

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究スタートアップ

研究期間：2008 年度 ～ 2009 年度

課題番号：20890200

研究課題名（和文）

神経障害性疼痛におけるセラミドの関与

研究課題名（英文）

Spinal ceramide is responsible for the development of neuropathic pain.

研究代表者

小林 悠佳 (KOBAYASHI YUKA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20511562

研究成果の概要（和文）：200字程度

神経障害性疼痛にはグリア細胞由来の炎症性サイトカインによる中枢感作が重要性である。本研究では、脂質メディエーターであるセラミドに着目し、神経障害性疼痛における役割について検討した。結果より、セラミドによる脊髄ミクログリアの活性化および炎症性サイトカインの発現増加が神経障害性疼痛の形成に寄与する可能性が示唆され、セラミドを神経障害性疼痛治療の新規治療ターゲットとして提示する。

研究成果の概要（英文）：200字程度

In this study, the involvement of spinal ceramide in neuropathic pain through microglia activation and inflammatory cytokines increase was revealed. Therefore, ceramide was nominated as a novel therapeutic target of neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	940,000	282,000	1,222,000
2009 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,020,000	606,000	2,626,000

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：神経障害性疼痛、スフィンゴ脂質、グリア細胞、サイトカイン、アロディニア

## 1. 研究開始当初の背景

神経の損傷や機能障害などによって引き起こされる神経障害性疼痛は、特徴的な症状として痛覚過敏やアロディニア（痛みを惹

起しない軽く触った程度の触刺激によっても痛みを誘発する症状）を呈し、モルヒネを代表とするオピオイド鎮痛薬に抵抗性を示す。その発症および維持に関する詳細なメカ

ニズムは不明瞭な点が多いため十分な疼痛緩和を得る治療法は未だに確立されておらず、患者の QOL を著しく損なっている。この非常に複雑な疼痛メカニズム解明のためこれまで様々な研究がなされ、現在では、グリア細胞が疼痛治療のターゲットとしてクローズアップされてきている。グリア細胞は、神経損傷に伴って遊離されるケミカルメディエーターにより活性化されるだけでなく、炎症により誘発される活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の過剰産生によっても活性化されることが報告されている。生体内で産生される ROS は、病態時では過剰状態となり酸化ストレスを生じる。最近の研究では、この酸化ストレスが、細胞死の制御に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。また、近年 ROS のシグナル伝達経路における新規プレーヤーとして脂質分子であるセラミドが注目されつつある。セラミドは生体膜の構成成分であるが、一方で様々な刺激や外因性物質により惹起されるストレス応答を伝達する機能も有する。これまでの研究でセラミドの炎症やそれに伴う疼痛への関与が注目されてきているが、神経障害性疼痛への関与については報告されていない。

そこで本研究では、神経障害性疼痛における脊髄セラミドの関与について検討した。

## 2. 研究の目的

### (1) 神経障害性疼痛におけるセラミドの関与

セラミドは細胞内ストレス応答伝達のセカンドメッセンジャーとして機能することから、神経損傷などに起因した疼痛ストレス条件下においてセラミドの機能活性化を引き起こすことが考えられる。そこで、セラミドと疼痛の関連性、ならびにセラミドが神経障害性疼痛の発症および維持に及ぼす影響について明らかにする。

### (2) セラミドによる神経障害性疼痛発現機構の解明

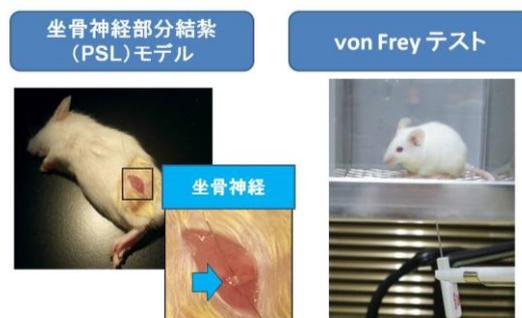
セラミドが細胞内 ROS シグナルにおいて重要な役割を果たしていることは報告されているが、そのシグナルが慢性疼痛を引き起こす有力なシグナルであることは、未だに明らかにされていない。また、ROS シグナルに限らず、セラミドを介した細胞内伝達機構は数多く存在することから、疼痛を引き起こす伝達経路が複数存在する可能性が考えられる。さらに、神経障害性疼痛の発症および維持には、細胞内伝達機構だけでなくグリア細胞の活性化が深く関与している。そこで、グ

