解析では、シグナル関連タンパク質の免疫組織化学的染色を行った。後角を脛骨神経領域と腓腹神経領域に分け、それぞれについて Image J を用いて客観的形態計測を行った。脛骨神経の組織学的変化は走査型電子顕微鏡により観察した。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた解析

(1) の研究結果から、KCC2 の低下による $[Cl^-]_i$ の上昇が疼痛閾値に低下 (痛覚の上昇) に働くと考えられた。この仮説を証明するために、KCC2 の発現量が半減している KCC2 ノックアウトマウスのヘテロ接合体、GABA の開口放出に関与する小胞型 GABA 輸送体 (VGAT) の発現量が半減している VGAT ノックアウトマウスのヘテロ接合体を用いた。切断手術を行い、野生型の非手術側と手術側、ヘテロ接合体の非手術側と手術側4つの疼痛閾値の変化を解析した。

4. 研究成果

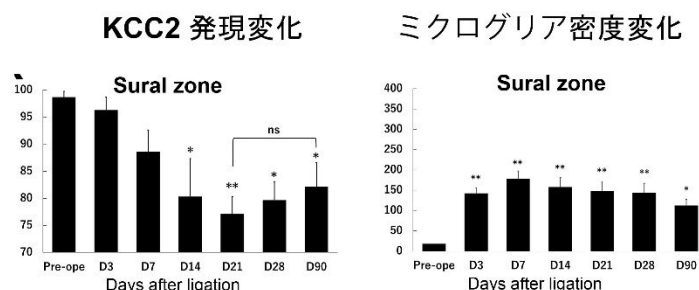
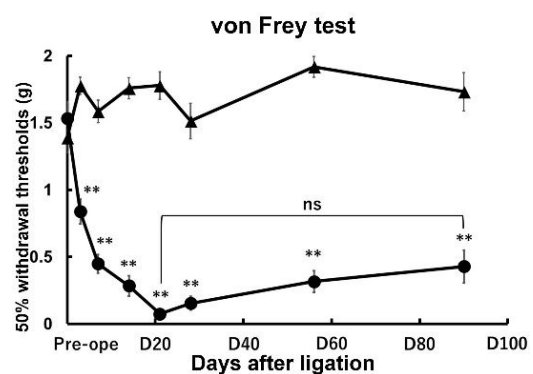
(1) 神経障害性疼痛モデルマウスの結果

<結紮モデル> 機械刺激の閾値は術後急速に低下し、21 日目に最低値を示し、以後有意な上昇は認めず、90 日目までアロジニアが持続した (右図)。KCC2 の発現も、脛骨及び腓腹神経領域ともに術後低下し、21 日目に最低値を示し、90 日まで有意な回復は認めなかった。ミクログリア (Iba1 陽性細胞) は、術後7 日で最大に達し以後減少するが、腓腹神経投射領域では90 日まで有意に増加していた。脛骨神経は、術後7 日目で完全に変性し、28 日から急速に軸索の再生、髄鞘化が進行し、56 日には切断前と同程度に回復していた。

<切断モデル> 機械刺激の閾値は、術後14 日で最低値を示し、その後90 日目に掛けて有意に回復した。KCC2 の低下、Iba1 細胞の増加は、術後14 日まで認められるが、術後90 日においては術前と同程度まで回復した。

両方のモデルとも GABA シナプス関連タンパク質に有意な変化は認められなかった。

両モデルの比較により、機械刺激の閾値の変化・KCC2 の低下・ミクログリアの増加はパラレルであること、Iba1 の変化が KCC2 の低下に先んじることから、ミクログリアの活性化・KCC2 の

