

## 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 05 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791429

研究課題名（和文）脊髄内酸素メタボリズムがつくる微小環境の神経因性疼痛の成立への関与  
 研究課題名（英文）Involvement of microenvironment constituted by intra-spinal oxygen metabolism in establishment of neuropathic pain

研究代表者

若松 拓彦（WAKAMATSU KAKUHIKO）

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：20551451

研究成果の概要（和文）：

脊髄レベルでの神経因性疼痛の成立に重要な役割を果たしている脊髄マクログリア細胞（microglia）を研究の対象に選び、その活性化の機序をグリアの活動の”場”である脊髄内の酸素代謝、微小レドックス環境と関連つけて検討した。その結果、マクログリアにおいてその活性化に伴う神経因性疼痛関連の遺伝子発現誘導が酸素分圧により調整されていることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In response to activation of microglia, HIF-1 activation and expression of genes, which play essential roles in neuropathic pain, are observed under 20% conditions. In particular, LPS and ATP induced P2X4 expression, which is most strongly related to neuropathic pain development than P2X7, under 20% O<sub>2</sub> conditions and much more induce under 1% O<sub>2</sub> conditions. These findings suggest that redox environment caused by micro oxygen environment in spinal cord may affect activation of microglia and gene expression involved in 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	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：慢性疼痛，麻酔科学，低酸素応答，マクログリア，神経因性疼痛

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛の基礎研究においてマイクログリア細胞の果たす役割が最近精力的に追究されている。炎症性サイトカインがマイクログリアの活性化に重要な役割を果たしているという報告が相次いでいる。しかし一方、末梢での神経障害や炎症がいかなる分子機序でマイクログリアの活性化をもたらすかについての知見は未だ乏しく質・量ともに不十分である。マクロファージの活性化における酸素代謝の役割についての報告がある[5]。単球がマクロファージに分化する過程において、エネルギー代謝経路の転換が起る。つまりマクロファージの活動の”場”が血液内から組織間質に移行することに対応して、ミトコンドリアでの電子伝達系を用いた ATP 産生経路から解糖系主体の産生機構へと転換しているが、このスイッチに転写因子である低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) が必須の役割を担っている。脊髄内マイクログリアの活性化において脊髄内微小酸素環境が作り出すレドックス環境が重要な役割を果たして神経因性疼痛関連の遺伝子発現調節の基盤環境を提供しているという仮説を着想した。

### 2. 研究の目的

脊髄レベルでの神経因性疼痛の成立に重要な役割を果たしている脊髄マイクログリア細胞(microglia)を研究の対象に選び、その活性化の機序をグリアの活動の”場”である脊

髄内の酸素代謝、微小レドックス環境と関連つけて検討することにより、脊髄マイクログリア細胞の活性化における脊髄内レドックス環境が痛覚過敏症、異痛症などの成立に果たす役割を明らかにして治療への端緒をつかむことを目的としていた。

### 3. 研究の方法

本研究は以下に掲げた大きな三つの実験系で構成された。

#### (1) 培養マイクログリアを用いた実験系

細胞生物学的、分子生物学的な手法を用いマイクログリアの活性化、神経因性疼痛関連の遺伝子発現の分子機構の解明の目的

#### (2) 実験小動物を用いた疼痛評価実験系

神経障害モデル、炎症モデルを構築し、マイクログリアの活性化状況を疼痛評価とあわせて遺伝子・薬剤処理を施したマイクログリアの脊髄内への導入を行い疼痛評価を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養マイクログリアを用いた実験

マイクログリア由来の樹立細胞株を用いた実験系を確立した。

① マイクログリアの活性化の検討は、toll-like receptor,カンナビノイド受容体に加えてインテグリンなどの接着因子の細胞表面での発現、接着能、貪食能を指標にした。活性化因子としては、ATP、炎症性サイトカイン、レチノ

イン酸を用いる。単球-マクロファージの分化活性化との類似性を視野にいれて、ホルボールエステル(PMA),活性化型ビタミンDを用いて検討した。この結果、マイクログリアの活性化にともない細胞内レドックス調整転写因子HIF-1の活性化が起こる事を見いだした。

②. マイクログリアの活性化の前後で、酸素消費量、代謝経路の変化を検討する。酸素消費量はクラーク電極を用いた機器を用いて行い、細胞内ATP、lactate, pyruvate含有を測定する実験系を確立した。さらにグルコーストランスポーター、各種解糖系酵素の発現量をアッセイする実験系を確立して予備的な実験結果を得た。

マイクログリアの活性化の前後で、酸素消費量、代謝経路の変化を検討した。酸素消費量はクラーク電極を用いた機器を用いて行い、細胞内ATP、lactate, pyruvate含有を測定する実験系を確立した。さらにグルコーストランスポーター、各種解糖系酵素の発現量をアッセイする実験系を確立して実験結果を得た。低酸素誘導性遺伝子発現ならびに神経因性疼痛関連遺伝子(purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4 (P2X4), purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 7 (P2X7), brain derived neurotrophic factor (BDNF))発現はともに 20%酸素下において LPS, PMA、ATP の活性化刺激により増加し、1%酸素下ではさらに増加した。

(2) 慢性疼痛モデルをラットを作成してマイクログリアの活性化を評価する実験系の立ち上げに着手してHIF-1の活性化を示唆する研究結果を得た。

## 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3件)

① Daijo, H., Kai, S., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Kishimoto, S., Suzuki, K., Harada, H., Takabuchi, S., Adachi, T., Fukuda, K., Hirota, K. (2011). Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice under non-hypoxic conditions in a mu-opioid receptor-dependent manner. *European journal of pharmacology* 667, 144-152. (査読有り) DOI:10.1016/j.ejphar.2011.06.014

② Tanaka, T., Wakamatsu, T., Daijo, H., Oda, S., Kai, S., Adachi, T., Kizaka-Kondoh, S., Fukuda, K., and Hirota, K. (2010). Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 298, R661-671. (査読有り) DOI:10.1152/ajpregu.00732.2009.

③ Tanaka, T., Takabuchi, S., Nishi, K., Oda, S., Wakamatsu, T., Daijo, H., Fukuda, K., and Hirota, K. (2010). The intravenous

anesthetic propofol inhibits  
lipopolysaccharide-induced  
hypoxia-inducible factor 1 activation and  
suppresses the glucose metabolism in  
macrophages. J Anesth 24, 54-60.(査読有り)  
DOI: 10.1007/s00540-009-0829-1

[学会発表] (計 1 件)

① Fentanyl activates hypoxia-inducible  
factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice  
under non-hypoxic conditions in a  $\mu$ -opioid  
receptor-dependent manner

H. Daijo, K. Hirota, S. Kai<sup>1</sup>, T. Matsuyama,  
K. Suzuki T. Tanaka, T. Wakamatsu, K.  
Fukuda  
2011 Annual Meeting, American Society of  
Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/15

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若松 拓彦 (WAKAMATSU TAKUHIKO)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号 : 20551451