リア細胞に対するセラミドの影響を検討し、治療ターゲットとなるシグナル調節因子の探索を行う。

## 3. 研究の方法

ICR 雄性マウスを用い、坐骨神経を縫合糸で部分結紮 (Partial Sciatic nerve Ligation: PSL) することにより神経障害性疼痛モデルを作製した。疼痛反応は、von Frey テストを用いて評価した。具体的には、0.16 g のフィラメントを用いてマウスの後肢足底を 10 回刺激した際の逃避反応の回数を記録した。また、マウスの脊髄を採取し、RT-PCR 法および免疫染色法を用い生化学・組織化学的解析を行った。

対照群として坐骨神経の露出のみを行う Sham 群を作製した。



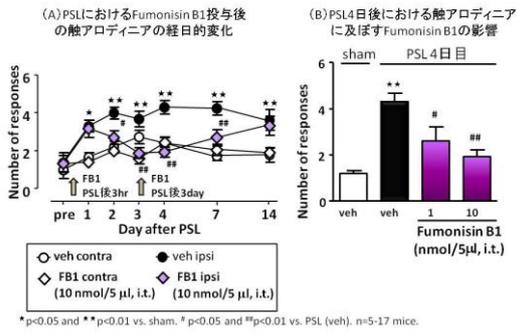
## 4. 研究成果

### (1) 神経障害性疼痛におけるセラミドの関与

#### ① PSL 処置後触アロディニアに及ぼすセラミド合成酵素阻害薬の影響

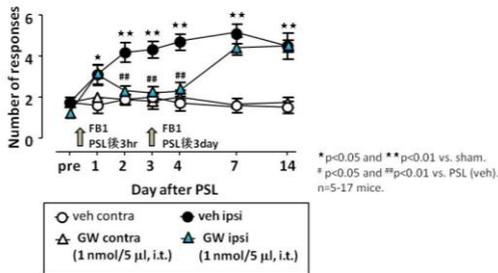
PSL 処置により 14 日以上持続する触アロディニアが観察され、これまでの報告と一致した。この触アロディニアに対するセラミドの関与を明らかにするため、PSL 誘発触アロディニアに及ぼすセラミド合成酵素阻害薬である Fumonisin B1 (FB1: 10 nmol) の影響について検討した。PSL 処置 3 時間後の FB1 脊髄くも膜下腔内 (i.t.) 投与では PSL 処置 2 日目において触アロディニアを抑制したが 3 日目には認められず、その効果は一過性であった。一方、PSL 処置 3 時間後および 3 日目に FB1 を i.t. 投与すると PSL 処置 2 日目から 7 日目まで触アロディニアは顕著に抑制された (Fig.1A)。この実験における PSL 処置 4 日目の触アロディニアの抑制効果は、FB1 (1-10 nmol) 用量依存的であった (Fig.1B)。また、PSL 処置 7 日目に FB1 を i.t. 投与しても、触アロディニアの抑制効果は認められなかった。

Fig.1 セラミド合成酵素阻害薬はPSLによる触アロディニアを減弱する



セラミドの合成はスフィンゴミエリンから加水分解を受けて生成されるスフィンゴミエリン経路を介することが知られている。そこで、神経障害性疼痛におけるスフィンゴミエリン加水分解酵素である中性スフィンゴミエリナーゼ (NSMase) の阻害薬を用いて、PSL 誘発触アロディニアに及ぼす影響を検討した。PSL 処置 3 時間後および 3 日目に NSMase の阻害薬である GW4869 (GW: 1 nmol) を i.t.投与すると触アロディニアは有意に抑制された。(Fig.2)