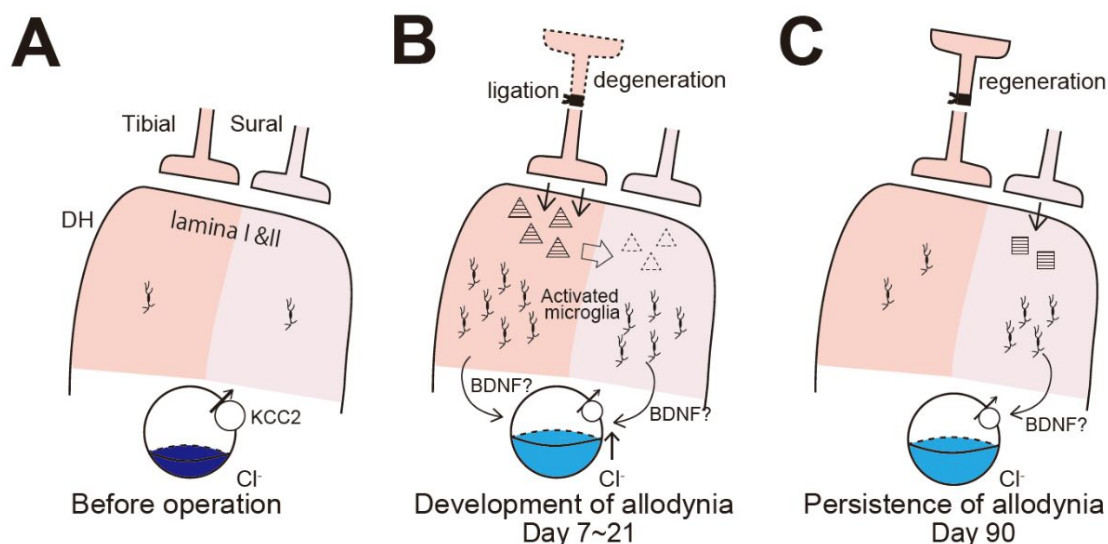


減少 GABA による抑制作用の減弱というカスケードで疼痛が生じると考えられた。

両モデルにおいて、脛骨神経はワラー変性を生じ、術後の KCC2, Iba1 の変化は、脛骨神経領域の方が腓腹神経領域より大きく、かつ先んじていたことから、「疼痛の発症」は、脛骨神経の中樞性終末から放出される液性因子が誘導すると考えられた。

結紮マウスの後角脛骨神経領域のみが有意なミクログリアの増加、KCC2 の低下を認め、アロジニアが 90 日間持続すること、脛骨神経領域より腓腹神経領域で変化が著名なことから、障害を受けない軸索から放出される液性因子が疼痛を持続させていると考えられた。

以上の結果をまとめて、疼痛の発症 (B) と、持続 (C) に関して下図に示すメカニズムが考えられた。

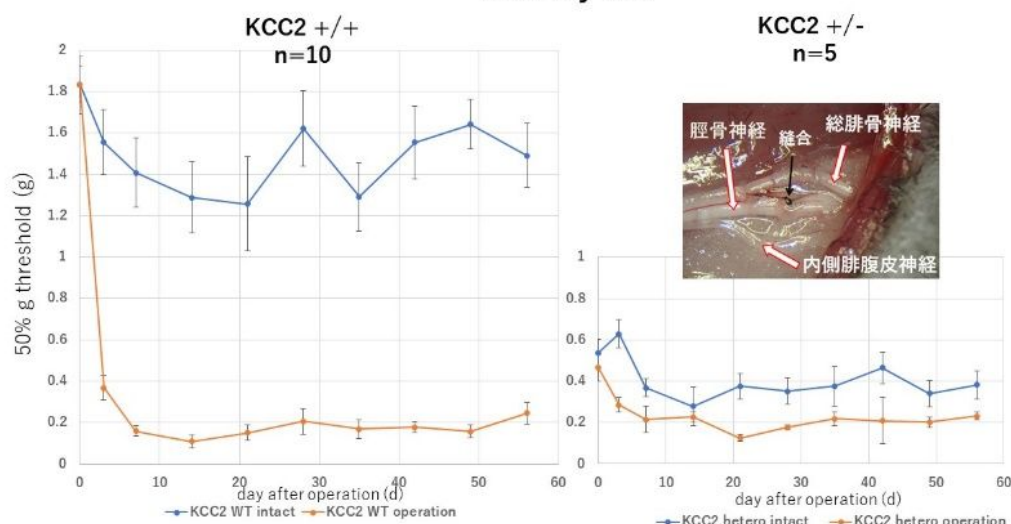


(2) ノックアウトマウスの結果

() KCC2 ノックアウトマウスのヘテロ接合体 切断手術

KCC2 の発現低下が、疼痛閾値を低下させるか、手術をすることでさらに閾値が低下するか、に注目して疼痛行動評価 (von Frey) を行った。その結果、手術前の両側 (右図青線)、手術後の非手術側 (右図オレンジ) において、野生型 (左図) と比較して優位に疼痛閾値が低い状態が続いていた。一方、ヘテロ接合体においても、手術側では野生型と同じ程度に十分に疼痛閾値が低値であった。

