

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19300121

研究課題名（和文） 神経障害性疼痛発症の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of neuropathic pain

研究代表者

野口 光一（NOGUCHI KOICHI）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10212127

研究成果の概要（和文）：

神経障害性疼痛発症の分子メカニズムを解明するために、主にラットを用いたニューロパチックペインモデルを用いて、侵害受容系における種々の分子の関与をこの3年間調べてきた。その結果、後根神経節や脊髄後角ニューロン、さらに脊髄グリア細胞における細胞内情報伝達系分子、ATP 受容体、サイトカインの関与に関して新しい所見を得て、国際一流雑誌に報告することが出来た。これらは新規疼痛治療薬開発のシーズとして期待される。

研究成果の概要（英文）：

In order to examine the novel mechanism of neuropathic pain, we have used the rat model of neuropathic pain and explored the expression and the role of several molecules in nociceptive pathway. As a result, we have found that some intracellular signaling molecules, ATP receptors and some cytokines have important roles in dorsal root ganglion neurons, spinal dorsal horn neurons and spinal glial cells. These results were published in international high-level journals. We believe that these findings are expected as novel seeds for development of new therapeutic drug of neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：神経解剖学、ペインリサーチ

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：後根神経節、MAP キナーゼ、脊髄後角、ATP 受容体、疼痛行動、神経障害

1. 研究開始当初の背景

従来より研究代表者は疼痛研究に特化して研究を続けてきたが、特にこの数年間はニューロパチックペインモデルにおける多彩な分子動態を解明し、非損傷DRGニューロ

ンにおける冷痛センサーであるTRPA1の増加など多くの分子に関する新知見を報告してきた。脊髄においてもニューロンにおけるCaMKIIの増加と疼痛における役割の報告等以外に、グリア細胞における変化も報告して

いる。最新のJ. Neurosci.には、Srcファミリーのリン酸化とニューロパチックペインとの関係という新規メカニズムを解明した。また、最近の研究から、グリア細胞が神経活動の調節にも積極的に関わっていることが示され、生体内でも様々な生理的役割あるいは疾患への関与が注目されている。実際に、神経因性疼痛モデルラットでは脊髄後角のグリア細胞、特にミクログリアに、細胞体の肥大化、突起の退縮、および細胞増殖など、活性化の典型的な形態変化が認められる。ATP受容体P2X₄や、ケモカイン受容体のCCR2やCX₃CR1、そしてTLR4などが、神経因性疼痛に重要なミクログリア分子として報告され、神経因性疼痛に対する脊髄ミクログリアなどグリア細胞の疼痛メカニズムにおける重要性が注目を集めている。

2. 研究の目的

(1) リン酸化MAP kinaseの脊髄後角やDRGニューロンにおける局在

代表的な神経因性疼痛モデルの脊髄後角やDRGにおいて、どのようなニューロンあるいはグリアでMAP kinase (ERK1/2, p38 MAPK, JNK/SAPK, ERK5など)の活性化が生じるかを詳細に同定する。

(2) MAP kinase活性化阻害剤の疼痛関連動作(神経因性疼痛)に及ぼす影響

ERK1/2活性化のinhibitorであるPD98059やU0126、p38 MAPK活性化のinhibitorであるSB203580やFR167653、およびJNK/SAPK活性化のinhibitorであるSP600125を髄腔内投与し、疼痛関連動作(hyperalgesia, allodynia)とMAP kinase活性化との関連を明らかにする。

(3) MAP kinase経路における上流、下流分子の決定、特にATP受容体に注目して

MAP kinaseの活性化がどのような神経活性物質の発現を調節しているのか、すなわちMAP kinaseの下流に存在する分子について、さらにはMAP kinaseを活性化させる上流の因子についても特定する。特に代謝型ATP受容体が末梢神経障害後に増加することを我々は発見しており、極めて有望なMAPKの上流因子と予想される。

3. 研究の方法

上記の課題を、疼痛行動測定、免疫組織化学法、in situ ハイブリダイゼーション法、Western blots法、PCR法、薬物の脊髄内投

与法、等を組み合わせて解析を進めた。

4. 研究成果

(平成19年度)

(1) リン酸化MAP kinaseの脊髄後角やDRGニューロンにおける局在

(2) MAP kinase活性化阻害剤の疼痛関連動作(神経因性疼痛)に及ぼす影響

代表的な神経因性疼痛モデルの脊髄後角やDRGにおいて、どのようなニューロンあるいはグリアでMAP kinaseの一つであるERK5の活性化が生じるのかを詳細に検討し、ERK5のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてknock downラットでの疼痛関連動作(hyperalgesia, allodynia)とMAP kinase活性化との関連を調べた。その結果は、疼痛刺激後のERK5のDRGでの発現と疼痛との関連は、J. Pharmacol. Exp. Ther.に発表した。末梢組織の炎症時におけるERK5の動態・関与に関してはJ. Neurochemに発表した。さらに末梢神経障害後のニューロパチックペインモデルにおける動態は、同じくJ. Neurochemに発表することが出来た。