Fig.2 スフィンゴミエリナーゼ阻害薬は PSLによる触アロディニアを減弱する

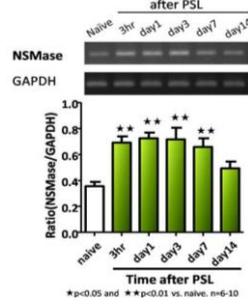


## ②神経障害性疼痛におけるセラミド合成酵素の発現変化

種々の神経変性疾患で神経変性領域におけるセラミド合成経路の活性化が観察され、細胞内セラミド濃度が上昇することが報告されている。このことから神経障害性疼痛時においてもセラミド合成経路に変化を生じること、行動解析の結果より、NSMase が神経傷害後脊髄において活性化することが想定される。

そこで、神経障害性疼痛における NSMase の発現変化を、PSL 処置後の脊髄を用い、RT-PCR 法により経日的に解析したところ、NSMase mRNA は PSL 処置 3 時間後から発現増加し 7 日目まで持続した。(Fig.3)

Fig.3 PSL後脊髄におけるNSMase mRNA発現量の経日的変化



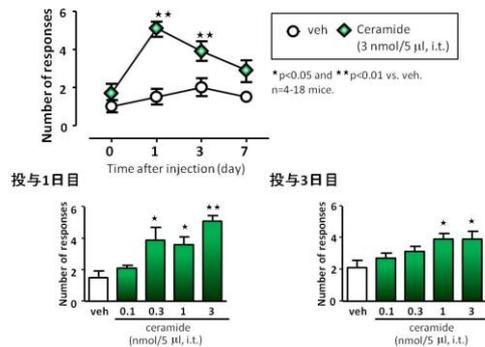
すなわち、神経傷害に伴い脊髄においてセラミド合成酵素の活性化により脊髄でのセラミド産生が増大している可能性が示唆された。

## ②脊髄くも膜下腔内投与セラミドと疼痛との関連性

これまで脊髄においてセラミドが疼痛発現に寄与することを示した報告がないことから、セラミド i.t.投与と疼痛発現の関係について検討した。Naive (未処置) マウスにセラミド (0.1-3 nmol) を i.t.投与し、触アロディニアの発現を経日的に評価したところ、セラミド i.t.投与 1 日目より用量依存的に触アロディニアが発現し、投与 3 日目まで持続した。(Fig.4) しかし、セラミドを坐骨神経周囲に局所投与しても、触アロディニアは惹起されなかった。

したがって、セラミドが脊髄において疼痛誘発因子として機能することが明らかとなった。

Fig.4 セラミド脊髄くも膜下腔内(i.t.)投与は疼痛反応を誘発する



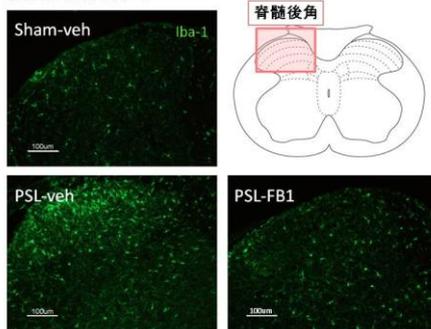
## (2) セラミドによる神経障害性疼痛発現機構の解明

### ①PSL 処置後の脊髄ミクログリアの活性化に及ぼすセラミド合成酵素阻害薬の影響

PSL 処置モデルにおける FB1 (10 nmol, i.t) 投与後の行動解析により、触アロディニアが減弱したことから、神経障害性疼痛において重要な役割を担う脊髄ミクログリアの活性化に及ぼす FB1 の影響について免疫組

織化学染色を用いて検討した。ミクログリアのマーカーとして抗 Iba-1 抗体を用いた。PSL 処置 4 日目に観察される脊髄ミクログリアの活性化は、PSL 処置 3 時間後および 3 日目の FB1 (10 nmol, i.t.) 投与により顕著に抑制された。(Fig.5)

