

機関番号：17102

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

研究成果の概要（和文）：

モルヒネも効き難い神経因性疼痛の発症メカニズムとして、我々は「神経損傷により脊髄内ミクログリアが活性化し、そこに発現するATP受容体P2X4の刺激によりミクログリアから神経栄養因子が放出され、それが神経因性疼痛を引き起こす」ことをすでに報告していた(Nature, 2003 & 2005)。本研究では、ミクログリアがいつ、どこで、どのようにして神経損傷情報を受け取り、何を介して神経因性疼痛を引き起こすのかという本質的な問題の解明を目指した。その結果、損傷神経から放出されたCCL21、それに加えインターフェロン $\gamma$ 、PDGF等のサイトカインを介してミクログリアの活性化が引き起こされることを明らかにした。また、ミクログリア活性化の後にアストロサイトでは転写因子STAT3の活性化が起こり、その結果痛みを引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We had already reported that activated microglia have a main role for evoking neuropathic pain which is resistant to morphine through the stimulation of P2X4 receptors after nerve damages (Nature, 2003 & 2005). In the present study, we tried to find how microglia receive information of nerve damage and cause the pain. It was clarified that microglia are activated through cytokines such as CCL21 released from the damage nerve, interferon- $\gamma$ , PDGF. Moreover, transcription factor STAT3 was activated only in astrocytes after nerve damage that is very important for the evoking neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	91,100,000	27,330,000	118,430,000
2007年度	81,600,000	24,480,000	106,080,000
2008年度	79,200,000	23,760,000	102,960,000
2009年度	69,500,000	20,850,000	90,350,000
2010年度	69,500,000	20,850,000	90,350,000
総計	390,900,000	117,270,000	508,170,000

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. 研究開始当初の背景

痛みは危険回避の大切な情報であるが、過剰な痛みは抑えなければならない。現在、世

界にはモルヒネも効き難い痛み「神経因性疼痛（現在では、神経障害性疼痛とも呼ぶ）」等に罹患する患者が2200万人以上も存在し、

救われ難い痛み苦しんでいるとされる。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った。このような状況の中、我々は「神経因性疼痛が脊髄内ミクログリアの異常な活性化と ATP 受容体 P2X4 の過剰発現を引き起こし、その受容体刺激によりミクログリアから神経栄養因子が放出され、神経因性疼痛を引き起こす」ことを報告した (Nature, 2003 & 2005)。しかし、ミクログリアがいつ、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という本質的な多くの問題が未解明のまま残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、神経が傷害された後、いつ、どこで、どのようにしてグリア細胞が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明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

つぎの5つの研究方法を実施した。

(1) 脊髄ミクログリア活性化の時空解析：まず神経因性疼痛発症に関して、ミクログリア活性化プロセスでの時間・空間解析(4D解析)を精密に行う。

(2) 活性化ミクログリア由来疼痛因子解析：神経因性疼痛に関与するミクログリア関連因子の同定、因子放出部位、放出メカニズムの時空解析を行う。

(3) In vivo 電気生理学的解析：前述の2課題により明らかになったミクログリア由来疼痛関連因子について、痛みシナプス伝達における影響を、末梢刺激誘発電流を中枢脊髄神経での in vivo 電気生理実験で検証する。

(4) In vivo イメージング技術での解析：神経因性疼痛発症モデル動物での中枢脊髄神経におけるミクログリアやアストロサイト活性化を in vivo イメージング技術で4D解析する。

(5) 病態モデル動物での総合解析：神経因性疼痛発症モデル動物脊髄でのアストロサイト活性化の時空解析を、ミクログリアでの解析と同様に研究を進め、両者を対比することにより、さらに、in vivo 電気生理解析および in vivo イメージング4D解析での成果を含めて、神経因性疼痛発症メカニズムを総合的に理解する。

## 4. 研究成果

(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P2X4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。

