

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17844

研究課題名（和文）神経障害性疼痛発症メカニズムにおけるミクログリアCRACチャネルの重要性

研究課題名（英文）Regulation of neuropathic pain by microglial Orai1 channels

研究代表者

辻川 翔吾（Tsujikawa, Shogo）

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00824301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミクログリアCalcium-release activated calcium (CRAC) チャネル(Orai1)をノックアウトするとミクログリアのカルシウムシグナルが抑制され、炎症性サイトカインの分泌を抑制することが分かった。また、行動実験からOrai1ノックアウトマウスではアロディニア症状が軽減されたため、ミクログリアOrai1を介したカルシウムシグナルが神経障害性疼痛発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛は難治性であり、その中でも神経障害性疼痛については機序が不明な点も多い。神経障害性疼痛を発症すると生活の質を大きく損なうため、臨床上非常に重要な問題である。本研究ではミクログリアCRACチャネルが神経障害性疼痛発症に関わっていることが示されたため、CRACチャネルを標的にした創薬など、今後の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of Orai1 channels for microglia-mediated neuroinflammation following nerve injury and find that deletion of Orai1 in microglia attenuates Ca²⁺ signaling and the production of inflammatory cytokines by proalgesic agonists. Conditional deletion of Orai1 attenuated microglial proliferation in the dorsal horn, spinal cytokine levels, and potentiation of excitatory neurotransmission following peripheral nerve injury. These cellular effects were accompanied by mitigation of pain hyperalgesia in microglial Orai1 knockout mice. A small-molecule Orai1 inhibitor, CM4620, similarly mitigated allodynia in male mice. Unexpectedly, these protective effects were not seen in female mice, revealing sexual dimorphism in Orai1 regulation of microglial reactivity and hyperalgesia. Together, these findings indicate that Orai1 channels are key regulators of the sexually dimorphic role of microglia for the neuroinflammation that underlies neuropathic pain.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 ミクログリア CRACチャネル アロディニア

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みを伝える末梢神経の損傷や機能異常は神経障害性疼痛という慢性疼痛を引き起こす。しかし、その発症機序は不明な点が多く有効な治療法が無いため鎮痛薬も奏功せず本邦でも多数の患者が存在する。神経障害性疼痛発症の機序は様々な起点が考えられているが、その一つとして脊髄後角に存在するミクログリアが挙げられる。中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアは中枢や末梢神経の損傷に反応して形態学的変化や細胞増殖を起こし、伝達物質を放出することによりシナプス伝達を調節する。またミクログリアからの伝達物質放出にはカルシウムシグナルが重要とされている。Calcium-release activated calcium (CRAC)チャネルは細胞膜カルシウムチャネルの一つであり、小胞体での細胞内カルシウム貯蔵が枯渇した際にカルシウムセンサータンパクである Stim が細胞膜内に存在するチャネルポア蛋白の Orai と結合することにより活性化され、細胞外から細胞内にカルシウムを流入させる。このチャネルはカルシウムシグナルを担う主要経路の一つとして近年重要視されているが、その中枢神経系での働き、特にミクログリアにおける役割はあまり知られていない。そのためミクログリアにおける CRAC チャネルがその伝達物質の放出調節に関わり、神経障害性疼痛発症のメカニズムに重要な働きを果たしているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

ミクログリア CRAC チャネルによるカルシウムシグナルが神経障害性疼痛発症に寄与している可能性をミクログリア特異的 CRAC チャネルノックアウトマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) ミクログリア特異的ノックアウトマウス

Cre/loxPシステムを用いて、ミクログリアマーカー蛋白質であるCX3CR1のプロモーター制御下でCreを発現するトランスジェニックマウス (CX3CR1-CreER) とOrai1^{fl/fl}マウスとの交配によりミクログリアに特異的なCRACチャネルのノックアウトマウス (Orai1^{fl/fl} CX3CR1-CreER) を作成する。

(2) アロディニアマウスモデル (Spared nerve injury model)

8週齢のマウスを用い麻酔下に左大腿内側を切開する。坐骨神経の3分枝のうち総腓骨神経、脛骨神経を結紮、切離する。腓腹神経は損傷しないよう閉創し麻酔から十分に覚醒させる。

(3) von Frey試験

機械的痛覚試験として両後肢足底外側部にvon Freyフィラメントを押し当て逃避反応を観察し、up and down法により疼痛閾値を測定する。

(4) 急性脊髄スライス作成

イソフルラン麻酔下に開胸し、95% O₂/5% CO₂でバブリングした氷冷スクロース溶液 (2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 11 glucose, 250 sucrose, 1 CaCl₂, 6 MgCl₂ [mM]) を左心室心尖部から還流する。脊髄を取り出し厚さ 300 μm、水平断でスライスを行う。その後、スライス切片を復温した後に人工脳脊髄液 (125 NaCl, 2.4 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 25 glucose, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ [mM]) 中で記録を行う。

