

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2005～2009

課題番号：17109015

研究課題名（和文）脱髄性神経損傷に起因する難治性神経因性疼痛の治療標的分子の同定

研究課題名（英文）Identification of molecular targets to cure intractable neuropathic pain with nerve injury-induced demyelination

研究代表者

植田 弘師（UEDA HIROSHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00145674

研究成果の概要（和文）：神経損傷に伴う難治性の神経因性疼痛の分子機構解明において、リゾホスファチジン酸（LPA）をめぐる治療標的分子の同定に成功した。主たる働きは知覚神経と脊髄後角におけるLPAの逆行性シグナルとしての脱髄や遺伝子発現制御とLPA合成を介する疼痛増強する機構である。脊髄内におけるLPA誘発性のミクログリア活性化、上位脳における同様なフィードフォワード機構、疼痛制御遺伝子発現のエピジェネティクス性増幅制御の存在など、新しい視点に立った創薬基礎を築いた。

研究成果の概要（英文）：We successfully identified various molecular targets for medicines to cure neuropathic pain. They are related to the lysophosphatidic acid (LPA)-mediated mechanisms underlying injury-induced demyelination, gene regulation, microglia activation and supra-spinal pain. Feed-forward amplification of these mechanisms and epigenetic gene regulation of key pain-related molecules were suggested to underlie the chronic status of neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2006年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2007年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2008年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2009年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
総計	83,300,000	24,990,000	108,290,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：脳・神経、脂質、神経因性疼痛、脱髄、神経回路

1. 研究開始当初の背景

難治性神経因性疼痛は本来の急性の痛みとは仕組みが異なり、抗炎症薬やモルヒネにより徐痛されにくく、そのメカニズム解明は殆どなされていなかった。本研究申請者は、神経線維ごとの疼痛伝達を解析する方法を開発し、神経因性疼痛時の疼痛伝達が急性痛のものとは異なることを発見した。この仕組み

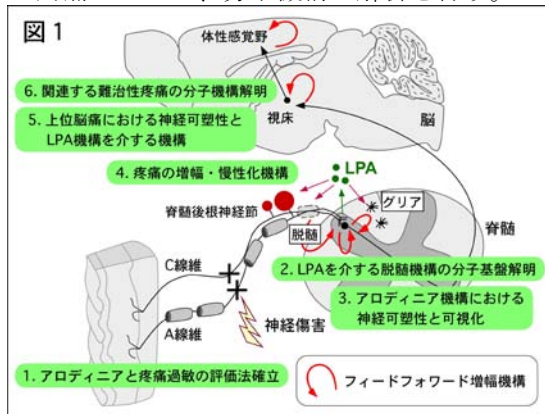
の一つとして臨床で見られる脱髄性神経痛の仕組みと絡ませ、さらに生化学的な証拠と合わせて、リゾホスファチジン酸（LPA）とその受容体LPA₁機構がその原因を担うことを遺伝子改変動物を用いた研究によって証明し、Nature Medicine誌（2004）にその成果を発表した。

2. 研究の目的

本研究では、痛み行動を担う分子薬理学、アロディニア機構における神経可塑性を担う生化学と機能的組織化学の観点からの研究戦略により、LPA 機構を中心とした神経因性疼痛の発症機構を明らかにし、異常痛と慢性化を治療する分子標的を同定することを目的としている。この目的に沿って、1) アロディニアと疼痛過敏の評価法確立、2) LPA を介する脱髄機構の分子基盤解明、3) アロディニア機構における神経可塑性と可視化、4) 疼痛の増幅・慢性化機構、5) 上位脳痛における神経可塑性とLPA機構を介する機構、6) 関連する難治性疼痛の分子機構解明、を5年の研究期限内に完遂することが目的である。

3. 研究の方法 (図1)

- 1) 熱的あるいは機械的侵害試験法に加えて、各種神経線維 (A β 、A δ 、C 線維) 特異的な侵害性応答を評価する試験法を確立する。
- 2) LPA および神経損傷による脱髄現象について、その分子基盤を組織化学的、生化学的および行動薬理的に解析する。また、LPA の *de novo* 産生について生化学的解析を行う。
- 3) 脊髄凍結切片におけるリン酸化 ERK を指標にして誤入力を可視化評価する。また、電子顕微鏡等を用いて、エファプスおよびスプラウティングの解析を行う。
- 4) 長期的遺伝子発現を担うエピジェネティクスおよび神経-グリア相関の観点から増幅・慢性化機構を解析する。
- 5) 脳内局所 LPA 適用による薬理的および組織化学的変調の解析を行う。
- 6) 脊髄損傷や線維筋痛症などの中枢性慢性疼痛について、分子機構の解析を行う。

