

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790253

研究課題名(和文)慢性疼痛の治療標的としての脊髄アストロサイト gap junctionの機能解析

研究課題名(英文)The role of astroglial gap junction in the regulation of chronic pain

## 研究代表者

森岡 徳光(Morioka, Norimitsu)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：20346505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は疼痛の慢性化におけるconnexin43(Cx43)-gap junctionの役割を明らかにすべく、培養脊髄アストロサイトならびに神経因性疼痛モデルマウスを用いて検討を行った。培養脊髄アストロサイトにおいて炎症性サイトカインであるTNF並びにIFN- $\gamma$ がCx43発現及びgap junction機能を低下させ、この反応にはJNK活性ならびにプロテアソーム系を介したタンパク分解系が関与していることが明らかとなった。さらに神経因性疼痛モデルマウスの脊髄後角においてCx43発現が著明に低下していることが明らかとなり、この反応が疼痛惹起に寄与している可能性が予想される。

研究成果の概要(英文)：To understand the relationship between the change of Cx43 expression and the regulation of nociceptive responses under neuropathic pain, the current study utilized partial sciatic nerve ligation (PSNL) model, which mimics some of the major features observed in clinical neuropathic pain. It was found that the expression of Cx43 in spinal dorsal horn following PSNL was significantly decreased during the maintenance phase, but not the induction phase of neuropathic pain, and this response was mediated by tumor necrosis factor (TNF)-c-jun N-terminal kinase (JNK)-dependent pathway. Furthermore, the decrease of Cx43 expression could be related in the induction of mechanical hypersensitivity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 薬理学一般

キーワード：疼痛 アストロサイト gap junction connexin43

### 1. 研究開始当初の背景

癌や炎症、神経損傷などにより生じる痛みは慢性化しやすく、痛みが強く感じられる痛覚過敏や触覚刺激に対して痛みを感じるアロディニアといった痛みの異常が起こる。このような慢性化した痛みは生活の質を著しく低下させ、労働・学習意欲の減退など社会的問題を引き起こす。慢性疼痛は難治性であり、オピオイドや非ステロイド性抗炎症薬といった既存の鎮痛薬が奏効しにくいいため、新たな鎮痛作用機序に基づいた治療法の確立が必要不可欠である。それ故、複雑かつ多様な慢性疼痛の発症メカニズムを明らかにすることが重要である。

### 2. 研究の目的

慢性疼痛治療の有力な標的細胞の一つとして脊髄アストロサイトが挙げられ、その機能を制御する薬剤が新たな鎮痛薬となる可能性がある。そこで申請者は脊髄アストロサイトの働きに必要不可欠である gap junction-connexin43 に着目した。アストロサイトに発現する gap junction は、主に connexin43 と呼ばれるタンパク分子の六量体が細胞間で結合することにより形成される低分子輸送体であり、IP<sub>3</sub> や Ca<sup>2+</sup>、グルコースなどを伝播させるほか、細胞外における pH、K<sup>+</sup>濃度を調節することにより神経伝達機能に重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、慢性疼痛における gap junction-connexin43 の役割は全く不明である。そこで、本研究では疼痛の慢性化に対する脊髄アストロサイトの gap junction-connexin43 の機能と役割を明らかにすることで、新規鎮痛薬のターゲット分子としての基盤を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

慢性疼痛モデルとして ddy 系雄性マウスの坐骨神経を部分損傷させることによる神経因性疼痛マウスを用いた。術後、一定期間経過したマウスを用いて疼痛閾値を von Frey filament により測定し、また脊髄後角部を採取して connexin43 タンパク発現量を Western blot により解析した。培養脊髄アストロサイトは新生児ラット脊髄より定法に従って作製した。これらに対して、各種薬物を処置後の connexin43 タンパク発現量変化を Western blot により解析した。また gap junction 機能は scrape loading dye transfer 法により解析した。

