

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19700337

研究課題名（和文） 帯状疱疹後神経痛への移行における BDNF/trkB シグナリングの役割

研究課題名（英文） The role of BDNF/trkB signaling in the transition to postherpetic neuralgia

研究代表者

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHIRO)

富山大学・生命科学先端研究センター・助教

研究者番号：00397176

研究成果の概要：

帯状疱疹から帯状疱疹後神経痛への発症機序は明らかでない。本研究は脳由来神経栄養因子 (BDNF) とその受容体 trkB に注目し、帯状疱疹後神経痛への移行における脊髄 BDNF/trkB シグナリングの役割について解析した。帯状疱疹痛マウスの脊髄において BDNF 産生量が増加し、抗体等で BDNF のはたらきをブロックすると、帯状疱疹痛を抑制し、帯状疱疹後神経痛への移行も抑制された。本研究の成果により、帯状疱疹後神経痛への移行における BDNF/trkB 受容体の関与が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：中枢・末梢神経薬理学

キーワード：帯状疱疹痛, 帯状疱疹後神経痛, 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛の中で、腰痛、有痛性糖尿病性ニューロパチーに次いで多いのが帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛である。この疾患は感覚神経節に潜伏感染していた水痘・帯状疱疹ウイルスの再活性化により発症する。わが国では年間50万人が帯状疱疹を発症し、そのうち10-15%程度が帯状疱疹後神経痛に移行すると推定される。発症率はストレス負荷や加齢とともに高く

なり、ストレス社会が蔓延し高齢化が急速に進むわが国や先進国では、ますます帯状疱疹および帯状疱疹後神経痛の患者数が増加すると予想される。これら疼痛に既存の鎮痛薬はほとんど効かないため、有用な治療薬の開発が望まれているが、いまだ実現には至っていない。その理由として神経因性疼痛の発症機序や疼痛に関わる遺伝子・タンパク質の動態がいまだ解明されていないことが挙げられる。このような背景

のもと、申請者はこれまでに、急性帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛、それぞれのユニークなマウスモデルを世界で初めて確立・報告した。現在までに、これらのモデルマウスを使用して、疼痛発症メカニズムに関する研究および新規化合物の評価を行ってきた。

麻酔科医および皮膚科医に対するアンケート調査によると、帯状疱疹を発症した患者における帯状疱疹後神経痛への移行のリスクファクターは、①年齢、②痛みの強さ、③皮疹の程度、④痛み治療不十分であると報告されている（宮崎ら、1999）。すなわち、帯状疱疹の痛みの程度が強いほど帯状疱疹後神経痛に移行しやすいという考えであり、帯状疱疹の痛みを十分に緩和することで帯状疱疹後神経痛の発症を予防できるということである。したがって、今後の研究において、急性帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛の発症機序、ならびに帯状疱疹から帯状疱疹後神経痛への移行メカニズムを明らかにすることは、新しい鎮痛薬と帯状疱疹後神経痛への移行を予防する新薬の開発に繋がることが期待できる。

2. 研究の目的

平成 17-18 年度科学研究費補助金（若手研究 B）の助成により、『帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の発症におよぼす神経栄養因子の役割』に関する研究を遂行し、現在までに以下のような成果を得た。

- ① 急性帯状疱疹痛マウスの後根神経節および脊髄後角において、脳由来神経栄養因子 (BDNF) および神経成長因子 (NGF) mRNA の発現が増大したが、帯状疱疹後神経痛マウスにおいては mRNA の発現に変化は見られなかった。
- ② 急性帯状疱疹痛マウスおよび帯状疱疹後神経痛マウスの脊髄後角において、神経栄養因子受容体 (trkA, trkB および trkC) mRNA の発現は変化しなかった。
- ③ 抗 trkB 抗体、抗 BDNF 抗体または trkB receptor chimera protein (trkB/Fc) の脊髄くも膜下腔内投与は、急性帯状疱疹痛を抑制したが、帯状疱疹後神経痛を抑制しなかった。

以上の成果から、急性帯状疱疹痛の痛み発生に脊髄 BDNF/trkB 系が関与し、一方で、帯状疱疹後神経痛の痛みそのものには BDNF/trkB 系の関与はほとんどないことが示唆された。現在のところ帯状疱疹から帯状疱疹後神経痛への移行メカニズムは不明である。BDNF は神経細胞の成熟、生存維持に重要な役割を果たしており、また神経可塑性にも重要な役割を担っている。

近年、脊髄神経の可塑的变化が痛みの持続に関与するという報告がなされている。したがって、急性帯状疱疹の時期において発現の増大した BDNF は、急性帯状疱疹の痛みそのものの発生に関与しているだけでなく、脊髄神経の trkB 受容体を介して神経の可塑的变化をもたらす、帯状疱疹後神経痛への移行における重要な役割を担っていると考えた。そこで本研究では、帯状疱疹後神経痛への移行における BDNF/trkB 受容体シグナリングの関与を明らかにすることを目的とし、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 疼痛関連反応の評価

