

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：34417
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21600015
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛維持の神経細胞－前駆細胞－グリアネットワークの解析と一酸化窒素の役割
 研究課題名（英文） Analysis of glial - progenitor - neural networks and role of nitric oxide to maintain neuropathic pain
 研究代表者
 松村 伸治（MATSUMURA SHINJI）
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70276393

研究成果の概要（和文）：ネスチンは神経前駆細胞に発現するクラス VI 中間径フィラメントである。そのネスチンプロモーターで GFP が発現するトランスジェニックマウスを用いて L5 脊髄神経切断モデルを作製し、神経やグリア細胞が脊髄内で増殖するかどうか、神経前駆細胞が存在する場所から移動するかどうかを調べた。神経前駆細胞の増殖や、神経やグリアへの分化が引き起こされる事を明らかにした。それらが末梢神経損傷後の神経障害性疼痛維持に関与している事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nestin is a class VI intermediate filament expressed in NPCs. To study whether neurons and glia proliferate in situ or migrate from specific regions harboring neural progenitor cells, we applied L5 spinal nerve transection to nestin-promoter GFPtransgenic mice to narrow the target to neural progenitor cells. It was suggested that proliferation of neural progenitor cells and their differentiation into neurons and astrocytes occur in the dorsal horn in response to peripheral nerve injury and that they may contribute to the maintenance of neuropathic pain at the late phase after peripheral nerve injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

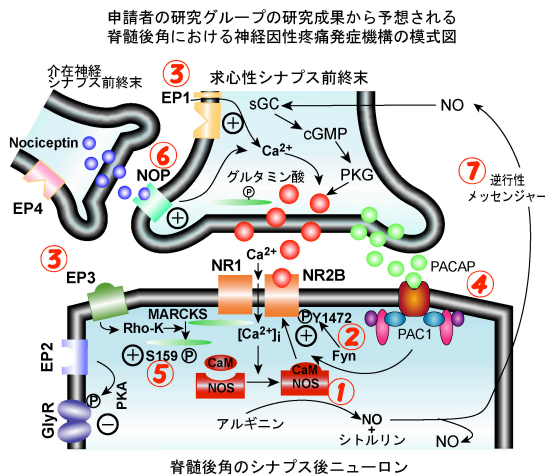
キーワード：神経障害性疼痛、脊髄、神経可塑性、前駆細胞、グリア、プリン作動性、マウス

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は非常に多くの生体因子が関与し、DNA マイクロアレイ等を用いた網羅的な研究が試みられているが、発生機序まで深く掘り下げることができていない。我々の研究グループは、神経因性疼痛のあるものは末梢神経からの異常入力が主要因で脊髄後角

のグルタミン酸遊離→神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の活性化→NO の産生増加→神経因性疼痛発症・維持という機能的かつ可逆的变化で生じるという以下の研究成果を得た。NO 産生が鎮痛薬により可逆的变化を示すという興味ある結果を始点とし、第 5 腰髄脊髄神経 (L5) の単独切断による神経因性疼痛モデル

(L5-SNT モデル)をマウスで確立しており(1, 2)、数多くの遺伝子改変マウスに適用している。その結果、神経因性疼痛出現に①nNOSの活性化が必要不可欠な重要条件(2, 3)で、その活性化に②NMDA 受容体 NR2B サブユニットのチロシン 1472 残基でのリン酸化(4)、③PGE受容体サブタイプの EP1, EP3, EP4(5)、④pituitary adenylylase cyclase activating-polypeptide (PACAP)(2)、⑤myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)の 159 残基でのリン酸化(6)、⑥nociceptin(7)が重要な役割を担っており、さらに⑦NO 自身が逆行性メッセンジャーとしてシナプス前終末に働き nNOS 活性にフィードバックをかけている(8)ことを明らかにしてきた。脊髄損傷によって脊髄後角で引き起こされる器質的な変化の探索では、脊髄後角に nestin 陽性細胞の増加を観察(9)した。しかし、成体脳における神経前駆細胞の増殖や分化には NO がネガティブな制御をしていることが報告されている。神経損傷による疼痛の原因となる NO 産生増加と前駆細胞が増えるという一見矛盾することが脊髄後角で起こっていることになるので、これら前駆細胞分化・増殖のトリガー因子や、神経因性疼痛への関わりを明らかにすることは神経因性疼痛発症維持の可塑性形成機構解明の一助となると考え、今回申請の研究の着想に至った。



