

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791442

研究課題名（和文） 網羅的遺伝子発現解析による難治性動的アロディニアの新規治療標的分子の探索と特定

研究課題名（英文） Exploration and identification of novel therapeutic targets for dynamic tactile allodynia

研究代表者

佐々木 淳（SASAKI ATSUSHI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教

研究者番号：10401811

研究成果の概要（和文）：帯状疱疹性疼痛マウスモデルの動的アロディニアの発生には、一次求心性線維ではなく脊髄後角ニューロンの興奮性増大の関与が示唆された。さらに網羅的遺伝子発現解析を行い、脊髄後角における P2X4 受容体、P2X7 受容体、S1P3 受容体の発現増加、および浸潤性 T リンパ球が動的アロディニアに関与することを見出した。P2X4 受容体、P2X7 受容体、S1P3 受容体および T リンパ球が帯状疱疹性動的アロディニアの新規治療標的になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We showed that increased excitability of spinal dorsal horn neurons, but not primary afferents, to brush stimulation is involved in the development of dynamic tactile allodynia in a murine model of herpes zoster-associated pain. To identify the candidate genes that have roles in the development of dynamic tactile allodynia, gene expression profiles of the spinal cord were analyzed by GeneChip oligonucleotide expression arrays. Among the genes upregulated in mice with dynamic tactile allodynia, P2X4 receptor, P2X7 receptor, S1P3 receptor and T-lymphocyte markers were identified. We also showed that increased expression of P2X4 receptor, P2X7 receptor, S1P3 receptor and T-lymphocyte infiltration in the spinal dorsal horn contribute to the development of dynamic tactile allodynia. These results suggest that targeting P2X4 receptor, P2X7 receptor, S1P3 receptor and T-lymphocytes is the new therapeutic strategy for treating herpes zoster-associated dynamic tactile allodynia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学（疼痛管理学）

キーワード：グリア細胞，触アロディニア，帯状疱疹，網羅的遺伝子発現解析，P2X4 受容体，P2X7 受容体，S1P3 受容体，T リンパ球

## 1. 研究開始当初の背景

帯状疱疹は、初感染後感覚神経節内に潜伏

感染していたヒトヘルペスウイルス 3（水痘・帯状疱疹ウイルス）が再活性化して生じ

る有痛性の皮膚疾患であり、自発痛に加え、衣服が擦れるなどの機械刺激による激痛（動のアロディニア）を生じることが特徴である。わが国では年間 60-70 万人が帯状疱疹を発症する。また、帯状疱疹の皮疹治癒後も痛みが持続する帯状疱疹後神経痛が帯状疱疹患者の 7-27%にみられる。帯状疱疹は加齢とともに発症頻度が高くなるので、高齢者の増加が著しいわが国を含めた先進諸国では帯状疱疹による疼痛（帯状疱疹痛）に加え、帯状疱疹後神経痛の予防と治療が重要かつ緊急の問題となっている。動のアロディニアは既存の鎮痛薬・鎮痛補助薬に強い抵抗を示す難治性疼痛症状であり、その発現は患者を抑うつ状態に陥れ、生活の質を著しく低下させる。しかし、これまでの動物実験では動のアロディニアに注目した研究は少なく、動のアロディニアの発生メカニズムおよびその発生に関わる遺伝子群についての知見は乏しかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だ確立した治療薬のない帯状疱疹性動のアロディニアについて、ヒトと同様の症状を発症するマウスモデルの解析に網羅的遺伝子発現解析を取り入れることで、新規治療標的分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 帯状疱疹関連疼痛マウスモデルの作製

#### ① ウイルス接種

雌性 C57BL/6j マウス（日本 SLC、実験開始時 6-7 週齢）の大腿部皮膚を注射針で乱切り、ヒトヘルペスウイルス 1 の培養上清（ $1 \times 10^6$  pfu）を滴下、塗布した。

#### ② 動のアロディニアの評価

後肢の足底部皮膚を絵画用絵筆で撫でることで生じる疼痛反応を 3 段階にスコア化することで動のアロディニアを評価した。皮疹はウイルス接種後 6-7 日目あたりで最大となり 20 日目には完全治癒することから、ウイルス接種後 20 日目以降を帯状疱疹後神経痛期と判断した。

#### (2) GeneChip 解析

健常コントロール群および帯状疱疹後神経痛群の各 6 匹分の患側 L4-5 脊髄から NucleoSpin® RNA II (Takara) を用いて total RNA を抽出し、Affimetrix 社 GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

#### (3) 定量的 RT-PCR

NucleoSpin® RNA II を用いて total RNA を抽出し、PrimeScript® RT Master Mix (Takara) を用いて逆転写反応を行った。大部分の定量的