(5) 電気生理学的実験

ホールセルパッチクランプ法を用いて、電極内液組成は95 CsF, 25 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 NaCl, 2 Mg-ATP, 10 QX-314, 5 TEA-Cl, 5 4-AP (mM)、外液は人工脳脊髄液を用い、細胞膜電位を-70 mVに固定して電流の記録を行う。

(6) カルシウムイメージング

脊髄ミクログリアの初代培養を2 μM Fura 2-AMで30分間インキュベートし、カルシウムイメージングを行う。

(7) ELISA法: 第4、5腰髄を採取しRIPA lysisバッファーでホモジェナイズする。遠心分離後、上清を採取したものを蛋白抽出液としmouse ELISA kit (Invitrogen Co.) を用い蛋白濃度の計測を行う。

4. 研究成果

(1) アロディニアマウスモデルを用いた行動実験

ミクログリアに特異的な CRAC チャネルの KO マウス (Orai1^{fl/fl} CX3CR1-CreER) と WT マウスをそれぞれ手術を行いアロディニアモデルとし、von Frey 試験により疼痛閾値を比較検討した。KO マウスでは WT マウスと比較し、有意にアロディニア症状が軽減していることが示された (図1)。

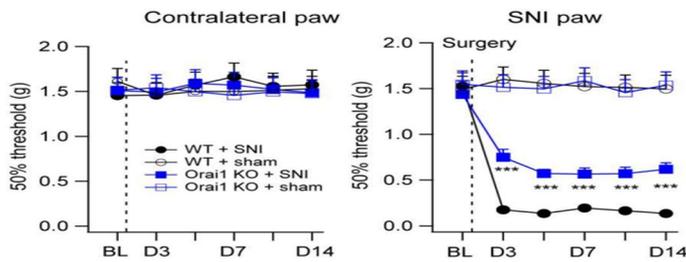


図1 von Frey 試験による疼痛閾値の比較
 (左) 非手術側における疼痛閾値の比較
 (右) 手術側における疼痛閾値の比較

(2) 脊髄ミクログリアを用いたカルシウムイメージング

これまでに神経障害性疼痛が発症するメカニズムとして、脊髄ミクログリアが活性化しカルシウムシグナリングが増大することが報告されている。行動実験で得られた結果のメカニズムを明らかにするため、マウス脊髄ミクログリアの初代培養を用いてカルシウムイメージングを行い比較検討した。WT 由来のミクログリアで観察されたストア作動性カルシウム流入が KO 由来のミクログリアでは有意に抑制されていることが示された (図2)。

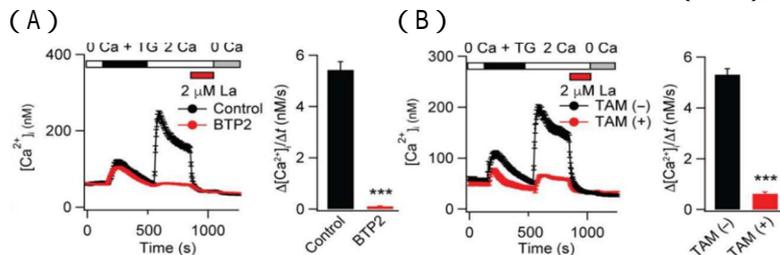


図2 カルシウムイメージングによるストア作動性カルシウム流入の比較
 (A) CRAC チャンネル阻害薬である BTP2 使用の有無による比較
 (B) CRAC チャンネルを不活化させる TAM 使用の有無による比較

(3) ELISA 法を用いた炎症性サイトカイン測定

神経障害性疼痛発症の過程ではミクログリアのカルシウムシグナリングの結果、ミクログリア由来の炎症性サイトカインが増大することが知られている。さらなるメカニズムを解明するために、アロディニアモデル作成 1 週間後に第 4、5 腰髄を採取し脊髄組織の炎症性サイトカインを測定した。WT マウスの脊髄と比較し、KO マウスの脊髄では IL-6、TNF α 、IL-1 β 、BDNF の組織濃度が有意に低下していることが示された (図3)。

