

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号 : 34519	研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 2010~2011	
課題番号 : 22790195	
研究課題名 (和文) 神経障害性疼痛発症における caspase-1 を介したサイトカイン活性化機構の解明	
研究課題名 (英文) Critical role for spinal caspase-1 in neuropathic pain development through its distinct regulation of cytokines	
研究代表者	
三好 敏 (MIYOSHI KAN)	
兵庫医科大学・医学部・助教	
研究者番号 : 30454755	

研究成果の概要 (和文) : 末梢神経障害モデル動物において脊髄における caspase-1 の著明な発現増強が引き起こされ、疼痛発現機構に関与していることを明らかにした。その詳細な結果としては、脊髄マイクログリアにおいて神経障害後 3 日目をピークとした Caspase-1 の発現増強が確認され、Caspase-1 に対する阻害薬を髄腔内に持続的に処置することによって疼痛発現が抑制された。一方、TLR4 活性化作用を有する LPS の髄腔内投与により、caspase-1, IL-18 が活性化することが確認され、さらに脊髄グリア細胞の活性化が確認された。これらのことから、神経障害時においては脊髄マイクログリアにおいて caspase-1, IL-18 の発現増強が引き起こされ、脊髄グリア細胞間における相互作用を引き起こすことで痛覚過敏を引き起こしていることを明らかにした。このことは、IL-18 シグナルの阻害薬が神経障害性疼痛治療に重要である可能性を示唆したものであると考えられる。

研究成果の概要 (英文) : SNL induced an increase in the expression of IL-18 and caspase-1 in microglia, in the spinal dorsal horn. Intrathecal injection of the TLR4 agonist, LPS, produced upregulation of Iba1, caspase-1, and IL-18 expression, which was prevented by a p38 MAPK inhibitor. Both anti-IL-18 antibody and caspase-1 inhibitors alleviated SNL-induced tactile allodynia. Conversely, intrathecal injection of IL-18 produced both tactile allodynia. IL-18-deficient mice or caspase-1-deficient mice did not develop tactile allodynia after SNL. Thus, blocking IL-18 signaling in glial cells might provide a fruitful strategy for treating neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・解剖学一般

キーワード : Caspase-1, IL-18, microglia, neuropathic pain, spinal cord, astrocytes

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛をはじめとする難治性疼痛は発症の仕組みがわかっておらず、NSAIDs（非ステロイド系抗炎症薬）やモルヒネが効かない場合は治療法がないため、患者や周囲の人たちの心身への負担は重い。神経因性疼痛は末梢神経あるいは中枢神経の損傷によるものが多く、例えば、手術の後遺症（術後痛）、がん、脊髄損傷、带状疱疹、糖尿病性神経炎、および三叉神経痛などによって引き起こされる。自発痛や痛覚過敏があり、さらに通常では痛みを感じない、例えば空調機器からの空気が当たる、肌着が触れるといった弱い刺激でも激痛を訴える異痛症（アロディニア）に悩まされることもある。

ミクログリアは存在こそ知られていたものの、その本態、機能は曖昧であった。ここ20年で急速に研究が進み、グリア細胞が神経活動の調節にも積極的に関わっていることが示され、生体内でも様々な生理的役割あるいは疾患への関与が注目されている。実際に、神経因性疼痛モデルラットでは脊髄後角のミクログリアにおいて細胞体の肥大化、突起の退縮、および細胞増殖など、活性化の典型的な形態変化が認められる。この活性化型ミクログリアにおけるP2X₄受容体を介して、神経因性疼痛の発症維持に重要な役割を果たしていると考えられている。その後、P2X₄受容体の他に、ケモカイン受容体のCCR2やCX₃CR1、そしてTLR4などが、神経因性疼痛に重要なミクログリア分子として報告され、神経因性疼痛に対する脊髄ミクログリアの重要性が注目を集めている。アストロサイトもミクログリア同様、ここ20年で急速に研究が進んできた。実際に、神経因性疼痛モデルラットでは脊髄におけるアストロサイトの増殖などが認められる。また、これまでの知見から神経因性疼痛発現初期段階においてはミクログリアが重要な役割を果たし、それに伴ったアストロサイトの活性化が神経因性疼痛維持に重要である可能性が考えられている。実際、ミクログリア活性化阻害剤ミノサイクリンは、神経因性疼痛形成前に投与すると疼痛形成を抑制するが、神経因性疼痛形成後に投与しても疼痛を抑制しないことが報告されている。さらに、アストロサイトを含むグリア細胞の機能調節薬であるプロペントフィリンは、神経因性疼痛形成後に投与しても疼痛発現を抑制する。

これらの知見から、神経因性疼痛発現の初期におけるミクログリアがアストロサイトの活性化に何らかの影響を及ぼし、神経因性疼痛の発症維持に重要な役割を果たしていると予想される。

2. 研究の目的

近年、脊髄グリア細胞が炎症性サイトカインを遊離することで、難治性疼痛の発症や維持に重要な役割を果たすことが示唆されている。我々は、この炎症性サイトカインのなかでもinterleukin-18 (IL-18)が末梢神経損傷後に脊髄ミクログリアにおいて増加し、神経障害性疼痛の発現に関与することを明らかにした。一方、システインプロテアーゼであるcaspase-1は炎症性サイトカインであるIL-1 β やIL-18を活性化することが知られているが、神経障害性疼痛の発現におけるcaspase-1の役割は未だ不明である。今回の申請では神経因性疼痛モデルの脊髄における、IL-18関連シグナルを介したグリア-神経相互作用に着目し、シグナル伝達分子の活性化とグリア細胞自身の形態変化あるいはグリア細胞における遺伝子発現の変化、さらには神経因性疼痛との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)…疼痛関連動作 (heat/cold hyperalgesia, mechanical allodynia) の確認

