

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19603008

研究課題名（和文） アロディニア形成を担うスプラウティング機構の解明

研究課題名（英文） Research on the allodynia-involved sprouting mechanisms

研究代表者

植田 睦美（UEDA MUTSUMI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究支援員

研究者番号：30437834

研究成果の概要：

神経因性疼痛モデルマウスにおいてリゾホスファチジン酸(LPA)の受容体(LPA1 受容体)依存的な脊髄近傍領域後根の脱髄を観察した。また、脱髄部位において有髄A線維と無髄C線維が直接接触する形態学的観察もなされた。一方、非侵害性Aβ神経刺激による神経伝達を脊髄後角におけるリン酸化ERK1/2で評価したとき、傷害後1週間後において疼痛伝達に関連する表層領域への入力を確認できた。これはスプラウティングを機能的に示唆する事実であり、脱髄同様にLPA1受容体遺伝子欠損マウスにおいて消失した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：リゾホスファチジン酸、神経因性疼痛、脱髄、スプラウティング、MAG、アロディニア、ミエリンタンパク質、Ramak 束

1. 研究開始当初の背景

痛みは警告信号としての意義を有するが、過剰あるいは慢性的な痛みは、生活の質を低下させ、生存の意義さえも喪失させるため、NSAIDs やモルヒネなどの強力な鎮痛薬を積極的に使用し、痛みを調節する事（ペインマネジメント）が基本的な考え方となっている。しかしながら、NSAIDs やモルヒネの効か

ない慢性難治性の神経因性疼痛については、未だ適切な治療法が確立されておらず、その分子メカニズムの解明とそれに基づく創薬が緊急の課題となっている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は NSAIDs やモルヒネの効かない慢性難治性の神経因性疼痛に見られる脱髄

現象に着目し、その分子メカニズムを解明するとともにそれに伴って生ずるスプラウティングの分子機構を解明することにある。

(2) 本申請者の共同研究者らは、リゾホスファチジン酸 LPA1 受容体活性化が神経因性疼痛の初発分子機構であることを見出した (Nature Medicine 2004)。中でも特徴的な事実は、脊髄後根に選択的に観察される脱髄現象である。多くの脱髄性疾患が神経因性疼痛を併発することや、脱髄による知覚神経間の混線 (エファプス) や異常突起伸展 (スプラウティング) がアロディニア (触刺激が痛覚に変わる) の基礎として考えられることから、LPA1 受容体を介するその分子機構解明は重要な課題である。

(3) 本研究では、研究期間内に神経軸索とミエリンとのクロストークについて①脊髄後根神経の LPA1 受容体以降の脱髄機構の解明、②髄鞘形成細胞と神経細胞間クロストークの分子機構の解明③無髄神経の突起退縮に働く分子群の同定の観点から研究を遂行していく。

3. 研究の方法

(1) 実験動物には 6 週齢 (体重 18-22g) の C57BL/6J 系雄マウスまたは LPA1 受容体遺伝子欠損マウス (C57BL/6J 系マウスと多数回交配したもの) を用いた。

(2) 神経因性疼痛モデルとして、マウスの右側後肢部分の皮膚を切開し、露出させた坐骨神経に部分結紮を施し、傷害 1 週間後のマウスを用いた。

(3) 坐骨神経、脊髄神経、後根における脱髄は透過型電子顕微鏡、トルイジンブルー染色により形態学的に評価した。

(4) シュワン細胞に発現しミエリン鞘の形成及び軸索突起伸展抑制に働いているタンパク質 Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) の発現を免疫染色法および Western blot 法により解析を行った。

(5) 神経突起発芽時に先端に集積が認められる GAP43 タンパク質をスプラウティングの指標とした。

(6) C57BL/6J 系雄マウスより脊髄後根神経節 (Dorsal Root Ganglion : DRG) ならびに脊髄後根 (Dorsal Root : DR) を摘出し、DMEM 培養液中での組織片培養を行い、LPA 処置による知覚神経線維における脱髄現象について、MAG タンパク質の Western blot により解析を行った (図 1)。

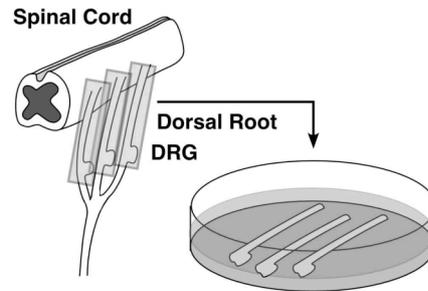


図 1 DR および DRG の組織片培養法

(7) また、末梢神経系の各種線維応答変調を機能的に評価するために、ニューロメーター装置 (Neurometer®: Neurotron Inc., Baltimore, MD, USA) を用いて、5 Hz 刺激 (無髄 C 線維)、250 Hz 刺激 (有髄 A δ 線維)、2000 Hz 刺激 (有髄 A β 線維) による神経伝達を神経刺激に応じて特異的に見出される ERK1/2 リン酸化で評価した。

