

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20047

研究課題名(和文) STAT1リン酸化抑制による、神経障害痛治療に関する研究

研究課題名(英文) Therapeutic effects to neuropathic pain by inhibition of STAT1 phosphorylation

研究代表者

西原 佑(Nishihara, Tasuku)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50568912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛モデル(CCIモデル)において、化合物Xの神経傷害および神経因性疼痛に対する効果を検討した。CCIモデルラットにおいて化合物XによるSTAT1抑制効果認めなかったが、化合物X投与群では、神経・軸索マーカーの一つであるPSD95が有意に高く発現し、マイクログリア(MG)の活性化が有意に抑制された。また、脊髄後角でのMGの活性化だけでなく、前角においてもMGの活性化を認めた。MGは後角ではアメーバ状に活性化しているのに対し、前角では神経の周囲を取り囲むような活性化をしている。現在引き続き化合物Xの効果をさらに検討すると同時に、脊髄でのMGの活性化の違いに着目して研究を続けている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the therapeutic effects of Chemical X to nerve injury and neuropathic pain. Chemical X didn't have significant effects to inhibition of STAT1 phosphorylation in CCI rats. But PSD95, one of neuronal marker, was significantly increased and microglial activation was significantly suppressed in Chemical X administered group. In spinal cord, activated microglia was observed not only in posterior horn but also in anterior horn. Activated microglia with flattened shape intimately attached to large neurons in anterior horn, while those in the left posterior horn displayed amoeboid-like shape and the attachment to neurons was not apparent. We are continuously investigating therapeutic effects of Chemical X and focusing to the difference of activation of microglia in spinal cord.

研究分野：神経免疫

キーワード：マイクログリア活性化

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は末梢神経の損傷を引き金として発生する、慢性的・持続的な疼痛である。神経因性疼痛は生死に関わらずとも、患者の QOL を著しく損ない、場合によっては精神を病むほどの苦痛である。この問題点として、現在においてもその発症メカニズムには依然不明な点が多く、また既存の鎮痛薬も効果を示しにくいといった点が挙げられる。

神経の傷害部位では、損傷後 3 日目以降からマクロファージ (マクロφ) や T リンパ球といった免疫細胞の浸潤が顕著となる。

我々は、これまで肺胞マクロφや腹腔マクロφ、また、脳では初代培養マイクログリアや、中枢神経傷害部位に集積するマクロφを用いて、それら免疫細胞の活性化調整を試みてきた。その中で、LPS 刺激によるそれらの細胞の活性化が化合物 X により抑制され、IL-1β や IL-6 といったサイトカイン、また iNOS 発現からの NO 産生を濃度依存的に抑制することを見出した。RNA 干渉による種々のノックダウン実験により、このメカニズムは、JAK1/STAT1 passway の遮断によるものと考えられた。

現在、承認・使用されている JAK/STAT passway 阻害剤として、リウマチに対する治療薬の一つであるトファシチニブがあるが、これは主に JAK3 を (高濃度では JAK1,2 も) 抑制する分子標的薬である。

神経因性疼痛モデルにおける脊髄において、STAT3 の活性化はすでに報告されており、神経因性疼痛の発症に関与するとされているが、我々の行った先行研究では STAT1 の活性化も認められている。しかしながら、STAT1 の関与に関しては報告がなく、不明確なままである。

2. 研究の目的

神経因性疼痛の発症には、末梢神経の損傷部位におけるマクロファージや脊髄でのマイクログリアの活性化が関与しているとされ、JAK/STAT passway の活性化がメカニズムの一つとして報告されている。中でも脊髄マイクログリアにおいて主に STAT3 の活性化が報告されており、神経因性疼痛の発症に関与するとされている。我々の研究では STAT1 の活性化も認めているが、これまでに STAT1 に言及した報告は認められない。

我々が見出した STAT1 のリン酸化抑制作用を持つ化合物 X が、神経因性疼痛に対し治療効果を持つのか検討する。

神経因性疼痛の更なるメカニズム解明と新たな治療ターゲットとして STAT1 リン酸化抑制の有用性を検討する。

3. 研究の方法

生後 8 週の雄性ウイスターラットを用い、慢性神経因性疼痛のモデルとして、す

でに確立されている坐骨神経における chronic constriction injury (CCI) モデルを作成する。CCI 部位ではマクロファージは術後 3 日目以降に顕著に認められ始める。pSTAT1 は 3 日目から優位に上昇し始め、7 日目にかけて上昇している。これらの結果から術後 3 日目より 1 日 2 回の皮下投与を連日行なう。

7 日目に CCI 部位・DRG・脊髄を採取し、real time RT-PCR・Western blotting・Immunohistochemistry 等の手法を用いてさらに詳しく解析する。主に CCI 部位と脊髄において下記内容を検証する。

4. 研究成果

神経因性疼痛モデルとして Chronic constriction injury (CCI) モデルを作成し、sham 群、control 群および化合物 X 投与群に分け、化合物 X の神経傷害および神経因性疼痛に対する効果を、qRT-PCR や Westernblotting などの生化学的手法を用いて解析した。

