

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15205

研究課題名(和文) 脊髄損傷後疼痛の新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) New mechanisms of neuropathic pain after spinal cord injury

研究代表者

野口 光一 (Noguchi, Koichi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10212127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット胸髄レベルの脊髄損傷後に生じる下肢足底の機械的刺激に対する過敏現象において、Caチャンネルサブユニットである $\alpha_2\delta_1$ の役割を検討して、以下の結果を得ることができた。1. ラット T10レベルへの脊髄損傷モデルを確立した。足底の機械的刺激に対する過敏反応は、胸髄損傷後14日目から少なくとも28日目までは継続していた。2. 28日目の腰髄部では明らかに $\alpha_2\delta_1$ 免疫反応の有意な増加が観察された。3. DRGでは $\alpha_2\delta_1$ mRNAの変化はなく、腰髄の後角を中心に発現増加が観察された。4. 脊髄損傷モデルにプレガバリンを経口投与すると、疼痛閾値の正常化及び腰髄部における $\alpha_2\delta_1$ 蛋白の低下が観察された。

研究成果の概要(英文)：We found the following findings using a rat model of thoracic spinal cord injury to examine the role of Ca channel subunit $\alpha_2\delta_1$ on the mechanical allodynia in the plantar surface. 1. Rat model of spinal cord injury at Th10 level showed the significant decrease in the threshold of mechanical stimuli to the plantar surface, which continued from 14-28d after spinal cord injury. 2. At 28d after SCI, the $\alpha_2\delta_1$ immunoreactivity in the lumbar spinal cord increased significantly. 3. $\alpha_2\delta_1$ mRNA in lumbar DRG showed no change after SCI, however in situ hybridization histochemistry revealed the increase in $\alpha_2\delta_1$ mRNA in superficial laminae of lumbar dorsal horn. 4. Oral administration of pregabalin ($\alpha_2\delta_1$ ligand) significantly reversed the decrease in the threshold of mechanical stimuli and also the upregulation of $\alpha_2\delta_1$ protein in lumbar dorsal horn. The significance of the changes in $\alpha_2\delta_1$ in lumbar dorsal horn after thoracic SCI has been discussed.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経傷害性疼痛 脊髄損傷 Ca チャンネル アロディニア

1. 研究開始当初の背景

整形外科臨床において、神経障害性疼痛に対する薬剤が導入された結果、その病態の解明に対する期待も高まっている。末梢神経の絞扼性神経障害、外傷や手術に伴う末梢神経障害、引き抜き損傷、他種々のニューロパチーなどの神経障害性疼痛において、多くのメカニズムが報告されている。私の教室においては整形外科臨床における問題認識からスタートした疼痛基礎研究を推進してきており、20年以上にわたる疼痛研究の結果150報以上の英文雑誌に論文を発表してきた。

本研究は2つの大きな背景の中から生まれており、一つは、長年にわたり研究代表者を含めた世界の多くの研究者から提唱されている脊髄における神経可塑的な変化が難治性疼痛の大きな原因となっており、その制御が難治性疼痛の新規治療薬や治療戦略の大きなシーズになるという仮説である。研究代表者は多くの神経可塑的な変化と難治性疼痛の関係について報告してきた。もう一つの大きな背景は、日本を含めた世界各国で最も良く使われている神経障害性疼痛に対する薬物がCaチャンネルの $\alpha_2\delta$ サブユニットのリガンドである。この作用機作は脊髄後角でのCaチャンネルの機能を抑制し神経伝達物質の遊離を抑制することで神経障害性疼痛を抑制すると言われている。しかしながら、 $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドの作用メカニズムは未だに極めて盛んに研究されている分野であり、この数年で作用メカニズムに関する多くの論文が一流の欧米の神経科学雑誌に発表されている状況である。脊髄損傷後の疼痛抑制メカニズムに関しては全く報告が無く、メカニズムの解明が待たれている状況である。