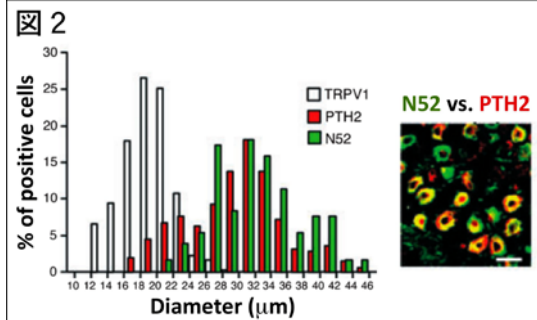


4. 研究成果

1) アロディニアと疼痛過敏の評価法確立

1-1) 発痛物質を足蹠皮下投与しその侵害性屈曲逃避応答を評価するAPF試験、およびニューロメーターを用いて各種神経線維 (A β 、A δ 、C 線維) 特異的な電気刺激を

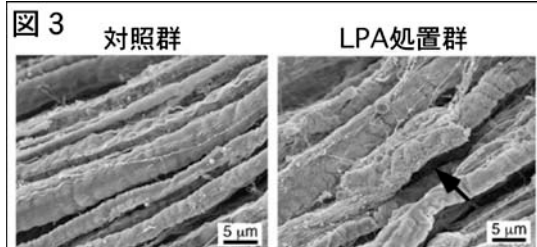
与えることにより、侵害性応答を評価するEPF試験法およびEPW試験法を確立した。これらの試験法を用いて、侵害性無髄C線維はペプチド性と非ペプチド性に分類され、有髄性A δ 線維とA β 線維の4つの神経線維応答を定量的に評価することに成功した (文献 15, 21)。さらに、ペプチド性のC線維には炎症性メディエーターに対する受容体 (BK2, H1, NK1)、TRPV1、Na $_v$ 1.8 や MOP受容体、非ペプチド性C線維にはP2X $_3$ 受容体、A δ 線維にはPTH2 受容体が機能分子として存在し (図2) (文献 5)、それぞれに対するアゴニストや阻害剤による疼痛閾値への変化を明らかにした。



1-2) これらの試験法を用いた解析から、坐骨神経部分神経損傷後では A β と A δ 線維に対する侵害性応答が亢進するのに対して、C 線維に対する侵害性応答が低下することを見出した (文献 14)。糖尿病性、脊髄損傷性、虚血性あるいはバクリタキセルによる中毒性の慢性疼痛病態では、主に A β と A δ 線維に対する侵害性応答のみが亢進し、C 線維に顕著な影響を及ぼさないことを見出した (文献 23)。

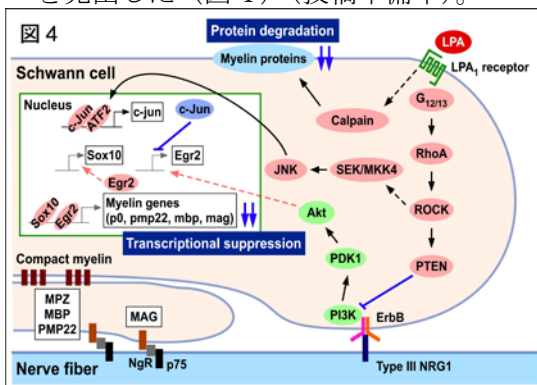
2) LPA を介する脱髄機構の分子基盤解明

2-1) 坐骨神経部分神経損傷およびLPAの脊髄くも膜下腔投与によるLPA $_1$ 受容体依存的な後根神経線維における脱髄 (Nature Med, 2004) を支持すべく、*ex vivo*培養実験におけるRhoA-ROCK機構を介するLPA誘発性脱髄を証明に成功した (文献 19) (図3)。



