

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592374

研究課題名(和文) 難治性神経疾患の予防、修復への神経栄養因子型治療法の確立

究課題名(英文) The targeting treatment for prevention and restoration in patients with neuro-degenerative disease

研究代表者

石川 敏三 (ISHIKAWA TOSHIZO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90034991

研究成果の概要(和文)：

難治性神経疾患ではしばしばうつ・不安様行動も併発し極めて急務な課題である。今までに慢性疼痛や虚血性傷害後に情動系異常を観察し、担当神経回路の細胞応答で可塑的状态が起きていることをシグナルから見だし、神経栄養因子不足を一因として考えてきた。本研究では、神経栄養因子が傷害の予防及び障害後の修復に極めて有用であること、また我々が開発した電磁刺激治療器が鬱状態、神経過敏を軽減する可能性を見いだした。すなわち、神経過敏で延髄尾側垂核の神経グリアおよび pERK などの時系列的・局所的变化を解明し神経栄養因子による治療応用に基礎的知見を得た。近い将来、神経栄養因子様活性をもつ化合物や磁気刺激によって慢性疼痛の治療が可能になれば、臨床への貢献度は極めて高いと考える。

研究成果の概要(英文)：

The neuro-glia activation in the spinal cord may mediate neuropathic pain. However, little is known about the roles of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and mitogen-activated protein kinase (MAPKs) in chronic pain. Although it is well documented that MAPK pathways can increase pain sensitivity via peripheral mechanisms, the present study focused on central mechanisms of MAPKs, especially ERK. In the present study, we characterized neuro-glia and evaluated pERK and c-FOS immunoreactivity after administration of 4-methylcatechol (4-MC), a BDNF inducer, can modify these derangements in relation to chronic pain. A chronic constriction injury (CCI) model as for neuropathic pain model was prepared in SD rats and pain was assessed by a reduction in paw withdrawal latency (PWL) to heat stimuli. 4-MC was injected chronically after CCI. On day 14, k252a (Trk-B receptor inhibitor) or SP600125 (JNK-1 inhibitor) was injected to determine if the analgesic effects of 4-MC could be reversed. The animals were perfused with 4% paraformaldehyde followed by fixation for immunohistochemistry (c-FOS, pERK). The rats showed a persistent decrease in PWL after CCI. On day 14, there was increase in pERK and c-FOS in regions related to pain pathways and regions associated with emotion. 4-MC reduced the decrease in PWL and this effect was reversed by k252a and SP600125, but not by minocyclin, microglial inactivator.

These results suggest that the derangement of neuro-glia associated with pERK in pain-emotion system are responsible for chronic pain. Neurotrophic factor related compound ameliorates chronic pain by preventing abnormal intracellular signaling via induction of BDNF and normalization of cell responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000

2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：神経障害性疼痛、神経グリア、神経栄養因子、シナプス再構築、MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は科学的でなく、また不安や鬱も併発し極めて難治性である。患者は生活の質を損ない、また医療費高騰に密接に関わり社会問題とされている。最近の著しい細胞分子生物学的研究の進歩により、神経障害性疼痛の発生・維持機構は飛躍的に解明されつつある。しかし、それらのメカニズムには不明な点が多くその伝達と調節に主に関わる三叉神経尾側亜核の神経グリア相互作用を始め、未だ基礎的知見の集積が現状である。我々は、基礎・臨床研究の両面より末梢神経損傷後のグルタメート神経系の過剰興奮及び立体的調節を担う GABA/Glycine 含有ニューロンの脱抑制の関与を神経グリア相互作用を含めた時系列的メカニズムの解明を進めてきた。しかし、病態モデルの違いにより差異があり局所脊髄・脳における神経グリア相互作用を時系列で解明したものはない

2. 研究の目的

(1) グリア反応-シナプス再構築の解明：

末梢からの繰り返し刺激による細胞損傷周囲、隣接部位のグリア反応は GFAP (astrocyte) や Iba-1 (microglia) をマーカーとし、さらにグリア関連リン酸化産物 p-38MAPK、s100 β の脊髄局所的、経時的変化よりその機構を解明する。特に、介在神経の豊富な Rexed III 付近を中心に選択的細胞脆弱性との関連に着いて検討する。

