

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 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700371

研究課題名（和文） 末梢神経損傷後に増加するロイコトリエンの神経因性疼痛への関与

研究課題名（英文） Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic pain.

研究代表者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70418961

研究成果の概要（和文）：

脂質メディエーターであるロイコトリエン(LT)が疼痛伝達に関与する報告は少なく、発現局在も明らかではない。そのため、神経障害性疼痛モデルラットを用い、LTの産出やそれら受容体の発現動態を検討したところ、末梢神経損傷後におけるLT合成酵素とそれら受容体が脊髄後角のマクログリアやneuronで増加していた。またLT合成酵素阻害薬の投与を行い疼痛行動を観察したところ、モデルラットにおいて有意に痛みを抑制した。これらのことから神経障害性疼痛が形成される初期段階ではマクログリアで増加するロイコトリエンが関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Leukotriene(LT)s belong to a large family of lipid mediators. LTs are known to be important factors in a variety of local and systemic diseases and allergic/inflammatory diseases. We examined whether LTs were implicated in neuropathic pain following peripheral nerve injury. Using the SNI model in rats, we investigated the expression of LT synthases and receptors mRNAs in the spinal cord and the roles on the pain behaviors. LTs and the receptors may be involved in the development of mechanical allodynia after peripheral nerve injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、ロイコトリエン、ロイコトリエン受容体、脊髄後角、後根神経節、マクログリア

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は末梢神経系、あるいは中枢

神経系の障害によって発症し、自発痛・熱痛覚過敏・触刺激によって激痛を生ずる異

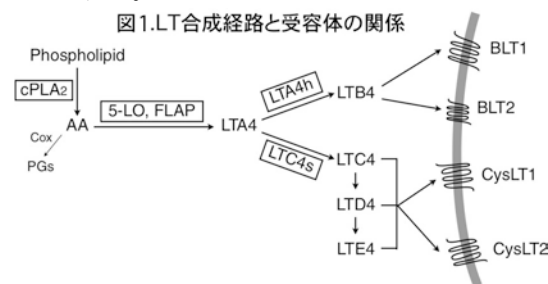
痛症を主症状とし、既存の NSAIDs (非ステロイド系抗炎症薬)やモルヒネ等の麻薬性鎮痛薬に抵抗性を示す難治性疼痛である。

古くから神経因性疼痛の発症メカニズムは神経切断による損傷発火に代表される末梢神経系の感作や、それに伴う中枢神経系ニューロンの可塑的变化が主要因であると考えられてきた。近年、ニューロンの可塑的变化にグリア細胞が積極的に関わることを示され、その役割が注目されている。事実、神経因性疼痛モデルラットにおいてグリア細胞、特にマイクログリアは活性化型(細胞体肥大化、突起肥厚等)となり、末梢神経損傷を受けた髄節の脊髄後角に遊走し凝集する事が知られている。しかしながら、*in vivo* において活性化型マイクログリアがどのようにしてニューロンの可塑的变化を引き起こすのか未だ明らかとなっていない為、*in vitro* では多数報告があり活性化型マイクログリアから放出されるであろうケミカルメディエーターの1つである脂質メディエーターに着目した。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、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明らかではない。そのため、これら脂質産生細胞と受容体局在を明らかにすることで疼痛発生メカニズムを明らかにしようと試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢神経損傷時の脊髄においてロイコトリエン合成から受容までの細胞間相互作用により、神経因性疼痛が生じる過程を包括的に解明することにある。そのため、末梢神経損傷時の図1に示すロイコトリエン合成酵素、受容体 mRNA 発現動態を明らかにした上で、その発現動態の調節因子の解明を行い、末梢神経損傷によって誘発された

疼痛行動に対するロイコトリエン受容体拮抗薬の効果、および受容体下流シグナルを明らかにする。



3. 研究の方法

神経因性疼痛モデルは、ラットの坐骨神経の枝である総腓骨神経と脛骨神経を結紮し、切断した Spared nerve injury(SNI)モデルを主に使用し、以下の実験を行った。

(1) 末梢神経損傷時の脊髄におけるロイコトリエン合成酵素、受容体 mRNA 発現動態の経時的変化の定量

モデル動物作成後 1, 3, 7, 14, 30 日の各 mRNA の経時的な発現変化を RT PCR 法にて調べた。

(2) LT 合成酵素、受容体 mRNA 発現細胞種の同定

cRNA プローブを作成し、*in situ* hybridization(ISH)法を行い、モデル動物作成後の各 mRNA の経時的な発現誘導のパターンを調べた。また、二重 ISH-免疫組織化学法にて発現細胞を同定した。

(3) 末梢神経損傷によって発現が増加したロイコトリエン合成酵素、受容体 mRNA の転写活性調節因子の解明

末梢神経損傷によって脊髄後角の細胞群で活性化される Mitogen-activated protein kinase(MAPK)は、さまざまな遺伝子の転写活性を調節する分子スイッチとして知られており、なかでも p38 は、炎症や末梢神経損傷時に脊髄後角のマイクログリアでリン酸化を受け、サイトカインや栄養因子の転写活性を上昇させ、産生された分子がニューロンの可塑的变化を誘発し、疼痛を惹起させると考えられている。そのため、