2-2) 坐骨神経部分神経損傷による脱髄は脊髄後根と坐骨神経線維自身に観察されるが、LPA $_1$ 受容体依存性が観察されたのは脊髄後根のみであった。合わせて、Remak束におけるC線維を区切るSchwann細胞のLPA $_1$ 受容体依存性障害も脊髄後根に限られた (投稿中)。

- 2-3) リゾホスファチジルコリン (LPC) を LPAに変換する酵素オートタキシン (ATX) の遺伝子欠損ヘテロマウスでは、神経損傷性神経因性疼痛が著明に減弱することを見出し (文献 16, 17)、さらに脊髄も膜下腔投与によるLPCがLPA₁受容体を介して神経因性疼痛と脊髄後根における脱髄を誘発することを明らかにした (投稿中)。
- 2-4) 電子顕微鏡等を用いた解析から、神経損傷後におけるLPA₁受容体依存的な脱髄が脊髄後根に生じることを見出した (投稿中)。さらに、LPCによる脊髄後根の脱髄がATXおよびLPA₁受容体を介することを証明した (投稿中)。
- 2-5) LPAおよび神経損傷が脊髄後根のカルパイン活性を誘導すること、およびカルパイン阻害薬が脱髄と神経因性疼痛を抑制することを明らかにした。一方、慢性炎症性疼痛モデルではこの現象は観察されず、LPA₁受容体機構の観点において神経因性疼痛と炎症性疼痛の明確な相違点を見出した (文献 1)。
- 2-6) LPAによる脱髄機構において、蛋白質分解系に加えて、ミエリン関連分子群および制御転写因子の遺伝子発現低下を見出した (図 4) (投稿準備中)。



3) アロディニア機構における神経可塑性と可視化

- 3-1) 各種慢性疼痛モデルにおける機械性アロディニア評価に加え、ニューロメーターによる神経線維特異的侵害性応答試験において、 β 非侵害性刺激による侵害性応答を見だし新たなアロディニア評価法となることを明らかにした (文献 14)。これはアロディニアに有髄 β 線維の関与、すなわち脱髄の関与の可能性を示唆する重要な証拠となった。同様の評価法は臨床的にも応用できることを明らかにした (文献 22)。
- 3-2) 電子顕微鏡を用いた解析から、神経損傷後の脊髄後根において侵害性のC線維あるいはA δ 線維が非侵害性の β 線維と直接接触していることを見出し、侵害性と非侵害性神経間の混線 (少なくとも物理的接触) がアロディニアの基礎となることを示

唆した (文献 15)。

- 3-3) 坐骨神経部分結紮モデルにおける脊髄後根において、神経発芽マーカー分子であるGAP-43の蛋白質発現が著明に増加することを見出した (投稿準備中)。
- 3-4) 神経活動バイオマーカーであるリン酸化ERKのシグナル検出法を用いた解析から、触情報を伝達する非侵害性 β 線維刺激が神経損傷では侵害性応答領域を活性化することを見出した (文献 14)。さらには、この脊髄後角における誤入力LPA₁受容体遺伝子欠損動物において消失することを解明した (文献 12)。すなわち、LPA₁受容体を介するアロディニア機構を後角レベルのリン酸化ERKのシグナルとして可視化することに成功した (図 5)。

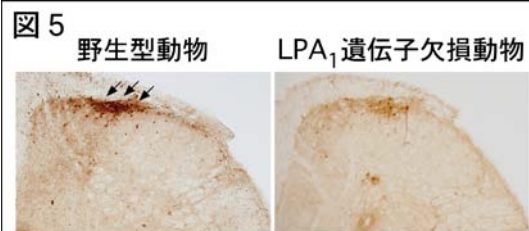


図 5 神経損傷後における β 線維刺激によるERKリン酸化

4) 疼痛の増幅・慢性化機構

- 4-1) 坐骨神経部分結紮モデルにおける後根神経節Ca_v α 2 δ 1チャネル発現上昇と疼痛伝達物質の遊離増強の可能性を見だし、阻害剤ギャバペンチンによる鎮痛効果を確認した (文献 11)。さらにマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、LPA処置後の脊髄後根神経節において著明に発現増加し、かつこの発現増加がRho阻害薬により抑制される遺伝子群を同定した (図 6) (文献 9)。