(2) 神経栄養因子 (BDNF) による治療：

様々な神経栄養因子 (nerve growth factor: NGF, basic fibroblast growth factor: bFGF, brain derived neurotrophic factor: BDNF) 投与あるいは、その誘導剤 4-methyl catechol (4-MC) が延髄損傷部および隣接部位の apoptosis を抑止できるか否か、

グリア反応と隣接部位でのシナプス再構築および知覚機能の修復を合わせ検討する。

3. 研究の方法

培養系実験により、様々な細胞の機能評価の確立を目指す。さらにその系で神経栄養因子がどのように修飾しうるかを確かめる。

(1) 培養細胞を用いた評価系

① 脳の神経細胞障害保護作用の検討

ラット大脳皮質の初代培養細胞を用い、グルタミン酸、血清除去及びH₂O₂により誘発される神経細胞死に対して評価する。

② 神経栄養因子産生促進活性

培養ラット海馬神経細胞または培養ラットアストロサイトを用い、試料の添加によるBDNFおよびGDNF mRNA発現変化をRT-PCR法で評価する。

③ 細胞内シグナル伝達の修飾

培養ラット大脳皮質、海馬神経細胞、副腎髄質由来株化細胞PC12を用い、神経栄養因子の主要な作用経路であるMAPキナーゼ経路、PI3キナーゼ経路、PKA/cAMP経路について活性化（リン酸化の有無）イムノブロット法で解析する。

(2) 動物およびモデル

神経障害性疼痛モデル作製：ハロタン麻酔下でラットの歯髄神経を弱く圧迫したモデルとする。候補化合物を投与して鎮痛効

果を調べると共に、細胞修復の面で詳しく調べるため、1、3、7、14、21、28日目に延髄を摘出、凍結切片を作成する。これらの組織切片に対して c-fos 遺伝子発現を in situ hybridization 法にて検討する。異なる組織切片で DNA 断片化に対する TUNEL 染色と Fas、Fas-ligand に対する免疫染色を検討する。

(3) 培養神経幹細胞の増殖と分化に及ぼす

4-MC の影響

胎生 14 日齢マウス終脳を分散後、線維芽細胞成長因子 (FGF-2) を含む DMEM/F12 培地で培養し、FGF-2 (10 ng/ml) を毎日添加した。分化誘導実験では増殖培地から FGF-2 を除いた培地 (非増殖培地) を用いた。4-MC の増殖への影響は FGF-2 存在下で行い、分化への効果は FGF-2 除去後に神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーで染色して同定する。

(4) 活性ポリフェノールによる組織、培養細胞への遺伝子発現制御の解析

ポリフェノール処理前後で組織または細胞を取り出し、RNA を調製する。MRNA に対する蛍光プローブを作り、同一 DNA チップにハイブリダイズさせ、DNA アレイスキャナーで蛍光強度を読み取り両者間で発現が異なる遺伝子をリストアップし、RT-PCR で確認する。

(5) 末梢神経障害後の CSF-glutamate, s100 β の測定

ハロタン (1%) / 酸素吸入下で、ダイアリシスプローベに人工脳脊髄液を灌流し、障害負荷および解除後 4 時間まで採取する。ラットを任意に以下の群に分ける。薬物投与は末梢神経障害 3 日後より過敏反応が出た後、開始し持続注入する。(1) 偽手術群: 手術のみ、(2) 非治療群: 生理食塩水を持続静注し、(3) 薬物治療群: 脊髄障害負荷前より実験終

了まで、持続投与する。透析液は分析まで -80°C 下で保存し、透析液中の glutamate 濃度は OPA 誘導体化して (HPLC-ECD 法) 定量的に測定する。

4. 研究成果

さまざまな難治性神経疾患にしばしばうつ・不安様行動が併発し、その発症機構がほとんど不明のまま、医療のみならず社会的にも急務な課題である。我々は、慢性疼痛や虚血性傷害後ラットで、情動性異常を観察し、ま、脳内神経回路の細胞応答からも、記憶・認知・感情機能に関与する部位で可塑的状态が起きている可能性をシグナルから見だし、その様式解明および治療に向けて特定分子の探索を進めている。

本研究から、神経栄養因子が神経細胞傷害の予防及び障害後の修復に極めて有用であることを突き止めた。ポリフェノール化合物、および細胞活性を高める可能性があり我々が開発した電磁刺激治療器が鬱状態、神経過敏を軽減する可能性を見いだした。したがって、慢性痛の分子機構解明、つまり脊髄の神経グリア作用の時系列的・局所の変化を解明し神経栄養因子による治療応用に基礎的知見を得た。よって近い将来に、神経栄養因子様活性をもつ化合物や磁気刺激によって慢性疼痛の治療が可能になれば、本研究の臨床への貢献度はきわめて高いと考える。

