

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790287

研究課題名(和文) 生薬ブシの神経障害性疼痛治療メカニズムの in vivo イメージング解析

研究課題名(英文) Analysis of therapeutic mechanisms of Bushi by using in vivo imaging

研究代表者

柴田 圭輔 (SHIBATA, Keisuke)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：50580411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生きた動物の大脳皮質体性感覚野(S1)のグリア細胞機能を、二光子励起レーザー顕微鏡を用いて径的に解析し、神経障害性疼痛の分子病態に果たすグリア細胞の役割を検討した。坐骨神経結紮術(SNL)により、(1) S1アストロサイトの機能が亢進すること(自発的細胞内Ca²⁺振動の陽性細胞数増加及び頻度上昇)、(2) S1アストロサイトで受容体Xの再発現が起こること、(3) 神経障害性疼痛が(1)及び(2)に依存的事であること、が明らかとなった。S1アストロサイトの活動亢進とそれに続く細胞イベントが、神経障害性疼痛の分子病態や慢性化と関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify an involvement of glial functions in the somatosensory cortex (S1) in the pathogenesis of neuropathic pain. Using in vivo 2 photon microscopy, I investigated chronologic time-courses of Ca²⁺ activities in S1 cortical astrocytes both in control and neuropathic pain model animals (SNL; spinal nerve ligation), in parallel with pain behaviors (allodynia). I found that (1) Ca²⁺ activities in S1 cortex was enhanced by SNL, (2) receptor X was re-awaken in S1 astrocytes, and (3) neuropathic pain was dependent on both (1) and (2). These data strongly suggest that abnormal Ca²⁺ activities in S1 astrocytes, and subsequent events should be involved in the cause or the development of neuropathic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経障害性疼痛 in vivo イメージング グリア細胞 一次体性感覚野 生薬・漢方薬

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は警告系という“痛み”本来の意味を失った痛みが慢性的に続く疾患である。特徴的な症状にアロディニア（単なる触刺激を激しい痛みとして感じる症状）があり、罹患患者の日常生活が大きく脅かされている。また、その苦痛が引き金となり、不眠やうつ病等の疾患を合併する患者も少なくない。早急な除痛が望まれるが、その一方で、モルヒネ等の強力な麻薬性鎮痛薬でさえ奏功しないことも多く、治療に苦慮している現状である。このように本疾患の分子病態解明と新規治療薬開発は喫緊の課題である。

2003年、脳・脊髄の情報処理・発信の根幹を成す『ニューロン-グリア細胞連関』の異常が本疾患の原因であることが津田らによって証明されたことを皮切りに (Tsuda et al., *Nature*, 2003)、本疾患におけるグリア細胞の関与が次々と報告されている。著者は、疾患時のグリア細胞の形態及び機能変化を *in vivo* でダイナミックに捉える必要性、また *in situ* で細胞間相互作用を保ったまま経時的にグリア機能を解析する必要性を感じ、生きた個体レベルでの脳・脊髄内グリア細胞の機能・形態解析が、本疾患の病態解明を目指す上で重要な役割を担うと考えた。しかし、当時は脳・脊髄組織へのアプローチの煩雑さ及び不安定さ等の理由により、脳・脊髄グリア細胞の機能・形態を *in vivo* で捉える方法はほとんど確立されておらず、グリア細胞の機能異常の時・空間的解析及び疼痛行動との関連性の解析は全く行われていなかった。

2. 研究の目的

低侵襲的で組織深部の構造物を観察することができる2光子励起レーザー顕微鏡を用いて、生きたマウスの脳・脊髄をイメージングし、グリア細胞機能変調と神経障害性疼痛の関連性を時・空間的に解析することを目的とした。また、神経障害性疼痛に有効な生薬ブシ末の鎮痛作用メカニズム解明にグリア細胞機能改善が関与するか否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 病態モデルマウスの作成

マウス右側後肢坐骨神経を露出し、神経束を半周のみ強固に結紮 (SNL) して神経障害性疼痛病態モデルを作成した。当モデルマウスは手術直後から一週間程かけて徐々に疼痛スコアが上昇し、その後疼痛閾値のピークが持続することが知られている。本実験では、手術前 (無処置) 及び手術後の疼痛形成期 (手術後 1-7 日まで) および疼痛慢性期 (手術後 7 日以降) の病態モデルマウスの、右側後肢からの知覚情報の到達点である左脳一次体性感覚野 (S1) に着目し、アストロサイトの細胞内カルシウムイメージングを行った。