図 6

マイクロアレイにより同定したLPA応答性遺伝子群

Accession number	Gene name
NM_016768	pre B-cell leukemia transcription factor 3
NM_011406	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1
Z31663	activin A receptor, type 1B
Z48781	ephrin B1
NM_009792	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha

これらの遺伝子群のうち、EphrinB1のノックダウンがアロディニアと疼痛過敏を抑制することを突き止めた (文献 9)。さらに、この変化は、脊髄後角におけるNMDA受容体機能増強に関与することが強く示唆された。

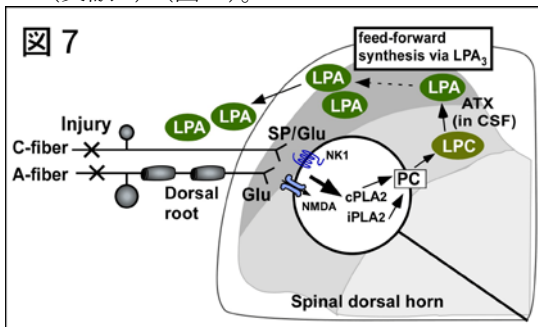
- 4-2) 神経因性疼痛の責任線維であるA δ 線維において、PTH2受容体が特異的に発現すること、およびその内在性リガンドTIP39による侵害応答は、神経損傷において著明に亢進していることを明らかにした (文献 5)。
- 4-3) 短時間作用型LPA₁受容体拮抗薬を用い

た薬理的解析から、LPAは神経損傷 2-3 時間後に産生および作用していることを明らかにした (文献 8)。

4-4) LPA₁受容体発現細胞を用いた高感度バイオアッセイ法やNano マトリックスを用いた精度の良いMALDI-TOF MS系によるLPA (LPC) 定量法を確立し、強度の侵害性刺激が脊髄のiPLA₂とcPLA₂の活性化を介してLPA産生を誘発することを見出した (文献 10, 投稿準備中)。

4-5) 神経損傷後の脊髄後角および脊髄後根において、LPA が産生されることを突き止めた (文献 3)。脊髄後角 *ex vivo* 標品ではサブスタンス P と NMDA 受容体刺激の併用が LPA 産生に重要であり、いずれか一方では生じないことを示し、神経因性疼痛が強度な刺激 (障害性刺激など) に依存することの証拠付けに成功した (文献 10)。

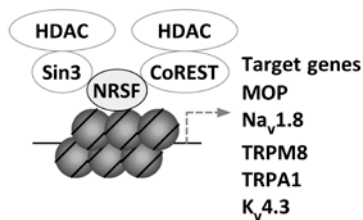
4-6) 脊髄後角 *ex vivo* 標品を用いた解析から、LPAがLPA₃受容体を介してさらなるLPA産生を誘発する、いわゆるフィードフォワード増幅機構が存在することを見出した (文献 7) (図 7)。



4-7) 培養マイクログリア細胞において、LPA が ATP 遊離を介して膜ラッピングおよび BDNF 遺伝子発現を誘発することを明らかにした (文献 13)。また *in vivo* においては、LPA による脊髄マイクログリアの活性化が神経因性疼痛に関与することを見出し、脊髄でもマイクログリアを介する痛みの増幅・慢性化が存在することを見出した (投稿準備中)。

4-8) 神経因性疼痛におけるC線維性知覚鈍麻およびモルヒネ抵抗性の分子基盤として、転写抑制因子NRSFによるNa_v1.8、MOPおよびその他の遺伝子のエピジェネティクス転写抑制制御機構の関与を証明した (文献 2、6、投稿準備中) (図 8)。

図 8 NRSFを介するエピジェネティクス制御機構



これに対して、A線維におけるBDNF遺伝子発現上昇についてもエピジェネティクス転写増強制御機構が存在することを明らかにした (投稿準備中)。

5) 上位脳痛における神経可塑性と LPA 機構を介する機構

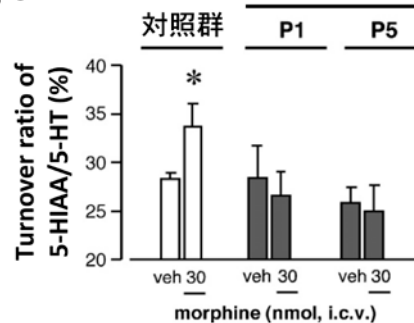
5-1) LPAの視床内投与が長期的な疼痛過敏とアロディニアを誘発することを明らかにした。さらに、その分子基盤においてマイクログリア活性化の関与を見出し、マイクログリア阻害剤により疼痛過敏が消失した (投稿準備中)。

