

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460721

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛を制御するケモカインシグナルの解明

研究課題名(英文) Assessment of spinal cord chemokine signaling in the mechanism of neuropathic pain.

研究代表者

齊藤 秀俊 (Saitoh, Hidetoshi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90444794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：痛みは生体の危険視号として重要な感覚であるが、行き過ぎた痛みは生活の質を著しく低下させる抑えなければならない感覚である。特に神経障害性疼痛はモルヒネによっても痛みの苦痛から逃れられない患者もおり、メカニズムの解明や治療薬の開発は急務の課題である。本課題では神経障害性疼痛を引き起こすケモカイン分子としてCCL3、CCR1、CCR5の関与を見出し、これら分子の相互作用を阻害する薬物が疼痛病態を改善することを報告した。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain is a debilitating pain state, which is often caused by injury to the nervous system. Hallmark symptoms of neuropathic pain include tactile allodynia and thermal hyperalgesia, which are refractory to currently available treatments such as non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids. The mechanism underlying development of neuropathic pain remains largely unknown. Therefore, unraveling the molecular and cellular basis of the development and maintenance of neuropathic pain is essential for the discovery of new treatments. In this study, we reported that upregulation of CCL3 and CCR5 was induced in the spinal cord after nerve injury, and that the CCR5 antagonist can alleviate neuropathic pain. Furthermore, in primary cultured microglia, we found that P2Y12 receptor activation induced CCL3 expression via NFAT signaling. These results suggest that CCL3-CCR5 axis is crucial in the mechanism of neuropathic pain, and CCR5 might be a therapeutic target for neuropathic pain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 ミクログリア ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

痛みは危険から回避するための大切な感覚情報であるが、行き過ぎた痛みは抑えなければならない。現在、世界にはモルヒネも効かない痛み「神経障害性疼痛」に罹患する患者が千数百万人も存在し、救われ難い痛みを苦しんでいる。その原因は、ガンの浸潤、糖尿病性神経炎、外科手術の不手際、ヘルペスなど様々であるが、詳細な発症メカニズムは不明である。従って有効な治療法は確立されていない。しかも加齢と共に罹患率は上昇し、我が国が迎える超高齢化社会の大きな負担となることは必定である。

神経障害性疼痛は、物理的な傷害や腫瘍を原因とする神経の障害等によって引き起こされる難治性の疼痛であるが、これまで申請者の属する研究室では、神経障害性疼痛モデル動物を用い、この疾病の発症に対するミクログリアの関与を世界に先駆けて証明してきた。さらに、申請者らは、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現変化解析により、脊髄ミクログリアの P2Y₁₂ 受容体が神経障害性疼痛発症メカニズムに関与し、この阻害薬によってモデル動物の痛みが軽減されることを明らかにしてきた。ミクログリアは通常は突起を多数伸ばして周囲の細胞に接触しては、脳内に異常がないかを監視する細胞であり、ひとたび神経細胞に異常が起こると、その部位へ移動し、細胞の形を変え、増殖し、様々な成長因子、サイトカイン、ケモカインを放出する。さらには、死んでしまった細胞を貪食して、脳内を清掃する役目もある。しかしながら、免疫細胞としてのミクログリアの働きは諸刃の剣であり、腫瘍細胞や細菌を殺すために放出された物質は時として、正常な神経細胞を傷つけ、さまざまな成長因子でさえ、神経細胞を変調させ神経回路に悪影響を及ぼすこともある。ケモカインは白血球の遊走をもちたサイトカインとして認識されてきたが、今日までの研究から中枢神経系のグリア細胞、神経細胞もその受容体を発現し様々な機能調節を受けることが明らかになりつつある。申請者はこれまでの研究からミクログリアの活性化に伴って様々なケモカインが産生放出されることを明らかにしてきている。また、傷害された末梢神経で CCL21 と呼ばれるケモカインが産生され、細胞の投射先である脊髄内で放出された CCL21 が脊髄ミクログリアの活性化を調節し、疼痛発症に関与することを突き止めてきた。