2. 研究の目的

2年間で脊髄損傷後疼痛モデルにおいて、脊髄後角での $\alpha_2\delta$ サブユニットの動態とその意義に関して、以下のポイントを解明する。

- (1)ラット脊髄損傷モデルにおける $\alpha_2\delta$ サブユニットの動態を確認
- (2)脊髄で増加する $\alpha_2\delta$ サブユニットの細胞の種類と時間経過を解明
- (3) $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドを投与し、 $\alpha_2\delta$ 脊髄での $\alpha_2\delta$ の発現変化と疼痛行動の変化を詳細に解析し、Caチャンネル $\alpha_2\delta$ サブユニットと脊髄損傷後疼痛との関係を議論する。

本研究の意義として、脊髄損傷性疼痛は極めて難治性の病態であり、その疼痛メカニズムはいまだ解明されていない。一方、 $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドは国際共同二重盲検比較試験において、中枢性神経障害性疼痛に対する効果

が証明されたが、その作用メカニズムは全く解明されていない状態である。本研究によって脊髄損傷性疼痛などの難治性疼痛の新規メカニズムと、治療薬としての $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドの新規作用メカニズムを解明する大きな意義が存在する。

$\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドの Pregabalin が末梢神経障害性疼痛の治療薬として日本を含む全世界で極めて良く使用されているのは、周知の事実である。2013年には国際共同二重盲検比較試験等の結果、脊髄障害後の中枢神経障害性疼痛への効果を示唆されている。しかしながら、興味深いことは、 $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドの作用メカニズムが疼痛研究者の研究テーマに未だになっていないことであり、この数年間でも Proc.Natl.Acad.Sci.USA.や J.Neurosci という超一流雑誌にその基礎的メカニズムに関する論文が多数発表されている。

末梢神経の障害後の $\alpha_2\delta$ サブユニットの発現が増加することは、Luoらが2001年に発表して以来良く検証されており、脊髄後角でのCaチャンネルの機能抑制による興奮性神経伝達物質の遊離抑制が、 $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドの神経障害性疼痛抑制のメカニズムとして提唱されている。

ところが、脊髄損傷後の $\alpha_2\delta$ サブユニットの動態に関しては、2011年にBoroujerdeらにより報告されたウェスタンブロットの報告があるのみである。これはどの細胞で $\alpha_2\delta$ サブユニットが増加していたかの情報は全く無い。また $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドが脳など上位中枢に対して強い効果を持つことより、脊髄障害性疼痛に対する効果の神経科学的根拠は未だ全く不明の状態である。

3. 研究の方法

実験は代表者の野口光一の指導のもと、教室のスタッフ及び大学院生が実験を行い、週1回のミーティングにて進捗状況を検討しながら研究計画の順調な遂行を図る。データ解析はスタッフと大学院生が、論文作成の指導は野口が行う。

ラット脊髄損傷モデルにおける $\alpha_2\delta$ サブユニット動態解析

- (1)IH Spinal Cord Impactor を用いて、ラット脊髄 T10 レベルに 100kdyne の contusion injury を作成する。排尿のコントロール等を行い、一定時間経過後の L1-CAM, リン酸化 L1-CAM, $\alpha_2\delta$ の脊髄における発現検討を免疫組織化学にて行う。脊髄受傷後、タイムコースを設定して比較的長期の段階まで発現を定量する。損傷

中心部からの距離による上記因子の変化の違いを解明する。これらの抗体の特異性については過去の報告と我々の予備実験で確認している。

(2) 細胞マーカーを用いた (NeuN, Iba-1, GFAP) 免疫組織化学二重標識法にて、 $\alpha 2\delta 1$ を発現している細胞種 (ニューロン、マイクログリア、アストロサイト) の同定を行う。

(3) 熱刺激に対する疼痛閾値測定 (Plantar test) や機械的刺激に対する閾値を測定する Anesthesiometer を用いて、脊髄損傷モデルの痛覚過敏を足底部、及び背部で計測する。