5-2) 坐骨神経部分結紮モデルにおいて、視床VPL内へのLPA₁受容体アンチセンスオリゴ投与が疼痛過敏を抑制することを明らかにした (投稿準備中)。

6) 関連する難治性疼痛の分子機構解明

6-1) 冷温繰り返しストレス負荷による線維筋痛症モデルを確立し、その妥当性については性差および薬物応答性の観点から証明した (文献 11)。さらに、本モデルではモルヒネ鎮痛が減弱しており、その分子基盤として脊髄後角におけるセロトニン代謝回転が低下することを見出した (文献 4) (図 9)。

図 9 線維筋痛症モデル



6-2) パクリタキセル投与による中毒性神経因性疼痛、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病性神経因性疼痛、坐骨神経周囲へのMethA Sarcoma接種によるがん性疼痛モデル、脊髄損傷による中枢性神経因性疼痛モデル、脳虚血性疼痛過敏における神経線維依存性の異常痛についてその性格付けを行った (文献 23, M Ueda 日本語総説、投稿準備中)。

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 68 件) 全て査読有り

- Xie W, Uchida H, Nagai J, Ueda M, Chun J, Ueda H, Calpain-mediated down-regulation of myelin-associated glycoprotein in lysophosphatidic acid-induced neuropathic pain. *J Neurochem.*, in press.

2. Uchida H, Ma L, Ueda H., Epigenetic gene silencing underlies C-fiber dysfunctions in neuropathic pain., *J Neurosci.* 2010, 30(13): 4806-14.
3. Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Aoki J, Ueda H., Evidence for De Novo Synthesis of Lysophosphatidic Acid in the Spinal Cord through Phospholipase A2 and Autotaxin in Nerve Injury-induced Neuropathic Pain., *J Pharmacol Exp Ther.* 2010, in press.
4. Nishiyori M, Nagai J, Nakazawa T, Ueda H., Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia., *Neurosci Lett.* 2010, 472(3):184-7.
5. Matsumoto M, Kondo S, Usdin TB, Ueda H., Parathyroid hormone 2 receptor is a functional marker of nociceptive myelinated fibers responsible for neuropathic pain., *J Neurochem.* 2010, 112(2):521-30.
6. Uchida H, Sasaki K, Ma L, Ueda H., Neuron-restrictive silencer factor causes epigenetic silencing of Kv4.3 gene after peripheral nerve injury., *Neuroscience.* 2010, 166(1):1-4.
7. Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Chun J, Aoki J, Ueda H., Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: an initiator of nerve injury-induced neuropathic pain., *Mol Pain.* 2009, 5:64.
8. Ma L, Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H., Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist., *J Neurochem.* 2009, 109(2):603-10.
9. Uchida H, Matsumoto M, Ueda H., Profiling of BoNT/C3-reversible gene expression induced by lysophosphatidic acid: ephrinB1 gene up-regulation underlying neuropathic hyperalgesia and allodynia., *Neurochem Int.* 2009, 54(3-4):215-21.
10. Inoue M, Ma L, Aoki J, Ueda H., Simultaneous stimulation of spinal NK1 and NMDA receptors produces LPC which undergoes ATX-mediated conversion to LPA, an initiator of neuropathic pain., *J Neurochem.* 2008, 107(6):1556-65.
11. Nishiyori M, Ueda H., Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia., *Mol Pain.* 2008, 4:52.
12. Xie W, Matsumoto M, Chun J, Ueda H., Involvement of LPA1 receptor signaling in the reorganization of spinal input through Abeta-fibers in mice with partial sciatic nerve injury., *Mol Pain.* 2008, 4:46.
13. Fujita R, Ma Y, Ueda H., Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and BDNF gene expression are mediated by ATP release in primary microglia., *J Neurochem.* 2008, 107(1):152-60.
14. Matsumoto M, Xie W, Ma L, Ueda H., Pharmacological switch in Abeta-fiber stimulation-induced spinal transmission in mice with partial sciatic nerve injury., *Mol Pain.* 2008, 4:25.
15. Ueda H., Peripheral mechanisms of neuropathic pain -involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination., *Mol Pain.* 2008, 4:11. (Review)
16. Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H., Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid., *Neuroscience.* 2008, 152(2):296-8.
17. Inoue M, Ma L, Aoki J, Chun J, Ueda H., Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain., *Mol Pain.* 2008, 4:6.
18. Sakai T, Aoki H, Hojo M, Takada M, Murata H, Sumikawa K., Adhesiolysis and targeted steroid/local anesthetic injection during epiduroscopy alleviates pain and reduces sensory nerve dysfunction in patients with chronic sciatica., *J Anesth.* 2008, 22(3):242-7.
19. Fujita R, Kiguchi N, Ueda H., LPA-mediated demyelination in ex vivo culture of dorsal root., *Neurochem Int.* 2007, 50(2):351-5.
20. Inoue M, Yamaguchi A, Kawakami M, Chun J, Ueda H., Loss of spinal substance P pain transmission under the condition of LPA1 receptor-mediated neuropathic pain., *Mol Pain.* 2006, 2:25.
21. Ueda H., Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and