モデル作成と同時に MAPK inhibitor を髄腔内に持続的に投与し、末梢神経損傷により増加した LT 合成酵素と受容体発現変化を調べた。

(4) 神経因性疼痛に対する LT 合成酵素阻害薬、LT 受容体拮抗薬の効果の検討

ロイコトリエン合成酵素阻害剤を髄腔内投与して、神経因性疼痛に関与するかを行動薬理学的手法を用いて検討した。さらに受容体の拮抗薬を投与して、疼痛関連行動が抑制されるかを検討した。

(5) 後根神経節におけるロイコトリエン受容体発現解析

ISH法を用いてロイコトリエン受容体発現細胞同定を行った。

(6) Leukotriene 足底投与による疼痛行動観察

DRG に発現している CysLT2 のリガンドである LTB4 を足底に投与し、疼痛行動を観察した。また、単体投与では痛み行動を起こさない濃度の ATP を LTB4 と一緒に投与を行った。

4. 研究成果

(1) 末梢神経損傷後の mRNA 発現動態の経時的変化

末梢神経損傷後の脊髄において半定量的 RT-PCR 法にて合成酵素・受容体 mRNA の発現変化を検討したところ、5-LO, FLAP, LTC4s 合成酵素が損傷後 3 日をピークに増加していた。また、受容体である CysLT1 は損傷後 3 日をピークに、BLT1 は損傷後 3 日をピークに増加していた。LTC4h 合成酵素と CysLT2 の発現変化は見られなかった。

(2) LT 合成酵素、受容体 mRNA 発現細胞種の同定

ISH法を用いて末梢神経損傷後の脊髄における発現を観察したところ、末梢神経損傷後における LT 合成酵素 (5-LO) mRNA が脊髄後角のマイクログリアで有意に増加した。また 4 種類の LT 受容体のうち、末梢神経損傷後 3 日で CysLT1 受容体はマ

イクログリアで、BLT1 受容体が脊髄後角 neuron で増加していた。

(3) 末梢神経損傷によって発現が増加したロイコトリエン合成酵素、受容体 mRNA の転写活性調節因子の解明

SNL モデル作成と同時に p38 MAP kinase の inhibitor である SB203580 もしくは MEK inhibitor である U0126 を髄腔内投与しマイクログリアで増加が見られた 5-LO, FLAP, LTC4s 合成酵素, CysLT1 の発現変化を検討したところ、SB203580 投与群において 5-LO mRNA のみ発現抑制されることが明らかにした。U0126 投与群ではいずれの遺伝子も発現抑制はみられなかった。

(4) 神経因性疼痛に対する LT 合成酵素阻害薬、LT 受容体拮抗薬の効果の検討

SNIモデル作成1日後から8日目までに5-LOのinhibitorであるAA-861、CysLT1受容体のantagonistであるPranlukast、BLT1受容体antagonistであるU-75302の髄腔内持続投与を行い、末梢神経損傷によって誘発された疼痛行動を観察した。その結果、この3種類の薬剤により、SNLモデル3~7日目まで有意に痛みを抑制した。しかしながらPranlukast、U-75302をSNLモデル6~13日目まで投与を行うと、疼痛行動の改善が見られなかったことから、Leukotrieneの疼痛へのは末梢神経損傷後の早期であることがわかった。

(1)~(4)の結果を2010年にGlia誌に発表した。

(5) 後根神経節におけるロイコトリエン受容体発現解析

ISH法により後根神経節のロイコトリエン受容体の発現を調べたところ、CysLT2受容体が小型~中型のneuronに発現しており、ATP受容体の一つであるP2X3受容体と高確率で共存していた。

(6) Leukotriene 足底投与による疼痛行動観察 naive rat の足底にロイコトリエンを投与を行ったところ疼痛行動が見られなかったが、ATP と同時に投与したところ、足を振ったりなめたりする疼痛行動があった。これらこと

から、ロイコトリエンはそれ単体では痛みを引き起こさず、ATP 等他の痛み関連因子と相互作用することで疼痛行動を引き起こすことが示唆された。

(5)~(6)の結果を2010年にMol Pain誌に発表した。

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3件)

① 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. Molecular Pain 2012, 8, 8, DOI: 10.1186/1744-8069-8-8, 査読有り

② 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, DOI:10.1002/glia.20948, 査読有り

③ Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Fukuoka T, Dai Y, Noguchi K. Expression of leukotriene receptors in the rat dorsal root ganglion and the effects on pain behaviors Mol Pain, 2010,17,57, DOI:10.1186/1744-8069-6-57, 査読有り

[学会発表] (計3件)

① 大久保正道, 山中博樹, 小林希実子, 野口光一. ラット後根神経節におけるロイコトリエン受容体の発現と疼痛行動への関与. 第33回日本疼痛学会 2011.7.22 愛媛

② Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K. Platelet-activating factor

biosynthesis in spinal cord contributes to neuropathic pain following peripheral nerve injury. 13th World Congress on Pain (IASP) 2010.8.30, Montreal

③ 大久保正道, 山中博樹, 小林希実子, 野口光一. 末梢神経損傷後に脊髄で増加する血小板活性化因子 (PAF) は神経障害性疼痛に関与する. 第32回日本疼痛学会 2010.7.2 京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70418961