von Frey test

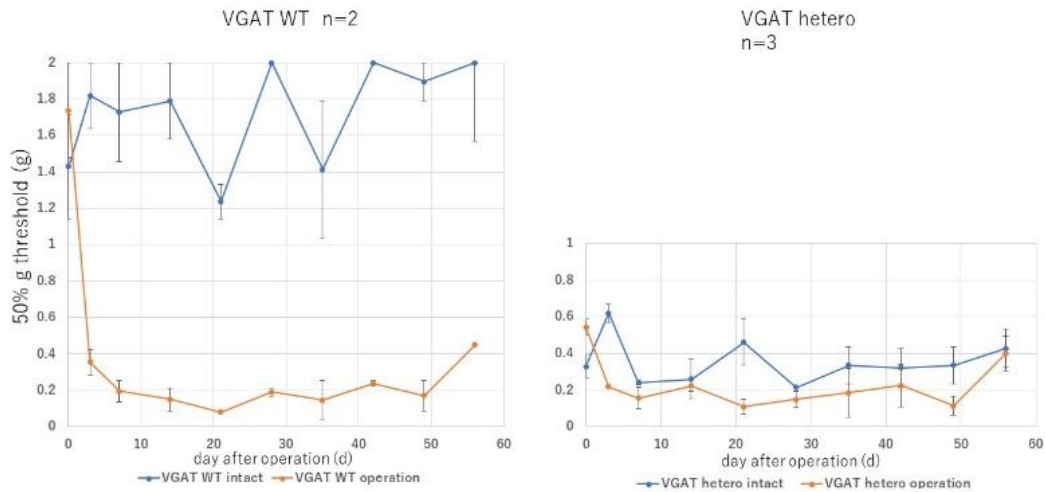


これらのことから、KCC2 の低下は疼痛閾値を低下させることが明らかになった。

() VGAT ノックアウトマウスのヘテロ接合体

VGAT の低下、GABA 放出の低下が疼痛閾値の低下を生じるか、手術後に疼痛閾値はどうなるか、を中心に解析した。その結果、野生型 (左図) と比較し、GABA 放出の低下により、疼痛閾値 (右図青線) が有意に低下していた。さらに、手術により、さらに疼痛閾値 (右図オレンジ線) が低下した。これらのことから、手術により脊髄後角における KCC2 発現量が低下し $[Cl^-]_i$ が上昇するが、GABA の作用は依然として抑制性であり、手術により、GABA の作用が興奮に変化するわけではなく、抑制性は保ちつつも、抑制作用が低下していることが明らかになった。

von Frey test



以上より、神経損傷にともない、脊髄後角においてミクログリアが活性化し、放出される brain derived neurotrophic factor (BDNF)などの働きで二次知覚ニューロンでの KCC2 の発現が低下し、GABA の抑制性が低下することにより痛覚閾値が上昇することが明らかになった。

さらに、これらの結果から、ミクログリアの活性化を抑制する、KCC2 の作用を上昇させる、GABA 受容体の作用薬を投与し GABA の抑制性を増加することにより、治療ができる可能性が示唆された。