2. 研究の目的

申請者らは予備実験の中で CCL3 と呼ばれるケモカインの一種が神経障害性疼痛様症状を示すことを見出している。このことから、中和抗体やケモカイン受容体阻害薬を試験し、疼痛を制御するケモカインシグナルを解明することで有用な神経障害性疼痛治療薬のターゲットを見出せると考えられたこと

から、本研究の到達目標を下記の3点に設定した。

1) ケモカインは様々な細胞種から産生・放出され、多種のケモカインによるシグナルが入り乱れている。産生細胞種、受容体発現細胞種の特定は中枢におけるケモカインの役割を知る上において基本的な情報となるが、未だそれらの情報は不足している。本研究ではラット、マウス末梢神経傷害モデルを用いて活性化されるケモカインシグナルに関連した分子群の組織内局在を *in situ* hybridization 法や免疫組織学的手法により特定する。

2) 予備実験より CCL3 をラットの髄腔内に投与することで神経障害性疼痛モデルと同様の疼痛行動が惹起されることを見出し、CCL3 を介したシグナルを第一検討項目として、その受容体である CCR1、CCR5 の阻害薬をモデル動物に投与して症状の遷移を観察しどちらの受容体がどのように疼痛発症に関与するのかを明らかにする。また、CCR5 の阻害薬としてはすでに医薬品として承認されている薬物のなかに maraviroc という有用な抗 HIV 薬が存在する。既存薬のリポジショニングを念頭に maraviroc の髄腔内投与も合わせて行う。

3) CCR1、CCR5 に作用するケモカインは複数存在するため、神経傷害時に内因性に作用しているケモカインを突き止めるために各種中和抗体を髄腔内投与して疼痛症状を緩和する中和抗体を探索する。これらケモカインシグナルと神経障害性疼痛との関連を解明し、具体的な中和抗体、受容体阻害薬を試験することによって、より実践的に、神経障害性疼痛発症のキーポイントを見出し、効果的な治療戦略を探索することが可能になる。

3. 研究の方法

CCL3 誘発性疼痛モデルラットの行動解析

疼痛モデルとして、既に申請者の属する研究室で確立されている、ラットの後肢を主に支配する L4-6 脊髄神経の内 L5 脊髄神経のみを切断する神経障害性疼痛モデル動物を用いる。また、予備実験より CCL3 をラットの髄腔内に投与することで神経障害性疼痛モデルと同様の疼痛行動が惹起されることを見出し、CCL3 誘起性疼痛モデル動物として用いた。

CCL3 を介したシグナルを第一検討項目として、CCL3 誘起性疼痛の時間的経過を投与後 6 時間までと、その後 14 日間の経過を観察する。その後いくつかの時間において CCL3 の受容体である CCR1、CCR5 の阻害薬をモデル動物の髄腔内に投与して症状の遷移を観察し、どちらの受容体がどのように疼痛発症に関与するのかを明らかにする。また、CCR5 の阻害薬としてはすでに医薬品として承認さ

れている maraviroc の髄腔内投与も合わせて行う。得られた結果を考慮し、L5 脊髄神経切断による神経障害性疼痛モデル動物への受容体阻害薬の投与を行い、疼痛発症への影響を解析した。

ケモカイン産生細胞種、ケモカイン受容体発現細胞種の同定

L5 脊髄神経切断による神経障害性疼痛モデル動物で疼痛閾値の低下が確認された動物の脊髄組織をサンプルとして、脊髄神経傷害側と非傷害側に分けて totalRNA を抽出、精製する。状況に応じて各細胞種特異的な表面マーカーとこれに対する蛍光標識抗体、セルソーターを用い細胞種ごとに分離して RNA を抽出する。得られた RNA サンプルを用い、リアルタイム PCR 法によってケモカインリガンド、ケモカイン受容体の mRNA 発現量を神経傷害後経時的に測定した。

