

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790159

研究課題名 (和文) 末梢神経損傷後の脊髄グリアで発現変化するプリン受容体の役割

研究課題名 (英文) The role of purinergic receptor in the spinal microglia following peripheral nerve injury

研究代表者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70418961

研究成果の概要：

活性化マクログリアの増加が神経因性疼痛に関与し、またマクログリアの活性化には ATP が関与することが示唆されていたが詳細なメカニズムが不明であった為、ATP 受容体に着目して研究を行った。2007 年度はマクログリアに定常的に発現する代謝型 P2Y₁₂ 受容体が神経因性疼痛発生の初期段階で関与することをつきとめ、2008 年度は末梢神経損傷後の脊髄後角マクログリアにおいて P2Y₆, 13, 14 受容体が増加することが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：神経解剖学、ペインリサーチ

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：プリン受容体、神経因性疼痛、脊髄後角、マクログリア、P2Y 受容体、アストロサイト、MAP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

末梢神経が損傷されることで脊髄後角では、astrocyteの突起の肥大化やmicrogliaの活性化が起こり、これが神経傷害性疼痛の発生に関与していることが報告されていた。*in vitro*の実験系において、microgliaの活性化にはATPが関与すること、活性化したastrocyteからATPが放出されることが報告

されていることから、ATPや、ATPの代謝物であるアデノシンがニューロンの過興奮や神経因性疼痛の形成に重要な役割を果たしていることが示唆されていた。(Tsuda et. al. TRENDS in Neurosci. 28, 102-107, 2005)。私は、正常ラットの後根神経節(DRG)と脊髄における全てのプリン受容体の発現を詳細に検討しており、その結果、脊髄の

microgliaにはP2X7受容体とP2Y12受容体が発現していること、astrocyteにはP2Y1受容体、A1受容体、A2b 受容体が発現していることを学会や論文 (Kobayashi et. al. J. Comp. Neurol. 2006) にて明らかにしていた。そのため、脊髄のグリアでこれらATP受容体が、神経因性疼痛が形成される過程において何らかの変化があるのではないかと考え研究を進めた。

2. 研究の目的

(1). どのプリン受容体が microglia の活性化に関与するのか？

in vivo において正常ラット脊髄 microglia には P2X7 と P2Y12 が発現している。*in vitro* の実験系から P2Y12 の関与が示唆されているが、この結果を裏付けるためにアンチセンスオリゴヌクレオチドやアンタゴニストを使用して活性化に関わる受容体を特定した。

(2). 活性化したmicrogliaでプリン受容体の発現変化が見られるか？

活性型microgliaにてP2X4の発現が上昇し、それにより疼痛行動に関与することが報告されていた (Tsuda et. al. Nature, 2004) が、その他のプリン受容体の役割はまだ分かっていなかった為、まず各受容体発現の詳細なタイムコースを検討した上で、二重染色法を用いてmicrogliaで増加するP2Y受容体の特定を行った。

3. 研究の方法

(1) P2Y12受容体がMicrogliaの活性化に関与するのか？

正常ラットの脊髄microgliaにはP2X7受容体とP2Y12受容体の2つが発現している。P2Y12のアゴニストのADP, 2-MeSADPを髄腔内に投与してmicrogliaの活性化が起こるかどうかを、マイクログリアマーカーであるIba1抗体を使用して免疫組織化学法を施行し、

形態学的変化を観察した。

(2) 活性化したmicrogliaで発現が増加するプリン受容体の役割は？

① モデル動物作成

坐骨神経部分結紮モデル (Seltzerモデル) や神経因性疼痛モデルであるSNIモデル (Spared nerve injury) を作成した。モデル作成後1, 3, 7, 14, 30日後にDRG・脊髄を摘出してtotal RNAの抽出と組織切片を作成した。

② 半定量的RT-PCR法によるmRNAの定量化

モデル動物作成後1, 3, 7, 14, 30日のプリン受容体の経時的な発現変化を調べた。発現のピークを調べることで神経因性疼痛に関与する時期を特定した。

③ *in situ* hybridization histochemistry 法の施行

cRNAプローブを用いた *in situ* hybridization法を行い、モデル動物作成後のプリン受容体の経時的な発現誘導のパターンを経時的・空間的に明らかにした。

④ 発現細胞の同定

免疫組織化学法と *in situ* hybridization法による二重染色により発現細胞の同定を行った。脊髄においてニューロンのマーカーである NeuN、astrocyte のマーカーである GFAP、microglia のマーカーである Iba1 を用いて発現細胞の同定を行った。

⑤ P2Y受容体を介した細胞内シグナル伝達系の解明

P2Y12受容体のアゴニスト投与による MAP kinase のリン酸化を免疫組織化学法にて検討した。活性化microgliaではリン酸化したMAP kinase (p-ERK1/2, p-p38)が増加し、これが疼痛行動に関与することが知られている。

そのため、プリン受容体のアゴニスト、アンタゴニストを用いてプリン受容体のシグナル下流にMAP kinaseシグナルに関与するのか、またMAP kinaseの阻害剤を髄腔内に投与し、プリン受容体発現調節がMAP kinaseを介して行われているかを検討した。

4. 研究成果

19年度はマイクログリアに定常的に発現する代謝型 P2Y₁₂ 受容体に着目し、P2Y₁₂ 受容体が神経因性疼痛においてどのような役割を果たしているのかを検討した。Seltzer model を作成し、その発現を RT-PCR 法と in situ hybridization 法にて詳細に検討した。P2Y₁₂ mRNA はモデル作成後 3 日をピークに 14 日まで有意に増加しており、マイクログリアに発現が見られた。また、免疫組織化学法を用いて検討を行ったところ、末梢神経損傷後の脊髄後角で P2Y₁₂ 受容体が増加し(図 1)、その発現細胞はマイクログリアであった(図 2)。

