

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791365  
 研究課題名 (和文) 神経因性疼痛発症機構におけるグリシンシグナルの役割と RNA 干渉による治療薬開発  
 研究課題名 (英文) Role of glycine signal in the mechanism of neuropathic pain and development using siRNA for medicament.  
 研究代表者  
 北山 友也 (Kitayama Tomoya)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：60363082

## 研究成果の概要：

坐骨神経結紮モデル動物における脊髄では、グリシンシグナル関連蛋白質に関して変動はなく、ミクログリアの活性は術後一過性に上昇していた。KCC2発現は術後12時間後から著明に減少し、3日後には回復した。BDNF特異的siRNA・TrkB特異的siRNAを脊髄腔内に投与した各ノックダウンマウスでは、いずれもアロディニアが部分結紮後3日間は認められず、4日目以降に発症が認められた。結紮後10日経過したマウスについてノックダウンした場合は、いずれもアロディニアの減弱はなかった。これらから、神経因性疼痛初期における痛みはBDNF-TrkBシグナルによるKCC2発現低下に起因することが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：シグナル伝達；グリシン；RNA干渉；神経因性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛（ニューロパシクペイン）は、炎症性疼痛とは異なり、知覚神経の情報伝達の異常に基づく慢性疼痛とされる。アロディニア allodynia は、本来痛みを伝えない非侵害性刺激（触覚、冷覚など）によっても痛みを生じる現象であり、神経因性疼痛の主症状である。アロディニアには、酸性非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）や麻薬性鎮痛

薬ですら有効な鎮痛効果を現さない。歯科領域においては、抜歯、抜髄他外科的処置における神経損傷後に生じる長期間持続する痛みの原因となる。三叉神経痛は硬化した動脈による三叉神経の圧迫による神経障害が一因となり、洗顔、食事、会話等の軽い刺激で突然激痛が生じる人類最大の疼痛といわれる。全身性では、帯状疱疹および糖尿病時にもアロディニアが生じることが知られてい

る。このように、神経因性疼痛は口腔領域および全身において、難治性で多大な苦痛を伴い、また歯科治療を著しく困難にする。その原因究明と新しい治療法の開発が待たれる重要な研究テーマである。

アロディニアの発症機構については、痛覚一次線維末梢の侵害受容器興奮性増大、神経線維での異常伝導、あるいは、中枢における（三叉神経脊髄路核、脊髄後角）における神経伝達機構の変化の可能性が考えられている。しかしながら、何れの神経伝達が関与するのか、その下流における情報伝達、転写制御による可塑的な調節などに関する分子機構について詳細は明らかでない。幾つかの報告では、脊髄腔 ATP/プリン受容体はアロディニア発現に重要な役割を果たす (Neurosci. Lett., 292, 25, 2000)。血小板活性化因子 (PAF) を脊髄腔内に投与することにより強力かつ長時間持続するアロディニアを形成すること、および下流シグナルに ATP, グルタミン酸, NO が関与すること (Pain, 111, 351, 2004) などが指摘されている。

また、グリシン神経活性のアロディニアにおける役割について近年注目されはじめている。グリシン受容体は、クロライドイオン透過性のイオンチャンネルを構成し、細胞の興奮性を抑制する。特に、グリシン受容体  $\alpha 3$  サブユニットは脊髄後角表層（一層および二層に局限）に分布する。また、グリシン受容体を遮断することによりアロディニア状の症状を誘導することができる。したがって、グリシン抑制からの脱抑制がアロディニアを誘発する可能性が考えられる (日薬理誌, 127, 18, 2006)。事実、脊髄ニコチン型アセチルコリン受容体  $\alpha 4\beta 2$  と  $\alpha 7$  刺激はグリシン神経の活性化を介してアロディニアを抑制することが報告されている (Life Sci., 80, 9, 2006)。また、我々はマウス坐骨神経損傷モデルにおいて「術後 4 日目以降に」グリシントランスポーター阻害薬が抗アロディニア作用を有することを見出している。近年、(N-methyl-D-aspartate) NMDA 受容体のグリシン結合サイトを阻害することにより抗アロディニア作用を得られることが報告されている (Brain Res., 1048, 218, 2005)。グルタミン酸受容体の一種である NMDA 受容体は、カルシウムイオン透過性のイオンチャンネルである。グリシンは、この受容体の活性化に関与すると考えられている。グリシンシグナルがアロディニアの発症過程において重要な役割をしていることを示す報告である。しかし、顎顔面領域からの疼痛におけるグリシン神経による制御はほとんど研究されて