Von Frey filamentを用いて後肢足蹠へ触刺激を与え、そのときの逃避反応や足振り動作などを指標に疼痛関連反応（アロディニアと痛覚過敏）を評価する。

(2) 急性帯状疱疹痛モデルマウスの作製

マウス (C57BL/6J strain, 雌, 実験開始時6週齢) をペントバルビタール麻酔下でバリカンと除毛クリームを用いて右腹部から後肢を除毛した。後肢の表皮に乱切を加え、単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus type-1, HSV-1) を経皮接種した。接種 4-5 日目にかけてヒトの帯状疱疹に類似した皮疹が出現し、疼痛反応も同時期より出現してくる。すべてのマウスに安定した疼痛反応が観察される接種 6 日目を急性帯状疱疹痛マウスとして使用した。

(3) 帯状疱疹後神経痛マウスの作製

HSV-1 接種マウスに発症した帯状の皮疹は、接種 5-8 日目にかけて徐々に悪化するが、接種後 10 日目あたりから痂皮が剥れ始め接種 15 日目までにはほぼ完全に治癒する。一部のマウスは皮疹の治癒とともに疼痛反応も消失するが、半数以上においては皮疹治癒後も疼痛関連反応が持続する。後者のマウスを帯状疱疹後神経痛モデルマウスとして使用した。

(4) 帯状疱疹後神経痛への移行率

1 群 24 匹として実験を行った。全 HSV-1 接種マウスのうち、接種後 35-40 日目において疼痛関連反応の持続するマウスの匹数を帯状疱疹後神経痛移行率 (%) として算出した。

(5) RNA の抽出

ペントバルビタール深麻酔下にマウスより脊髄腰膨大部を摘出した。摘出した組織は速やかに液体窒素にて凍結し、実験に用いるまで -80°C にて保存し

た。RNAはTrizol試薬 (Invitrogen) と RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。

(6) GeneChip 解析

Affymetrix 社のプロトコルにしたがい、抽出した RNA から逆転写酵素反応により cDNA を作製し、in vitro 転写反応によりビオチン標識した RNA を合成した。合成 RNA をマウス遺伝子発現解析用チップ Mouse Genome 430 2.0 Array にハイブリさせ、洗浄・染色後、スキャナーにより、各遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の発症

マウス後肢に HSV-1 を経皮接種すると、接種 5 日目より接種部位と同神経支配領域に皮疹が出現し、6-8 においてはヒト帯状疱疹と類似の帯状の皮膚病変を発症した。皮疹の出現と同時期より、後肢の触刺激に対する反応性が増大し、帯状疱疹痛を発症した。皮膚病変は、HSV-1 接種後 10 日目より治癒に移行し、接種 15 日目までには皮疹はほぼ完全に消失した。50%のマウスは皮疹の治癒とともに疼痛反応も消失したが、残り 50%のマウスにおいては皮疹の治癒後も持続的に疼痛反応が見られた。したがって HSV-1 を接種したマウスの約半数で帯状疱疹後神経痛を発症することが分かった。

(2) 帯状疱疹後神経痛への移行に BDNF/trkB が関与するか

以前の研究で、HSV-1 接種マウスの脊髄後角において、BDNF mRNA の発現が増大し、中和抗体等の処置により疼痛反応が減弱することを見出している(上記研究目的③参照)。そこで、帯状疱疹痛マウスの脊髄くも膜下腔内に trkB/Fc キメラタンパク質を投与し、帯状疱疹後神経痛への移行におよぼす効果を検討したところ、対照群と比較して移行するマウスの例数が減少した。したがって、帯状疱疹痛マウスの脊髄後角において発現の増大した BDNF が、trkB 受容体を介して帯状疱疹後神経痛の発症に関与していることが示唆された。

(3) アストロサイトにおける BDNF 産生メカニズム

温度感受性 SV40 大型 T 抗原遺伝子導入による不死化アストロサイト細胞株を樹立し、ATP による BDNF mRNA 発現上昇メカニズムを解析した。ATP はアストロサイトに存在する P2Y 受容体に作用し、細胞内 Ca²⁺の上昇、CaM kinase および CREB の活

性化(リン酸化)を誘導し BDNF 遺伝子プロモータを刺激することで BDNF mRNA の発現を増大させるメカニズムを明らかにした。このように BDNF の発現メカニズムが明らかになったことで、この経路の阻害するいずれかの薬物が帯状疱疹痛の治療薬および帯状疱疹後神経痛の予防薬になる可能性が示唆された。