参考文献

Kosaka Y., Yafuso, T., Shimizu-Okabe, C., Kim, J., Kobayashi, S., Okura, N., Ando, H., Okabe, A., **Takayama C.***, 2020. Development and persistence of neuropathic pain through microglial activation and KCC2 decreasing after mouse tibial nerve injury. *Brain Res.* 1733, 146718.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kosaka Yoshinori, Yafuso Tsukasa, Shimizu-Okabe Chigusa, Kim Jeongtae, Kobayashi Shiori, Okura Nobuhiko, Ando Hironobu, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 1733
2. 論文標題 Development and persistence of neuropathic pain through microglial activation and KCC2 decreasing after mouse tibial nerve injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146718 ~ 146718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Shiori, Kim Jeongtae, Yanagawa Yuchio, Suzuki Noboru, Saito Hiromitsu, Takayama Chitoshi	4. 巻 426
2. 論文標題 Hyper-Formation of GABA and Glycine Co-Releasing Terminals in the Mouse Cerebellar Nuclei after Deprivation of GABAergic Inputs from Purkinje Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 88 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.11.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Masato, Shimizu-Okabe Chigusa, Kim Jeongtae, Kobayashi Shiori, Matsushita Masayuki, Masuzaki Hiroaki, Takayama Chitoshi	4. 巻 134
2. 論文標題 Embryonic development of GABAergic terminals in the mouse hypothalamic nuclei involved in feeding behavior	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 39 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kim Jeongtae, Kobayashi Shiori, Shimizu-Okabe Chigusa, Okabe Akihito, Moon Changjong, Shin Taekyun, Takayama Chitoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Changes in the expression and localization of signaling molecules in mouse facial motor neurons during regeneration of facial nerves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 13 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchemneu.2017.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kozuka Chisayo, Kaname Tadashi, Shimizu-Okabe Chigusa, Takayama Chitoshi, Tsutsui Masato, Matsushita Masayuki, Abe Keiko, Masuzaki Hiroaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Impact of brown rice-specific α -oryzanol on epigenetic modulation of dopamine D2 receptors in brain striatum in high-fat-diet-induced obesity in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 1502 ~ 1511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-017-4305-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kozuka Chisayo, Shimizu-Okabe Chigusa, Takayama Chitoshi, Nakano Kaku, Morinaga Hidetaka, Kinjo Ayano, Fukuda Kotaro, Kamei Asuka, Yasuoka Akihito, Kondo Takashi, Abe Keiko, Egashira Kensuke, Masuzaki Hiroaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Marked augmentation of PLGA nanoparticle-induced metabolically beneficial impact of α -oryzanol on fuel dyshomeostasis in genetically obese-diabetic ob/ob mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Deliv	6. 最初と最後の頁 558 ~ 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10717544.2017.1279237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sunagawa M, Shimizu-Okabe C, Kim J, Kobayashi S, Kosaka Y, Yanagawa Y, Matsushita M, Okabe A, Takayama C	4. 巻 343
2. 論文標題 Distinct development of the glycinergic terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 459-471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016 / j.neuroscience.2016.12.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takamatsu G, Katagiri C, Tomoyuki T, Shimizu-Okabe C, Nakamura W, Nakamura-Higa M, Hayakawa T, Wakabayashi S, Kondo T, Takayama C, Matsushita M	4. 巻 482
2. 論文標題 Tescalcin is a potential target of class I histone deacetylase inhibitors in neurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1327-1333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.12.036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 KCC2の発現低下は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水千草、小俣大輔、友寄竜司、岡野貴江、小林しおり、岡部明仁、高山千利
2. 発表標題 The ontogeny of glycine transporter 1 (GlyT1) during development in the spinal cord.
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiori Kobayashi, Jeongtae Kim, Yuchio Yanagawa, Noboru Suzuki, Hiromitsu Saito, Chitoshi Takayama
2. 発表標題 Hyper-formation of GABA and glycine co-releasing terminals in the mouse cerebellar nuclei after deprivation of GABAergic inputs from Purkinje cells
3. 学会等名 2019 The 3rd Ryudai-OIST Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 K+-Cl-共輸送体(KCC2)の発現低下は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水千草、友寄竜司、平安山貴江、小林しおり、岡部明仁、高山千利
2. 発表標題 脊髄発達過程におけるグリシントランスポーター 1 (GlyT1)の発現変化
3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chitoshi Takayama
2. 発表標題 Relationship between changes in GABAergic action and peripheral neuropathic pain after mouse tibial nerve injury
3. 学会等名 第48回内藤コンファレンス「感覚系サイエンスの最前線 痛覚、痒覚、嗅覚、味覚」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chigusa Shimizu-Okabe, Ryuji Tomoyose, Kie Henzan, Shiori Kobayashi, Chitoshi Takayama
2. 発表標題 The expression pattern of glycine transporter 1 (GlyT1) during development in the spinal cord
3. 学会等名 NEURO2019、第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水千草、平安山貴江、小林しおり、高山千利
2. 発表標題 脊髄におけるグリシントランスポーター 1 (GlyT1)の発達変化
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiori Kobayashi, Jeongtae Kim, Chigusa Shimizu-Okabe, Chitoshi Takayama
2. 発表標題 Re-arrangement of synaptic connections associated with altered inhibitory input of Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihito Okabe, Chigusa Shimizu, Jongtae Kim, Shiori Kobayashi, Chitoshi Takayama
2. 発表標題 Modulation of respiration-related activities activated by GABA and Cl ⁻ co-transporters in the perinatal mouse hypoglossal nucleus.
3. 学会等名 11th FENS ヨーロッパ神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chigusa Shimizu, Masanobu Sunagawa, Shiori Kobayashi, Jeongtae Kim, Chitoshi Takayama
2. 発表標題 Distinct development of the glycinergic terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord.
3. 学会等名 11th FENS ヨーロッパ神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林しおり、金正泰、清水千草、柳川右千夫、高山千利
2. 発表標題 Re-arrangement of synaptic connections associated with altered inhibitory input of Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Chigusa Shimizu, Shiori Kobayashi, Hidetoshi Saze, Chisayo Kozuka, Yu Miyazaki, Shogo Arakaki, Yuta Ogura, Hiroaki Masuzaki, Jeongtae Kim, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama
2. 発表標題	Promotion of lipid excretion and improvement of intestinal environment by wx/ae rice which is rich in resistant starch
3. 学会等名	第95回日本生理学会大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Yoshinori Kosaka, Tsukasa Yafuso, Jeongtae Kim, Chigusa Shimizu, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama
2. 発表標題	マウス脛骨神経損傷モデルを用いた神経障害性疼痛とGABA伝達機構の変化
3. 学会等名	第40回日本神経科学大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	清水千草、小林しおり、佐瀬英俊、小塚智沙代、宮崎悠、新垣正悟、小倉裕太、益崎裕章、高山千利
2. 発表標題	wx/ae米は腸内環境を改善し、脂質の排泄を促進する
3. 学会等名	第38回日本肥満学会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	小坂祥範、屋富祖司、金正泰、小林しおり、清水千草、高山千利
2. 発表標題	マウス脛骨神経損傷による疼痛の発生及び回復とGABA機能の変化
3. 学会等名	日本解剖学会第73回九州支部学術集会
4. 発表年	2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----