いない。

## 2. 研究の目的

アロディニア形成初期にはグリシンシグナルの活性化がむしろ痛覚過敏を誘導し、アロディニア形成後/維持相においてはグリシンシグナルの脱抑制疼痛シグナルを増強している可能性を明らかにする。

さらに、このグリシンシグナルの活性化がむしろ痛覚過敏を誘導する現象について詳細な検討を行ないグリシンシグナルとアロディニア形成の関係について明らかにする。

これらの研究成果をもとにして、脊髄および三叉神経脊髄路核レベルでのアロディニアの発現機構におけるグリシン制御の役割の解析と抗アロディニア薬の開発をおこなう。

## 3. 研究の方法

三叉神経脊髄路核および脊髄のどの領域にグリシン神経が分布するかについて、グリシン神経に特異的に発現するグリシントランスポーター GlyT2 とグリシン受容体  $\alpha 3$  の二重染色により調べる。

アロディニアモデル動物は、坐骨神経部分結紮 (seltzer model) モデルによる神経因性疼痛を用いる。

モデル動物におけるフォンフライ刺激による逃避反応閾値の減少の経時的変化を調べる。

坐骨神経部分結紮モデルの脊髄ミクログリアの活性化の経時的変化を OX-42 を指標に調べる。

細胞内クロライドイオン濃度について、その制御蛋白質の発現変動を介して検討を加える。

## 4. 研究成果

モデル動物におけるフォンフライ刺激による逃避反応閾値の経時的変化を検討した結果、手術直後から逃避反応が認められ、少なくとも 30 日後まで持続した。坐骨神経結紮モデル動物における脊髄を用いた蛋白質発現の変動を経時的に検討した結果、グリシンシグナル関連蛋白質、すなわちグリシン受容体  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  およびグリシントランスポーターに関しては変動は認められなかった。しかしながら、活性化ミクログリアのマーカー蛋白質である OX-42 について検討したところ、同蛋白質の発現は術後一過性に上昇していた。すなわち、OX-42 蛋白質の発現は術後 3 日目をピークに減少していた。

次に、この OX-42 蛋白質の一過性発現上昇

の生理学的意義を検討するために鎮痛効果が認められた、グリシントランスポーター阻害薬を坐骨神経結紮モデル動物に経時的に投与した。その結果、術後3日目から4日目を境に、同薬物の効果は逆転していた。すなわち、術後3日目までは阻害薬の鎮痛効果は認められなかった。しかしながら、4日目以降では阻害薬を投与することにより、フォンフライ刺激による逃避反応閾値は、著明に増加していた。これらの結果は、ミクログリアの活性化の指標であるOX-42の発現変動と相関するものである。これは、ミクログリアを介した神経因性疼痛発症機構が存在すること、および神経因性疼痛の維持機構とは異なるメカニズムが存在する可能性を示唆するものである。神経細胞内クロライドイオン濃度維持機構についての検討では、同一イオンはクロライドイオン汲み出しに関与する $K^+Cl^-$ -co-transporter (KCC2)および細胞内に取り込む $Na^+K^+Cl^-$ -co-transporter1により維持されている。坐骨神経部分結紮によりKCC2の発現は術後12時間後から著明に減少し、3日後には回復した。さらにKCC2阻害薬であるR-DIOAを脊髄腔内に投与することによりアロディニア反応が惹起された。KCC2の発現制御に関与する脳由来神経栄養因子(BDNF)特異的siRNAを脊髄腔内に投与し、同部位のBDNFをノックダウンしたマウスでは、神経因性疼痛の症状であるアロディニアが部分結紮後3日間は認められず、4日目以降に同症状の発症が認められた。一方、神経部分結紮後10日経過したマウスについて、BDNFをノックダウンした場合には、アロディニアの減弱は認められなかった。BDNF受容体TrkBについても、特異的siRNAを用いたノックダウンマウスを作成し同様の検討を加えたところ、神経損傷後3日間についてアロディニアは認められず、損傷後10日目以降にTrkBをノックダウンしてもアロディニアを抑制することは出来なかった。これらの結果から、神経因性疼痛初期におけるアロディニア等の痛みは、ミクログリアを介したBDNF-TrkBシグナルによるKCC2発現低下に起因することが強く示唆される。

