

神経障害性疼痛に直結する神経回路動作異常メカニズムの解明と創薬への応用

Elucidation of abnormal functioning of neuronal circuits underlying neuropathic pain and its application for drug discovery

課題番号：19H05658

津田 誠 (TSUDA Makoto)

九州大学・薬学研究院・教授



研究の概要（4行以内）

神経系の障害により、モルヒネにも抵抗性を示す神経障害性疼痛が発症する。その主な症状のひとつであるアロディニア（触刺激で起こる痛み）はメカニズムが不明で著効する治療薬もない。本研究では、アロディニアに直結する神経回路の動作異常と、グリアとの相互作用や脳由来シグナルの役割を明らかにし、触から痛への誤変換機序の解明と創薬への応用を目指す。

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性アロディニア、一次求心性神経 A β 線維、光遺伝学、脊髄後角神経回路

1. 研究開始当初の背景

がんや糖尿病、帯状疱疹、脳梗塞などで神経系が障害された場合、アロディニアを主症状のひとつとする神経障害性疼痛が発症する。そのメカニズムは依然未解明で、根本的な治療法が無い場合、多くの患者が耐え難い痛みを苦しんでいる。

皮膚からの触覚と痛覚信号は一次求心性神経の主に A β 線維と A δ /C 線維を介して脊髄後角の深層と表層にそれぞれ入力する。それ故、通常、触刺激で痛みは起こらないが、神経の障害等によりそれは起こる。なぜ触刺激信号が痛みを誤変換してしまうのか？その根源的問いは未だ解かれていない。

2. 研究の目的

上記の背景から、神経障害性疼痛の新しいメカニズムの発見とそれを基盤とした医薬品開発への応用は極めて重要な課題である。代表者は、これまで神経やグリア細胞に注目し、神経障害性疼痛の新しいメカニズムを世界に先駆けて明らかにしてきた (Nature 2003; Nat Rev Neurosci 2018 など)。本研究では、これまで構築してきた疼痛・グリア研究基盤と、最近確立した技術（新規アロディニア評価法と神経サブセット特異的機能制御法）を融合させ、アロディニアに直結する神経回路の動作異常を特定する。そして、その異常の原因をグリアとの相互作用および脳から脊髄へのトップダウンシグナルから追究し、触から痛への誤変換メカニズムを明

らかにする。また、特定した神経やグリア細胞に作用する薬物を既存薬から探索し、創薬への応用を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、オプトジェネティクスを利用した A β 線維選択的刺激によるモルヒネ抵抗性神経障害性アロディニアの新規評価法 (eNeuro 2018) とウイルスベクター等による神経サブセット特異的機能制御法、そして組織学、電気生理学、生体イメージング等を組み合わせた包括的な検討を行う。

脊髄後角神経サブセットの可視化と機能操作技術を用いて、A β 線維刺激による神経障害性アロディニアおよび A β 線維から第 I 層神経への異常な興奮入力に対する役割を検討する。さらに、神経障害後に活動変化を生じた神経サブセットについては、その原因をグリア細胞（ミクログリアとアストロサイト）に注目して解析する。加えて、脳から脊髄後角神経へのシグナル入力とその役割も検討する。最後に、アロディニアに重要な神経やグリア細胞に作用する薬物を既存薬ライブラリーから探索する。

4. これまでの成果

ニューロペプチド Y (NPY) プロモーター搭載 AAV ベクターで制御される脊髄後角神経 (NPY⁺神経) を tdTomato で可視化したラットでの解析から、同神経は第 II 層外側に局在する抑制性介在神経サブセットであること

を明らかにした。脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ実験および神経トレーシング実験から、NPY⁺神経は A β 線維からのシナプス入力を受け、GABA を介して第 I 層投射神経を抑制的に制御することが示された。

ジフテリア毒素で NPY⁺神経のみを特異的に除去することにより、モルヒネ抵抗性の A β 線維性アロディニアが発症した。また、人工受容体 hM4Di で NPY⁺神経活動を抑制することでも同様のアロディニアが出現した。興味深いことに、NPY⁺神経活動低下により A β 線維刺激後の c-FOS 発現が脊髄後角第 I/II 層(痛覚信号受容領域)で認められた。すなわち、NPY⁺神経の活動低下が A β 線維由来信号の痛覚信号受容領域への誤入力に十分な変化であることが示された。