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 7 件)

- ① S Yamamoto, T Ishikawa, M Nishi, H Sasaki, K Ishikawa, T Kakeda; A low-power magnetic stimulator evokes induction of spinal neurotrophic in rat chronic pain. *Pain Research*, 2011, 26(1) (in

printing) 査読有

②K Fukuhara, K Ishikawa, S Yasuda, O Nakanishi, T Ishikawa; The brain derived neurotrophic factor potently mediate neuro-plasticity of sensory-limbic systems with a concurrent depression-like behavior in chronic pain. *Pain Research*, 2011, 26(1) (in printing) 査読有

③K ISHIKAWA, H SASAKI, S YASUDA, K FUKUHARA, T MAEKAWA, T ISHIKAWA, Role of Brain-derived Neurotrophic Factor on Spinal Neuro-glia Interactions and pERK activity in Rat Neuropathic Pain, *Anesth and Analgesia*, 2011, (in printing) 査読有

④Y Shizuoka, T Ariyoshi, O Nakanishi, K Fukuhara, S Yamamoto, M Yamamoto, T Ishikawa; The analgesic Effect of agmatine in formalin-induced Pain is enhanced by a non-competitive NMDA receptor antagonist, *Pain Research*, 2010, 25(1), p55-63 査読有

⑤三根由起子, 石川浩三, 蓑田誠治, 福原佳世子, 古田 翼, 松本吉洋, 石川敏三; ラット慢性疼痛における脊髄グリア細胞および p 38-MAPK 活性の変調と神経栄養因子型治療, 薬理と治療, 2010, 38(3), p 273-283 査読有

⑥佐々木宏典, 西 光晴, 香川慶輝, 山本 悟, 掛田崇寛, 安田聖子, 石川敏三; 神経因性疼痛に対する新規磁気刺激装置 Angel Touch[®]の作用機構 -脊髄および下行性抑制神経系-, 薬理と治療, 2010, 38(3), p285-295 査読有

⑦石川敏三, 松本吉洋, 仲西 修, 石川浩三; 痛みの分子機構 {総説}: 脊髄の神経可塑性と脊髄上位下行性抑制系, 日本

歯科麻酔学会誌, 2010, 38(3), p249-256, 査読有

[学会発表] (計 16 件)

①安田聖子, 石川浩三, 岸下裕輔, 石川敏三; 難治性疼痛に併発する気分障害における知覚-情報系 MAPKs の挙動; 神経栄養因子治療の試み, 第 7 回九州・山口脳循環代謝フォーラム, 福岡市, 全日空ホテル 2010, 12, 17

②S Yasuda, K Ishikawa, K Fukuhara, O Nakanishi, T Ishikawa; The brain derived neurotrophic factor potently mediate neuroplasticity of sensory-limbic systems with a concurrent depression-like behavior in chronic pain, *Neuroscience* (2010, 11, 17) San Diego Convention Center, USA 741.19, p12-12

③T Ishikawa, M Nishi, H Sasaki, K Ishikawa, T Kakeda; A low-power magnetic stimulator evokes induction of spinal neurotrophic in rat chronic pain, *Neuroscience* (2010, 11, 16) San Diego Convention Center, USA681.18, p128-128

④ Y Kagawa, S Yamamoto, T Ibuki, Y Ida, Y Kishishita, Y Owada, T Ishikawa; Role of peripheral interaction of NGF with inflammatory mediators, 5HT and NA in developing MO-induced hyperalgesia, *Neuroscience* (2010, 11, 14) San Diego Convention Center, USA 283.16, p121

⑤ 山本 悟, 西 光晴, 佐々木宏典, 石川浩三, 松本吉洋, 石川敏三; 新しく開発した家庭用超短波治療器の安全性及び難治性疼痛に対する効果の検討, 第 32 回日本疼痛学会, (2010, 7, 2), 京都, 国立京都国際会館, 25(2), p92

