

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22600012

研究課題名（和文）末梢神経傷害後の脊髄マイクログリアで増加する P2Y 受容体の疼痛への関与

研究課題名（英文）Induction of P2Y receptors in the spinal cord following peripheral nerve injury.

研究代表者

柳本 富士雄 (YANAMOTO FUJIO)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40368543

研究成果の概要（和文）：

末梢神経の損傷により引き起こされる疼痛を神経障害性疼痛といい、難治性疼痛の一つとして知られている。神経障害性疼痛の病態として脊髄後角のマイクログリア関与することが近年明らかとなっており、マイクログリアの活性化要因の一つに ATP が関与することが多数報告されている。本研究では ATP 受容体である P2Y 受容体が神経障害性疼痛発生機序に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Peripheral nerve injury can trigger neurological abnormalities, including neuropathic pain. Recent evidence shows that glial cells in the spinal cord play important roles in the mechanisms of neuropathic pain. In this study, we show that microglial P2Y receptors activated by peripheral nerve injury may play a key role in the development of neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,002,000	4,402,000

研究分野：疼痛学

科研費の分科・細目：

キーワード：P2Y 受容体、神経障害性疼痛、脊髄後角、マイクログリア、ATP

## 1. 研究開始当初の背景

近年、侵害受容刺激の一つとして、ATP が注目されている。ATP 分子は生体内に広く分布し末梢組織の損傷や炎症時に細胞外へ ATP が放出された状態において痛みを引き起こす事が知られるようになった。細胞外液に存在するヌクレオチド・ヌクレオシド (ATP,

ADP, UTP, UDP 等) をアゴニストとする受容体が ATP 受容体である。ATP 受容体は rat では 7 種類のイオンチャンネル型 P2X (P2X1-7) 受容体と、7 種類の G タンパク質共役型 P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 12, 13, 14) 受容体がクローニングされている。一方、末梢神経が損傷されることで脊髄後角ではマイクログリアの活性化が起こり、これが神経傷害性疼痛の

発生に関与していることが、近年明らかとなってきている。中枢神経の疾患の病態の一部にマイクログリアが関与し、その誘因が ATP である可能性が示されており、疼痛伝達系の正常状態でヌクレオチド・ヌクレオシドが過剰に働いていることが予測された。これまでの研究で、活性化したマイクログリアには P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12 受容体の発現上昇が見られること、P2Y12 受容体がマイクログリアの形態変化に関与することが報告されている。特に、マイクログリアに発現増加する P2X4, P2X7, P2Y12 受容体は神経障害性疼痛にも関与することが知られているが、そのほかの ATP 受容体発現変化は不明であった。そのため神経障害性疼痛後をおこした後のマイクログリアにおいて P2Y 受容体の発現変化がみられるか、またそれら受容体の神経障害性疼痛への関与を検討した。

## 2. 研究の目的

### (1) 神経障害性疼痛モデルラットの脊髄における P2Y 受容体の発現変化を検討

naive ラットの脊髄における P2Y 受容体の発現パターンは過去に報告があるが、神経障害性疼痛で発現変化が見られるかどうか不明であるため、半定量的 RT-PCR 法、in situ hybridization histochemistry (ISHH) 法を用いて明らかにする。

### (2) 発現変化が見られた P2Y 受容体は疼痛発生機構に関与するか

神経障害性疼痛モデルを作成し、発現変化の見られた P2Y 受容体の antagonist や Locked nucleic acid (LNA) を含んだアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-LNA) を投与してその機能を阻害した状態で、疼痛行動の評価を行う。

### (3) P2Y 受容体発現誘導に関与するシグナル探索

末梢神経損傷後の脊髄マイクログリアでは Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの Extracellular signal - regulated kinase (ERK) 1/2 と p38 のリン酸化が起こることが知られている。この疼痛に

関与する MAPK シグナルをブロックすることで、神経障害性疼痛モデル作成後の P2Y 受容体の発現変化が抑えられるかを検討する。

## 3. 研究の方法

200-250 g の雄性 Sprague Dawley ラットを使用し、神経障害性疼痛モデルを作製した。神経障害性疼痛モデルは、ラットの坐骨神経の枝である総腓骨神経と脛骨神経を結紮し、切断した Spared nerve injury (SNI) モデルを使用した。

naive と SNI モデル作製 1, 3, 7, 14, 30 日後のラットより L4-5 脊髄を取り出し、半定量的 RT-PCR 法、in situ hybridization histochemistry (ISHH) 法を用いて発現解析を行った。また、発現細胞を同定するためにニューロンのマーカーである抗 Neu N 抗体、アストロサイトのマーカーである抗 GFAP 抗体、マイクログリアのマーカーである Iba1 抗体を用いて二重 ISHH-免疫組織化学法を行った。

発現変化の見られた P2Y 受容体の antagonist や AS-LNA を SNI モデルラット作製と同時に浸透圧ポンプを用いて持続的に 7 日間髄腔内投与を行い疼痛行動解析を行った。用いた antagonist は、P2Y6 受容体 antagonist の MRS2578、P2Y12 受容体 antagonist の MRS2395、P2Y13 受容体 antagonist の MRS2211、を使用した。疼痛行動解析には機械刺激閾値を計測するために dynamic plantar anesthesiometer を使用した。

また、SNI モデルを作製した rat に 2 種類の MAPK inhibitor (U0126, SB203580) を髄腔内投与することで、P2Y 受容体発現が抑制されるかを RT-PCR 法、ISHH 法にて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 神経障害性疼痛モデルラットの脊髄における P2Y 受容体の発現変化

SNI モデルラットの脊髄を半定量的 RT-PCR を行ったところ、これまでに報告のある P2Y12 受容体の他に P2Y6 受容体 mRNA, P2Y13 受容体 mRNA, P2Y14 受容体 mRNA が損傷後 3 日をピークに 2 週間まで有意な増加が見られ

た。これらの受容体 mRNA 発現を ISHH 法にて検討したところ、損傷側の脊髄において発現増加がみられた(図 1-3)。

図 1. 末梢神経損傷後の脊髄で発現増加する P2Y6 受容体 mRNA

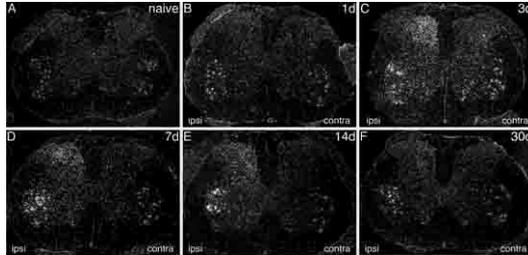


図 2. 末梢神経損傷後の脊髄で発現増加する P2Y13 受容体 mRNA

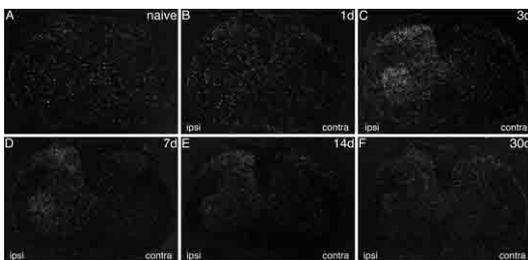
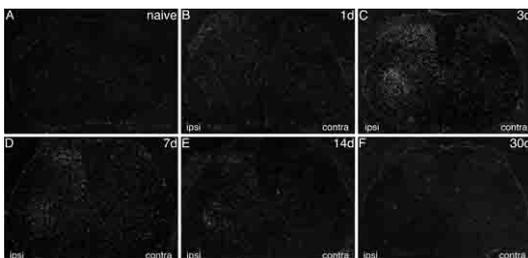


図 3. 末梢神経損傷後の脊髄で発現増加する P2Y14 受容体 mRNA



発現細胞を明らかにするために二重 ISHH-免疫組織化学法を用いて検討を行った。P2Y6 受容体は naive ラットの脊髄では一部の後角の neuron と motor neuron に発現しており、SNI モデル作製後にはマイクログリアと損傷した motor neuron で発現増加が見られた。P2Y13 受容体は naive でもマイクログリアにおいて発現が見られるが、SNI モデル作製後にマイクログリアで増加が見られた。P2Y14 受容体は naive ではほとんど検出されず、SNI モデル作製後にマイクログリアにおいて発

現上昇が見られた。これら受容体は astrocyte での発現は見られなかった。

(2) SNI モデル作製後に発現増加した P2Y 受容体は疼痛発生機構に関与するか

次に P2Y 受容体のアンタゴニストの薬理行動解析を行った。P2Y14 受容体の特異的な antagonist が存在しなかったため、AS-LNA を用いた。P2Y6 阻害剤の MRS2578、P2Y13 阻害剤の MRS2211、あるいは P2Y14 アンチセンスオリゴヌクレオチドを髄腔内に浸透圧ポンプを用いて持続的に投与を行い、疼痛関連動作を観察した。その結果、これらの薬剤で機械的アロディニアを抑制することができた。

さらに、これら受容体 antagonist を混合することでさらなる疼痛閾値の回復が見られるかを検討した。P2Y6 受容体 antagonist と P2Y12 受容体 antagonist と P2Y13 受容体 antagonist を混合し7日間投与を行ったところそれぞれの受容体 antagonist を投与したときより数日長く疼痛閾値の回復が見られた。これら受容体の働きを抑制することで疼痛閾値の改善が見られたことから、マイクログリアにおける P2Y 受容体群の発現増加により ATP/ADP/UTP/UDP-sugar に対する感受性の増大が神経障害性疼痛発生機序に関与していることが示唆された。

(3) P2Y 受容体発現誘導に関与するシグナル探索

最後に、どのようなシグナル伝達系を介してマイクログリアでこれらの P2Y 受容体が増加するかを調べる為に MAP kinase inhibitor を髄腔内投与した。末梢神経損傷モデル作成時に p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 と MEK inhibitor である U0126 を3日間浸透圧ポンプを用いて持続的に投与したところ、p38 MAP kinase 阻害剤投与群において P2Y6、P2Y13 受容体、P2Y14 受容体のマイクログリアでの発現増加を抑制するが、P2Y12 や Iba1 の発現増加には抑制効果がないことを明らかにした。また、U0126 投与群では全ての受容体で抑制効果が見られなかった。これらのことから神経障害性疼痛が形成される初期段階で p38 MAP kinase の阻害により P2Y6、

13, 14 受容体の発現増加が抑制される為、マイクログリアのATP感受性が減少することで疼痛行動が改善されることが示唆される。

## 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 Kobayashi K, Yamanaka H, Yanamoto F, Okubo M, Noguchi K. Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia* 査読有り 2012;60:1529-39 DOI 10.1002/glia.22373

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳本 富士雄 (YANAMOTO FUJIO)  
神戸大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40368543

### (2) 研究分担者

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

森山 萬秀 (MORIYAMA KAZUHIDE)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30301659