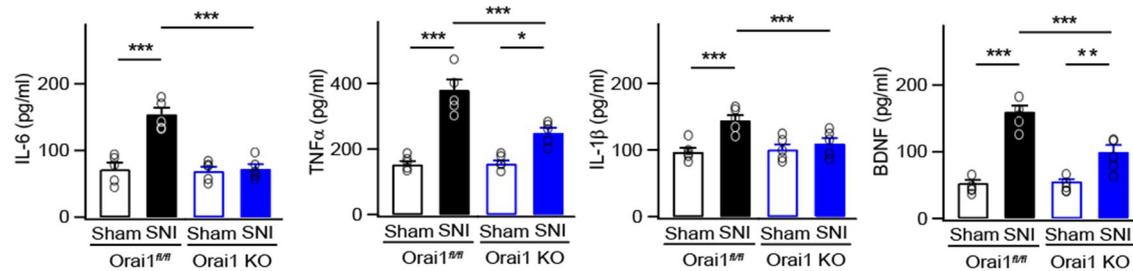


図3 脊髄組織の炎症性サイトカイン濃度の比較

(4) 急性脊髄スライスを用いた電気生理学的実験

ミクログリアが放出した炎症性サイトカインは電気シグナルに変換され中枢神経系へと伝達されることが知られている。さらなる機序解明のため、アロディニアモデル作成 1 週間後の急性腰髄スライスを作成しスライスパッチクランプ記録を行った。WT アロディニアマウス由来の脊髄では sham マウスと比較し興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) の頻度の増加がみられたが、KO アロディニアマウス由来の脊髄では WT アロディニアマウスと比較し EPSC の頻度の増加が有意に低下していることが示された (図4)。抑制性シナプス後電流については全ての群で差は認められなかった。

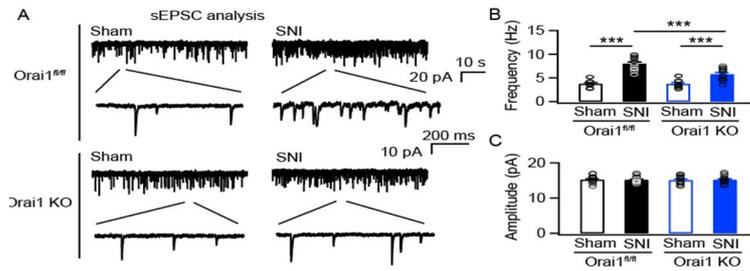


図4 急性脊髄スライスを用いた sEPSC の比較

- (A) 各群の代表トレース
- (B) 各群における Frequency の比較
- (C) 各群における Amplitude の比較

以上の結果から、神経を損傷すると活性化した脊髄ミクログリアが CRAC チャンネルを介したカルシウムシグナリングを増大させ炎症性サイトカインを多量に分泌する。分泌された炎症性サイトカインが脊髄の興奮性シグナルのみを増強し、痛みのシグナルを中枢神経へ伝達している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shogo Tsujikawa, Kaitlyn E DeMeulenaere, Maria V Centeno, Shahrzad Ghazisaeidi, Megan E Martin, Martinna R Tapias, Mohammad M Maneshi, Megumi Yamashita, Kenneth A Stauderman, Apkar V Apkarian, Michael W Salter, Murali Prakriya	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of neuropathic pain by microglial Orai1 channels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eade7002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.ade7002	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 Maneshi MM, Toth AB, Ishii T, Hori K, Tsujikawa S, Shum AK, Shrestha N, Yamashita M, Miller RJ, Radulovic J, Swanson GT, Prakriya M	4. 巻 33
2. 論文標題 Orai1 Channels Are Essential for Amplification of Glutamate-Evoked Ca ²⁺ Signals in Dendritic Spines to Regulate Working and Associative Memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108464	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 Hori K, Tsujikawa S, Novakovic MM, Yamashita M, Prakriya M	4. 巻 598
2. 論文標題 Regulation of chemoconvulsant-induced seizures by store-operated Orai1 channels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5391-5409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP280119	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 Hino H, Matsuura T, Kuno M, Hori K, Tsujikawa S, Mori T, Nishikawa K	4. 巻 133
2. 論文標題 Left Ventricular Hypertrophy Increases Susceptibility to Bupivacaine-induced Cardiotoxicity through Overexpression of Transient Receptor Potential Canonical Channels in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 1077-1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000003554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori K, Matsuura T, Tsujikawa S, Hino H, Kuno M, Oda Y, Nishikawa K, Mori T	4. 巻 60
2. 論文標題 Lipid emulsion facilitates reversal from volatile anesthetics in a rodent model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Toxicology	6. 最初と最後の頁 716-724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15563650.2021.2020280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 辻川 翔吾	4. 巻 30
2. 論文標題 ペインクリニックの未来 慢性痛治療のターゲット 脊髄グリア細胞研究最前線	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 786-790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辻川 翔吾
2. 発表標題 神経障害性疼痛メカニズムにおけるミクログリアCRACチャネルの重要性
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Yamazumi, Shogo Tsujikawa, Madoka Kuroki, Tadashi Matsuura, Takashi Mori
2. 発表標題 Fragmented QRS predicts 2-year mortality in patients undergoing transcatheter aortic valve replacement
3. 学会等名 Anesthesiology annual meeting 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻川 翔吾
2. 発表標題 非癌性慢性疼痛に対して大量オピオイドを不適切使用されていた1例
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会第2回関西支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山住 奎、辻川 翔吾、黒木 円花、松浦 正、森 隆
2. 発表標題 術前心電図多棘性QRS波は経カテーテル大動脈弁留置術後の生存率予測に有用である：後ろ向き観察研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻野 佐依、辻川 翔吾、黒木 円花、松浦 正、森 隆
2. 発表標題 術前心電図多棘性QRS波は血液透析患者の脊椎外科術後の生存率予測に有用である
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------