(4) $\alpha 2\delta 1$ サブユニットリガンド投与による脊髄後角における変化

脊髄損傷後の疼痛において $\alpha 2\delta 1$ サブユニットリガンドの効果が、こうした細胞接着因子の活性化を介しているかどうかを免疫組織化学法を用いて検討する。浸透圧ポンプで一定期間 (脊髄損傷後 5-14 日) pregabalin を髄腔内投与し、その後ラット脊髄の灌流固定して、 $\alpha 2\delta 1$ の集積の変化を観察、定量化する。

(5) $\alpha 2\delta 1$ サブユニットリガンド投与の、疼痛行動と脊髄内での $\alpha 2\delta 1$ サブユニット発現変化への効果を検証することで、その関係性をディスカッションする。

4. 研究成果

2 年間にわたる研究により以下の成果を得た。

(1) 胸髄部脊髄損傷後の下肢運動麻痺とアロディニア (知覚過敏) の時間経過

脊髄損傷後の下肢の運動機能と疼痛行動を観察した。損傷後 1 日後では、BBB スケールは 2.4 ± 0.6 であったが、4 週後には 12.4 ± 0.6 に回復していた。胸髄部での脊髄損傷は下肢への機械的刺激に対する閾値を低下させたが、その計測は dynamic anesthesiometer を用いた。閾値の低下は、損傷後 14 日目まで観察され、少なくとも 28 日目までは継続していた。

(2) 腰髄部における $\alpha 2\delta 1$ 免疫組織化学反応の変化

胸髄部への脊髄損傷により腰髄部における $\alpha 2\delta 1$ の免疫組織反応の変化を検討した。コントロールラットでは、 $\alpha 2\delta 1$ 免疫反応は後角層を中心に観察された。脊髄損傷後 4 週目の腰髄では、明らかに免疫反応の増加が後角全層で見られた。免疫組織化学反応を定量化するとコントロール群と比較して有意な増加であることが判った。

(3) 腰髄及び脊髄神経節 (DRG) における $\alpha 2\delta 1$ mRNA 発現の変化

$\alpha 2\delta 1$ は DRG ニューロンで産生され脊髄後角に輸送されることがわかっているため、まず

DRG での $\alpha 2\delta 1$ mRNA 発現を in situ ハイブリダイゼーション法にて検討した。その結果は発現レベル及び陽性ニューロンの数にも変化は観察されなかった。次に、胸髄脊髄損傷後の腰髄における $\alpha 2\delta 1$ mRNA 発現変化を同じく in situ ハイブリダイゼーション法にて検討した。その結果、損傷後 7 日目より明らかに mRNA は増加し、その増加は後角浅層及び運動ニューロンにて観察された。シグナルを定量化すると、増加は損傷後 7 日目から 21 日目までが有意な増加となり、陽性ニューロンのカウントでも同様に有意な増加は、損傷後 7 日目から 21 日目までで見られた。

(4) 脊髄損傷後のプレガバリン投与の効果

まず、プレガバリンの経口投与が足底の機械的刺激に対する過敏反応をどう抑えるかを検討した。プレガバリン投与は脊髄損傷後 14 日目から開始したが、閾値の低下は投与開始の翌日からすぐに見られ、プレガバリン投与の間継続した。機械的刺激に対する閾値低下に対する効果は、生食投与のコントロール群とプレガバリン投与群で統計学上有意な差異であった。

次に $\alpha 2\delta 1$ 免疫組織化学反応に対するプレガバリン投与の効果を検証した。損傷後 4 週目の時点で、明らかに $\alpha 2\delta 1$ 免疫反応のプレガバリン投与群でコントロール群と比較して低下していた。定量化の結果、有意な変化であった。プレガバリン投与後の残存する $\alpha 2\delta 1$ 免疫反応は、神経終末部ではなく主に脊髄の細胞体にて観察された。これらの結果は、プレガバリン投与は、脊髄損傷後の疼痛閾値に効果があるばかりでなく、 $\alpha 2\delta 1$ 蛋白の発現・分布にも影響があることが明らかとなった。