PCR には Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies) を用い、標的遺伝子を検出するプライマーは Invitrogen より購入し、SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara) を使用した。発現量は GAPDH により標準化し、検量線法を用いて解析した。一部の実験では、TaqMan プローブと ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて定量的 PCR を行った。

#### (4) 免疫組織化学染色

マウスを 4%パラホルムアルデヒドにて還流固定し腰部脊髄を摘出した。摘出した脊髄は 4%パラホルムアルデヒドにて後固定後、30%スクロースに置換後ドライアイスにて急速凍結した。クリオスタットにて横断脊髄の凍結切片を作製し、蛍光免疫染色を行った。蛍光像は、TCS-SP5 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) または Radiance 2100 共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-Rad) を用いて撮影し解析した。

#### (5) 脾臓 T リンパ球の分離

ウイルス接種 7 日目のマウスから摘出した脾臓を MACS 溶液中ですりつぶし、径  $30 \mu\text{m}$  ナイロンフィルターに通した。さらに Lympholyte®-M (Cedarlane Laboratories) を用いた比重密度勾配遠心法により細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液に対し、MACS CD4 または CD8 マイクロビーズ

(Miltenyi Biotec) で CD4 または CD8 陽性細胞を標識し、MS カラム (Miltenyi Biotec) を用いて陽性分画を磁氣的に選択することで、CD4 と CD8 陽性 T リンパ球を得た。

得られた各 T リンパ球はリン酸緩衝生理食塩水で  $2 \times 10^5$  個/ml となるように調整し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベーション後、細胞懸濁液のまま、もしくは遠心により得た上清を、マウスの脊髄くも膜下腔内に  $5 \mu\text{l}$  投与した。

#### (6) 電気生理学的解析

末梢神経の活動は、麻酔下で皮疹部を支配する脛骨神経を露出し、双曲電極を用いて、細胞外電位記録法により解析した。脊髄後角ニューロンの活動は、麻酔下で皮疹部位からの感覚入力を受ける腰髄を露出後、タングステン電極を刺入し、後角深部広作動域ニューロン（非侵害性から侵害性までの広い感覚情報を受容するニューロン）の活動を細胞外電位記録法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 脊髄後角ニューロンと末梢神経における各種機械刺激に対する興奮性変化

感覚神経節でのウイルス増殖により発症するという帯状疱疹の病態から考えると、一次感覚神経、もしくは脊髄後角ニューロンの

変調が動的アロディニアの原因となっている可能性が高い。そこで、末梢神経と脊髄後角ニューロンのどちらの変調が動的アロディニア発現に関与するのかを解析した。

帯状疱疹痛期の脛骨神経の興奮性は、絵画用絵筆による撫で刺激（動的機械刺激）、無鉤ピンセットによる挟み刺激、フォンブレイ線維による点状機械刺激のいずれに対しても有意に低下した。健常マウスに比べ、帯状疱疹痛期の脊髄後角広作動域ニューロンでは、動的機械刺激に対する興奮性が増大したが、挟み刺激に対する反応性は低下し、点状機械刺激に対しては有意な変化はみられなかった。脊髄後角広作動域ニューロンは、受容野への連続電気刺激により発火頻度が刺激と共に増加する wind-up 現象が誘導されるが、帯状疱疹痛期では刺激に伴う発火頻度の増加は観察されなかった。したがって、動的機械刺激に対する興奮性の増大に wind-up 機構は関与しないと考えられる。以上の結果より、末梢神経ではなく、脊髄後角ニューロンの興奮性の増大が動的アロディニアの発現に関与すると考えられる。

#### (2) グリシントランスポーター (GlyT) 阻害薬の抗アロディニア作用

脊髄後角での主な抑制性神経伝達物質はグリシンである。シナプス間隙の抑制性グリシン濃度を増加させる目的で GlyT2 阻害薬を脊髄くも膜下腔内に投与すると動的アロディニアが顕著に抑制された。この結果は、帯状疱疹性動的アロディニアへの GlyT2 阻害薬の有効性を示唆するとともに、脊髄後角ニューロンの興奮性伝達の亢進が動的アロディニアの発現に関与するという (1) の考えを支持するものである。

#### (3) ニューロン興奮マーカー c-fos, ミクログリアマーカー Iba-1, アストロサイトマーカー GFAP 発現変化

脊髄後角におけるニューロン興奮マーカー c-fos, ミクログリアマーカー Iba-1 および CD68, アストロサイトマーカー GFAP 発現変化を定量的 RT-PCR および免疫染色法により調べ、脊髄後角ニューロン興奮, ミクログリア, アストロサイトの活性化の経時変化を調べた。c-Fos 陽性細胞は帯状疱疹痛期でのみ顕著に増加した。Iba-1 の mRNA 発現および免疫活性は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期の両時期で増加したが、帯状疱疹痛期でより顕著であった。GFAP の mRNA 発現および免疫活性は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期の両時期で同程度増加した。以上から、帯状疱疹痛期では脊髄後角ニューロンが興奮状態にある、ミクログリアの活性化は帯状疱疹痛期で特に顕著に生じる、アストロサイトの活性化は帯状疱疹痛期のみならず帯状