Fig.5 セラミド合成酵素阻害薬投与はPSLによるミクログリアの活性化を抑制する

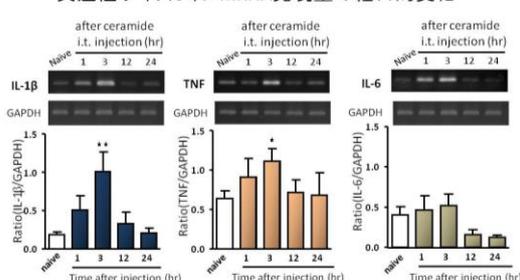


### ②セラミド脊髄くも膜下腔内投与後の脊髄における炎症性サイトカイン発現

セラミド i.t.投与により疼痛が誘発されたことから、その疼痛発現機構について検討を行った。近年、神経傷害により脊髄グリア細胞が活性化し、それらの細胞起因の炎症性サイトカインにより引き起こされる中枢感作が神経障害性疼痛形成に重要であることが示されている。そこで、脊髄ミクログリアの活性化および脊髄における炎症性サイトカインの発現に及ぼすセラミド i.t.投与の影響について検討した。

これまで、神経障害性疼痛モデルにおいて IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ および IL-6 の発現上昇が報告されている。本研究でも同様に PSL 処置後の脊髄において IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ および IL-6 の発現上昇が確認された。これら炎症性サイトカインに焦点を当て、セラミド i.t.投与後の脊髄における発現変化について RT-PCR により解析した。その結果、セラミド (3 nmol, i.t.) 投与により 3 時間後において IL-1 $\beta$  および TNF $\alpha$  mRNA は有意に発現増加した。一方、IL-6 mRNA の変化は認められなかった。(Fig.6)

Fig.6 セラミドi.t.投与後の脊髄における炎症性サイトカインmRNA発現量の経日的変化



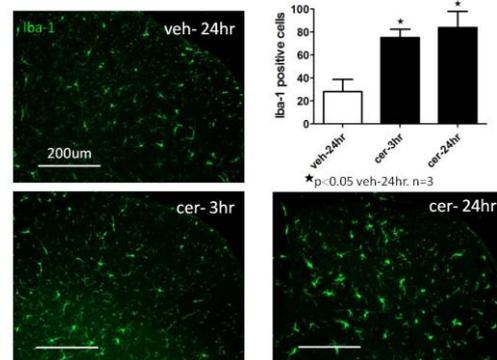
\*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. naive, n=9-10.

### ③セラミド脊髄くも膜下腔内投与による脊髄ミクログリア活性化に及ぼす影響

セラミド i.t.投与後の脊髄を用いて免疫組織化学染色によりミクログリアの活性化を検討した。セラミド (3 nmol, i.t.) 投与 3 時間後および 24 時間後の脊髄後角において、ミクログリアの活性化が観察された。(Fig.7)

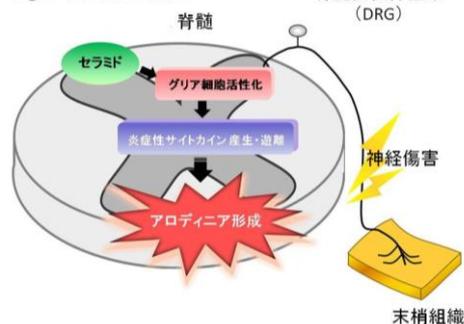
したがって、セラミドの疼痛発現機構に脊髄ミクログリアの活性化および炎症性サイトカインの発現上昇が密接に関与していることが示唆された。

Fig.7セラミドi.t.投与によるミクログリアの活性化



以上の結果より、セラミドが脊髄において疼痛誘発分子として機能することを初めて見出した。また神経障害性疼痛時にはセラミド生成経路が活性化しており、セラミドによる脊髄ミクログリア活性化および炎症性サイトカイン発現増加が神経障害性疼痛の形成に関与することが明らかとなった。本研究により、神経障害性疼痛の疼痛発現機構におけるセラミドの重要性を導き、新規治療アプローチにおける標的分子の探索に新たな手がかりを与えることができたと考える。

