

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07260

研究課題名(和文) 上行性疼痛制御系モジュレーター分子としてのBDNF

研究課題名(英文) BDNF as a modulator of the regulatory system for ascending pathway of pain

研究代表者

小林 希実子 (Kobayashi, Kimiko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：70418961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：疼痛モデル動物において損傷あるいは炎症時の脊髄後角における脳由来神経成長因子Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の役割を検討した。BDNFは末梢神経損傷や末梢炎症後の脊髄後角の投射ニューロンで発現しており、痛みの上行性調節への関与が示唆された。投射先のひとつである腕傍核は不快情動創出に関係が深い場所であることから痛みの可塑性の形成と不快情動へのBDNFの関与が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BDNFと痛みについては末梢神経損傷後にDRGで増加するBDNF、マイクログリアで増加するBDNFといった報告が多数なされているが、上行性の制御に関与することは新しい発見である。疼痛の最も悲劇的な結果である抑鬱症状および疼痛カタストロフィーの治療対象として、上行性入力としてBDNFの関与を明らかにすることで、痛みや痛みが引き起こす抑鬱に対する早期の対応方法の発見に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Brain derived neurotrophic factor (BDNF) serves as a neurotransmitter modulator. In the neuropathic pain model, BDNF in the spinal dorsal horn has been recently considered to play a crucial role in the sensitization of dorsal horn neurons leading to mechanical allodynia. However, the cellular distribution of BDNF in the spinal cord has remains unclear. Therefore, we defined the precise expression of BDNF mRNA in the spinal cord after peripheral nerve injury and peripheral inflammation. BDNF mRNA signals greatly increased in the spinal projection neurons but not glia, suggesting its involvement in the ascending regulation of pain.

研究分野：神経科学、疼痛学

キーワード：脊髄後角 脳由来神経成長因子 投射ニューロン 腕傍核

## 1. 研究開始当初の背景

痛みは生体警告システムとして重要な役割を果たしているが、その役割の範囲を超えた過剰な痛みが生じて慢性化・難治化する例が多数知られている。痛みを引き起こすような刺激を侵害刺激と呼び、生体組織への侵害刺激は機械的刺激、熱刺激、冷刺激、化学的刺激がある。これらの刺激を伝える一次知覚神経線維を特に侵害受容器と呼ぶ。

侵害受容器は上記の刺激のうち1つのみに反応するものがあるが、多くは異なる複数種類の刺激に反応する。侵害刺激を伝える線維は主に早い痛みを伝える細い有髄の A 線維とズキズキする遅い痛みを伝える無髄の C 線維に分けられる。これらの線維は脊髄後根を経て脊髄に侵入し、各線維は多数の細根に分かれて脊髄後角に終始する。

脊髄後角には大きく分けて投射ニューロンと介在ニューロンが存在する。侵害受容ニューロンは主に脊髄表層の二次ニューロンとシナプスを形成する。この脊髄表層、特に lamina I に存在する投射ニューロンは非常に数が限られておりほとんどが介在ニューロンであることが知られている。近年、介在ニューロンにより構築される局所回路が痛みや痒みシグナルのプロセッシングに重要であることが多数報告されている。しかしながら投射ニューロンに関してはどこに投射するのかはよく知られているものの、どのような分子が痛みシグナルの伝達や痛みの可塑性に関与するのか、さらに痛みにより引き起こされる不快情動や抑鬱行動のメカニズムに関してわかっていない。そこで我々は末梢炎症や神経障害性疼痛により投射ニューロンがどのような変化をもたらすことで痛みの可塑性が形成され、過剰な痛みが引き起こされるのかという疑問に対し研究を進めた。

## 2. 研究の目的

生体警告系としての役割を果たす急性痛は生存に必須であるが、病態生理学的な痛みである、侵害受容器を介する炎症性疼痛や神経障害性疼痛は中枢神経系に可塑的变化が生じることでもとの病態像が取り除かれたにもかかわらず痛みが遷延する。炎症性疼痛は組織破壊の結果産出される炎症性物質により絶え間なく自発痛が発生し、さらに侵害受容器の過剰化により痛覚過敏が生じる。