(2) 2光子励起レーザー顕微鏡を用いたア

ストロサイトの細胞内カルシウムイメージング

作製した病態モデルマウスを麻酔し、左 S1 領域の頭蓋骨を丁寧に除去し、観察窓を作製した。その後、アストロサイトに比較的選択的に取り込まれる Ca^{2+} 蛍光指示薬 (Fluo-4) を微量注入 (10 μ l, 10 min) し、カバーガラスで蓋をした。アストロサイト選択性は SR101 により確認した。S1 アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 動態の観察は、フェムト秒レーザー (波長 930nm) を用い、脳表から 50-80 μ m の深さを限定的に 2光子励起することにより行った。また観察中は、ヒートパッドを用いて体温を一定 (37°C) に保持し、長時間の安定なイメージングを心掛けた。

4. 研究成果

(1) 病態モデルマウスでは S1 アストロサイトが機能亢進している。

先ず始めに、SNL 手術前 (Pre) 及び手術後 5 日目 (SNLd5)、12 日目 (SNLd12) のマウスの、S1 アストロサイトの自発的細胞内カルシウム振動をイメージングし、その陽性細胞数及び頻度を比較した (図 1 A-C は代表例)。その結果、自発的細胞内 Ca^{2+} 振動の陽性細胞数は、Pre 群では $31.7 \pm 7.7\%$ であったのに対し、SNLd5 群では $78.3 \pm 5.1\%$ 、SNLd12 群では $84.0 \pm 3.9\%$ に増加していた (図 1D)。また、自発的細胞内 Ca^{2+} 振動頻度は、Pre 群では 1.3 ± 0.2 times/10 min であったのに対し、SNLd5 群では 2.8 ± 0.1 times/10 min、SNLd12 群では 3.2 ± 0.1 times/10 min に増加していた (図 1E)。以上の結果より、SNL 手術によって S1 アストロサイトの自発的細胞内 Ca^{2+} 振動は増加する、即ち、病態モデルマウスの S1 アストロサイトは機能亢進していることが明らかとなった。

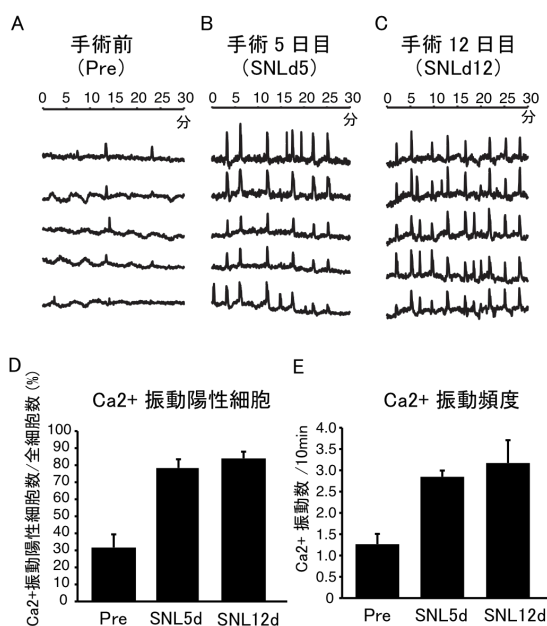


図1. 病態モデルマウスにおける S1 アストロサイトの自発的細胞内 Ca^{2+} 振動

(2) 病態モデルマウスの S1 アストロサイトに受容体 X が再発現していた。

次に、SNL 手術による S1 アストロサイトの機能亢進に関連する発現分子の変化について検討した。これまでに *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いた検討から、SNL 手術により S1 領域で液性因子 Y 及び Z の放出量が増加することを明らかとしている。そこで、2 光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法を用いて、SNL 手術 3 日後 (SNLd3) のマウスの S1 領域に液性因子 Y 及び液性因子 Z を直接処置したときのアストロサイトにおける Ca^{2+} 応答を観察した。先ず、液性因子 Y を処置したところ、一部を除き、殆どのアストロサイトが Ca^{2+} 応答を示さなかった (図示さず)。一方、液性因子 Z を処置したところ、多くのアストロサイトが Ca^{2+} 応答を示した (図示さず)。興味深いことに、液性因子 Z 受容体サブクラスの 一つである受容体 X に対するアゴニストを処置したところ、 55.5 ± 2.6 % のアストロサイトが Ca^{2+} 応答を示した (図 2)。受容体 X は、アストロサイトにおいては発達期には高発現するが、成熟期には殆ど発現しないことが報告されている。実際

に、手術前のマウスでは受容体 X に対するアゴニストを処置しても殆どのアストロサイトで Ca^{2+} 応答は起こらなかった。即ち、この結果から、SNL 手術によって S1 アストロサイトに受容体 X が再び発現し機能することが明らかとなった。これまでも、物理的に傷害された成熟脳の傷害周辺部位ではアストロサイトに受容体 X が発現し機能することが報告されている。こうしたアストロサイトにおける受容体 X の再発現は、物理的障害や機能異常といった突然の異変に対応する為に必要な機構であると考えられる。現在、アストロサイトにおける受容体 X の再発現メカニズムについて研究を開始している。