2. 研究の目的

L5-SNT モデルマウスで脊髄後角に前駆細胞の増加を観察する。脊髄中心管の上皮細胞は幼弱神経細胞のマーカーである FoxJ1 を発現していることが知られている。そこで中心管上皮細胞から前駆細胞が脊髄後角へと移動する可能性が考えられる。また、神経切断によって増殖した前駆細胞がニューロンあるいはグリアに分化するかで神経因性疼痛の形成が大きく変わることも予想される。ここでの問題は、1) なぜ脊髄神経切断という離

れた場所でのシグナルが中心管へと伝達されるのか、2) 活性化した前駆細胞の運命はニューロンになるのかグリアになるのか、また、3) その決定因子は何か、また、4) 前駆細胞の活性を抑える NO 産生が増大するのになぜ前駆細胞が増殖するのかが挙げられる。これらの解明にはニューロン、前駆細胞、グリアの相互作用の解明が必要不可欠なことである。そこで我々は、個体・組織・細胞各レベルの標本を用意し、神経因性疼痛に関わりの深い物質、プロスタグランジン(PG)・NO・ATP 等、を投与して、ニューロン・前駆細胞・グリアが形態的にどのように変化するかを免疫組織化学的に明らかにする。さらにリアルタイムな NO 産生や細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化のそれぞれあるいは同時イメージングにより、NO と前駆細胞の増殖・分化の矛盾を解明しニューロン-前駆細胞-グリアの3者のネットワークの神経因性疼痛形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) L5 神経切断モデルマウス脊髄における nestin 陽性細胞の挙動の観察

神経因性疼痛モデル動物脊髄での nestin 陽性前駆細胞活性化・不活性化因子の検討動物モデル Kim & Chung モデルを一部改変して申請者らが確立した神経因性疼痛動物モデルであるマウス第5腰部(L5)脊髄神経単独を切断したモデル動物を用いて実験を行った。マウスは、nestin-EGFP transgenic mice (東大・細胞分子生理学研究室・山口先生より供与) や野生型マウスを用いた。L5 脊髄神経切断モデルを作製し、輻射熱疼痛計および von Frey 刺激毛を使った機械刺激により痛覚閾値を測定し、神経因性疼痛を確認した。

(2) 免疫組織化学 (1) のモデルマウスから得た標本を、ニューロン (Tuj1, PSA-NCAM, NeuN)、アストログリア (GFAP)、オリゴデンドロサイト (NG2)、ミクログリア (Iba1, OX42)、に特異的な抗体を用いて染色しその局在、共存の有無を明らかにした。また、前駆細胞やアストロサイトが活性化され増殖をしているか BrdU を用いて調べた。L5 脊髄神経の単独切断に伴う神経因性疼痛が隣接する第4-6 腰髄後角における細胞の局在にどのような影響を及ぼしているかも検討した。

(3) 脊髄スライス標本を用いたリアルタイムな nestin 陽性細胞の挙動- $[Ca^{2+}]_i$ 動態イメージング 前駆細胞の挙動を、nestin-EGFP をマーカーに用いたリアルタイムイメージした。ATP がミクログリアの増加に関与している事が知られているので、ATP アゴニストの前駆細胞への効果を $[Ca^{2+}]_i$ 動態イメージングを用い検討した。

(4) 分散培養細胞を用いたニューロン、前駆細胞、グリアの応答性の変化 DRG の分散培養細胞にはニューロン、前駆細胞、グリアが含まれる。その培養液中に神経因性疼痛に関わりの深い ATP アゴニストを投与して、前駆細胞どのように変化するかを検討した。

