

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460724

研究課題名(和文)古典的グリア細胞機能に着目した慢性疼痛発現メカニズムの解明とその治療法への応用

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms and curatives for chronic pain based on the classical glial cells' functions.

研究代表者

大澤 匡弘 (Ohsawa, Masahiro)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80369173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経障害による痛みの動物モデル(神経障害性疼痛モデル)を用いて、脊髄グリア細胞の機能変化について、ニューロンへのエネルギー供給の視点から、アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル(ANLS)に異常が生じていると想定し解析を行った。その結果、乳酸により痛みに対する感受性が亢進し、神経障害性疼痛モデルの痛覚過敏も、アストロサイトの活性化による乳酸の過剰放出が原因であることが明らかになった。また、神経障害性疼痛によるアストロサイトの活性化は、神経伝達の亢進を起こすプロテインキナーゼCの機能を亢進し、その機序に液性因子以外の反応が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated to reveal the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) in the neuropathic pain. Intrathecal (i.t.) treatment with L-lactate induced mechanical hyperalgesia. Moreover, inhibition of L-lactate release from astrocytes attenuated the mechanical hyperalgesia in neuropathic pain model of mice. Therefore, our study suggested that astrocytes are critical nervous cells in the development and/or maintenance of neuropathic pain through the L-lactate and physical contact with neurons. Neuropathic pain model showed increased phosphorylation of protein kinase C (PKC) that sensitize the nociceptive transmission in the spinal cord. This phosphorylation PKC might be mediated by the different mechanisms from the release of gliotransmitter.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アストロサイト 乳酸 Rhoキナーゼ プロテインキナーゼC DREADD 神経障害性疼痛

### 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は様々な疾患に見られる症状であるが、その治療は困難であり患者のみならず、医療者にとっても大変悩ましい問題である。慢性疼痛は神経障害などにより痛覚情報が持続的に入力し、脊髄における痛覚伝達の亢進が起こるために生じる。応募者は、脊髄におけるセリン・スレオニンリン酸化酵素であるプロテインキナーゼC (PKC) や Rho キナーゼ(ROCK)の活性化が、神経障害性疼痛発症に關与する可能性を報告してきた(Ohsawa et al., Eur J Pharmacol, 2001, Pain 2008, 2011)。さらに、神経系細胞(アストロサイトやミクログリア)の持続的活性化が痛覚過敏を引き起こすとわかっており、これらの神経系細胞機能を正常化する薬物を脊髄クモ膜下腔内へ処置すると痛覚過敏が改善することを確認している。

脊髄におけるグリア細胞の機能変化は、神経障害性疼痛の原因であることにほぼ間違いない。これまでの国内外の研究結果から、神経障害性疼痛の形成にはミクログリアの活性化が、神経障害性疼痛の維持にはアストロサイトの活性化が關与すると明らかにされている。これらグリア細胞の活性化により炎症性サイトカイン類などの液性因子の放出が増大し、神経細胞の興奮性やシナプス伝達が可塑的に亢進するため、慢性疼痛が生じると考えられている。

アストロサイトは、シナプス伝達の調節をしているだけではなく、神経細胞へのエネルギー供給も行なっている。中枢神経系では主要エネルギーとしてグルコースが利用されており、脳実質血管から供給される。通常、神経細胞は刺激がない状態ではグルコースを取り込み、ATPをつくるが、神経伝達時など大量のエネルギーが必要なときは、アストロサイトから供給される乳酸を利用して、増加した必要エネルギー需要に対応している。我々は、糖尿病マウスに見られる認知機能障害がアストロサイトの機能低下に起因していることを見出し、乳酸を補給すると認知機能の低下を改善できることを報告した。つまり、アストロサイトはエネルギー供給を利用して、神経伝達を調節していると考えられる。

神経障害性疼痛の発現に關与するアストロサイトの機能変化は、グルタミン酸の取り込み低下や炎症性サイトカインの遊離促進であると考えられている。他方、アストロサイトは神経細胞にエネルギーを与えることや神経細胞との細胞接着を介して神経系機能を調節することが古くから知られている。しかし、アストロサイトの機能はわかっているが、慢性疼痛時にどのようにその機能が変化し、痛覚過敏発現にどう影響するかについては検討がなされていない。神経障害性疼痛の病態形成や進行における新規メカニズムを明らかにするためには、神経障害時においてアストロサイトが神経細胞に対して行う役割の変化を詳細に検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、神経障害性疼痛発症における脊髄でのアストロサイトと神経細胞の機能的連関の關与を、アストロサイトから神経細胞へのエネルギー供給の変化ならびに神経細胞との物理的接触から解析し、神経障害に起因する慢性疼痛治療への新規創薬ターゲットを見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