神経障害性疼痛に關与する内因性ケモカインリガンドの特定

L5 脊髄神経切断による神経障害性疼痛モデル動物でどの内因性ケモカインが疼痛発症に深く關与するかを特定するため各種中和抗体を髄腔内投与して疼痛症状を緩和する中和抗体を探索した。特に CCR1、CCR5 に作用するケモカインはである CCL3、4、5、7 については優先的に解析を行った。

ミクログリアからのケモカインリガンド放出メカニズムの解析

これまでにミクログリアに発現する ATP 受容体である P2X7 受容体の活性化に伴い CCL3、CXCL2 が産生・放出されることを見出してきた。一方で疼痛発症には ADP 受容体である P2Y12 受容体が重要な役割を担っていることも明らかにしている。細胞外ヌクレオチドへの親和性という観点から P2Y12 受容体がまず初めに活性化する受容体と予想しており、P2Y12 受容体の活性化自身がケモカインの産生放出に關与する可能性を確認するために初代培養ミクログリアを用いて P2Y12 受容体活性化後のケモカイン産生量を mRNA とタンパク量の観点から検討した。mRNA についてはリアルタイム PCR 法を用い、タンパク量に関しては ELISA 法を用いて定量する。また P2Y12 受容体シグナルと P2X7 受容体シグナルのクロストークの有無を考慮し、P2X7 受容体阻害薬も併用した実験系を用いた。

4. 研究成果

本課題では平成 25、26 年度の間に神経障害性疼痛を引き起こすケモカイン分子として CCL3 を見出し、国際誌に発表した。実験動物において、外因的に与えた CCL3 によって引き起こされる疼痛は、CCL3 の受容体として同定されている CCR1、CCR5 のそれぞれが關与する、2 つの病態遷移相を持つことを見出し、特に CCR5 阻害薬の処置によって比較

的長期にわたる疼痛の軽減が達成されることを実験的に証明してきた。末梢神経傷害後の脊髄からセルソーターを用いてミクログリアを単離する手法を確立し、ミクログリアにおいて CCL3 の遺伝子転写レベルの亢進を検出することに成功した。

CCL3 発現増加の細胞内シグナルの解明のために、ミクログリアの初代培養細胞を調整し、神経障害性疼痛に關与することがわかっている P2Y12 受容体アゴニストを処置する実験系を構築し、ミクログリアの P2Y12 受容体刺激が一過性の細胞内カルシウム応答を引き起こし、NFAT とよばれる転写因子の活性化を介して CCL3 の発現を誘導していることを見出した。これにより、ミクログリアの P2Y12 受容体活性化によるケモカイン発現から疼痛発症へとつながる病態メカニズムを新たに提唱するに至った。

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 2 件)

Ochi-ishi R, Nagata K, Inoue T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. Mol Pain. Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia. 2014;10:53.
doi: 10.1186/1744-8069-10-53.

Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Kojima C, Masuda T, Tsuda M, Inoue K, Hoka S. Chemokine (C-C motif) receptor 5 is an important pathological regulator in the development and maintenance of neuropathic pain. Anesthesiology. 2014;120(6):1491-503.
doi: 10.1097/ALN.000000000000190.

[学会発表](計 3 件)

松下克之, 齊藤秀俊, 小嶋ちなみ, 津田誠, 井上和秀, C-C chemokine receptor type 5 is an important pathological regulator in the development and maintenance of neuropathic pain, 第 87 回日本薬理学会年会

松田烈士, 増田隆博, 西本奈央, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀, 高坂新一, 田村智彦, Transcriptional regulation of microglial motility by IRF8, 第 87 回日本薬理学会年会

山下智大, 張佳明, 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀, ミクログリアに発現する P2X4 受容体を標的とした神経障害性疼痛治療薬の探索, 日本薬学会第 135 年会

Masuda Takahiro, Shosuke Iwamoto, Ryohei Yoshinaga, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Akira Nishiyama, Tak W. Mak, Tomohiko Tamura, TSUDA MAKOTO, Kazuhide Inoue, IRF5 is a crucial determinant for the formation of P2X4R+ reactive microglia driving neuropathic pain, Neuroscience2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

www.yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤秀俊(Saitoh, Hidetoshi)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90444794