さらに、神経障害性疼痛モデルでの NPY⁺神経活動をパッチクランプ法により解析し、A β 線維からのシナプス入力の減少、活動電位発生数の減少および静止膜電位の低下が認められ、NPY⁺神経の活動性が神経障害後に低下することを明らかにした。特に静止膜電位の低下は A β 線維由来アロディニアの重症度と相関していた。そこで、神経活動を高める人工受容体 PSAM-5HT3R を NPY⁺神経に発現・活性化させた結果、神経損傷後の A β 線維由来アロディニアが抑制され、脊髄後角第 I/II 層での c-FOS 発現も低下した。以上より、NPY⁺神経はモルヒネ抵抗性 A β 線維由来アロディニアに中核的役割を果たすことが明らかとなった (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2021)。

さらに代表者は、神経障害性疼痛におけるアストロサイトの重要性をこれまで示してきたが (Brain 2011; Sci Rep 2015)、他の慢性疼痛モデルでもその普遍的な役割を実証した (*Brain Behav Immun*, 2020)。さらに、マウスの脊髄後角表層 (第 I~III 層外側) に局在する新規アストロサイトサブセット (転写因子 Hes5 を発現) の発見から、この細胞の活性化で A β 線維刺激による c-FOS 発現が脊髄後角第 I/II 層で誘導されることを示し、同サブセットが A β 線維由来シグナルを痛覚に変換する重要なグリア細胞であることを明らかにした (*Nat Neurosci*, 2020)。

5. 今後の計画

上記の成果から NPY⁺神経の重要性が示されたことを踏まえ、現在解析が進行している他のサブセットとの相互作用に注目し、A β 線維由来アロディニアに直結する脊髄後角内神経回路を明らかにする。さらに、神経損傷後に生じる NPY⁺神経での活動異常のメカニズムは、同神経での発現が変化する遺伝子の解析や NPY⁺神経とグリア細胞との相互作用から追究していく。脳から脊髄後角へ投射する神経の役割も神経活動を調節する人工受容体などを利用して検討する。以上の計画から、本研究目標である神経障害性疼痛に直結す

る神経回路の動作異常メカニズムを解明し、神経やグリアに作用する薬物を既存薬ライブラリーから探索して創薬への応用を目指す (*Int J Cancer*, 2019; *J Pharmacol Sci*, 2019; *Cells*, 2021)。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Yamashita T, Kamikaseda S, Tanaka A, Tozaki-Saitoh H, Caaveiro JMM, Inoue K, Tsuda M. New inhibitory effects of cilnidipine on microglial P2X7 receptors and IL-1 β release: an involvement in its alleviating effect on neuropathic pain. *Cells* 10: 434 (2021)
2. Tashima R, Koga K, Yoshikawa Y, Sekine M, Watanabe M, Tozaki-Saitoh H, Furue H, Yasaka T, Tsuda M. A subset of spinal dorsal horn interneurons crucial for gating touch-evoked pain-like behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 118: e2021220118 (2021)
3. Kohro Y, Matsuda T, Yoshihara K, Kohno K, Koga K, Katsuragi R, Oka T, Tashima R, Muneta S, Yamane T, Okada S, Momokino K, Furusho A, Hamase K, Oti T, Sakamoto H, Hayashida K, Kobayashi R, Horii T, Hatada I, Tozaki-Saitoh H, Mikoshiba K, Taylor V, Inoue K, Tsuda M. Spinal astrocytes in superficial laminae gate brainstem descending control of mechanosensory hypersensitivity. *Nat Neurosci* 23: 1376-1387 (2020)
4. Ono T, Kohro Y, Kohno K, Tozaki-Saitoh H, Nakashima Y, Tsuda M. Mechanical pain of the lower extremity after compression of the upper spinal cord involves signal transducer and activator of transcription 3-dependent reactive astrocytes and interleukin-6. *Brain Behav Immun* 89: 389-399 (2020)
5. Koga K, Yamagata R, Kohno K, Yamane T, Shiratori-Hayashi M, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M. Sensitization of spinal itch transmission neurons in a mouse model of chronic itch requires an astrocytic factor. *J Allergy Clin Immunol* 145: 183-191.e10 (2020)
6. Yamamoto S, Yamashita T, Ito M, Caaveiro JMM, Egashira N, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M. New pharmacological effect of fulvestrant to prevent oxaliplatin-induced neurodegeneration and mechanical allodynia in rats. *Int J Cancer* 145: 2107-2113 (2019)
7. 津田誠. 第 37 回井上学術賞 (2021)
7. ホームページ等
<http://life-innov.phar.kyushu-u.ac.jp/>