⑥安田聖子, 石川浩三, 佐々木宏典, 石川敏三; 神経栄養因子不足が坐骨神経損傷誘発

- 慢性疼痛に併発する気分障害を発症する，第 32 回日本疼痛学会，(2010, 7, 2)，京都，国立京都国際会館，25(2)，p96
- ⑦ 蓑田誠治，安田聖子，掛田崇寛，松本吉洋，石川敏三；ラット坐骨神経損傷後の慢性疼痛に伴う気分障害は痛覚閾値を低下させる，第 32 回日本疼痛学会 (2010, 7, 2)，京都，国立京都国際会館，25(2)，p96
- ⑧ 福原佳世子，三根由起子，石川浩三，佐々木宏典，石川敏三；神経栄養因子誘導剤 (4-MC) が脊髄神経-アストログリア細胞の JNK 活性化を介し慢性疼痛を緩和する，第 32 回日本疼痛学会，(2010, 7, 2)，京都，国立京都国際会館，25(2)，p97
- ⑨ T Ishikawa，K Ishikawa，H Sasaki，S Yamamoto，T Maekawa，T Kakeda；Microglia mediates p38-MAPK activation in initiated allodynia, **Neuroscience** (2009, 10, 18) Chicago Convention Center, USA
- ⑩ S Yamamoto，T Furuta，Y Mine，K Fukuhara，S Minoda，T Ibuki，T Ishikawa；Time-dependency of neuro-glia interaction in development and maintenance of hyperalgesia, **Neuroscience**, (2009, 10, 18), Chicago Convention Center, USA
- ⑪ YW Lee，K Ishikawa，H Sasaki，T Ishikawa；Microglia mediates the GABA(A) receptor antagonist-induced tactile allodynia, **6th Congress of EFIC** (European Federation of IASP Chapter) in Lisbon, Portugal, 2009, 10. 5
- ⑫ 石川敏三，佐々木宏典，蓑田誠治，有吉 亨，野島順三，常岡英弘，市原清志，高橋睦夫，山田 治；新しく開発した低エネルギー磁気刺激装置による脊髄神経可塑性および感覚障害の機能再建，第 4 回日本臨床医学検査教育学会，東京，東京医歯大学，2009，8，19-21

- ⑬ 佐々木宏典，西 光晴，石川浩三，山本 悟，石川敏三；磁気刺激前処置は神経栄養因子誘導作用を介し疼痛を緩和する，第 31 回日本疼痛学会，(2009, 7, 18)，名古屋，名古屋国際会議場，24(2)，P78
- ⑭ 山本 悟，佐々木宏典，三根由起子，石川浩三，松本吉洋，石川敏三；痛覚過敏症における脊髄神経系の時系列的グリア活性の関与，第 31 回日本疼痛学会 (2009, 7, 17)，名古屋，名古屋国際会議場，24(2)，P65
- ⑮ 有吉 亨，佐々木宏典，山本 悟，石川敏三；痛覚過敏症における脊髄神経-Glia 細胞相互作用の薬理的解析，第 31 回日本疼痛学会 (2009, 7, 17)，名古屋，名古屋国際会議場，24(2)，P66
- ⑯ 三根由起子，石川浩三，Youn-Woo Lee，掛田 嵩寛，石川敏三；GABA_A受容体拮抗薬誘発アロディニアにマイクログリアの活性化が関与する，第 31 回日本疼痛学会 (2009, 7, 17)，名古屋，名古屋国際会議場，24(2)，P67

〔図書〕(計 1 件)

- ① 石川敏三，掛田崇寛，山本美佐；治療・臨床を意識したこれからの疼痛治療薬開発動向：有望な鎮痛カスケードの開発動向 7 節 MAPK ファミリー系. 各種慢性疼痛治療における有効な薬剤選定と治療薬開発パラダイム～痛み発現メカニズムから有望な鎮痛カスケード〕，技術情報協会，2010，pp 569-576

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：神経栄養因子産生促進装置

発明者：石川 敏三

権利者：木下 巖

種類：医療機器

番号：201010546497. 9

出願年月日：平成 22 年 11 月 11 日

国内外の別：中国

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 敏三 (ISHIKAWA TOSHIZO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90034991

(2) 研究分担者

古川 昭栄 (FURUKAWA SYOEI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90159129

仲西 修 (NAKANISHI OSAMU)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50137345

伊吹 京秀 (IBUKI TAKAE)
京都府立医科大学・医学系研究科・講師
研究者番号：90232587

山本 美佐 (YAMAMOTO MISA)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70379957

松本 吉洋 (MATSUMOTO YOSHIHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・
学術研究員
研究者番号：30364152

(3) 連携研究者

なし