神経障害性疼痛は末梢神経や中枢神経の損傷もしくは機能障害により起因し、自発痛・熱痛覚過敏・触刺激によって激痛を生ずる異痛症を主症状とする難治性の疼痛である。炎症性疼痛も神経障害性疼痛も詳細な作用機序は異なるが、痛みの伝達経路としては一次知覚神経から脊髄後角で二次ニューロンに伝達され、二次ニューロンでは介在ニューロンによる調節を受けながら侵害受容特異的な上行性投射ニューロンにより脊髄側索の脊髄視床路を上行して橋の腕傍核や視床などに至ることが知られている。

予備実験から、末梢神経損傷後や末梢炎症 12 時間後に脊髄後角の I 層の神経細胞を中心に脳由来神経成長因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) が増加する結果を得ており、BDNF が発現増加する neuron は投射ニューロンの特徴を有していたため、この BDNF に焦点を当てて研究を進めた。

本研究ではこの侵害受容特異的な上行性投射ニューロンが炎症時や末梢神経障害後にどのような分子的变化を起こすことで痛みの可塑性を引き起こし、痛みを持続的にさせているのかに着目した。痛みを伝える脊髄表層の投射ニューロンは主に腕傍核や中脳水道周囲灰白質へ投射することが知られており、特に腕傍核からさらに扁桃核へと投射する経路では痛みに対する嫌悪や不安情動、抑鬱行動の反応に関与することから、この経路に着目して実験を行った。

## 3. 研究の方法

SD 雄性ラットを用いて代表的な神経因性疼痛モデルである spared nerve injury (SNI) モデルと、末梢炎症性疼痛モデルである Complete Freund's adjuvant (CFA) モデルを作製した。

(1) これらのモデルを用いて経時的に BDNF の発現変化を観察した。各タイムコースの損傷側/炎症側の L4-5 レベルの脊髄後角を分離し、半定量的 RT-PCR 法を用いて、発現のピークを観察した。次いで、そのピーク前後のタイムコースの脊髄を in situ hybridization histochemistry 法を用いて発現細胞を観察し、さらに免疫組織化学法を組み合わせ発現細胞の同定を行った。発現細胞の同定を行うためのマーカーとしてニューロンのマーカーである NeuN、アストロサイトマーカーの GFAP、マイクログリアマーカーの Iba、興奮性ニューロンマーカーの Lmx1b、投射ニューロンマーカーの NK1 受容体を使用し、二重染色を行った。

(2) 投射ニューロンで遺伝子が増加することを確認するためにすでに投射先として知られている脳の腕傍核に逆行性トレーサーである Fluoro-Gold を投与して BDNF が発現増加する脊髄投射ニューロンとの共存関係を観察した。トレーサーを投与して約 1 週間のちに疼痛モデルを作製し、発現がピークになるタイムコースで脳や脊髄サンプルを取り出し、トレーサーを抗体を使用して検出し、二重 ISH-IHC 法を行うことで投射ニューロンにおける BDNF mRNA 発現を確かめた。

(3) BDNF タンパク質検出のために様々な市販の BDNF 抗体を検討し、また BDNF 抗体を新たに作製した。

(4) BDNF が増加するきっかけとなる因子を探索した。痛みが生じたとき DRG の過剰興奮により substance P が大量に放出することが知られており、これが投射ニューロンに発現する NK1 受容体に作用することで上位へ痛み刺激が伝えられるとされている。この substance P が BDNF の発現を調節している可能性があるため NK1 受容体拮抗薬を髄腔内投与し上記疼痛モデルを作製し BDNF の発現上昇が押さえられるかを確認した。