実験には5週齢の ddY 系雄性マウスおよび C57BL/6J マウスを使用した。飼育環境は  $23 \pm 2$ 、 $50 \pm 10\%$  に維持しており、12 時間の明暗サイクル(点灯 6:00、消灯 18:00)に設定した。

#### (2) 神経障害性モデルの作成

ペントバルビタール(60 mg/kg, i.p.)により麻酔したマウスの坐骨神経を露出し、坐骨神経の半分から 1/3 を部分的に結紮して作製した。

#### (3) 脊髄後角内微量注入

C57BL/6J マウスをペントバルビタール(60 mg/kg, i.p.)麻酔下にて脊柱定位固定し、脊椎の T13 と L1 の間隙から硬膜を破り、穴を開けた。インジェクション用ガラスピペットを挿入し、アデノ随伴ウイルス

(AAV5-GFAP-hM3Dq-mCherry) を微量注入(500 nl)した。AAV 処置 3 週間後に実験を行った。

#### (4) 行動解析

圧刺激に対する反応閾値は von Frey filament を用いて測定した。マウスの足蹠へ太さの異なるフィラメントを押し当て、逃避行動が認められる重さ(g)から評価を行った。

#### (5) 生化学的解析

神経結紮 14 日後に、マウスの脊髄腰髄膨大部を摘出し、Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) 緩衝液にて組織抽出液を作成し試料とした。コフィリンおよびリン酸化コフィリンに対する抗体を用いたウェスタンブロット法により、それぞれのタンパク質発現を評価した。

#### (6) 免疫組織学的解析

神経結紮 14 日後に、マウスを経心的に灌流固定し、帯状回皮質を含む脳部位の薄切片(8  $\mu$ m)を作成した。この切片を各種神経系細胞マーカータンパク質に対する特異抗体と反応させた。蛍光標識した二次抗体と反応させ、各細胞の形態ならびに発現を蛍光顕微鏡により測定した。

(7) Designers Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD) 法  
脊髄後角へ AAV を微量注入後、3 週間経過し

たマウスへ、Clozapine-N-oxide (CNO) を腹腔内投与 (1 mg/kg) し、誘発される行動変化と圧刺激に対する閾値を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 圧刺激に対する痛覚閾値に対する L-乳酸の影響

L-乳酸を脊髄クモ膜下腔内へ投与すると、圧痛覚過敏が認められた。この痛覚過敏は、L-乳酸投与 1 時間をピークとし、2 時間後には消失した (Fig.1)。この L-乳酸による痛覚過敏は、モノカルボン酸トランスポーターの阻害薬である 4-CIN により抑制された。このことから、L-乳酸による痛覚過敏は、ニューロンへ L-乳酸が取り込まれ生じることが示唆された。

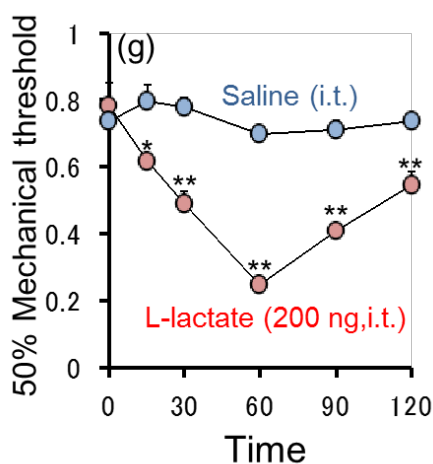


Fig.1. Effect of intrathecally (i.t.) administered L-lactate (200 ng) on the mechanical threshold in mice (n=10). The mechanical thresholds were measured at 15, 30, 60, 90 and 120 min after i.t. treatment. Each point represents the mean with S.E.M of 10 mice. \*P<0.05 and \*\*p<0.01..