SD雄性ラットを用いて代表的な神経因性疼痛モデルであるBennettモデル (chronic constriction injury: CCI)、およびChungモデル (spinal nerve ligation: SNL)、さらに末梢炎症性疼痛モデルであるcomplete Freund's adjuvant (CFA)モデルを作製し、疼痛関連動作 (thermal hyperalgesia, mechanical allodynia)を経時的に観察、確認した。CFAは神経因性疼痛モデルの対照として使用した。

(2)…モデル動物の脊髄後角、およびDRGにおけるcaspase-1の増減の定量化

ラット後根神経節 (DRG)由来のcDNAからcaspase-1のRNA probeを作製する。術後1、3、7、14、21日目にL5レベルの脊髄後角とL4/5DRGを摘出し、Northern blot analysis、In situ hybridization (ISHH)法、定量的

RT-PCR 法、免疫組織化学法、および Western blotting を施行し、定量化を行う。

(3) … 脊髄後角、および DRG における caspase-1 の局在の同定

Caspase-1 がニューロンで活性化されているのか、グリアで活性化されているのかをニューロンのマーカーである MAP2、NeuN、ミクログリアのマーカーである Iba1、OX42、およびアストロサイトのマーカーである GFAP を用いてそれぞれ同定する。DRG ニューロンの場合にはさらに NF200 との二重染色を、DRG グリアの場合には GFAP との二重染色を行うことで鑑別を行う。

(4) … Caspase-1 阻害薬、siRNA の髄腔内投与による行動学的評価

Caspase-1 阻害薬あるいは caspase-1-siRNA を、osmotic ポンプを用いて持続的に髄腔内投与し、疼痛関連動作 (thermal hyperalgesia, mechano allodynia, cold allodynia/hyperalgesia) を抑制、あるいは増悪させるかを行動学的に評価、観察する。

(5) … IL-18 上流・下流分子の決定

IL-18 や Caspase-1 を活性化することが予想される様々なサイトカインおよびケモカインをナイーブのラットに髄腔内投与することで、神経損傷と同様の現象が生じるかどうか検討する。

4. 研究成果

Interleukin-18 (IL-18) は様々な生物学的活性を持つことが報告され、現在注目を集めている炎症性サイトカインのひとつである。我々は、この IL-18 が脊髄マイクログリアから遊離されることで、神経因性疼痛発現に関与していることを明らかにした。一方、IL-18 は Caspase-1 によって活性化することが知られている。Caspase-1 は IL-18 同様神経因性疼痛下では脊髄マイクログリアにおいて活性化が認められた。さらに、この Caspase-1 は、IL-1b の主要な活性化因子であることも知られている。この IL-1b は神経因性疼痛下において脊髄グリア細胞で活性化されることが明らかにされている。そこで、これら

IL-1b/IL-18 シグナルを抑制する目的で、Caspase-1 阻害薬を髄腔内に持続処置したところ、神経因性疼痛発現が強く抑制された。これらのことから、caspase-1 は IL-18 および IL-1b シグナルを抑制することで神経因性疼痛発現を抑制していることが明らかとなった。また、これら IL-18/IL-1b シグナルの上流因子として fractalkine および 5-HT が神経因性疼痛発現に重要であることも明らかとしている。この脊髄における 5-HT の遊離を介した fractalkine の活性化が IL-18/IL-1b シグナルの活性化に非常に重要である。これら Caspase-1 が活性化する因子である IL-1b/IL-18 シグナルが 5HT/fractalkine を介した神経グリア相互作用に中心的な役割を果たす事を明らかにした研究成果は、J. Neurosci. に発表した。

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 3 件)

- ①. Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K. (2012) Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. Pain, 153:68-79. 査読有
DOI: 10.1016/j.pain.2011.09.009
- ②. Gu M, Miyoshi K, Dubner R, Guo W, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F., (2011) Spinal 5-HT(3) receptor activation induces behavioral hypersensitivity via a neuronal-glia-neuronal signaling cascade. J. Neurosci., 31, 12823-12836. 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1564-11.2011
- ③. Narita M, Niikura K, Nanjo-Niikura K, Narita M, Furuya M, Yamashita A, Saeki M, Matsushima Y, Imai S, Shimizu T, Asato M, Kuzumaki N, Okutsu D, Miyoshi K, Suzuki M, Tsukiyama Y, Konno M, Yomiya K, Matoba M, Suzuki T. (2011) Sleep disturbances in a neuropathic pain-like condition in the mouse are associated with altered GABAergic transmission in the cingulate cortex. Pain, 152, 1358-1372. 査読有
DOI: 10.1016/j.pain.2011.02.016

[学会発表] (計 1 件)

- ①. Miyoshi K, Noguchi K. Critical role for spinal IL-18/caspase-1 interaction in neuropathic pain development through its distinct regulation of interleukins. World Congress on PAIN. Montreal, Canada, 2010 年 8 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 歓 (MIYOSHI KAN)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30454755

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：