### 4. 研究成果

神経因性疼痛モデルマウスの脊髄後角において connexin43 発現が著明に低下していることが明らかとなった(図1)。この現象は疼痛閾値の低下と相関していた。さらに脊髄 connexin43 低下と疼痛閾値に対する因果関係を明らかにする目的で、脊髄後角に connexin43 特異的 siRNA を投与したところ、

投与後2日目より、有意な疼痛閾値の低下が観察された(図2)。これらの結果は、脊髄後角における connexin43 が神経因性疼痛発症に重要な役割を担っていることを示唆している。

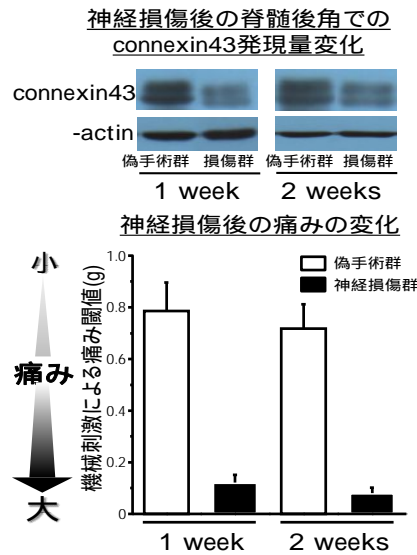


図1 坐骨神経損傷により痛みの閾値が低下し(下図)、それに相関して脊髄後角におけるconnexin43発現量が低下(上図)

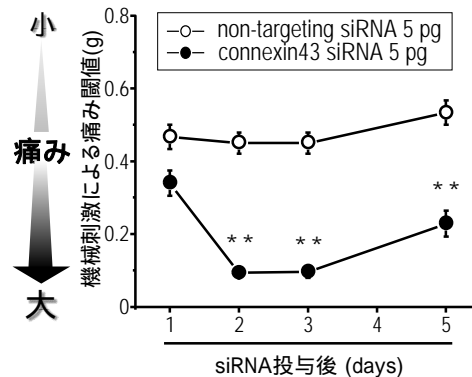


図2 健常マウスの脊髄(も膜下腔内)にconnexin43 siRNA(5pg, )を投与すると、対象群(non-targeting siRNA, 5 pg, )と比較して機械刺激に対する痛み閾値が低下する。\* $p < 0.01$  vs non-targeting siRNA.

さらにこれらの connexin43 発現低下メカニズムを明らかにする目的で培養脊髄アストロサイトを用いて解析を行った。これまでに炎症性サイトカインが慢性疼痛に関与していることはよく知られている。また最近、脳アストロサイトにおける connexin43 発現制御に炎症性サイトカインが関与していることも報告されている。そこで、慢性疼痛時に脊髄後角にて産生増大される腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) およびインターロイキン-1 (IL-1) の効果を検討した。その結果、培養脊髄アストロサイトにそれぞれ24, 48時間処置すると TNF- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  により有意に connexin43 発現量ならびに gap junction 機能が低下することが明らかとなった(図3)。一方、IL-1 は影響を及ぼさなかった。また、TNF- $\alpha$  及び

IFN- を併用することで、connexin43 発現量ならびに gap junction 機能は相加的に低下することが明らかとなった(図3)。次に TNF- 及び IFN- による connexin43 発現低下作用メカニズムについて、MAP キナーゼ(MAPK)の関与を検討したところ、TNF- 及び IFN- による connexin43 発現低下は c-jun N terminal kinase(JNK)阻害薬である SP600125 前処置により著明に拮抗されることが明らかとなった。一方で、MAPK キナーゼ阻害薬である U0126 および p38 阻害薬である SB202190 によつては無影響であった。