(2) 神経障害性疼痛における L-乳酸の役割  
過去の報告から、脊髄後角のアストロサイトやミクログリアの活性化が、神経障害性疼痛の発現の原因であることが指摘されている。そこで、神経障害性疼痛時には、脊髄のアストロサイトが活性化し、L-乳酸の放出が増大していると想定し検討を行った。4-CIN の単回処置により、神経障害性疼痛モデルマウスの圧刺激に対する痛覚過敏が改善した。また、アストロサイト機能を抑制する fluorocitrate の単回投与によっても、圧刺激に対する痛覚過敏が改善した。

##### (3) L-乳酸の脊髄クモ膜下腔内投与によるニューロンの活性化の検討

ニューロンの活性化は cFos タンパク質の発現を指標として検討した。L-乳酸 (200 ng, i.t.) により、脊髄後角における cFos の発現が上昇した。この L-乳酸による cFos 発現の上昇は、4-CIN の処置により消失した。このことから、L-乳酸は MCT を介して細胞内へ取り込まれ、

ニューロンの活性化を起こしていることが明らかになった。

##### (4) 脊髄後角におけるコフィリンタンパク質のリン酸化に対する L-乳酸の影響

L-乳酸の脊髄クモ膜下腔内投与により、コフィリンタンパク質の発現に変化は見られなかったが、リン酸化コフィリンタンパク質の発現は有意に上昇した。

##### (5) DREADD 法による脊髄後角アストロサイトの痛覚伝達への影響

アストロサイトのマーカー遺伝子である、GFAP の下流に eGFP を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を腰椎 L4 脊髄後角へ微量注入し、3 週間経過した後の脊髄では GFAP 陽性細胞のみに遺伝子発現していた (Fig. 2)。次に、GFAP プロモーターの下流に hM3Dq を発現する AAV を脊髄後角へ微量注入し、三週間後に CNO を投与すると、痛覚閾値の一過性の低下が認められた (Fig. 3)。AAV を感染したマウスの CNO による痛覚閾値の低下は、MCT 阻害薬である 4-CIN により消失した (Fig. 3)。

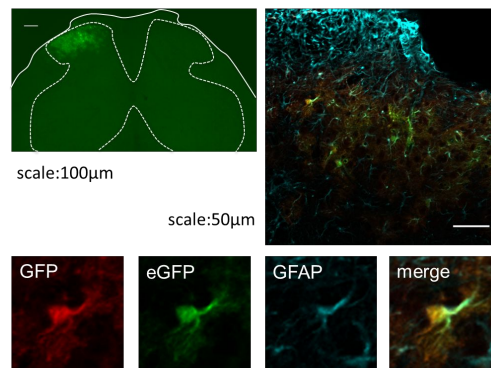


Fig.3. Astrocyte specific gene expression by microinjection of AAV5-GFAP-eGFP into the dorsal horn of spinal cord. GFP expression was obvious in the dorsal horn of spinal cord of mice 21 days after intra-spinal dorsal horn of AAV5-GFAP-eGFP. Higher magnification pictures indicate the colocalization of GFAP (light blue), eGFP (green), and GFP antibody (red) the spinal cord.

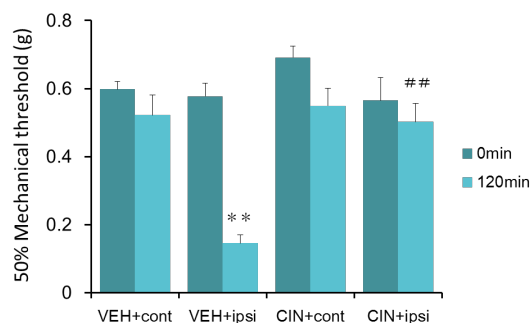


Fig. 4. Effect of MCT inhibitor on the CNO-induced mechanical hyperalgesia in mice injected intra-spinal dorsal horn

AAV5-GFAP-hM3Dq. The experiments were started 21 days after AAV5 microinjection. The mechanical threshold was measured before and 120 min after i.p. administration of CNO. Each column represents the mean with S.E.M > of 7 mice. \*\*<P0.05 vs. before CNO treatment. ##P<0.01 vs. vehicle-pretreated mice.

#### (6) 神経障害性疼痛時の脊髄で見られる PKC $\gamma$ リン酸化亢進に対するアストロサイトの役割

神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角では、PKC $\gamma$ のリン酸化が亢進していた。PKC $\gamma$ は、リン酸化により活性が亢進することから、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄で、PKC $\gamma$ が活性化していることを初めて見出した。次に、PKC $\gamma$ のリン酸化上昇に対するアストロサイトの役割を明らかにするため、 $\alpha$ -aminoadipate を神経障害の処置前から一日一回反復投与すると、リン酸化 PKC $\gamma$ の発現上昇が抑制された。また、アストロサイトの活性化を起こす Rho キナーゼの阻害によっても、同様に PKC $\gamma$ のリン酸化の上昇が抑制された。