L5 脊髄神経損傷により、L5 DRG ニューロンの神経損傷側において、神経損傷12時間後からCCL21の発現が有意に増加した。一方、非損傷側においては、CCL21の発現がほとんど認められなかった。また、神経損傷後、軸索小丘及びL5脊髄後根神経の軸索においてもCCL21の発現がみられた。また、脊髄後角において、神経損傷12時間後では、CCL21の発現がほとんど認められない一方で、24時間後、48時間後にはCCL21の発現増加が認められ、神経損傷により、CCL21の発現増加が生じることが明らかとなった。また、L5脊髄神経損傷後の脊髄後角でのCCL21の作用を阻害するためにCCL21の中和抗体0.3  $\mu$ gを神経損傷直前と、神経損傷後3日目まで一日二回、髄腔内投与をしたところ、神経損傷による軽度機械刺激に対する後肢逃避閾値の低下が有意に抑制された。さらに、CCL21の欠損マウスであるpltマウスにおいても野生型マウスと比べ、疼痛閾値の低下が抑制されていた。神経損傷後の脊髄後角において、P2X4受容体の増加が観察されることが知られているが(Tsuda et al., 2003)、この神経損傷によるP2X4受容体の増加は、野生型マウスと比べ、pltマウスでは抑制されていた。また、野生型マウス由来初代培養ミクログリアへCCL21を24時間処置したところミクログリアでのP2X4受容体の発現増加が観察された。さらに、pltマウスでは神経損傷後の疼痛が発症しなかったのに対し、神経損傷後2日目にpltマウスへ、リコンビナントCCL21を髄腔内投与したところ疼痛閾値の低下が観察された。この低下は、P2X4受容体欠損マウスへのCCL21の投与によっては観察されなかった。以上より、L5脊髄神経損傷により、CCL21がDRGニューロンに発現し、放出後、ミクログリアに作用しP2X4受容体の発現増加を介し神経障害性疼痛の発症に深く関与している可能性が示唆

された。

(2) 活性化ミクログリア由来疼痛因子解析

① P2X4 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 P2X4 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。

② P2X7 受容体と CCL3 放出

細胞外 ATP は P2X7 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。

③ P2Y12 受容体と神経因性疼痛発症

ミクログリアに発現する P2Y12 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。

④ P2Y6 受容体と食食作用

神経因性疼痛モデルラットでは、P2Y6 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、P2Y6 受容体刺激によりミクログリアは強度の食食作用を示すことが明らかになった。

⑤ カンナビノイド CB2 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 CB2 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) アストロサイトの関与

末梢神経傷害によるアストロサイト活性化の時空解析を行った。その結果、アストロサイトの増殖(リン酸化 histone H3 陽性)は、損傷側脊髄においてのみ、ミクログリア増殖終了後にあたる術後4日目付近より顕著となり、7日目には終わった。末梢神経損傷-ミクログリア活性化-アストロサイト活性化という流れが見えてきた。マウスにおいて末梢神経損傷後、損傷側脊髄後角において STAT3 の活性化がアストロサイト特異的に起こることが明らかとなった。神経損傷後の脊髄後角におけるアストロサイトの活性化についてアストロサイトのマーカーである GFAP を用いて検討を行った結果、STAT3fl/fl マウス(コントロール)では神経損傷後7および14日目においてその発現が明らかに損傷側で増加しているのに対し、STAT3fl/fl・Nes-Cre マウスでは全ての期間においてほとんど GFAP の発現が観察されず、また軽度機械刺激に対する痛み閾値が有意に抑制された。GLAST 発現細胞特異的 STAT3 欠損マウスでも同様の検討を行った結果、神経損傷後21日目において対象群に比べてTx投与群(コンディショナルノックアウト)で GFAP の発現が主に深層部で抑制され、また軽度機械刺激に対する痛み閾値も部分的に抑制が観察された。これらよりアストロサイトでの STAT3 シグナルが神経障害性