疹後神経痛期においても活性化状態が維持されていることが示唆される。

#### (4) 動的アロディニア関連遺伝子の探索

帯状疱疹後神経痛マウスの患側脊髄で発現変化する遺伝子を GeneChip® を用いて網羅的に解析し、動的アロディニア関連遺伝子を探索した。健常群と比較し帯状疱疹後神経痛群では 2,030 個のプローブセットに発現変化がみられた (増加は 1,161 個, 減少は 869 個)。

#### (5) P2X4 受容体の関与

健常群と比較し帯状疱疹後神経痛群で発現増加した ATP 受容体サブタイプの P2X4 受容体に着目した。定量的 RT-PCR 解析の結果、P2X4 受容体 mRNA 発現増加は帯状疱疹後神経痛期よりも帯状疱疹痛期で顕著に生じた。P2X4 受容体免疫活性は脊髄後角ニューロン (NeuN 陽性細胞) とアストロサイト (GFAP 陽性細胞) では観察されず、ミクログリア (OX-42 陽性細胞) でのみ観察された。動的アロディニア発現初期から P2X4 受容体拮抗薬を脊髄くも膜下腔内に繰り返し投与すると、動的アロディニアの発現が抑制された。P2X4 受容体拮抗薬の投与はミクログリアマーカー Iba-1 およびミクログリア由来痛み関連遺伝子 BDNF の mRNA 発現増加を抑制しなかったが、Cl<sup>-</sup> 排出ポンプである K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter (KCC2) の mRNA 発現低下を抑制した。また、trkB-Fc キメラタンパク質を動的アロディニア発現初期から脊髄くも膜下腔内に繰り返し投与すると、動的アロディニアの発現が抑制され、KCC2 の mRNA 発現低下も抑制された。以上から、P2X4 受容体の活性化はミクログリアの活性化プロセス自体には関与しないが、その活性化により BDNF が放出され、trkB 受容体活性化によって KCC2 発現低下が生じるという動的アロディニア発現メカニズムが明らかとなった。

#### (6) P2X7 受容体の関与

健常群と比較し帯状疱疹後神経痛群で発現増加した ATP 受容体サブタイプの P2X7 受容体に着目した。定量的 RT-PCR 解析の結果、患側脊髄における P2X7 受容体 mRNA 発現増加は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期で同程度生じていた。選択的 P2X7 受容体拮抗薬の脊髄くも膜下腔内投与は、単回投与により急性の抗アロディニア効果、反復投与により持続性の抗アロディニア効果を示した。P2X7 受容体免疫活性は脊髄後角ニューロン (NeuN 陽性細胞) とアストロサイト (GFAP 陽性細胞) で観察され、ミクログリア (CD68 陽性細胞) では観察されなかった。以上から、脊髄後角ニューロンとアストロサイトに発現する P2X7 受容体が動的アロディニアの発現に関与することが示唆される。

#### (7) S1P3 受容体の関与

健常群と比較し帯状疱疹後神経痛群で発現増加したスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 受容体サブタイプの S1P3 受容体に着目した。定量的 RT-PCR 解析の結果、患側脊髄における S1P3 受容体 mRNA 発現増加は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期で同程度生じていた。脊髄くも膜下腔内に S1P3 受容体拮抗薬を単回投与すると帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期の両時期の動的アロディニアが抑制された。以上から、S1P3 受容体が動的アロディニアの発生に関与することが示唆される。

#### (8) 脊髄後角への T リンパ球浸潤の関与

GeneChip<sup>®</sup>解析結果から脊髄後角への T リンパ球の浸潤を示唆する遺伝子発現変化がみられたことから、動的アロディニア発生への T リンパ球の関与を検討した。帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期の両時期の患側脊髄において、各種 T リンパ球マーカー (CD3, CD4, CD8) の mRNA 発現増加および免疫陽性細胞数の増加が生じ、帯状疱疹痛期でより顕著であった。リンパ球遊走阻害薬 FTY720 の経口投与により動的アロディニアの発生が抑制され、さらに、帯状疱疹痛期マウスの脾臓から得た CD4 陽性ヘルパー T リンパ球のインキュベーション懸濁液および上清を健常マウスに脊髄くも膜下腔内投与することで動的アロディニアが生じ、CD8 陽性キラー T リンパ球のインキュベーション懸濁液および上清では動的アロディニアは生じなかった。以上から、脊髄後角に浸潤する T リンパ球、特にヘルパー T リンパ球が動的アロディニアの発生に直接的に関与する可能性が示唆される。