#### (7) 考察

本研究の結果から、神経障害性疼痛時にはアストロサイト ニューロン乳酸シャトル (ANLS) が異常になっており、過剰な L-乳酸の供給が起こるため、脊髄での痛み伝達が亢進し、神経障害性疼痛が認められる可能性が示された。また、脊髄後角アストロサイトの選択的な活性化により痛覚閾値が低下し、その原因物質も L-乳酸であることが明らかになった。

神経障害性疼痛時には、脊髄後角でのアストロサイトやミクログリアが活性化していることから、これら細胞の機能変化が神経障害性疼痛の原因であると多くの報告が指摘している。ミクログリアについては、数多くの検討結果からサイトカイン類やケモカイン類が痛覚過敏に関与していることは明白であるが、アストロサイトについては、その役割について明らかにされていなかった。本研究の結果から、アストロサイトから放出される L-乳酸がニューロンを活性化しやすい状態にし、神経伝達を亢進する可能性が明らかになった。

L-乳酸はアストロサイトにおいて産生される。アストロサイトは、中枢神経系では唯一のグリコーゲンを貯蔵できる細胞である。本研究の結果から、アストロサイトの機能を抑制すると、神経障害性疼痛が改善することが明らかになった。また、L-乳酸のニューロンへの取り込みを行っている MCT の阻害によっても、神経障害性疼痛が改善した。これらのことから、神経障害により機能変化したアストロサイトは、L-乳酸を過剰に放出するため、ニューロンの興奮性が亢進し、痛覚過敏が生じたと考えられた。

神経障害性疼痛モデルでは、脊髄後角においてミクログリアやアストロサイト、ニューロンなど、ほぼすべての細胞が機能変化している。このため、どの細胞が痛み伝達の亢進に中心的役割を果たしているかを明らかにすることは困難であった。最近開発された DREADD 技術は、生体に存在しない物質 (CNO) にのみ活性化される受容体を、特定の細胞のみに発現させ、細胞特異的な機能調節を可能にした。この手法を脊髄後角のアストロサイトに応用するため、脊髄後角への微量注入法を開発し、脊髄後角のアストロサイトのみを活性化させ、圧刺激に対する痛み閾値を検討した。脊髄後角のアストロサイトに hM3Dq を発現したマウスでは CNO 投与により痛覚閾値の低下が認められたが、溶媒を投与した動物では痛覚閾値に影響がみられなかった。これは、脊髄後角のアストロサイトの選択的活性化により痛み伝達が亢進することを示している。つまり、神経障害性疼痛の際に見られるアストロサイトの活性化が、痛覚過敏の発現に中心的役割を果たしている可能性を示している。

また、アストロサイトの選択的活性化による圧刺激に対する痛覚閾値の低下は、MCT 阻害薬により抑制されたことから、アストロサイトの活性化による痛覚過敏は、これまでに報告されているグルタミン酸の再取り込み阻害などに加え、L-乳酸の過剰放出も原因の一つであることが初めて明らかになった。

ニューロン機能はアストロサイトにより調節を受けるが、いくつかの様式が想定される。まず、L-乳酸などの液性因子による調節であるが、それ以外に物理的接触の関与も示唆されている。本研究において、ニューロンに発現する PKC $\gamma$ のリン酸化が神経障害性疼痛モデルの脊髄後角で上昇し、アストロサイトの機能を抑制すると抑制された。また、アストロサイトの活性化を起こす細胞内情報伝達系である Rho キナーゼの抑制によってもリン酸化 PKC $\gamma$ の上昇が抑制されたことから、アストロサイトの活性化が、何らかの機構によってニューロンへ影響を与えていることが明らかになった。我々の今回の検討結果から、L-乳酸が PKC $\gamma$ のリン酸化を引き起こさないことから、アストロサイトから放出されるニューロンへのエネルギー物質の供給とは異なる機序で、脊髄の痛覚伝達を調節していることが考えられ、アストロサイトの物理的接触によるインテグリン類の活性化が関与している可能性が考えられた。今後は、インテグリン系を介したアストロサイトからニューロンへの物理的接触による機能調節のメカニズムを解明する必要があるといえる。

本研究の結果から、アストロサイトの痛覚伝達への作用様式の新規機序を明らかにすることができた。ANSL は様々な生命現象において、重要な役割を果たしていることが知られており、多くの神経疾患の原因となると考えられる。神経障害による痛みも ANSL の