4. 研究成果

(1) 脊髄における、発達に伴うネスチン発現変化の探索 胎児期の発現については以前に報告があったが、生後の脊髄におけるネスチンの発現変化について追跡した。

中心管付近に最も強いネスチンの発現が観察され、生後 0 日で、中心管の面積の $96.2 \pm 0.5\%$ がネスチン陽性であった。中心管では成長しても $66.9 \pm 2.0\%$ 発現していた。痛みを受容している脊髄後角や、接触感覚を受容している脊髄後角では生後すぐでは、それぞれの面積のうち $14.8 \pm 4.2\%$ と $12.4 \pm 1.4\%$ の発現が観察されたが、7 日以後ほとんど発現していなかった ($0.12 \pm 0.03\%$ および $0.18 \pm 0.06\%$)。

(2) 神経障害性疼痛によるネスチン陽性細胞の脊髄後角に於ける増加 L5-SNT モデルマウスでは、モデル作製 3 日後から有意に健側よりも患側でネスチン陽性細胞が多く観察された (図 1)。

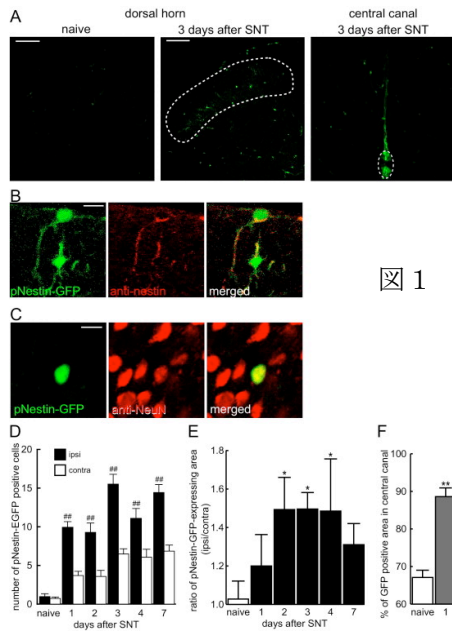


図 1

(3) 5-ブロモデオキシウリジン (BrdU) ラベリングを用いた L5 脊髄神経切断後の細胞増殖の確認 L5 神経切断により増加したネスチン陽性細胞が増殖によるものかどうか確認するために BrdU の取り込みを調べた。2 日と 3 日後に患側側脊髄後角で有意に BrdU 取り込みが増大し、BrdU ラベルされた細胞の一部はネスチンを発現し前駆細胞である事が、

また、一部はミクログリアである事がわかった (図 2)。

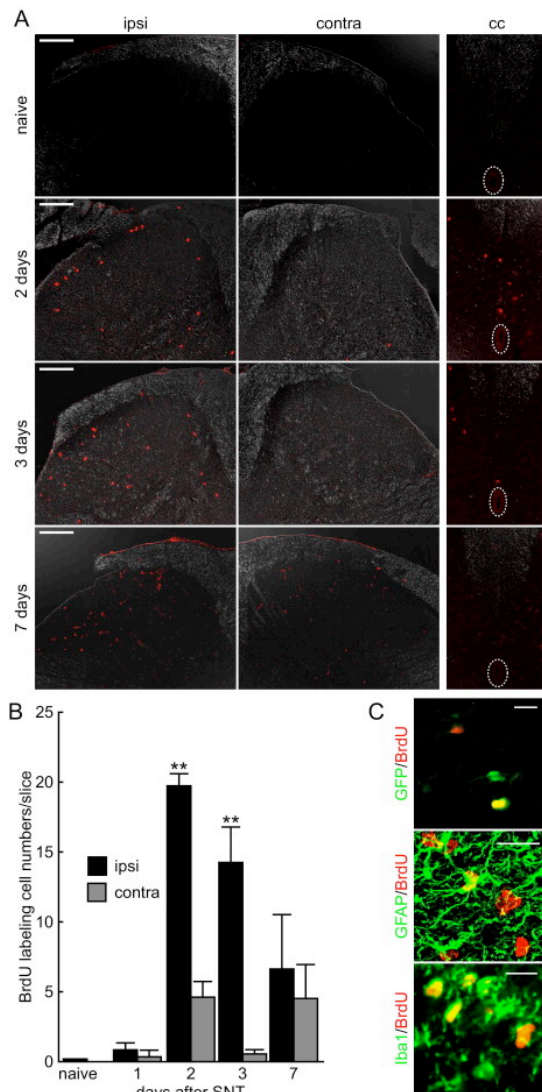


図 2 L5-SNT の BrdU 取り込み

(4) 脊髄スライス培養標本への ATP の効果 損傷した組織から放出される ATP はニューロンとグリア細胞間の相互コミュニケーションにおいて重要な役割を演じている事が知られている。そこで、ATP が神経障害性疼痛時の脊髄後角においてどのような役割を演じているかを調べた。

まず、L5-SNT モデルマウスより得たスライス標本を用いてカルシウムイメージングを試みた。L5-SNT 後 3 日で患側のネスチンの発現が増大した (図 3A)。それぞれの細胞体の位置に ROI を設定して、ATP アゴニストを投与したところ、患側のネスチン陽性細胞でのカルシウム濃度上昇が増大していた (図 3B)。SL5-SNT 後 7 日まで、経日的に測定したところ、15-SNT 後 2 日目から有意に、患側で ATP アゴニストに対するカルシウム応答性が増大している事を明らかにした (図 3C)。