以上、胸髄部の脊髄損傷後の下肢足底の機械的刺激に対する過敏反応は、腰髄における $\alpha 2\delta 1$ Ca チャネルの変化と関係する可能性が高く、他の難治性疼痛に効果がある $\alpha 2\delta 1$ リガンドであるプレガバリンが脊髄損傷後疼痛に対してサブユニットに対する影響を通じて効果を持つことが示唆された。現在、以上の結果をまとめて、英文雑誌に投稿中である。

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 11 件)

Kogure Y, Wang S, Tanaka K, Hao Y, Yamamoto S, Nishiyama N, Noguchi K, Dai Y. Elevated H2O2 levels in

trinitrobenzene sulfate-induced colitis rats contributes to visceral hyperalgesia through interaction with the transient receptor potential ankyrin 1 cation channel. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016 査読有 doi: 10.1111/jgh.13226.

Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Kanda H, Yagi H, Noguchi K. Macrophage-Colony Stimulating Factor Derived from Injured Primary Afferent Induces Proliferation of Spinal Microglia and Neuropathic Pain in Rats. *PLoS One.* 2016 Apr 12;11(4):e0153375. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0153375.

Wang S, Yamamoto S, Kogure Y, Zhang W, Noguchi K, Dai Y. Partial Activation and Inhibition of TRPV1 Channels by Evodiamine and Rutaecarpine, Two Major Components of the Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *J Nat Prod.* 2016 27;79(5):1225-30. 査読有 doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00599.

Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie M, Noguchi K, Sato M. Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. *Neurosci Lett.* 2016 Jan 26;612:18-24. 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.049.

Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Noguchi K. Annexin A2 in primary afferents contributes to neuropathic pain associated with tissue type plasminogen activator. *Neuroscience,* 2016; 314:189-199 査読有 doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.058.

Kiyoyuki Y, Taniguchi W, Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Nishio N, Nakatsuka T, Noguchi K. Leukotriene enhances NMDA-induced inward currents in dorsal horn neurons of the rat spinal cord after peripheral nerve injury. *Mol. Pain,* 2015; 11:53

査読有 doi: 10.1186/s12990-015-0059-5.

Tatsumi E, Katsura H, Kobayashi K, Yamanaka H, Tsuzuki, K, Noguchi K, Sakagami M. Changes in transient receptor potential channels in the rat geniculate ganglion after chorda tympani nerve injury. *Neuroreport,* 2015; 30:856-861 査読有 doi: 10.1097/WNR.0000000000000436.

Fukuoka T, Noguchi K. A potential anti-allodynic mechanism of GDNF following L5 spinal nerve ligation; Mitigation of NPY up-regulation in the touch sense pathway. *Neuroscience,* 2015; 304:240-249 査読有 doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.059.

Iwaoka E, Wang S, Matsuyoshi N, Kogure Y, Aoki S, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Evodiamine suppresses capsaicin-induced thermal hyperalgesia through activation and subsequent desensitization of the transient receptor potential V1 channels. *J. Nat. Med.,* 2015; Published online 査読有 DOI 10.1007/s11418-015-0929-1

Ikeda-Miyagawa Y, Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Shenglan Wang, Dai Yi, Yagi H, Hirose M, Noguchi K. Peripherally increased artemin is a key regulator of TRPA1/V1 expression in primary afferent neurons. *Mol. Pain,* 2015;11:8 査読有 DOI 10.1186/s12990-015-0004-7

Fukuoka T, Miyoshi K, Noguchi K. De novo expression of Nav1.7 in injured putative proprioceptive afferents: Multiple tetrodotoxin-sensitive sodium channels are retained in the rat dorsal root after spinal nerve ligation. *Neuroscience,* 2015;284:693-706 査読有 doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.10.027.