- initiation mechanisms., *Pharmacol Ther.* 2006, 109(1-2):57-77. (Review)
22. Sakai T, Tomiyasu S, Yamada H, Sumikawa K., Evaluation of allodynia and pain associated with postherpetic neuralgia using current perception threshold testing., *Clin J Pain.* 2006, 22(4):359-62.
23. Matsumoto M, Inoue M., Hald A, Xie W, Ueda H. Inhibition of paclitaxel-Induced A-Fiber hypersensitization by gabapentin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006, 318(2):735-40.

[学会発表] (計 157 件) 招待講演及び特別講演 54 件、一般講演 103 件

1. 植田弘師, 慢性疼痛時の神経可塑性を担うリゾホスファチジン酸, 第 39 回日本慢性疼痛学会, 2010 年 2 月, 東京 (特別講演)
2. Ueda H., “Neural pathological roles for receptor mediated LPA signaling”, FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCE, 2009 年 6 月, Arizona(USA), (招待講演)
3. Ueda H., “Experimental Models for Thalamic Pain and Fibromyalgia”, APLAR2008(13TH CONGRESS OF THE ASIA PACIFIC LEAGUE OF ASSOCIATIONS FOR RHEUMATOLOGY). 2008 年 9 月, 横浜, (招待講演)
4. 植田弘師, 慢性痛と鎮痛薬-その分子機構解明, 第 29 回日本麻酔・薬理学会. 2007 年 6 月, 名古屋 (特別講演)
5. 植田弘師, 神経因性疼痛の分子機構, 第 35 回日本慢性疼痛学会, 2006 年 2 月, 東京 (特別講演)

[図書] (計 9 件)

1. 植田弘師, 戸田一雄, ブレーン出版「わかる痛み学」, 2009, 177
2. Ueda H., Informa Healthcare, Opioid-Induced Hyperalgesia, 2009 “Cellular Mechanisms Underlying Morphine Analgesic Tolerance and Hyperalgesia”, p9-20

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 全身性疼痛症候群の治療または予防薬
 発明者: 植田弘師
 種類: 特許
 番号: 特願 2008-204762
 出願年月日: 2008 年 8 月 7 日
 国内外の別: 国内

名称: 線維筋痛症の治療薬
 発明者: 植田弘師
 種類: 特許
 番号: 特許公開 2009-007278
 出願年月日: 2007 年 6 月 27 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

1. 長崎大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野ホームページ
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/neuro/>
2. 長崎大学重点研究課題「痛み克服の国際的研究教育拠点の形成」ホームページ
<http://www.mdp.nagasaki-u.ac.jp/pain/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 弘師 (UEDA HIROSHI)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号: 00145674

(2) 研究分担者

澄川 耕二 (SUMIKAWA KOJI)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号: 60028660

井上 誠 (INOUE MAKOTO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号: 60380987

藤田 亮介 (FUJITA RYOUSUKE)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号: 70380855

内田 仁司 (UCHIDA HITOSHI)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・技術補佐員
 研究者番号: 30549621

(3) 連携研究者

なし