

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591908

研究課題名（和文） 坐骨神経痛発現メカニズムにおける脊髄グリア細胞活性化の寄与

研究課題名（英文）Glial activation in the spinal cord contributes to induction of sciatica

研究代表者

橋 俊哉（TACHIBANA TOSHIYA）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40299095

研究成果の概要（和文）：

整形外科領域の坐骨神経痛モデルである 2 種類のラット神経根損傷モデルを作成し、疼痛関連動作を経時的に観察し、安定的に痛覚過敏を確認し、さらに前根損傷モデルの方が安定して痛覚過敏が顕著に検出できることを見いだした。両モデルにおいて、Iba-1、GFAP の上昇を確認することができ、特に前根損傷単独においてもグリア細胞の活性化が生じるという新しい発見があった。前根損傷モデルの L5 レベルの脊髄後角にて、リン酸化 ERK の有意な増加を確認した。アメリカとの共同研究において、下降性の疼痛促進経路においてニューロンとグリアのコミュニケーションが極めて重要である所見を発見し、J. Neurosci に発表した。

研究成果の概要（英文）：

In order to investigate the molecular mechanisms of pain seen in orthopedic clinics, such as root injury/compression pain, we have used two rat models of root injury-induced pain. One is ventral root injury model and another is dorsal root injury model. We examined the pain behaviors of these two models and found that the ventral root injury model showed more stable hyperalgesia and allodynia compared to dorsal root injury model. Using immunohistochemistry with antibodies for Iba-1 and GFAP, we found that activation of glial cells (microglia and astrocyte) in the spinal cord even after ventral root injury. We also confirmed that phosphorylated ERK was increased in the spinal cord in the ventral root injury model, which might have a role in ventral injury-induced pain hypersensitivity. With collaboration with a laboratory in USA, we published a paper in J. Neurosci, where the finding that neuro-glial interaction is important in descending pain accelerating pathway in the spinal cord, was presented.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

従来より chronic constriction injury (CCI) モデルや選択的脊髄神経切断 (SNL) モデルなど様々な神経因性疼痛モデルを用いて、脊髄後根神経節 (DRG) や脊髄後角における神経活性物質の遺伝子発現の変化が報告されてきたが、これらのモデルのいずれもがDRGよりも末梢側である脊髄神経や坐骨神経の部分的軸索損傷モデルである。しかしながら、実際の臨床の場、特に整形外科領域においては椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症など、DRGよりも中枢側 (脊髄神経根、馬尾、あるいは脊髄自体など) が傷害されることによって坐骨神経痛が引き起こされることが多く、これら病態のメカニズム解明は遅れていると言わざるを得ない。

ミクログリアは20世紀初頭のRio Hortegaの記載以降、約1世紀の間存在は知られていたがその本態、機能は曖昧であった。ここ20年で急速に研究が進み、徐々にその機能が明らかになっている。神経系の細胞も免疫細胞と同様に活発にサイトカインを産生し、免疫系とは異なる特異なサイトカインネットワークを形成している。このネットワークの中心に位置するのがミクログリアである。ミクログリアは種々の病態下で活性化され、サイトカインをはじめとする様々な液性因子を産生し、神経系の細胞の機能を調節している。最近の研究から、グリア細胞が神経活動の調節にも積極的に関わっていることが示され、生体内でも様々な生理的役割あるいは疾患への関与が注目されている。実際に、神経因性疼痛モデルラットでは脊髄後角のグリア細胞、特にミクログリアに、細胞体の肥大化、突起の退縮、および細胞増殖など、活性化の典型的な形態変化が認められる。この活性化型ミクログリアにはP2X<sub>4</sub>の高濃度発現が認められ、P2X<sub>4</sub>受容体拮抗薬やアンチセンスによるP2X<sub>4</sub>タンパク質の減少によりアロディニアが抑制されることから、神経損傷により活性化したミクログリアが、P2X<sub>4</sub>受容体を介して、神経因性疼痛の発症維持に重要な役割を果たしていると考えられている。その後、P2X<sub>4</sub>受容体の他に、ケモカイン受容体のCCR2やCX<sub>3</sub>CR1、そしてTLR4などが、神経因性疼痛に重要なミクログリア分子として報告され、神経因性疼痛に対する脊髄ミクログリアの重要性が注目を集めている (下記論文参照)。