#### 4. 研究成果

末梢神経損傷後、損傷した DRG の細胞では神経成長因子である BDNF mRNA やタンパクが増加し、免疫組織化学法の結果から脊髄後角で DRG のターミナルで BDNF の陽性が増加し、それにより痛みの増強が起こることが報告されていた (Sebert ME et. al. J Neurosci Res. 1993 36(4):357-67., Cho HJ et. al. Exp Neurol. 1998 154(1):224-30., Cejas PJ et. al., Pain 2000 86(1-2):195-210.)。しかし、2005 年に発表された Coull JA. et. al. (Nature. 2005 438, 7070, 1017-21) の論文により、末梢神経損傷後にマイクログリアで BDNF の発現が増加することが神経障害性疼痛の一因であるとの報告がなされたものの脊髄後角における BDNF の発現をきちんと観察した論文はこれまでになかった。

そのため、3.(1)のとおり末梢神経損傷モデルとして SNI モデルを作製しさらに炎症モデルである CFA モデルでも BDNF の発現動態を観察したところ、両モデル共に 12 時間後から脊髄後角で mRNA が増加し始め、1-3 日をピークにその後減少した。in situ hybridization 法にて発現細胞を観察したところ、laminae I-IIo と IV にて BDNF mRNA が発現増加する細胞がみられた。発現増加した細胞種を同定するために、各種グリア細胞マーカー・ニューロンマーカーと二重 in situ hybridization 法を行ったところ、グリア細胞マーカーとは共存しておらず、ほとんどがニューロンマーカーである NeuN と共存していることがわかった。

さらにこのニューロンが介在ニューロンか投射ニューロンかを検討するために投射ニューロンの大部分に発現が見られる NK1 受容体の抗体を使用して二重 in situ hybridization 法を行ったところ BDNF mRNA 発現細胞とほとんど共存していた。

次に 3.(2)の、脊髄 lamina I の投射ニューロンの主な投射先である腕傍核に逆行性トレーサーである Fluoro-Gold を投与した実験により、腕傍核に投射する 9 割以上の投射ニューロンで BDNF mRNA の発現増加が観察された。炎症モデルでも、末梢神経損傷モデルでも同様の結果が得られた。

このように末梢神経損傷モデルでも炎症モデルでも同じようなタイムコースでなおかつ投射ニューロンで BDNF mRNA が増加していたことから、投射先において LTP の出現などにより痛みの可塑性や、痛みによる情動不安を引き起こす可能性が示唆された。

次に、腕傍核での脊髄から投射されたターミナルで BDNF タンパク質が増加しているかを検討するために BDNF 抗体の信頼性を検討した。なぜなら、2000 年頃に発表されていた論文で免疫組織化学法でよく使用されていた amgen 社の抗体は、二重 ISH-IHC 法をおこなうと同一細胞で BDNF mRNA とタンパク質の発現を確認できる唯一の抗体であったが、この抗体は現在入手不可能である。そのため様々なメーカーの抗体を購入し、DRG において BDNF mRNA と BDNF の IHC 法をおこなうと、細胞質が染色された BDNF 免疫陽性の細胞に BDNF mRNA が発現していない、もしくはその逆の結果が得られた。つまり、現在購入可能でラットにおいて正しく BDNF タンパク質を検出できる抗体を得ることができなかった。そのため、新たな BDNF 抗体を作製する必要がある、立体構造などから適正と思われる BDNF 抗原ペプチドを選択し、BDNF のポリクローナル抗体を作製した。しかしながら新規に作製した抗体も信頼性の高い染色像を得ることができなかった。

投射ニューロンのマーカーとして使用されている NK1 受容体は substance P の受容体である。DRG の過剰興奮により substance P が大量に放出することや、BDNF mRNA 発現誘導が損傷もしくは炎症後 12 時間と非常に早いことから substance P が BDNF の発現誘導を行っているのではないかと考え、3.(4)の実験を行った。髄腔内に NK1 受容体拮抗薬をあらかじめ投与しておき、CFA モデル、SNI モデル作製後の BDNF 発現変化を確認したところ、NK1 受容体拮抗薬ではその増加を抑制できなかった。他の因子が関与している可能性が高くなったため、いくつか候補を検討している。

新型コロナの影響で動物実験の停止や消耗品類の入荷の遅れなどから予定していた実験を期間内に終わることができなかったが、これらの結果を現在まとめており論文投稿の準備を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------