#### (9) 分裂促進因子活性化タンパク質 (MAP) キナーゼの関与

MAP キナーゼはリン酸化され活性化する。MAP キナーゼ経路はグリア細胞における疼痛発現シグナル経路のひとつであると考えられている。そこで、脊髄における MAP キナーゼ (ERK, p38, JNK) の活性化 (リン酸化) を免疫染色により調べた。その結果、ERK と p38 のリン酸化が帯状疱疹痛期の脊髄後角で著明に生じ、JNK のリン酸化は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛の両時期で生じた。また、ERK 阻害薬および p38 阻害薬の脊髄くも膜下腔内は帯状疱疹痛期の動的アロディニアのみを抑制し、JNK 阻害薬の脊髄くも膜下腔内は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期の両時期の動的アロディニアを抑制した。以上から、ERK と p38 の活性化が帯状疱疹痛期の動的アロディニアの発生に関与し、JNK の活性化は帯状疱疹痛期と帯状疱疹後神経痛期の両時期の動的アロディニアの発生に関与す

ることが示唆される。

本研究成果により、難治性動的アロディニアの新規治療薬の標的分子として、GlyT-2, P2X4 受容体, P2X7 受容体, S1P3 受容体を同定した。また、これらに関連した実験から、BDNF/TrkB 受容体シグナルの役割や MAPK キナーゼ類の関与も明らかにした。さらに、脊髄後角に浸潤する T リンパ球が動的アロディニアの発生および難治化に関与するという新たな疼痛発生メカニズムを発見した。従来の研究では、脊髄後角の構成細胞であるニューロン同士あるいはニューロン-グリア細胞の相互作用に焦点が当てられてきたが、本研究成果から、脊髄後角における疼痛発生メカニズムの新たなプレイヤーとして T リンパ球を見出した。今後、T リンパ球と脊髄後角細胞をつなぐ分子メカニズムを解明することで、脊髄後角のもともとの構成細胞同士の相互作用だけに焦点を当てた従来の枠組みを超えた新しい発想に基づく疼痛発生機構および新規の疼痛治療標的分子が明らかになると考えられる。

#### 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 4 件)

- ① Nishikawa Y, Sasaki A, Kuraishi Y. Blockade of glycine transporter (GlyT) 2, but not GlyT1, ameliorates dynamic and static mechanical allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. *J Pharmacol Sci*, 112(3), 352-360 (2010) 査読有
- ② Nishikawa Y, Sasaki A, et al. (以下 4 名省略). Modality-specific hyperexcitability of dorsal horn neurons to mechanical stimuli in herpetic mice. *Neuroreport*. 20(12):1077-1080 (2009) 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 佐々木淳, 脊髄後角での免疫応答と帯状疱疹性アロディニア, 第 21 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2012 年 3 月 13 日, 京都.
- ② Sasaki A, Shinoda A, Kuraishi Y. T-lymphocytes infiltration and signaling in the spinal dorsal horn contribute to dynamic allodynia in a murine model of herpetic pain. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011 年 7 月 14-18, Florence, Italy.

- ③ 松村裕太, 佐々木淳, 津田誠, 倉石泰, 井上和秀, 带状疱疹痛におけるミクログリアおよび P2X4 受容体の役割, 第 63 回日本薬理学会西南部会, 2010 年 11 月 26 日, 鹿児島.
- ④ 佐々木淳, 北見紀明, 金山翔治, 安東嗣修, 倉石泰, 带状疱疹痛と带状疱疹後神経痛モデルにおける脊髄内 P2X7 受容体の発現増加と P2X7 受容体拮抗薬の抗アロディニア効果, 第 30 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2009 年 8 月 28 日, 東京.
- ⑤ 西川幸俊, 佐々木淳, 安東嗣修, 倉石泰. 新規鎮痛薬としてのグリシントランスポーター阻害薬の可能性, 次世代を担う創薬・医療薬学シンポジウム 2009, 2009 年 8 月 24 日, 東京.
- ⑥ 佐々木淳, 安東嗣修, 倉石泰, 動物モデルからみた带状疱疹後神経痛の病理と薬物有効性, 2009 年 7 月 18 日, 名古屋.

[図書] (計 1 件)

- ① 倉石泰, 佐々木淳, 技術情報協会, 慢性疼痛における薬剤選定と治療薬開発, 2010, pp. 250-280

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 淳 (SASAKI ATSUSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・

助教

研究者番号 : 10401811