我々は脊髄後角のグリア細胞においてシグナル伝達分子の Src、ERK1/2、p38 MAPK、および ERK5 が活性化し、急性痛の発現や慢性痛の発現・維持に関与していることを報告してきた。さらに最近、脊髄ミクログリアにおいて炎症性サイトカインの一つである IL-18が増加し、この発現上昇がアストロサイトの活性化を介してアロディニアの形成に重要な役割を果たすことを見いだした。世界的にみても、グリア細胞に関する報告は過去にないペースで増加してきており、グリア細胞の活性化と痛みという分野がいかに注目されているかが伺われる。申請者は、従来から一次知覚ニューロンや脊髄後角における遺伝子発現の変化と慢性疼痛の病態との関連を追及しており、その成果は J. Neurotrauma や Pain 等の国際誌に発表してきた。今回の申請では整形外科外来で多く見られる椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症を想定した坐骨神経痛モデルを用いて、脊髄後角におけるシグナル伝達分子の活性化 (MAP kinaseを中心に) とグリア細胞自身の形態変化、あるいはグリア細胞における疼痛関連分子遺伝子の発現変化 (炎症性サイトカインを中心に)、さらには神経因性疼痛との関連を解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

### (1) リン酸化MAPKと炎症性サイトカインの脊髄後角やDRGニューロンにおける局在

椎間板ヘルニアモデルや腰部脊柱管狭窄症モデルなどの整形外科領域の坐骨神経痛モデルの脊髄後角やDRGにおいて、どのようなニューロンあるいはグリアで MAPK (ERK1/2、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5など) の活性化が生じるのかを詳細に同定する。また、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18) についても同様に、一次知覚ニューロンや脊髄後角を含めた中枢神経系における発現・分布を、免疫組織化学法、Western blotting法、In situ hybridization法、RT-PCR法を組み合わせることで詳細に調べる。

### (2) MAPK活性化阻害剤と炎症性サイトカインに対する中和抗体の疼痛関連動作に及ぼす影響

MAPK活性化阻害剤であるPD98059やU0126、SB203580やFR167653、およびSP600125を髄腔内投与し、疼痛関連動作 (hyperalgesia、

allodynia) とMAPK活性化との関連を調べる。また、炎症性サイトカイン (IL-18、IL-18 receptor、TNF $\alpha$ 、IL-1b、IL-6、IL-12) に対する中和抗体を髄腔内投与し、疼痛関連動作とサイトカイン発現変化との関連を明らかにする。

### (3) MAPK経路における上流、下流分子の決定、および二次ニューロンとの相互作用

MAPK の活性化がどのような炎症性サイトカインの発現を調節しているのか、すなわちMAPK の下流に存在する分子について、さらには MAPK を活性化させる上流の因子についても特定する。またこれら MAPK の活性化を伴った炎症性サイトカインの発現変化がどのようにして脊髄二次ニューロンの興奮性に影響を及ぼすのかについても詳細に検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 疼痛関連動作 (heat/cold hyperalgesia、mechanical allodynia) の確認

SD雄性ラットを用いて整形外科領域の坐骨神経痛モデルである椎間板ヘルニアモデル、および腰部脊柱管狭窄症モデルを作製し、疼痛関連動作 (thermal hyperalgesia、mechanical allodynia) や走行距離を経時的に観察、確認する。さらにDRGよりも末梢側の損傷モデルである脊髄神経切断 (SNL) モデルやCFAモデルなどの炎症性疼痛モデルについても比較検討する。

### (2) 脊髄後角、およびDRGにおけるリン酸化MAPK、炎症性サイトカインの増減の定量化

術後1、3、7、14、21日目にL5レベルの脊髄後角とL4/5DRGを摘出し、ERK1/2活性化の指標であるリン酸化ERK1/2 (p-ERK1/2)、IL-18に対する polyclonal 抗体を用いた免疫組織化学、およびWestern blottingを施行し、定量化を行う。その他のリン酸化MAPK (p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5) や炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-1b、IL-6、IL-12) に対しても同様の検討を行う。

### (3) 脊髄後角、およびDRGにおけるリン酸化MAPK、炎症性サイトカインの局在の同定

p-MAPK やIL-18がニューロンで増加しているのか、グリアで増加しているのかをニューロンのマーカーであるMAP2、NeuN、ミクログリアのマーカーであるIba1、OX42、およびアストロサイトのマーカーであるGFAPを用いてそれぞれ同定する。DRGニューロンの場合にはさらにNF200 との二重染色を行うことで