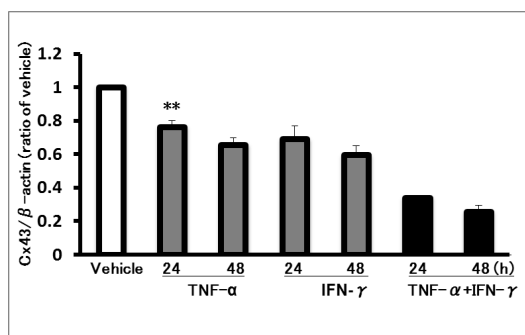


図3 脊髄アストロサイトにおける炎症性サイトカインによる connexin43 発現に及ぼす影響

次に、JNK 活性がどのようなメカニズムを介して connexin43 発現を低下させるのかについて検討した。まず脊髄アストロサイトに TNF- 及び IFN- 処置後、さらにタンパク合成阻害薬である cycloheximide を処置することで、connexin43 分解に及ぼす影響を観察した。その結果、TNF- 及び IFN- 処置により connexin43 分解は vehicle 処置群と比較して有意に促進していることが明らかとなった。最近、connexin43 分解には proteasome 系が関与していることが報告されている。そこで、proteasome 阻害薬である MG132 の効果を検討したところ、TNF- 及び IFN- 処置による connexin43 発現及び gap junction 機能の低下は、MG132 前処置により有意に拮抗されることが明らかとなった。さらに、TNF- 及び IFN- により脊髄アストロサイトの proteasome 活性が変化しているかについて、20S proteasome assay kit を用いて検討したところ、TNF- 及び IFN- 処置により proteasome 活性は有意に増大しており、さらにこの反応は JNK 阻害薬である SP600125 により拮抗されることが明らかとなった。

以上、神経因性疼痛モデルを用いた検討により、脊髄後角での connexin43 発現低下が疼痛惹起に関与していることが世界に先駆けて明らかとなった。さらに培養脊髄アストロサイトを用いた検討により、炎症性サイトカインである TNF- 及び IFN- が connexin43 発現制御に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また TNF- 及び IFN- による connexin43 発現低下メカニズムには JNK 活性化に基づく proteasome 系の増大反応が関与していることも明らかとな

った。本研究成果は、慢性疼痛発症における脊髄 connexin43 の重要性を示唆するものであり、connexin43 発現制御に基づく薬物が新たな鎮痛薬となる可能性を提示している。

#### 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 2 件)

1. Morioka N., Suekama K., Zhang F.F., Kajitani N., Hisaoka-Nakashima K., Takebayashi M., Nakata Y. Amitriptyline upregulates connexin43-gap junction in cultured rat cortical astrocytes via the activation of p38 and c-Fos/AP-1 signaling pathway. Br. J. Pharmacol., (査読有), 171, 2014, 2854-2867. DOI:10.1111/bph.12614

2. Zhang F.F., Morioka N., Nakashima-Hisaoka K. and Nakata Y.: Spinal astrocytes stimulated by tumor necrosis- and/or interferon- attenuate connexin 43-gap junction via c-jun terminal kinase activity.: J. Neurosci. Res., (査読有), 91, 2013, 745-756. DOI: 10.1002/jnr.23213

[学会発表](計 4 件)

1. 張芳芳、森岡徳光、北村智哉、中島一恵、仲田義啓: 脊髄アストロサイトにおける TNF- 及び IFN- による Cx43 発現低下に対するプロテアソームの関与. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日、宮城。

2. Zhang FF, Morioka N., Kitamura T, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y.: Down-regulation of Cx43-gap junction expression in rat cultured spinal astrocytes by TNF- and/or IFN-. The 10<sup>th</sup> Biennial Conference of the Chinese Neuroscience Society, 2013 年 9 月 20 日, Beijing, China.

3. 張芳芳、森岡徳光、北村智哉、中村庸輝、中島一恵、仲田義啓: TNF- 及び IFN- による脊髄アストロサイトにおける Cx-43-gap junction の発現制御機構. 第 123 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 7 月 12 日、愛知

4. 張芳芳、森岡徳光、中村庸輝、徳原昌人、中島(久岡)一恵、仲田義啓: 炎症性サイトカインによる脊髄アストロサイトの Gap junction-connexin43 発現制御機構の検討. 第 50 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2011 年 11 月 13 日、香川。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生  
命科学部門薬効解析科学

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森岡 徳光 (MORIOKA NORIMITSU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准  
教授

研究者番号：20346505