疼痛の病態メカニズムに重要であることが明らかとなり、またアストロサイトでの STAT3 シグナルの役割の解明に向けた研究基盤が確立された。

5. 主な発表論文等

(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 87 件)

1. Biber K, Tsuda M, Saitoh-Tozaki H, Tsukamoto K, Toyomitsu E, Masuda T, Boddeke H, Inoue K. Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. *EMBO J* in press

2. M. Nishida, M. Ogushi, R. Suda, M. Toyotaka, S. Saiki, N. Kitajima, M. Nakaya, K.-M. Kim, T. Ide, Y. Sato, K. Inoue, and H. Kurose. Heterologous down-regulation of angiotensin type 1 receptors by purinergic P2Y2 receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- $\kappa$ B, *PNAS* in press

3. K. Kuboyama, H. Harada, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Ushijima and K. Inoue. Astrocytic P2Y1 receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *J Cerebral Blood Flow & Metab*, (13 April 2011) | doi:10.1038

4. M. Tsuda, Y. Kohro, T. Yano, T. Tsujikawa, J. Kitano, H. Tozaki-Saitoh, S. Koyanagi, S. Ohdo, R-R Ji, M. W. Salter, K. Inoue. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 134(4): 1127-1139 (2011)

5. Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S. P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia*. 2010 May;58(7):790-801.

6. S.Hasegawa, Y. Kohro, M. Shiratori, S. Ishii, T. Shimizu, M. Tsuda and K. Inoue. Role of PAF Receptor in Proinflammatory Cytokine Expression in the Dorsal Root Ganglion and Tactile Allodynia in a Rodent Model of Neuropathic Pain. *PLoS ONE* 2010 May 3;5(5):e10467.

7. M. Shiratori\*, H. Tozaki-Saitoh\*, M. Yoshitake, M. Tsuda, K. Inoue. P2X7 receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways. *J Neurochem*. 114(3):810-819, 2010

8. M. Maeda, M Tsuda, H. Tozaki-Saitoh, K. Inoue, H.Kiyama. Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y12 signaling-dependent manner in the dorsal horn. *Glia* 58(15):1838-1846, 2010

9. N. Kusunose, S. Koyanagi, K. Hamamura, N. Matsunaga, M. Yoshida, T. Uchida, M. Tsuda, K. Inoue and S. Ohdo. Molecular basis for the

dosing time-dependency of anti-allodynic effects of gabapentin in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain* 2010, 6:83

10. K.Nagata\*, T. Imai\*, T. Yamashita, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Inoue. \*equally contributed. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* 2009, 5:20

11. S.Hasegawa, Y.Kohro, M.Tsuda and K.Inoue. Activation of cytosolic phospholipase A2 in dorsal root ganglion neurons by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II after peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2009, 5:22

12. J. Masuda, M. Tsuda, H. Tozaki-Saitoh, K. Inoue. Intrathecal delivery of PDGF produces tactile allodynia through its receptors in spinal microglia. *Mol Pain* 2009, 5:23

13. M. Tsuda, K. Kuboyama, T. Inoue, K. Nagata, H. Tozaki-Saitoh and K. Inoue. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain* 2009, 5:28

14. 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*, 106(19):8032-7, 2009

15. 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*. 56:50-58, 2008.

16. 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*. 28:4949-56, 2008

17. 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* 446, 1091-1095, 2007 など

[学会発表] (計 169 件)

1. K Inoue. Microglia in pain signalling. The 29th Naito Conference: Glia World, invited, Kanagawa (2010.10.5-8)

2. K Inoue. The function of microglial P2 purinergic receptors in neuropathic pain. Purine 2010: Adenine Nucleosides and Nucleotides in Biomedicine, invited symposist, Tarragona, Spain (2010, 5.31).