Fig.8 本研究の総括



### 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 9 件)

- ①Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y et al. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 $\beta$ . *Pain.*, 149(2), 305-315, 2010. 査読有
- ②Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(31), 13076-13081, 2009. 査読有
- ③Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y et al. Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384(3), 311-315, 2009. 査読有
- ④Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase in sciatic nerve contributes to neuropathic pain after partial sciatic nerve ligation in mice. *Anesth. Analg.*, 109(4), 1305-1311, 2009. 査読有
- ⑤Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. Suppressive effect of imipramine on vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(7), 1231-1234, 2009. 査読有
- ⑥Iwai S, Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and microglial activation in mice with peripheral nerve injury. *Drug Discov. Ther.*, 2 (6), 353-356, 2008. 査読有
- ⑦Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y et al. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia in mice subjected to peripheral nerve injury. *J. Pharmacol. Sci.*, 108 (3), 341-347, 2008. 査読有
- ⑧Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y et al. Up-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  in spinal cord contributes to vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Neurosci. Lett.*, 445, 140-143, 2008. 査読有
- ⑨Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y et al. The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 592 (1-3), 87-92, 2008. 査読有

〔学会発表〕 (計 14 件)

- ①小林悠佳, 木口倫一, 前田武彦, 岸岡史郎 セラミドは脊髄ミクログリアの活性化および炎症性サイトカインの遊離を介して神経障害性疼痛を調節する. 第 83 回日本薬理学会年会 2010. 3. 16-18 (大阪)
- ②前田武彦, 木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎 HMGB1 によるレプチンシグナル活性化は神経障害性疼痛の形成に関与する. 第 83 回日本薬理学会年会 2010. 3. 16-18 (大阪)
- ③木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 レプチンはマクロファージにおける IL-1 $\beta$  および MIP-1 $\alpha$  の発現を増加させる. 第 83 回日本薬理学会年会 2010. 3. 16-18 (大阪)
- ④小林悠佳, 木口倫一, 前田武彦, 岸岡史郎 神経障害性疼痛におけるセラミドの関与. 第 116 回日本薬理学会近畿部会 2009. 11. 13 (大津)
- ⑤木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 シュワン細胞における ERK の活性は坐骨神経結紮による神経障害性疼痛に関与する. 第 32 回日本神経科学大会 2009. 9. 16-18 (名古屋)
- ⑥木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 MIP-1 $\alpha$  の介在する神経障害性疼痛形成機構におけるマクロファージの役割. 第 115 回日本薬理学会近畿部会 2009. 6. 26 (金沢)
- ⑦木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 CC ケモカイン MIP-1 $\beta$  は末梢神経傷害後のアロディニア形成を促進する. 第 30 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム 2009. 8. 28-29 (東京)
- ⑧木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 神経障害性疼痛における MIP-1 $\alpha$  の関与. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009. 3. 16-18. (横浜)
- ⑨木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 レプチンシグナルにより増加するケモカイン CCL3/MIP-1 $\alpha$  は神経因性疼痛の形成に関与する. 第 114 回日本薬理学会近畿部会, 2008. 11. 14. (神戸)
- ⑩ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Kishioka S Involvement of CC chemokine ligand 3 (CCL3) and 4 (CCL4) in nerve injury-induced neuropathic pain. XI Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, 2008. 9. 12-14. (仙台)
- ⑪前田武彦, 木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎 アディポサイトカインによるアロディニア形成の調節. 第 29 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2008. 8. 29-30. (富山)
- ⑫木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎 神経因性疼痛行動に及ぼすケモカイン

CCL3/MIP-1 $\alpha$  の影響. 第 29 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2008. 8. 29-30. (富山)

⑬木口倫一, 小林悠佳, 前田武彦, 岸岡史郎  
坐骨神経部分結紮モデルマウスにおける CC  
ケモカインリガンドおよびその受容体発現  
増加. 第 31 回日本神経科学大会, 2008. 7.  
9-11. (東京)

⑭前田武彦, 木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎  
レプチンの神経因性疼痛増悪作用のメカニ  
ズム解明. 第 113 回日本薬理学会近畿部会,  
2008. 6. 20. (岡山)

[図書] (計 1 件)

①Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Saika  
F, Kishioka S: Chapter 14 Involvement of  
inflammatory mediators in neuropathic  
pain caused by vincristine. *Int. Rev.  
Neurobiol.*, 85, pp179-190, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160416/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 悠佳 (KOBAYASHI YUKA)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20511562

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし