

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300115

研究課題名（和文） 神経障害性疼痛の関わる脊髄ニューロン・グリアの分子形態学的基盤

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of spinal neuro-glial interaction involving 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特に脊髄グリアとニューロン間の相関に関する分子を解明するために、主にラットを用いたニューロパシ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 ATP 受容体、脂質メディエーター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。

研究成果の概要（英文）：

In order to examine the novel mechanism of neuropathic pain, especially interaction between spinal glial cells and neurons, 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 several new findings and hypotheses about ATP receptors and lipid mediators in dorsal root ganglion neurons, spinal dorsal horn neurons and spinal glial cells. These results were published in international high-level journals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経障害性疼痛 脊髄 ATP受容体 脂質メディエーター マイクログリア

1. 研究開始当初の背景

今後の医学の中心となる患者の QOL の向上に最も重要な、不必要な痛みの除去のため、既存の鎮痛剤では除去が困難な難治性疼痛病態の治療薬開発のシーズ発見のため

に基本的な方向性として基礎的研究を推進してきた。難治性疼痛の代表である神経障害性疼痛モデルの一次知覚ニューロン及び脊髄における多彩な分子動態において、非

損傷 DRG ニューロンや損傷ニューロンにおいて多くの変化が生じ、難治性の変化を生じているメカニズムを報告してきた。また、脊髄においても、ニューロンだけでなく、マイクログリアやアストロサイトなどグリア細胞においても、多くのシグナル分子、サイトカイン、ATP 受容体等のダイナミックな変化が生じ、病態を形成していることがわかった。これらのニューロン-グリア連関に関する研究の最大の未解決問題は、末梢神経障害からグリア活性化へ至る機構、さらにグリアでの多彩な変化が最終的にニューロンの興奮性を上昇させる機構が、明らかになっていない事である。

これまでの本教室での基盤研究の成果をさらに発展させて上記の問題を解明すべく、次の観点から研究を進める。第1には最近発見したロイコトリエンの神経障害性疼痛への関与を積極的に発展させる。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。活性化型マイクログリアから放出される脂質メディエーターに特に着目した。脂質メディエーターは細胞膜、あるいは核膜から切り出されたのち、修飾を受けて生理活性を持つようになる (Annu Rev Pharmacol. 2009, 49, 123-50)。その代表的な分子としてアラキドン酸を基質とするエイコサノイド(プロスタグランジン類、ロイコトリエン[LT]類)が知られている。プロスタグランジンは末梢における発痛に関与することが報告されているが(Ann N Y Acad Sci. 1998, 1, 840, 269-81.)、ロイコトリエンが疼痛伝達に関与する報告は少なく、神経系におけるロイコトリエンの産生細胞、および受容体の発現局在も全くわかっていない。

第2には活性化型マイクログリアで発現する受容体として、P2Y受容体があり、これも神経障害性疼痛に関与することが注目を集めている (Kobayashi et. al. J. Neurosci 2008, 28, 2892-902)。これを報告したP2Y12以外の受容体の関与、お互いの連関、

さらにP2Y受容体の発現上昇のメカニズム等、現時点で不明であり精査すべき問題点が存在する。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛モデルの脊髄、特にグリア細胞及びニューロンにおいて

(1)a. ロイコトリエン各合成酵素・受容体発現変化・発現細胞の同定

b. 各合成酵素・受容体の発現調節因子の探索

c. 疼痛によるロイコトリエン受容体下流シグナルの解析

(2)a. ATP 受容体 P2Y6, 13, 14 受容体の神経障害性疼痛への関与

b. P2Y 受容体が発現上昇するシグナルカスケードの解明

c. P2Y 受容体の機能阻害と、マイクログリアの形態変化、活性化との関係

以上を検索し、さらに発展させることである。

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 22 年度結果)

(1)一次知覚ニューロンにおけるロイコトリエン合成酵素、受容体 mRNA 発現、その疼痛行動への関与の解明 末梢炎症モデルを用いて、a. CysLT2 が DRG ニューロンで多く発現し、それと ATP 受容体 P2X3 が高頻度に共存することが明らかとなった。b. CysLT2 のアゴニストである LTC4 を事前投与すると、単独では疼痛行動を惹起しない量の ATP アゴニストでも疼痛行動が現れることが明らかとなった。c. 一次知覚ニューロンにおいてもロイコトリエン受容体 CysLT2 が末梢炎症時の痛覚過敏に関与していることが明らかとなり、以上のデータは Molecular Pain に発表した。

(2) 神経障害性疼痛モデルにおける脊髄での P2Y6, 13, 14 受容体の発現解析と、それぞれ特異的な antisense、阻害剤の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。以下の所見が得られて論文投稿直前である。

①半定量的 RT-PCR 法を用いて P2Y6, 13, 14 mRNA 発現量の変化を測定したところ、それぞれ特異的な時間的変化を示す発現増加が観察された。

②マイクログリアにおいて P2Y6, 13, 14 mRNA シグナルが増加しており、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。

④p38 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。

(平成23年度結果)

(1) 末梢神経障害後の脊髄マイクログリアにおける PAF (platelet-activating factor) 合成酵素及びその受容体の増加 末梢神経損傷モデルを用いて、PAF 合成酵素である LPCAT2 が活性化マイクログリアにて産生増加することを、RT-PCR 及び二重染色 in situ ハイブリダイゼーション法にて発見した。さらにその受容体である PAFr が同様にマイクログリアで増加し、PAFr 阻害剤の投与で疼痛過敏が抑制されることが明らかとなった。末梢神経障害後に脊髄マイクログリアで PAF-PAFr シグナリングが神経障害性疼痛に関与していることを Molecular Pain に発表した。

(2) 神経障害性疼痛モデルにおける脊髄での P2Y6, 13, 14 受容体の発現解析と、それぞれ特異的な antisense、阻害剤の投与後の疼痛行動の変化の解析をこの2年間行ってきた。以下の所見が得られて論文を投稿して、現在 revision のための追加実験中である。

①~④昨年度の結果と同様であり、それぞれの結果を論文投稿ができるよう、実験を繰り返し

定量化し、そのデータを論文用に作成した。

⑤P2Y6, 12, 13 の阻害剤を同時投与すると、単体投与よりも疼痛行動の抑制が長時間継続した。

(平成24年度結果)

(1) 上記に記した神経障害性疼痛モデルにおける脊髄での P2Y6, 13, 14 受容体の発現解析と、それぞれ特異的な antisense、阻害剤の投与後の疼痛行動の変化の解析に関する論文は、最終的に採択され、GLIA 60:1529-1539 (2012) に発表した。

(2) 引き続き末梢神経障害による Neuropathic Pain モデルでの脊髄における動態、特にグリア細胞とニューロンとの相関に関わる分子の探索を続けた。従来より末梢の炎症や発痛に関わることで極めて有名である COX (cyclooxygenase) とその下流の脂質メディエーターとしてのプロスタグランジンが、脊髄内においても侵害受容に関わることが示唆されていた。これらは主に PGE2 とその各受容体に関してであり、それ以外の PG 系についての情報は極めて少なかった。そこで末梢神経障害時の脊髄における COX とその下流の酵素 (PGD2)

TxA2 合成酵素各種、その受容体の発現動態と神経障害性疼痛における役割について検討した。その結果、以下の事が明らかとなった。

①神経障害性モデルラットを用いて、脊髄における COX, PGD2, TXA2 synthases とその受容体の発現とモデルにおけるその変化を分子組織化学的に検討した。

②COX-1 は脊髄に定常的に発現しており、脊髄後角 I-II 層のマイクログリアにおいては末梢神経障害によりその発現が増加した。一方、COX-2 は神経障害後脊髄の血管において発現が増加した。

③TXA2 synthase と PGD2 synthase mRNAs が脊髄マイクログリアで神経障害後に急速に増加した。

④COX-1 阻害剤と DP2 受容体拮抗剤がモデルの機械的アロディニアを抑制した。

⑤以上の結果は、末梢神経障害後の脊髄マイクログリアでの PGD2 産生は COX-1 依存的であり、脊髄ニューロンはマイクログリアより PGD2 を

受容しているという可能性が証明された。DP2のシグナル経路を介したPGD2が、脊髄マイクログリアからニューロンへの興奮性メディエーターとして、さらに神経障害性疼痛時の機械的アロディニアのトリガーとして働いていることが示唆された。

これらの結果は、GLAI 2013; 61: 943-956に発表した。

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 20 件)

1. Kondo T, Sakurai J, Miwa H, Noguchi K. Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distention-induced visceral pain. *Neuroreport* 2013;24:68-72. 査読有
DOI 10.1002/glia.22436
2. Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, Noguchi K. COX-1-dependent prostaglandin D2 in microglia contributes to neuropathic pain via DP2 receptor in spinal neurons. *Glia* 2013;61:943-56. 査読有
3. Yu L, Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids. *Mol Pain* 2013;9:3 査読有
4. Kashimoto R, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Yagi H, Mimura O, Noguchi K. Phosphorylation of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) protein in spinal microglia following peripheral nerve injury and lysophosphatidic acid administration. *Glia* 2012;61:338-48 査読有
DOI 10.1002/glia.22436
5. Daigo E, Sakuma Y, Miyoshi K, Noguchi K, Kotani J. Increased expression of interleukin-18 in the trigeminal spinal subnucleus caudalis after inferior alveolar nerve injury in the rat. *Neurosci Lett* 2012;529:39-44 査読有
doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.007
DOI 10.1016/j.jchemneu.2012.07.003
6. Lee SM, Cho YS, Kim TH, Jin MU, Ahn DK, Noguchi K, Bae YC. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J Chem Neuroanat* 2012;45:45-9 査読有
DOI 10.1002/glia.22373
7. Kobayashi K, Yamanaka H, Yanamoto F, Okubo M, Noguchi K. Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia* 2012;60:1529-39 査読有
DOI 10.1002/glia.22373
8. Wang S, Dai Y, Kobayashi K, Zhu W, Kogure Y, Yamanaka H, Wan Y, Zhang W, Noguchi K. Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR-2 in rat DRG neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain. *Eur J Neurosci* 2012;36:2293-301 査読有
DOI 10.1111/j.1460-9568.2012.08142.x
9. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Kanda H, Dai Y, Noguchi K. Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2012;8:8 査読有
DOI 10.1186/1744-8069-8-8
10. Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K. Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. *Pain* 2012;153:68-79 査読有

- DOI 10.1016/j.pain.2011.09.009
11. Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Fukuoka T, Noguchi K. Increase of close homologue of cell adhesion molecule L1 in primary afferent by nerve injury and the contribution to neuropathic pain. *J Comp Neurol*. 2011; 519:1597-615 査読有
DOI 10.1002/cne.22588
 12. Fukuoka T, Noguchi K. Comparative study of voltage-gated sodium channel α -subunits in non-overlapping four neuronal populations in the rat dorsal root ganglion. *Neurosci Res* 2011;70:164-71 査読有
DOI 10.1016/j.neures.2011.01.020
 13. Yoshida N, Kobayashi K, Yu L, Wang S, Na R, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin. *Mol Pain* 2011; 7:41 査読有
DOI 10.1186/1744-8069-7-41
 14. Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y Noguchi K. Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. *Pain* 2011;153:68-79 査読有
DOI 10.1016/j.pain.2011.09.009
 15. Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K. Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 2011;504:57-61 査読有
DOI 10.1016/j.neulet.2011.08.058
 16. Noguchi K, Okubo M. Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain. *Biol Pharm Bull* 2011;34:1163-9 査読有
DOI 10.1248/bpb.34.1163
 17. 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
DOI 10.1002/glia.20948
 18. 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
DOI 10.1002/cne.22238
 19. Fukuoka T, Kobayashi K, Noguchi K. Laminae-specific distribution of alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 2010; 169: 994-1006. 査読有
DOI 10.1016/j.neuroscience.2010.05.058
 20. Kondo T, Oshima T, Obata K, Sakurai J, Knowles CH, Matshimoto T, Noguchi K, Miwa H. Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception. *Digestion*

2010;82:150-155. 査読有

DOI 10.1159/000310836

[学会発表] (計 8 件)

1. 野口光一. 神経障害性疼痛の動物モデルと遺伝子発現. (シンポジウム) 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012. 10. 27 名古屋
2. Noguchi K. Leukotriene synthases and the receptors in nociceptive pathway contribute to the neuropathic and inflammatory pain. 14th World Congress on Pain (IASP 2012) 2012. 8. 31 Milan Italy
3. 野口光一. 痛み研究の目指すところ：今後の研究の方向性について. (シンポジウム) 日本ペインクリニック学会 第 46 回大会 2012. 7. 6 出雲
4. 野口光一. 痛みの科学-神経障害性疼痛のメカニズムと神経可塑性-. (共催セミナー) 日本ペインクリニック学会 第 46 回大会 2012. 7. 5 出雲
5. Noguchi K. Detailed analysis of gene expression in primary afferent neurons in a rat model of neuropathic pain. The 9th IASP Research Symposium 2011. 10. 16 Shanghai China
6. 野口光一. 痛みの分子メカニズム. 第 37 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2010. 11. 19 名古屋
7. 野口光一. 神経障害性疼痛の分子メカニズム. 第 21 回日本末梢神経学会学術集会 2010. 9. 4 仙台
8. Noguchi K. IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction contributes to neuropathic pain. (Symposium) 13th World Congress on Pain (IASP) 2010. 8. 31 Montreal Canada

[図書] (計 1 件)

1. 野口光一. 運動器の痛みの慢性化のメカニズム. 山下敏彦 編. 運動器のペインマネジメント. 東京: 中山書店 2011:9-20

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：