(平成20年度)

(1) MAP kinase経路における上流、下流分子の決定、特にATP受容体に注目して

MAP kinaseの活性化がどのような神経活性物質の発現を調節しているのか、すなわちMAP kinaseの下流に存在する分子について、特に代謝型ATP受容体が末梢神経障害後に増加することを発見した。研究の結果、P2Y12受容体がミクログリアで増加し、この受容体のシグナルが下流のMAP kinase経路(p38)の調節に関与していること、さらにこのP2Y12及びp38の連関が、ニューロパチックペインモデルにおけるミクログリアの活性化、疼痛メカニズムにおいて重要な役割を持っていることを解明した。これらの結果は、Journal of Neuroscienceに発表した。

(2) 神経障害性疼痛モデルにおけるグリア細胞におけるMAP kinaseの役割

MAPK kinaseファミリーに属するTAK1(Transforming Growth Factor-Activated Kinase 1)が、神経傷害時に脊髄アストロサイトで増加することを発見した。TAK1のアンチセンスオリゴを脊髄腔内に投与し発現を抑制すると、神経傷害に伴う機械的刺激に対する痛覚過敏反応を抑制した。さらにアストロサイトにおけるJNK1

(c-Jun-N-terminal kinase) の活性化を抑制したが、p38MAPK に関しては影響しなかった。これらの結果は神経障害性疼痛メカニズムにおけるアストロサイトでの TAK1/JNK1 シグナリングの受容性を示唆している。これらの新しい所見は、GLIA に発表した。

(平成 21 年度)

神経障害性疼痛モデルにおける脊髄での P2Y14 受容体の発現解析と、P2Y14 特異的な antisense の髄腔内投与後の疼痛行動の変化の解析をこの 1 年間行ってきた。結果的に以下の所見が得られて実験を継続中である。

(1) 半定量的 RT-PCR 法を用いて P2Y14 mRNA 発現量の変化を測定したところ、3 日をピークに 2 週間後まで継続する発現増加が見られた。

(2) ISHH 法を用いてその局在を調べたところ、モデル作成後はやはり 3 日をピークに損傷側の後角と motoneuron の周囲にマイクログリアにおいて P2Y14 mRNA シグナルが増加していた。細胞がマイクログリアであることは免疫二重染色法を用いて確認した。

(3) 術側では P2Y14 AS-ODN 投与群と MM ODN の 2 群間は統計学的に有意差があり、手術後 5-7 日で antisense 群で機械的刺激、温度刺激に対する過敏反応の抑制が観察された。

(4) p38 阻害剤である SB203580 投与群では P2Y14 mRNA の発現が抑制されていた。

これらのデータをまとめて、さらに P2Y14 の内因性リガンドである UDP glucose について検討を加えて、論文作成する予定である。3

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 19 件)

- ①. Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 2010; 518: 687-98. 査読有
- ②. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K. Leukotriene synthases and the receptors induced by peripheral nerve injury in the spinal cord contribute to the generation of neuropathic pain. *Glia* 2010;58: 599-610. 査読有
- ③. Kondo T, Obata K, Miyoshi K, Sakurai J, Tanaka J, Miwa H, Noguchi K. Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. *Gut* 2009; 58:1342-52. 査読有
- ④. Cui, X.Y., Dai, Y., Wang, S.L., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Chen, J. and Noguchi, K. (2008) Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol. Pain*, 4, 17. 査読有
- ⑤. Sakurai, J., Obata, K., Ozaki, N., Tokunaga, A., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Kondo, T., Miyoshi, K., Sugiura, Y., Matsumoto, T., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in sensory neurons after noxious gastric distention and its involvement in acute visceral pain in rats. *Gastroenterology*, 134, 1094-1103. 査読有
- ⑥. Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*, 131, 1241-1251. 査読有
- ⑦. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K. and Noguchi, K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J. Neurosci.*, 28, 2892-2902. 査読有
- ⑧. Katsura, H., Obata, K., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2008) Transforming growth factor-activated kinase 1 induced in spinal astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *Glia*, 56, 723-733. 査読有
- ⑨. Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.*, 510, 188-206. 査読有
- ⑩. Miyoshi, K., Obata, K., Kondo, T., Okamura, H. and Noguchi, K. (2008) Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the

- spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J. Neurosci.*, 28, 12775-12787. 査読有
- ⑪. Ogura, H., Tachibana, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Dai, Y., Yoshiya, S. and Noguchi, K. (2007) Axotomy increases plasma membrane Ca²⁺ pump isoform4 in primary afferent neurons. *Neuroreport*, 18, 17-22. 査読有
- ⑫. Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., and Noguchi, K. (2007) Alternation of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci*, 25, 1097-1111. 査読有
- ⑬. Kozai, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Kobayashi, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. *Glia*, 55, 595-603. 査読有
- ⑭. Mizushima, T., Obata, K., Katsura, H., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321, 28-34. 査読有
- ⑮. Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. *J. Neurochem.*, 102, 1569-1584. 査読有
- ⑯. Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2007) Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation. *J. Neurochem.*, 102, 1614-1624. 査読有
- ⑰. Fukui, T., Dai, Y., Iwata, K., Kamo, H., Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Wang, S., Cui, X., Yoshiya, S. and Noguchi, K. (2007) Frequency-dependent ERK phosphorylation in spinal neurons by electric stimulation of the sciatic nerve and the role in electrophysiological activity. *Mol. Pain*, 3, 18. 査読有
- ⑱. Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Activation of fibroblast growth factor receptor by axotomy, through downstream p38 in dorsal root ganglion, contributes to neuropathic pain. *Neuroscience*, 150, 202-211. 査読有
- ⑲. Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.*, 117, 1979-1987. 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ①. 野口光一. 脊髄後角における痛覚伝達の分子メカニズム. (指定講演) 第 19 回神経科学の基礎と臨床 2009.12.19, 大阪
- ②. 野口光一. 痛みの分子メカニズム. (特別講演) 第 1 回 Macnab Memorial Lecture 2009.12.5, 福島
- ③. Okubo M, Yamanaka, H., Kobayashi K, Noguchi K. Platelet-activating factor biosynthesis in spinal cord contributes to neuropathic pain following peripheral nerve injury. The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) 2009.10.17-21, Chicago, U.S.A.
- ④. 野口光一. 炎症性疼痛の分子メカニズム. (特別講演) 第 1 回日本線維筋痛症学会 2009.10.11, 大阪
- ⑤. 野口光一. 痛みの分子メカニズム. (特別講演) 第 31 回日本疼痛学会 2009.7.17-18, 名古屋
- ⑥. 野口光一. 痛み-その発生機序と臨床的制御の意義-「炎症性疼痛の分子メカニズム」. (招待講演) 第 5 3 回日本リウマチ学会総会. 学術集会 (JCR 2009) 2009.4.24, 東京
- ⑦. Yamanaka, H., Okubo, M., Kobayashi, K. and Noguchi, K. (2008) Induction of annexin A2 in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A.
- ⑧. Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2008) Laminae-specific distribution of Nav mRNAs in the rat spinal cord. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A.

- ⑨. Okubo, M., Yamanaka, H., Kobayashi, K. and Noguchi, K. (2008) Upregulation of leukotriene synthesis in glial cells contributes to neuropathic pain following peripheral nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D. C., U. S. A.
- ⑩. Noguchi, K. (2008) MAP kinase regulation of pain: peripheral, central and glial mechanisms. (Workshops) 12th World Congress on Pain, 8.17-22, Glasgow, U. K.
- ⑪. Noguchi, K. (2008) TRP channels and nociception. (Workshops) 12th World Congress on Pain, 8.17-22, Glasgow, U. K.
- ⑫. Noguchi, K. (2008) Neuropathic pain mechanisms: TRP family and signal transduction molecules. (Plenary Lecture) NeuPSIG satellite to the Glasgow 2008 World Congress on Pain, 8.13-15, London, U. K.
- ⑬. Noguchi, K. (2008) Contribution of changes in signal transduction molecules in DRG and spinal cord to neuropathic pain. (Symposium) The 3rd Asian Pain Symposium, 7, 18-19, Fukuoka.
- ⑭. 野口光一 (2008) 痛みのメカニズム-最近のトピックス-. (特別講演) 第22回日本歯科麻酔学会リフレッシャーコース, 7.13, 東京.
- ⑮. 野口光一 (2008) 痛み伝達の調節機構-TRPファミリー分子とシグナル伝達-(特別講演) 第22回日本ニューロモデュレーション学会, 5.18, 東京.
- ⑯. 野口光一 (2007) 疼痛伝達の分子メカニズムの解明. (指定講演) 次世代の神経科学研究, 第313回大阪大学神経科学懇話会, 12.22, 大阪.
- ⑰. 野口光一 (2007) TRP channel family and cutaneous sensation. (指定講演) 第17回国際痒みシンポジウム, 9.15, 大阪.
- ⑱. Noguchi, K. (2007) Roles of ERK5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. (Symposium) 7th IBRO World Congress of Neuroscience, 7.12-17, Melbourne, Australia.
- ⑲. Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. (Workshop) Second International Congress on Neuropathic Pain, 6.7-10, Berlin, Germany.
- ⑳. 野口光一 (2007) 分子と痛み(1): シグナルと痛み-MAPKを中心として. (特別講演)

第2回痛み研究者の集い, 10.6-7, 京都.

[図書] (計2件)

- ①. 小畑浩一, 野口光一 (2007) 痛みのメカニズム. 運動器の痛み診療ハンドブック, (山下敏彦 編), 南江堂, 東京, 2-17.
- ②. Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2007) Regulation of ERK in sensory neurons during inflammation. In: Encyclopedic Reference of Pain, 1st ed, (Schmidt, R.F. and Willis, W.D. eds.), Springer-Verlag, Heidelberg.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 光一 (NOGUCHI KOICHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10212127