有髄線維を有する大型ニューロンか、あるいは無髄線維を有する小型ニューロンかを決定する。DRG グリアの場合にはGFAP との二重染色を行うことで衛星細胞での発現変化を確認する。

## 4. 研究成果

(1)疼痛関連動作 (heat/cold hyperalgesia、mechanical allodynia) の確認：SD 雄性ラットを用いて整形外科領域の坐骨神経痛モデルである神経根損傷モデルを作成し、疼痛関連動作 (thermal hyperalgesia、mechanical allodynia) を経時的に観察し、安定的に痛覚過敏を確認できるようになった。またDRGよりも末梢側の損傷モデルである脊髄神経切断 (SNL) モデルとの比較を行っている。

(2)脊髄後角におけるグリア細胞の活性化の確認：マイクログリアのマーカーであるIba-1、アストロサイトのGFAPの免疫組織化学法を施行した。両モデルにおいて、Iba-1、GFAPの上昇を確認することができ、特に前根損傷単独においてもグリア細胞の活性化が生じるという新しい発見があった。

(3)リン酸化MAPK、炎症性サイトカインの増減の定量化：術後1、3、7、14、21日目にL5レベルの脊髄後角を摘出し、ERK1/2 活性化の指標であるリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2)、IL-18 に対する polyclonal 抗体を用いた免疫組織化学を施行した結果、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) の有意な増加を確認した。

(4)アメリカとの共同研究において、下降性の疼痛促進経路においてニューロンとグリアのコミュニケーションが極めて重要である所見を発見し、J. Neurosci に発表した。

## 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5件)

- ①. Yamagiwa T, Fukunishi S, Tachibana T, Okamura H, Yoshiya S, Kashiwamura S. Abrogation of Treg function deteriorates rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2012 Feb;22(1):80-8 査読有  
DOI: 10.1007/s10165-011-0476-x
- ②. Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K. (2012) Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. Pain, 153:68-79. 査読

有

DOI: 10.1016/j.pain.2011.09.009

- ③. Gu M, Miyoshi K, Dubner R, Guo W, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F., (2011) Spinal 5-HT(3) receptor activation induces behavioral hypersensitivity via a neuronal-glial-neuronal signaling cascade. J. Neurosci., 31, 12823-12836. 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1564-11.2011

- ④. Narita M, Niikura K, Nanjo-Niikura K, Narita M, Furuya M, Yamashita A, Saeki M, Matsushima Y, Imai S, Shimizu T, Asato M, Kuzumaki N, Okutsu D, Miyoshi K, Suzuki M, Tsukiyama Y, Konno M, Yomiya K, Matoba M, Suzuki T. (2011) Sleep disturbances in a neuropathic pain-like condition in the mouse are associated with altered GABAergic transmission in the cingulate cortex. Pain, 152, 1358-1372. 査読有

DOI: 10.1016/j.pain.2011.02.016

- ⑤. Tachibana, T, Yokoi H, Kirita M, Marukawa S, Yoshiya S. (2009) Instability of the pelvic ring and injury severity can be predictors of death in patients with pelvic ring fracture: a retrospective study. J Orthop Traumatol, 10, 79-82. 査読有  
<http://www.springerlink.com/content/u22x253j75r31330/?MUD=MP>

[学会発表] (計 2 件)

- ① Miyoshi K, Noguchi K. Critical role for spinal IL-18/caspase-1 interaction in neuropathic pain development through its distinct regulation of interleukins. World Congress on PAIN. Montreal, Canada, 2010 年 8 月 30 日
- ② Tachibana T, Moriyama T, Okada F, Maruo K, Inoue S, Horinouchi Y, Yoshiya S. Box-designed interbody fusion cage with autologous cancellous bone graft versus autologous tricortical iliac crest bone graft without plate fixation in the cervical spine: a retrospective study. 26th Annual Meeting of the European Section of the Cervical Spine Research Society Corfu Island 2010 年 5 月 26 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橘 俊哉 (TACHIBANA TOSHIYA)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40299095

### (2) 研究分担者

三好 歓 (MIYOSHI KAN)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30454755

### (3) 連携研究者

なし