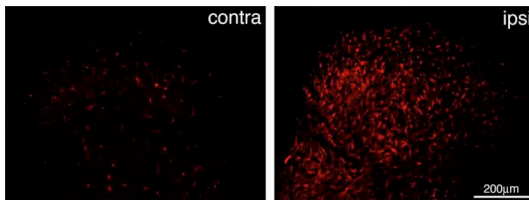


図 1. 末梢神経損傷後の脊髄後角で増加する P2Y₁₂ 受容体

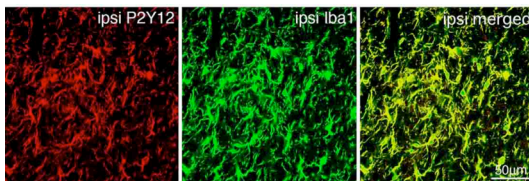


図 2. 末梢神経損傷後に増加した P2Y₁₂ 受容体はマイクログリアのマーカーである Iba1 と共存する

疼痛行動を調べた結果、モデル作成 2 日前からアンタゴニストまたは antisense oligo nucleotide (ASODN) を投与した群ではアロデニア、hyperalgesia を有意に抑制する(図 3)が、モデル作成後 4 日から投与した群では抑制されなかった。

また、モデル作成 2 日前から P2Y₁₂ アンタゴニストまたは ASODN を髄腔内投与した群で p38 MAP Kinase のリン酸化を見たところ、antagonist, ASODN 投与群で有意に減少していた。以上のことから神経因性疼痛発生の初期段階で P2Y₁₂ 受容体が関与することが示唆された。

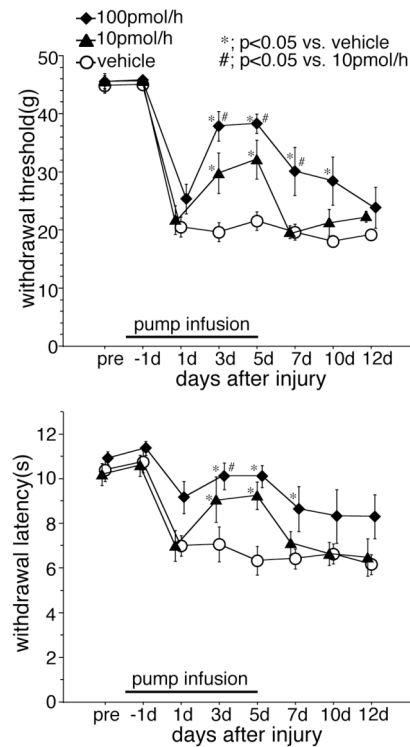


図 3. P2Y₁₂ 受容体アンタゴニスト投与による機械刺激・熱刺激の閾値の回復

平成 20 年度は、神経因性疼痛モデルの 1 つである Spared nerve injury (SNI) モデルを作成後の P2Y 受容体発現変化について検討を行った。

RT-PCR法を用いて mRNA 発現変化の検討を行ったところ P2Y₆, P2Y₁₃, P2Y₁₄ 受容体 mRNA がモデル作成後 3 日をピークに有意に増加が見られた。これらの受容体の局在を明らかにする為、in situ hybridization 法にて詳細に検討しところ、P2Y₆, 13, 14 受容体 mRNA は後角のマイクログリアで発現が増加していた。また、P2Y₆ 受容体は、損傷を受けた motorneuron でも増加が見られた。次に、SNI モデル作成と同時に p38 MAPK の inhibitor である SB203580 を髄腔内に持続投与を行い 3 日後に脊髄における mRNA の発現を検討した結果、P2Y₁₃, P2Y₁₄ mRNA は Vehicle 投与群に比べて発現が抑制されていたが、P2Y₁₂ 受容体は抑制されなかった。

このことから、活性化したマイクログリアは ATP 感受性が高くなることで、脊髄後角において痛みシグナルの modulation が行われていることが示唆された。

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 8 件)

- ① Kobayashi K, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Noguchi K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J. Neurosci.*, 28, 2892-902.
- ② Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y and Noguchi K. (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.*, 10, 510, 188-206
- ③ Cui XY, Dai Y, Wang SL, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Chen J, Noguchi K. (2008) Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol Pain*. 30, 4(1), 17.
- ④ Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*, 131, 1241-1251.
- ⑤ Yamanaka, H., Obata, K, Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Noguchi, K. (2007) Alternation of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain, *Eur. J. Neurosci*, 25, 1097-111.
- ⑥ Kozai, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Kobayashi, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. *Glia*. 55, 595-603.
- ⑦ Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H.,

Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR-2 through PLC/PIP₂-dependent mechanisms contributes to inflammatory pain, *J. Clin. Invest.*, 117, 1979-1987.

- ⑧ Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Noguchi, K. (2007) Activation of fibroblast growth factor receptor by axotomy, through downstream p38 in dorsal root ganglion, contributes to the neuropathic pain, *Neuroscience*, 150, 202-211

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T. and Noguchi, K. Induction of P2Y receptor in the spinal cord following peripheral nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A. (2008)
- ② Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H. and Noguchi, K. P2Y12 receptor expressed in spinal microglia contributes to neuropathic pain. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, 11.3-7, San Diego, U.S.A. (2007)
- ③ 小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一 神経因性疼痛における脊髄マイクログリアに発現する P2Y12 受容体の関与. 第 30 回日本神経科学大会, 9.10-12, 横浜. (2007)
- ④ 小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一 神経因性疼痛における脊髄マイクログリアに発現する P2Y12 受容体の関与. 第 29 回日本疼痛学会, 7.7, 横浜. (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：70418961