3. K Inoue. The role of spinal microglia in neuropathic pain. The Lecture to enter as Foreign Academician member of the Royal Academy of Pharmacy of Spain, Special Lecture, Madrid (2010.5.28)

4. K Inoue. The function of microglia in neuropathic

pain. 2009 European Glial Cell Meeting (Euroglia 2009), invited symposist, Paris (2009.9)

5. K. Inoue. Purinergic signaling in microglia in neuropathic pain. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) 2009/APSN 2009, Plenary lecture, invited, Busan, Korea (2009.8)

6. K Inoue. Pain signalling through purinergic receptors of microglia. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, symposist invited, Kyoto (2009.7-8)

7. K.Inoue. Microglia and mechanisms of neuropathic pain. Gordon Research Conferences, Glial Biology: Functional Interactions Among Glia & Neurons, invited, Ventura (2009.3)

8. K. Inoue. Glial - neuronal interactions in neuropathic pain. NeuPSIG Satellite Symposium to the Glasgow 2008 World Congress on Pain. Invited, London (2008.8)

9. K. Inoue. P2X4 molecules expressed in microglia involving in neuropathic pain. Glasgow 2008 World Congress on Pain, Organizer, Invited, Glasgow (2008.8)

10. K.Inoue. Neurons talk with microglia through nucleotides. 7th Dutch Endo-Neuro-Psycho Meeting. Plenary lecture, invited, Doorwerth (2008.6)

11. K. Inoue. Microglia listening to neurons through purinergic receptors. Purines 2008. Plenary lecture, invited, Copenhagen (2008.6-7) など

[図書] (計 11 件)

1. Tsuda M and Inoue K. P2X receptors in Sensory Neurons. In *The Nociceptive Membrane (Current Topics in Membrane, vol.57)* ed.by Uhtaek Oh. p.277-310, Academic Press, London 2006

2. 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

3 井上和秀. ATP。痛み研究のアプローチ。河谷正仁編、p.153-162、真興交易(株)医書出版部 2006

4. 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

5. Ishida S, Tanabe H, Shinozaki Y, Koyano S, Kagechika H, Shudo K, Ozawa S, Sawada J, Ohno Y and Inoue K. How DNA microarray technology contributes to the Retinoid Evaluations. In "Vitamin A: New Research" ed by Ingrid T. Loesing, pp. 71-92, Nova Science Publishers, Inc., 2007

6. 井上和秀. 生理活性ヌクレオチド・ヌクレオシド。In *New 薬理学*、田中千賀子、加藤隆一編、p.147-149、南江堂 2007
7. 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.Corasanti, T. Sakurada and S.Sakurada, Burlington: Academic Press, 2009, pp. 159-163.
8. K. Inoue. P2 Purinergic Receptor. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Signaling Mechanisms*. Volume Editor: K. Mikoshiba, Total editor: Abel Lajtha, Springer Science+Business Media, New York, 2009, pp.361-374.
9. E. Toulme, M. Tsuda, B. S. Khakh and K. Inoue. Role of P2X receptors in pain. In *Translational Pain Research: From Mouse to Man*, CRC Press, in press
10. M. Tsuda, H. Tozaki-Saitoh, K. Inoue. Pain and purinergic signaling. In *Synaptic processes in the nervous system: the role of glial cells: BRAIN RESEARCH REVIEWS*, edited by Joachim W. Deitmer and Christian Steinhäuser. in press
11. H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, and K. Inoue Role of purinergic receptors in neuroprotection. In *Purine and Pyrimidine Receptor: Advances in Pharmacology*, edited by Kenneth A. Jacobson and Joel Linden, in press

〔産業財産権〕

○出願状況（下記など計7件）  
名称：ジアゼピンジオン誘導體  
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。
- ホームページ：  
<http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

- ① 津田 誠 (TSUDA MAKOTO)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：40373394
- ② 齊藤 秀俊 (SAITOH HIDETOSHI)  
九州大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：90444794
- ③ 中塚 映政 (NAKATSUKA TERUMASA)  
関西医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：30380752

(3) 連携研究者

なし ( )