異常に起因する可能性を見出すことができたので、今後は、その正常化による神経障害性疼痛の治療への応用が期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 20 件)

北尾優花、糸和彦、大澤匡弘：社会的敗北ストレスによる痛覚閾値の低下に対する duloxetine の効果と ACC 領域の NA 神経の関与 第 89 回日本薬理学会年会,2016,横浜

Ishikura K, Ohsawa M, Kume K: The mechanism of spinal phosphorylation of protein kinase C in the neuropathic pain. 第 89 回日本薬理学会年会,2016,横浜

Maruoka J, Kato S, Ishikura K, Kume K, Ohsawa M: Involvement of L-lactate reduction in the cognitive impairment of diabetic mice. 第 89 回日本薬理学会年会,2016,横浜 (学生優秀発表賞受賞)

Miyamoto K, Ishikura K, Kume K, Ohsawa M: The analysis of hyperalgesia by L-lactate from spinal astrocytes. 第 89 回日本薬理学会年会,2016,横浜

Ohsawa M, Miyamoto K, Ishikura K, Iio A, Kume K: L-Lactate induces sensitization of spinal nociceptive transmission in the mouse. 4<sup>th</sup> Congress of Asian College of Neuropharmacology, 2015, 台湾

北尾優花、糸和彦、大澤匡弘：社会的敗北ストレスによる痛覚閾値の低下に対する duloxetine の効果 . 第 128 回日本薬理学会近畿部会,2015,大阪 (優秀発表賞受賞)  
石倉啓一郎、糸和彦、大澤匡弘：神経障害性疼痛におけるリン酸化 PKC の関与 . 第 128 回日本薬理学会近畿部会,2015,大阪

飯尾彩加、糸和彦、大澤匡弘：神経障害性疼痛に対するメサドンの効果 . 第 128 回日本薬理学会近畿部会,2015,大阪

宮本啓補、石倉啓一郎、飯尾彩加、糸和彦、大澤匡弘：脊髄ニューロン グリア 乳酸シャトルの痛覚制御における役割 . 第 128 回日本薬理学会近畿部会,2015,大阪

大澤匡弘、糸和彦：悪液質とサルコペニアの進展予防と QOL の改善 . 第 9 回日本緩和医療薬学会年会,2015,横浜

大澤匡弘、宮本啓補、石倉啓一郎、糸和彦：慢性疼痛発現における脳内痛覚伝達系の亢進の関与 . 第 9 回日本緩和医療薬学会年会,2015,横浜

丸岡純也、加藤慎也、糸和彦、大澤匡弘：糖尿病マウスの認知機能障害における L-乳酸の関与 . 第 45 回日本神経精神薬理学

会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会,2015,舟堀

北尾優花、糸和彦、大澤匡弘：社会的敗北ストレスモデルマウスにおける痛み閾値の低下 . 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015,2015,東京 (優秀ポスター賞受賞)

宮本啓補、石倉啓一郎、飯尾彩加、糸和彦、大澤匡弘：乳酸による痛覚過敏に関与する細胞内情報伝達系の解析 . 生体機能と創薬シンポジウム 2015,2015,船橋

Miyamoto K, Ishikura K, Kume K, Ohsawa M: The involvement of spinal L-lactate on the neuropathic pain in mice. 第 38 回日本神経科学大会, 2015, 神戸

Ohsawa M, Murakami T, Maruoka J, Makino T, Mori N, Higashiguchi T, Kume K: Effect of Chrysanthemum Flower Kikuka on the animal model of cancer cachexia. The 16th Congress of Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia (PENSA), 2015, Nagoya.

Ohsawa M, Maruoka J, Kume K: Cancer cachexia and insulin resistance; Evidence from basic research. The 16th Congress of Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia (PENSA), 2015, Nagoya.

宮本啓補、糸和彦、大澤匡弘：Involvement of spinal glial neuron shuttle in neuropathic pain onset. 第 88 回日本薬理学会年会,2015,名古屋

宮本啓補、糸和彦、大澤匡弘：神経障害性疼痛発症における脊髄グリア・ニューロンシャトルの関与 . 第 24 回神経行動薬理若手研究者の集い,2015,名古屋

大澤匡弘：神経障害性疼痛時の脊髄における乳酸の役割の検討 . 第 126 回日本薬理学会近畿部会,2014,和歌山

[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

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/neuro/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大澤匡弘 (Masahiro Ohsawa)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：80369173

(2)研究分担者

山本昇平 (Shohei Yamamoto)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：9043326