(受容体 X、液性因子 Y 及び Z の具体的な記載は、特許出願中・論文作成中のため、伏せ字とした)

(3) 生薬ブシ末の鎮痛メカニズム解明

研究代表者は、生薬ブシ末が、神経障害性疼痛に対して非常に強い鎮痛効果を有し、その薬理作用の 1 つが脊髄アストロサイトの活性化抑制であることを見出した (Shibata et al., 2011)。*In vivo* S1 アストロサイトカルシウムイメージング法を用い、病態モデルマウスの形成期及び維持期の S1 の異常カルシウム変動に対する生薬ブシ末の作用を検討中である。ブシ末はアストロサイト標的薬である可能性があり、本研究により S1 アストロサイトの制御と、神経障害性疼痛抑制作用との関連性が明らかとなることが期待出来る。

以上、本研究により、SNL 手術によって① S1 アストロサイトに機能亢進 (自発的細胞内 Ca^{2+} 振動の陽性細胞数増加及び頻度上昇) が起こること、② S1 アストロサイトにおける受容体 X の再発現が起こること、が明らかとなった。こうした S1 グリア細胞の機能変化が、疼痛慢性化や痛覚伝達異常を引き起こす原因となると考えられる。

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) Keisuke Shibata, Takeshi Sugawara T, Kayoko Fujishita, Youichi Shinozaki, Takashi Matsukawa, Tsutomu Suzuki, Schuichi Koizumi. The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice *PLoS One*. 2011;6(8):e23510. Epub 2011 Aug 18 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1) 柴田圭輔、菅原健、藤下加代子、篠崎陽一、鈴木勉、小泉修一
生薬ブシ末は活性化アストロサイトを抑制して慢性化した神経障害性疼痛を緩解する
第 14 回応用薬理シンポジウム、2012 年 9 月

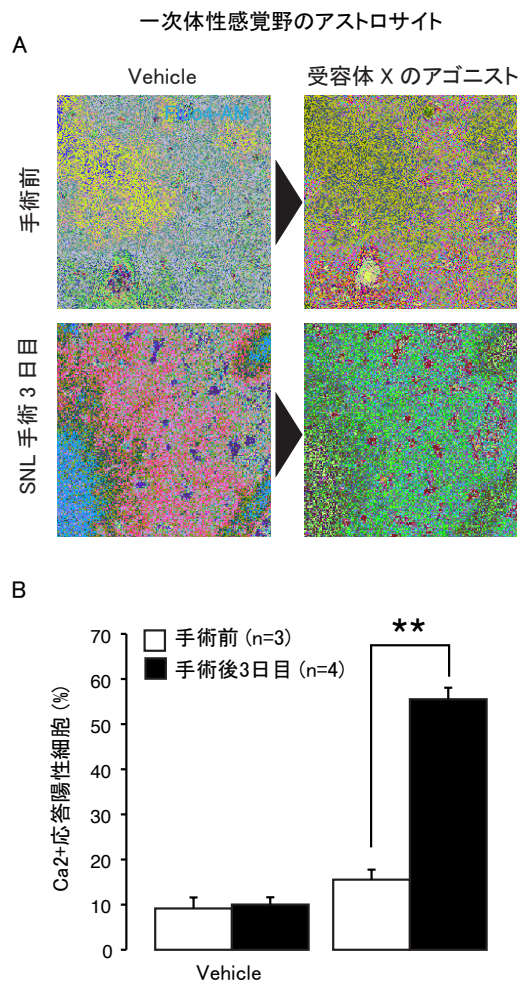


図 2. 受容体 X のアゴニストを処置したときの S1 アストロサイトの Ca^{2+} 応答

3-4 日、山梨 ベルクラシック甲府

2) 柴田圭輔

神経障害性疼痛におけるグリア細胞の役割
と生薬ブシ末の鎮痛メカニズム

日本東洋医学会 関東甲信越支部 山梨県部
会(口頭発表、招待講演)、2012年1月28日、
山梨 玉穂ふれあい診療所

3) Keisuke Shibata, Takeshi Sugawara, Kayoko
Fujishita, Youichi Shinozaki, Takashi Matsukawa,
Tutomu Suzuki and Schuichi Koizumi

The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the
neuropathic pain in mice

Neuroscience 2011, November, 12-16th, 2011,
Washington D.C

4) Keisuke Shibata, Takeshi Sugawara, Kayoko
Fujishita, Youichi Shinozaki, Takashi Matsukawa,
Tutomu Suzuki and Schuichi Koizumi

The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the
neuropathic pain (Oral presentation)

第34回日本神経科学大会、2011年9月14-17
日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 圭輔 (SHIBATA Keisuke)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：50580411