## 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4件)

- ① Morioka N., Abdin JM., Morita K., Kitayama T., Nakata Y. and Dohi T. The regulation of glycine transporter GlyT1

is mainly mediated by protein kinase Calpha in C6 glioma cells. *Neurochem. Int.*, **53**, 248-254, 2008. 有

- ② Morita K., Motoyama N., Kitayama T., Morioka N., Kifune K. and Dohi T. Spinal anti-allodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **326**, 633-645, 2008. 有
- ③ Morita K., Kitayama T., Morioka N. and Dohi T. Glycinergic mediation of tactile allodynia induced by platelet-activating factor (PAF) through glutamate-NO-cyclic GMP signaling in spinal cord in mice. *Pain*, **138**, 525-536, 2008. 有
- ④ Morioka N., Abdin M. J., Kitayama T., Morita K., Nakata Y. and Dohi T. P2X(7) receptor stimulation in primary cultures of rat spinal microglia induces downregulation of the activity for glutamate transporter. *Glia* **56**, 528-538, 2008. 有

[学会発表] (計14件)

- ① 北山友也、血小板活性化因子受容体阻害薬による抗神経因性疼痛作用。  
第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜
- ② 北山友也、神経因性疼痛発症時におけるCl<sup>-</sup>輸送体発現制御機構。  
第114回日本薬理学会近畿部会、2008年11月14日、神戸
- ③ 北山友也、神経因性疼痛で認められるグリシンシグナル賦活による疼痛抑制効果。  
第18回日本臨床精神神経薬理学会 第38回日本神経精神薬理学会 合同大会、2008年10月1日、東京
- ④ 北山友也、神経因性疼痛形成段階で認められるグリシンシグナル変調に関する薬理学的研究。  
第50回日本歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2008年9月24日、東京
- ⑤ 本山直世、血小板活性化因子 (PAF) の脊髄内投与によるアロディニア発症におけるNO-cGMPカスケードを介したグリシン受容体 $\alpha 3$ (Gly $\alpha 3$ )の関与。  
第50回日本歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2008年9月23日、東京
- ⑥ 森田克也、血小板活性化因子 (PAF) 受容体阻害による神経因性疼痛寛解作用。  
第113回日本薬理学会近畿部会、2008年6月20日、岡山
- ⑦ 森岡徳光、脊髄ミクログリアにおけるATP受容体を介したグルタミン酸トランスポーター制御機構。  
第3回トランスポーター研究会年会、2008

年6月8日、京都

- ⑧北山友也、神経因性疼痛に対するグリシントランスポーターの役割—痛みの制御の可能性—

第3回トランスポーター研究会年会、2008年6月8日、京都

- ⑨北山友也、神経因性疼痛形成および維持におけるグリシンシグナル関連蛋白質発現解析。

第81回日本薬理学会年会、2008年3月19日、横浜

- ⑩森田克也、グルタミン酸誘発アロディニア応答におけるグリシン受容体 $\alpha 3$ の関与。

第81回日本薬理学会年会、2008年3月18日、横浜

- ⑪森岡徳光、脊髄ミクログリアにおけるATP受容体を介したグルタミン酸トランスポーター機能調節。

第35回薬物活性シンポジウム、2007年11月30日、広島

- ⑫北山友也、神経因性疼痛発症機構におけるCl<sup>-</sup>輸送体の関与。

第112回日本薬理学会近畿部会、2007年11月16日、大阪

- ⑬本山直世、坐骨神経障害マウスにおけるグリシントランスポーター阻害薬の神経因性疼痛寛解作用機序。

第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2007年8月31日、札幌

- ⑭森田克也、血小板活性化因子(PAF)、グルタミン酸脊髄内投与によるアロディニア発症におけるNO/cGMPカスケードとグリシン受容体の関与。

第111回日本薬理学会近畿部会、2007年6月15日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北山 友也 (Kitayama Tomoya)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60363082

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

森田 克也 (Morita Katsuya)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10116684

本山 直世 (Motoyama Naoyo)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70509661

森岡 徳光 (Morioka Norimitsu)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60346505