(8) 疼痛評価法には機械刺激誘発性疼痛試験 (Digital von Frey) 法、熱刺激誘発性疼痛試験 (Thermal withdrawal test) 法、電気刺激誘発性屈曲反応試験 (Electrical stimulation-induced paw withdrawal : EPW) 法を用い、それぞれ圧閾値、反応潜時、反応閾値により評価した。

4. 研究成果

(1) 坐骨神経部分結紮傷害 1 週間後に坐骨神経、脊髄神経、後根における脱髄を透過型電子顕微鏡、トルイジンブルー染色により解析したとき、坐骨神経と後根のみに脱髄が観察されたが、脊髄神経には観察されなかった。しかしながら、LPA1 受容体遺伝子欠損マウスでは後根のみの脱髄が消失した。

(2) ミエリン関連タンパク質である MAG は神経軸索のランビエ絞輪傍部に集積している。傷害 1 週間後のマウスではこの MAG の特異的

発現分布も脱髄同様に坐骨神経と後根神経で免疫染色法により発現低下を示し、LPA1 受容体遺伝子欠損マウスでは後根のみの MAG の発現低下が消失した。さらに、後根神経での MAG の発現低下は末梢側よりも中枢側、とりわけ脊髄入力部位で顕著に観察されることを見出した。この、脊髄近傍領域後根特異的な MAG の発現低下は Western blot 法においても定量的に証明した。

(3) マウスの脊髄神経および後根神経の部位での MAG の発現変化について、経時変化を Western blot 法により解析したところ、神経傷害後、後根神経では3日目から顕著に減少が認められた。しかしながら、脊髄神経の MAG は変化しなかった(図2)。

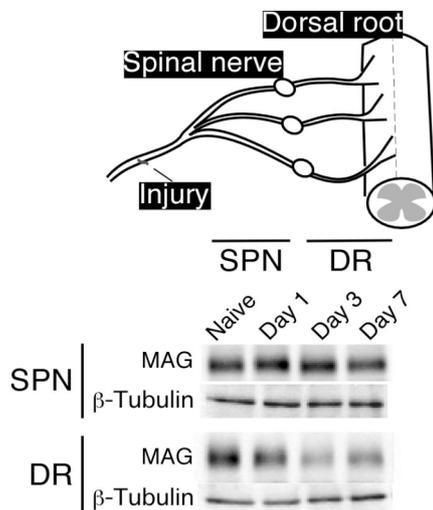


図2 SPN および DR における MAG の発現変化

(4) 一方、MAG はシュワン細胞に発現しており、軸索突起伸展抑制に働いているが、MAG の発現低下部位である後根神経脱髄部位に神経突起伸展マーカーである GAP43 タンパク質が発現上昇していることを Western blot 法により明らかにした。

(5) 後根神経脱髄部位における電子顕微鏡解析においては無髄侵害性知覚神経 C 線維が認められる Ramak 束において傷害後無髄 A 線維と無髄 C 線維が直接接触する形態学的観察もなされた。

(6) C57BL/6J 系雄マウスに LPA を脊髄クモ膜下腔内投与すると、後根部位において用量依

存的な MAG 発現低下が認められた。

(7) LPA によって誘発される MAG 発現低下について、LPA のシュワン細胞に対する直接作用を検討するために、組織片培養法を用いて培養液中に LPA を処置するとその1日後に顕著な MAG 発現低下が観察された。

(8) この組織片培養法を用いた LPA による MAG 発現低下について各種プロテアーゼの関与を検討したところ、関与する蛋白質分解酵素の同定に成功した。

(9) さらにはその蛋白質分解酵素特異的な阻害剤が神経因性疼痛を遮断することを機械刺激誘発性疼痛試験法と熱刺激誘発性疼痛試験法により明らかにした。

(10) C57BL/6J 系雄マウス傷害1週間後、EPW test による知覚神経選択的な機能評価したところ、有髄 A δ 線維および有髄 A β 線維における有意な閾値低下(過敏応答)が観察された。一方、LPA1 受容体遺伝子欠損マウスでは、坐骨神経部分結紮による有髄 A 線維の閾値低下は認められなかった。