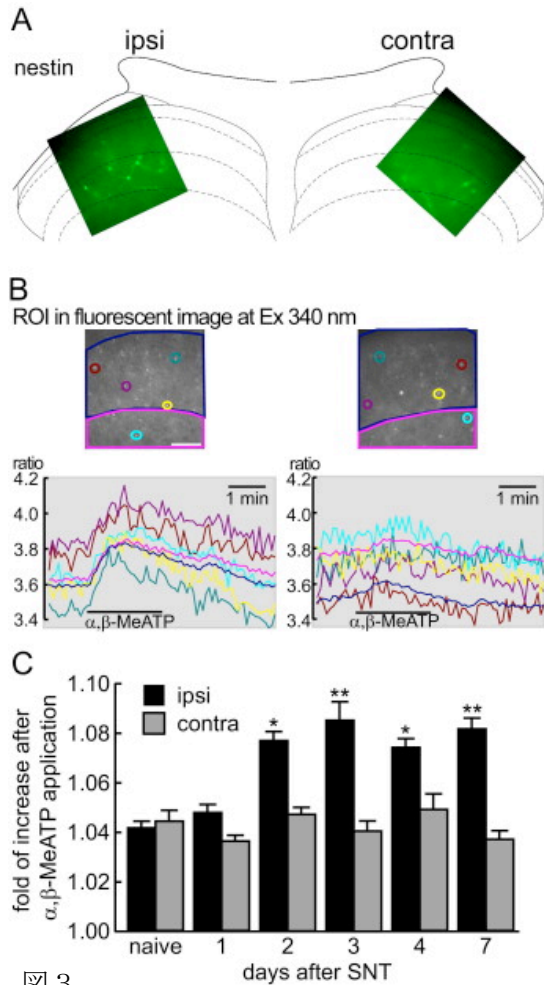


図 3

次に、ネスチン発現にプリン作動性受容体が関与しているかどうかを調べるために、脊髄スライス培養標本を用いて、プリン受容体アンタゴニストの効果を検討した。脊髄スライ

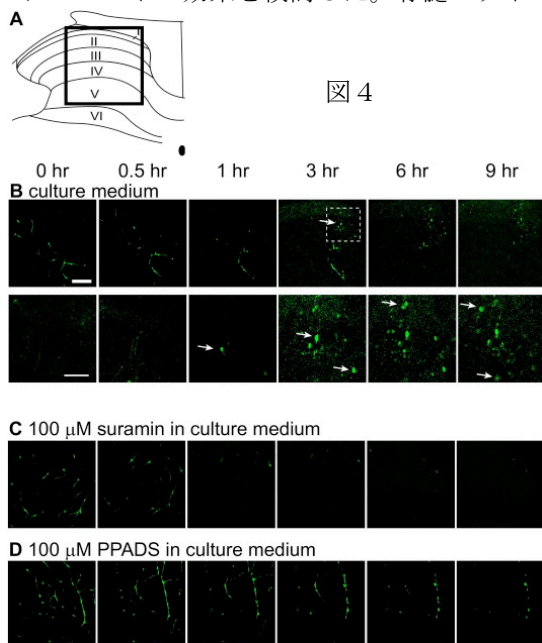


図 4

ス培養標本は培養開始後 3 時間から新たなネスチン陽性線維が発現してくるが、プリン作動性アンタゴニスト存在下では新生が阻害された (図 4)。

さらに、DRG 初代分栽培用標本を用いて、プリン作動性受容体とネスチン発現の関連を調べた。成体の DRG ニューロンはネスチンを発現していない。その DRG の初代分散培養に ATP アゴニストを投与したところ濃度依存的にネスチン発現ニューロンの数が増大した。

以上の結果より、神経障害性疼痛において、神経幹細胞の活性化、増加が引き起こされて、それにはプリン作動性受容体が関与している事を示唆する。慢性疼痛における神経幹細胞の増殖やそれらの神経回路再構築への関与の解明は今後の課題である。

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 6 件)

① 伊藤誠二、下條正仁、松村伸治 (2011)
痛みの可塑性と慢性化
脊椎脊髄ジャーナル 特集痛みとしびれのサイエンス—基礎と臨床, 第 24 巻 第 5 号, 341-347 頁 査読無

② Kunori, S., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Katano, T., Audoly, L., Urade, Y. and Ito, S.
A novel role of prostaglandin E2 in neuropathic pain: blockade of microglial migration in the spinal cord.
Glia 59, 208-218, 2010. 査読有

③ Matsumura, S., Kunori, S., Mabuchi, T., Katano, T., Nakazawa, T., Abe, T., Watanabe, M., Yamamoto, T., Okuda-Ashitaka, E. and Ito, S.
Impairment of CaMKII activation and attenuation of neuropathic pain in mice lacking NR2B phosphorylated at Tyr1472.
Eur. J. Neurosci. 32, 798-810, 2010. 査読有

④ Matsumura, S., Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., Lu, J., Naritsuka, H., Yamaguchi, M. and Ito, S.
Characterization of nestin expression in the spinal cord of GFP transgenic mice after peripheral nerve injury.
Neuroscience 170, 942-953, 2010. 査読有

⑤ Ohnishi, T., Matsumura, S. and Ito, S.
Translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by ATP is mediated by P₂X and P₂Y receptors.

Mol. Pain 5, 40 (1-16), 2009. 査読有

⑥ Kunori, S., Matsumura, S., Mabuchi, T., Tastumi, S., Sugimoto, Y., Minami, T. and Ito, S.

Involvement of prostaglandin F_{2α} receptor in ATP-induced mechanical allodynia.

Neuroscience 163, 362-371, 2009. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Ito, S., Kunori, S., Matsumura, S., Katano, T., Urade, Y. and Okuda-Ashitaka, E.

Blockade of microglial migration in the spinal cord by prostaglandin E2 via EP2. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, November 12-16, 2011.

② Matsumura, S., Kunori, S., Nakazawa, T., Abe, T., Yamamoto, T., Katano, T., Watanabe, M., Okuda-Ashitaka, E. and Ito, S.

Attenuation of neuropathic pain by impaired Ca²⁺ signaling in mutant mice lacking the Tyr-1472 phosphorylation site of the NR2B.

The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, November 13-17, 2010.

③ Ito, S., Kunori, S., Mabuchi, T., Tastumi, S., Sugimoto, Y., Matsumura, S. and Minami, T.

Involvement of prostaglandin F_{2α} receptor in ATP-induced mechanical allodynia.

The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, October 17-21, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：埋植用鎮痛製剤

権利者：荒木吉朗、海堀昌樹、松村伸治、伊藤誠二、權雅憲

種類：特願

番号：(2010-127252) 2010

出願年月日：2011-251944

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 伸治 (MATSUMURA SHINJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70276393

(2) 研究分担者

伊藤 誠二 (ITO SEIJI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80201325

(3) 連携研究者

なし