CCIモデルラットでは STAT1 の活性化が認められているが、化合物 X による STAT1 抑制効果に有意差は認められなかった (図 1)。

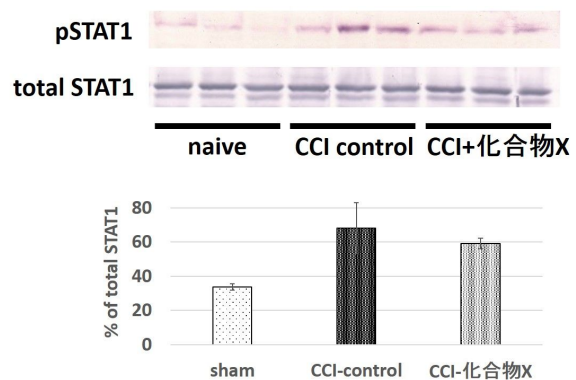


図1: 化合物XのSTAT1活性化に対する効果

しかしながら、化合物 X を投与した群では、Westernblotting において神経・軸索マーカーの一つである PSD95 が有意に高く発現しており (図 2) CCI による神経の傷害が化合物 X によって抑制されている可能

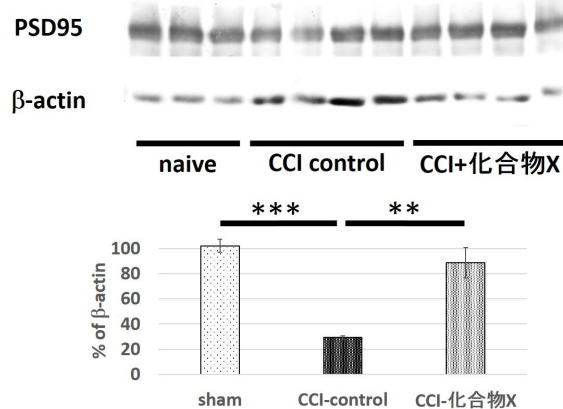


図2: 化合物Xによる神経保護効果

性が示唆された。

qRT-PCRではマイクログリアの有意な活性化抑制を認めており(図3)、これらのデータから、はっきりとした作用機序は不明であるが、何らかの作用機序によりマイクログリアの活性化が抑制され、神経傷害を軽度に抑えていると考えられる。

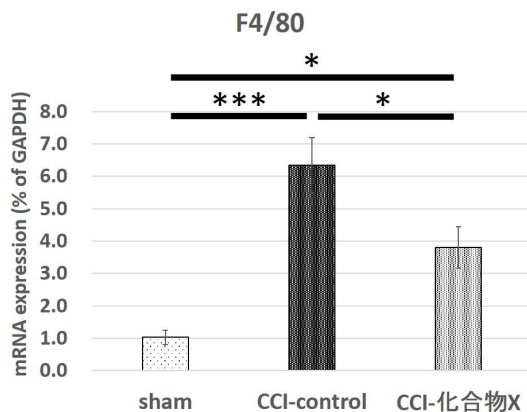


図3: 化合物Xのマイクログリア活性化に対する効果

また、脊髄前角においてマイクログリアの活性化が観察された(図4-A)。神経因性疼痛モデルでは、脊髄後角でのマイクログリアの活性化が認められることは広く知られているが、これまでに前角におけるマイクログリアの活性化に焦点を当てた研究は認められず、新たな知見である。

脊髄前角でのマイクログリアの活性化は、脊髄後角の活性化とは少し形態が異なっており、後角ではアメーバ状に活性化しているのに対し(図4-Bb)、前角では神経の周囲を取り囲むような活性化をしている(図4-Ba: 矢印)。これは Synaptic stripping と呼ばれる現象で、神経に対し保護的に働いているものと考えられている。

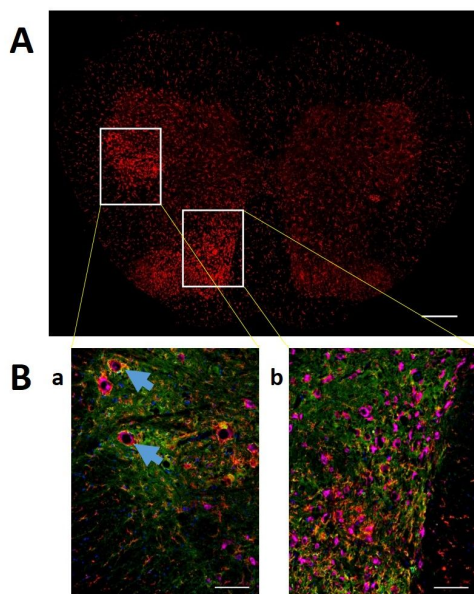


図4: 前角と後角におけるマイクログリア活性化の差 (赤: CD11b、緑: NG2、紫: NeuN)

現在、引き続き化合物 X による神経保護効果の背景を探るとともに、脊髄前角および後角でのマイクログリアの活性化の差異に関しても検討を重ねている。

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1件)

1. Hong S, Remacle AG, Shiryaev SA, Choi W, Hullugundi SK, Dolkas J, Angert M, Nishihara T, Yaksh TL, Strongin AY, Shubayev VI.

Reciprocal relationship between membrane type 1 matrix metalloproteinase and the alginate peptides of myelin basic protein contributes to chronic neuropathic pain.

Brain, Behavior, and Immunity. 査読有、2017 Feb ; 60:282-292.

DOI: 10.1016/j.bbi.2016.11.003.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

西原 佑 (Nishihara, Tasuku)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50568912

(2)研究分担者:

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者:

なし ()

研究者番号:

(4)研究協力者：

田中 潤也 (TANAKA, Junya)