(学会発表)(計 15 件)

Okutani Hiroaki, Yamanaka Hiroki, Kobayashi Kimiko, Okubo Masamichi, Hirose Munetaka, Noguchi Koichi. Activation of spinal STAT6 signaling in M2 like microglia suppressed neuropathic pain. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2016) 2016.11.13 San diego (アメリカ)

Wang Shenglan, Kobayashi Kimiko, Yamanaka Hiroki, Yamamoto Satoshi, Kogure Yoko, Noguchi Koichi, Dai Yi. Modulation of TRPA1 activation by APM activated protein kinase. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2016) 2016.11.13 San diego(アメリカ)

Wang Shenglan, Kojima Y, Kogure Yoko, Yamamoto Satoshi, Noguchi Koichi, Dai Yi. TRPA1 is Involved in Vincristine Induced Cold Allodynia. 16th World Congress on Pain 2016.9.30 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

Kobayashi Kimiko, Kanda Hirosato, Yamanaka Hiroki, Okubo Masamichi, Noguchi Koichi. Expression of the PGE2 synthases and receptors in spinal cord following peripheral nerve injury. 16th World Congress on Pain 2016.9.28 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

Okubo Masamichi, Yamanaka Hiroki, Kobayashi Kimiko, Dai Yi, Kanda Hirosato, Yagi Hideshi, Noguchi Koichi. Macrophage-colony stimulating factor derived from injured primary afferent induces proliferation of spinal microglia and neuropathic pain in rats. 16th World Congress on Pain 2016.9.28 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

Yamanaka Hiroki, Kobayashi Kimiko, Okubo Masamichi, Noguchi Koichi. Annexin A2 in primary afferents contributes to neuropathic pain associated with tissue type plasminogen activator. 16th World Congress on Pain 2016.9.28 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

Okutani Hiroaki, Kobayashi Kimiko, Yamanaka Hiroki, Okubo Masamichi, Hirose Munetaka, Noguchi Koichi.

Expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 and its receptor in dorsal horn of neuropathic pain model rats. 16th World Congress on Pain 2016.9.28 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

Noguchi Koichi. Microglial signaling pathways for microglial structural changes and neuropathic pain after nerve injury. (ワークショップ)16th World Congress on Pain 2016.9.27 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

小林 希実子, 神田 浩里, 山中 博樹, 大久保 正道, 野口 光一.末梢神経損傷後のラット脊髄における PGE2 合成酵素と EP 受容体の発現変化. 第 39 回日本神経科学大会 2016.7.22 パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市)

野口 光一. 痛みメカニズムと国際疼痛学会横浜大会について.(特別講演) 第 38 回日本疼痛学会 2016.6.24 かでの 2・7 (北海道・札幌市)

奥谷 博愛, 小林 希実子, 山中 博樹, 大久保 正道, 廣瀬 宗孝, 野口 光一. 神経障害性疼痛モデルラットの脊髄後角における IL-4 および IL-4 受容体の発現変化. 第 38 回日本疼痛学会 2016.6.24 かでの 2・7 (北海道・札幌市)

野口 光一. 神経障害性疼痛の分子メカニズム. (教育共催セミナー)第 68 回日本自律神経学会総会 2015.10.29 ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)

王 勝蘭, 山本 悟史, 野口 光一, 戴 毅. エボジアミンは TRPV1 チャネルのパーシャルアゴニストである. 第 37 回日本疼痛学会 2015.7.4 市民会館崇城大学ホール (熊本県・熊本市)

小暮 洋子, 王 勝蘭, 山本 悟史, 戴 毅, 野口 光一. TNBS 誘発性大腸炎モデルラットの臓痛発症メカニズムにおける過酸化水素と TRPA1 の役割 第 37 回日本疼痛学会 2015.7.4 市民会館崇城大学ホール (熊本県・熊本市)

神田 浩里, 小林 希実子, 山中 博樹, 大久保 正道, 野口 光一. 末梢神経損傷後の脊髄における PGE2 合成酵素と EP

受容体の発現変化 第 37 回日本疼痛学
会 2015.7.4 市民会館崇城大学ホール
(熊本県・熊本市)

(図書)(計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 光一 (Noguchi, Koichi)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10212127