(11) 一方、C57BL/6J 系雄マウス傷害1週間後における各種線維応答変調を脊髄後角における ERK1/2 リン酸化を指標として解析したところ、①5 Hz 刺激による C 線維刺激後、脊髄後角にリン酸化 ERK1/2 陽性細胞が観察されたが、陽性細胞数は神経傷害モデルでは有意に減少していた。②250 Hz 刺激による A δ 線維刺激後、脊髄後角にリン酸化 ERK1/2 陽性細胞が観察されたが、陽性細胞数は神経傷害モデルでは有意に上昇していた。③2000 Hz 刺激による A β 線維刺激後、Sham マウスではその脊髄後角にリン酸化 ERK1/2 陽性細胞は認められないのに対して、傷害後1週間後のマウスではその疼痛伝達に関連する脊髄後角第 I, II 層に陽性細胞が観察された。通常 A β 線維は脊髄後角深層領域にシナプス入力していることから、非侵害性 A β 神経のスプラウティングを機能的に示唆する事実である。この異所性の神経活性化は LPA1 受容体遺伝子欠損マウスでは有意に抑制された。

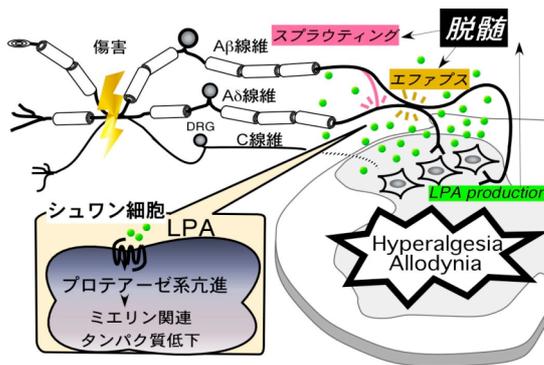


図 3 LPA 依存的な脊髄近傍領域後根の脱髄とスプラウティング

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 5 件)

- (1) Ueda H, Ueda M: Mechanisms underlying morphine analgesic tolerance and dependence. *Frontiers in Bioscience*, in press, 2009 査読有り
- (2) 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* 152(2):296-8, 2008 査読有り
- (3) Fujita R, Ma Y, Ueda H: Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia. *J. Neurochem.* 107(1): 152-60, 2008 査読有り
- (4) Inoue M, Ma L, Aoki J, Ueda H: Simultaneous stimulation of spinal neurokinin 1 and NMDA receptors produces lysophosphatidylcholine, which undergoes autotaxin-mediated conversion to lysophosphatidic acid, an initiator of neuropathic pain. *J. Neurochem* 107(6) 1556-1565, 2008 査読有り
- (5) 井上誠 植田弘師: 神経傷害時の有髄 A 線維におけるトランスアクティベーション機構 ペインクリニック 28 1013-1018, 2007 査読無し

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Ma L, Inoue M, Ueda H. Critical time period for lysophosphatidic acid (LPA)-signaling in nerve injury-typed neuropathic pain. 第 31 回日本神経科学大会 2008, 07, 10 東京
- (2) Xie W, Inoue M, Ueda H. Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic

acid (LPA) from lysophosphatidylcholine (LPC), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. 第 31 回日本神経科学大会 2008, 07, 10 東京

- (3) Ma L, Inoue M, Ueda H. Autotaxin mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain through the synthetic enzymic action for lysophosphatidic acid (LPA). *Asian Pain* 2008 2008, 07, 18 福岡
- (4) Xie W, Inoue M, Ueda H. Lysophosphatidylcholine (LPC) hydrolyzed by autotaxin/ATX into lysophosphatidic acid (LPA), induces neuropathic pain through LPA1 receptor. *Asian Pain* 2008 2008, 07, 18, 福岡
- (5) Matsumoto M, Inoue M, Ueda H. Nicotine analgesia and primary afferent cholinergic neuron. *Asian Pain* 2008 (第 30 回日本疼痛学会) 2008, 07, 20 福岡
- (6) Inoue M, Ueda H. Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA) from lysophosphatidylcholine (LPC), initiates the sciatic nerve injury-induced neuropathic pain. *Society for Neuroscience* 2008, 11, 17 Washington D.C
- (7) Inoue M, Ueda H. The de novo biosynthesis of lysophosphatidic acid (LPA), an initiator of neuropathic pain, following intense stimulation of primary afferent fiber. 第 82 回日本薬理学会 2009, 03, 16 横浜

〔その他〕

長崎大・院医歯薬学総合・分子薬理学HP
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/neuro/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 睦美 (UEDA MUTSUMI)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
 研究支援員
 研究者番号: 30437834

(2) 研究分担者 (INOUE MAKOTO)

井上 誠
 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