(4) GeneChip システムによる網羅的遺伝子発現解析

(1)において、帯状疱疹後神経痛への発症には、脊髄後角における BDNF/trkB シグナリングが重要な役割を担っていることが示唆された。そこで移行メカニズムを朱お菜に解析する目的で、脊髄 BDNF/trkB の下流に存在する分子を GeneChip システムによる網羅的遺伝子発現解析法により探索した。帯状疱疹痛マウスの脊髄後角において、578 遺伝子の発現が増加した。これら発現が増大した遺伝子のうち、187 遺伝子の発現が trkB/Fc キメラタンパク質の投与により抑制された。帯状疱疹痛マウスにおいて 50 倍に増加し、trkB/Fc 投与により発現が 1/2 に抑制された遺伝子 A について注目し、その発現部位を免疫染色により調べたところ、ミクログリアに発現していることが明らかとなった。したがって、アストロサイトやミクログリアで産生された BDNF が、ミクログリアに存在する trkB 受容体に作用し、遺伝子 A の発現を増大させていることが示唆された。現在、他の遺伝子も鎮痛薬のターゲット分子となる可能性を考え、詳細に検討中であるとともに、この遺伝子 A が帯状疱疹後神経痛の発症に関与するかどうか、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA を投与して検討中である。

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 6 件)

- ① Takasaki I, Takarada S, Tatsumi S, Azegami A, Yasuda M, Fukuchi M, Tabuchi A, Kondo T, Tabuchi Y, and Tsuda M. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate Elicits the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Exon IV mRNA in Rat Astrocytes. GLIA 56, 1369-1379 (2008) 査読あり

- ② Sasaki A, Nakashima Y, Takasaki I, Andoh T, Shiraki K, Kuraishi Y: Morphine inhibits herpetic allodynia through mu-opioid receptors in Abeta-fiber neurons. *Neuroreport* 19, 975-979 (2008) 査読あり
- ③ Sasaki A, Takasaki I, Andoh T, Shiraki K, Takeshima H, Takahata H, and Kuraishi Y. Nociceptin-receptor deficiency prevents postherpetic pain without effects on acute herpetic pain in mice. *Neuroreport*. 19, 83-86 (2008) 査読あり
- ④ Sasaki A, Mabuchi T, Serizawa K, Takasaki I, Andoh T, Shiraki K, Ito S, and Kuraishi Y: Different roles of nitric oxide synthase-1 and -2 between herpetic and postherpetic allodynia in mice. *Neuroscience*. 150, 459-66 (2007) 査読あり
- ⑤ Sasaki A, Nakashima Y, Takasaki I, Andoh T, Shiraki K and Kuraishi Y: Effects of Loperamide on Mechanical Allodynia Induced by Herpes Simplex Virus Type-1 in Mice. *J. Pharmacol. Sci.* 104, 218-224 (2007) 査読あり
- ⑥ Takasaki I, Takarada S, Fukuchi M, Yasuda M, Tsuda M and Tabuchi Y: Identification of genetic networks involved in the cell growth arrest and differentiation of a rat astrocyte cell line RCG-12. *J. Cell. Biochem.* 102, 1472-1485 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① Takasaki I, Takarada S, Tatsumi S, Azegami A, Yasuda M, Fukuchi M, Tabuchi A, Kondo T, Tabuchi Y, and Tsuda M: Extracellular ATP elicits the expression of BDNF exon IV mRNA in rat astrocytes and astrocyte cell line RCG-12. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2008), 2008, 11, 15-19, Washington DC, USA.
- ② 立見 沙織, 高崎 一郎, 宝田 聡子, 田渕 圭章, 津田 正明: アストロサイトにおけるATP誘導性BDNF遺伝子発現上昇メカニズムの解析. 日本薬学会北陸支部第117回例会, 2007年11月11日, 金沢
- ③ 高崎 一郎, 佐々木 淳, 安東 嗣修, 白木 公康, 倉石 泰: 帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛のモデルマウス. 北陸実験動物研究会, 2007年9月15日, 富山
- ④ 高崎 一郎, 倉石 泰: 網羅的遺伝子発現解析に基づいた帯状疱疹痛発症機序の解明. 第24回麻酔メカニズム研究会, 2007

年7月21日, 大阪

- ⑤ 高崎 一郎, 小松 史明, 谷口 佳奈, 佐々木 淳, 安東 嗣修, 加藤 一郎, 平賀 紘一, 白木 公康, 倉石 泰: 帯状疱疹痛モデルマウスの疼痛発症における脊髄 galectin-3の関与. 日本薬学会第127年会, 2007年3月28-30日, 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHIRO)
富山大学・生命科学先端研究センター・
助教
研究者番号: 00397176

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし