

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790646

研究課題名（和文） グリア細胞の遠隔活性化に着目した慢性疼痛発現メカニズムの解明とその治療法の確立

研究課題名（英文） Investigation of the mechanisms and curatives for chronic pain based on the remote activation of supraspinal glial cells.

研究代表者

大澤 匡弘 (OHSAWA MASAHIRO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80369173

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛の中でも神経の損傷に伴う痛みである神経障害性疼痛は、既存の鎮痛薬では緩和することが難しい疼痛の一つである。本研究では神経障害性疼痛モデルを作製し、大脳における神経系機能の亢進について検討を行い、その調節による疼痛緩和の可能性について検討を行った。神経障害性疼痛モデルマウスにみられた痛覚過敏は、神経伝達物質の放出を抑制するガバペンチンにより改善した。このガバペンチンの効果は、神経障害後3日間の処置でみられたが、神経障害による痛覚過敏が出現してからの処置では改善しなかった。このことから、ガバペンチンは大脳へ作用して神経障害による痛覚過敏の形成を抑制することが明らかになった。次に大脳における神経系細胞の機能変化について検討を行った。大脳の帯状回皮質においてミクログリアならびにアストロサイトの活性化が認められた。また、ミクログリアの活性化を調節する薬物であるミノサイクリンを帯状回皮質へ処置すると神経障害による痛覚閾値の低下が抑制された。このことから帯状回皮質におけるミクログリアの活性化は神経障害による痛覚過敏の発現に関与することが明らかになった。また、ミクログリアの抑制は、アストロサイトの活性化も抑えた。さらに、興奮性の神経伝達に関わるグルタミン酸神経の受容体機能の神経障害による亢進も、ミノサイクリンにより改善した。これらのことから、神経障害により帯状回皮質においてミクログリアが活性化し、この脳領域での興奮性神経伝達を亢進させるため、痛覚過敏が生じていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Neuropathic pain that results from the nerve injury is the chronic pain that is hard to treat with analgesics. The present study was designed to reveal the supraspinal mechanisms of neuropathic pain using partial sciatic nerve-ligated mouse model. The mechanical hyperalgesia in nerve-ligated mice were reversed by the preemptive, but not postinjury, administration of L-type calcium channel $\alpha 2\delta$ subunit blocker gabapentin. It is suggested that centrally administered gabapentin attenuates the development, but not maintenance of neuropathic pain. In the next, we examined the expression of neuronal cells in several brain regions. We observed that the expressions of Iba-1 that is a marker of microglia and GFAP that is a marker of astrocyte were increased in the anterior cingulate cortex (ACC). Intra-ACC treatment with microglial inhibitor minocycline attenuated the hyperalgesia in nerve-ligated mice, suggesting that the activation of microglia in the ACC is involved in the expression of hyperalgesia in neuropathic pain. Moreover, inhibition of the ACC microglia also attenuate the activation of astrocytes. Furthermore, the increased phosphorylation of AMPA receptor subunit GluA1 at ser831 in nerve-ligation is attenuated by the intra-ACC treatment with minocycline. Therefore, it is possible that the ACC microglial activation in nerve-ligation is involved in the neuropathic pain, which is mediated by the enhanced glutamatergic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：慢性疼痛、帯状回皮質、ミクログリア、神経障害、ミノサイクリン、アストロサイト、視床

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は、患者にとっても医療者にとっても大変悩ましい問題である。慢性疼痛の中でも、神経損傷による持続的な痛覚の入力による神経障害性疼痛は、その治療法がほとんどないためその開発が急務である。神経障害性疼痛は、脊髄における神経系細胞の機能変化による痛覚伝達亢進が原因であると考えられている。しかしながら、多くの研究が展開されているにも関わらず、その知見は断片的で病態生理が系統立てて明らかにされていないため、治療法まで到達していない。

最近の研究結果から、脊髄だけではなく脳内においても神経系細胞の機能が変化していることが報告されている。特に脊髄からの痛覚情報の中継点である視床での神経細胞の可塑的变化が慢性疼痛の発現に関与すると考えられている。

神経系細胞のうちアストロサイトやミクログリアは損傷を受けた神経組織の修復を目的として集積する。脊髄損傷モデルでは、損傷部位だけではなく、少し離れた場所においてもミクログリア細胞の集積がみられる。このような損傷部位から離れた部位でのグリア細胞の活性化は remote activation (遠隔活性) とよばれ、脊髄損傷の際にみられる痛覚過敏の原因として最近注目されている。

申請者のこれまでの研究から、大脳におけるグルタミン酸神経系の活性化により、長時間持続する痛覚閾値の低下(痛覚過敏)がみられることを発見した。また、痛覚過敏の動物モデルである糖尿病マウスの視床へグルタミン酸受容体拮抗薬を処置すると、痛覚過敏やアロディニアといった感覚異常が改善することも見出した。これらのことは、大脳におけるグルタミン酸神経系の活性化が痛覚過敏やアロディニアといった感覚異常を引き起こしていることを示唆している。

2. 研究の目的

これらのことから、本申請では、神経障害時における脳内での神経系細胞の機能変化ならびに神経伝達の変化と、それらの痛覚過敏発現に対する関与を明らかにするため、行動学的、生化学的ならびに免疫組織化学的な手法による多角的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物

実験には5週齢の ddY 系雄性マウスを使用した。飼育環境は 23±2℃、50±10%に維持しており、12時間の明暗サイクル(点灯 6:00、消灯 18:00)に設定した。

(2) 神経障害性モデルの作成

ペントバルビタール(60 mg/kg, i.p.)により麻酔したマウスの坐骨神経を露出し、坐骨神経の半分から 1/3 を部分的に結紮して作製した。

(3) 脳内微量注入

マウスをペントバルビタール(60 mg/kg, i.p.)麻酔下にて脳定位固定し、歯科用ドリルを用いて片側帯状回皮質直上の頭蓋骨に穴を開けた。インジェクション用ガイドカニューレを挿入し、歯科用セメントにて頭蓋骨に固定した。4日間の回復期間のあとに、実験に用いた。

ミクログリアの抑制作用を有するミノサイクリンを帯状回皮質へ微量注入後、行動解析を行った。

(4) 行動解析

圧刺激に対する反応閾値は von Frey filament を用いて測定した。マウスの足蹠へ太さの異なるフィラメントを押し当て、逃避行動が認められる重さ (g) から評価を行った。

(5) 生化学的解析

神経結紮 14日後に、マウスの帯状回皮質を摘出し、Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) 緩衝液にて組織抽出液を作成し試料とした。AMPA 受容体サブユニット GluA1、GluA2 及びそのリン酸化、ならびにコフィリンに対する抗体を用いたウェスタンブロット法により、それぞれのタンパク質発現を評価した。

(6) 免疫組織学的解析

神経結紮 14日後に、マウスを経心的に灌流固定し、帯状回皮質を含む脳部位の薄切切片(8µm)を作成した。この切片を各種神経系細胞マーカータンパク質に対する特異抗体

と反応させた。蛍光標識した二次抗体と反応させ、各細胞の形態ならびに発現を蛍光顕微鏡により測定した。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスにみられる痛覚過敏に対するガバペンチンの効果

圧刺激に対する反応閾値は、Sham 手術群と比較して坐骨神経部分結紮において有意に低下していた。この痛覚過敏はカルシウムチャンネル $\alpha 2 \delta$ サブユニットの阻害薬であるガバペンチンを、坐骨神経部分結紮後より 6 日間、脳室内へ処置することで抑制された (Fig.1)。一方、痛覚過敏が形成される坐骨神経部分結紮 7 日目にガバペンチンを脳室内へ処置しても、痛覚過敏に有意な影響は認められなかった。次に、ガバペンチンを坐骨神経部分結紮後から 3 日間処置し、痛覚閾値への影

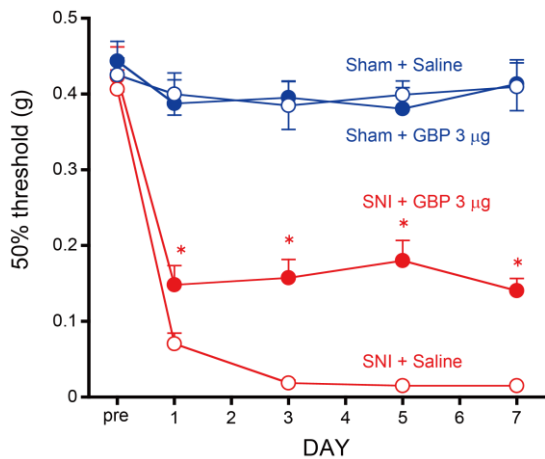


Fig.1. Effect of gabapentin (GBP; 3 mg, i.c.v.) on the mechanical threshold in nerve-ligated and sham-operated mice. GBP was injected intracerebroventricularly once a day after the behavioral test for six days. Each point represents the mean with S.E.M. for 10 mice per group. Where error bars are not visible, they are smaller than the symbol. * $P < 0.05$ vs. saline-treated sham (open blue circle) group (Student's two-tailed t-test).

響を評価したところ、神経障害による痛覚過敏は抑制されたが、神経障害が形成される 4 日目から 3 日間処置しても、痛覚過敏に有意な影響は認められなかった。このことから、ガバペンチンは脳内において痛覚過敏の形成にかかわっていることが示唆された。

(2) 神経障害性疼痛モデルマウスの脳内における神経系細胞の発現変化

脳内における神経系細胞の発現変化について免疫組織化学的方法を用いて検討を行った。

坐骨神経部分結紮マウスの帯状回皮質に

おいて、ミクログリア細胞の発現が上昇しており、活性型であるアメボイド型のミクログリア細胞が認められた (Fig.2)。Sham 手術群では、ミクログリア細胞の発現は認められたものの、坐骨神経部分結紮群と比較して発現量は低かった。また、アストロサイトの発現も坐骨神経部分結紮モデルマウスにおいて shams 手術群と比較して上昇していた。

(3) 神経障害性疼痛モデルマウスにおける痛覚過敏に対するミノサイクリンの効果

神経障害による痛覚過敏発現における帯状回皮質におけるミクログリアおよびアストロサイトの活性化の関与を明らかにするため、ミクログリアの機能を抑制するミノサイクリンの効果を検討した。

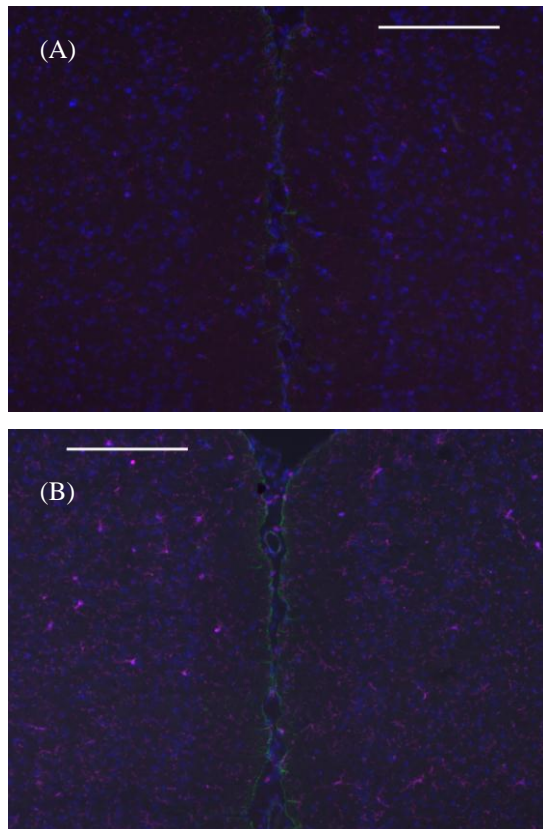


Fig.2. Expression of microglial marker Iba-1 (pink) in the anterior cingulate cortex (ACC) of sham-operated (A) and nerve-ligated (B) mice. Iba-1 immunoreactivity was increased in the ACC of nerve-ligated mice as compared with sham-operated mice.

坐骨神経部分結紮により認められた痛覚過敏は、坐骨神経部分結紮後より 14 日間、ミノサイクリンを腹腔内処置することで抑制された。また、ミノサイクリンの脳室内処置によっても同様に痛覚過敏が抑制された。また、ミノサイクリンを帯状回皮質へ微量注入することによっても、坐骨神経部分結紮による痛覚過敏は抑制された (Fig.3)。

次に、坐骨神経部分結紮による帯状回皮質でのミクログリア細胞の発現変化に対するミノサイクリンの効果を検討した。ミノサイクリンを、坐骨神経部分結紮後より14日間、腹腔内へ処置することで、帯状回皮質におけるミクログリア細胞の発現上昇は抑制された。また、アストロサイトの発現上昇も同様に、ミノサイクリンの腹腔内処置により認められなくなった。

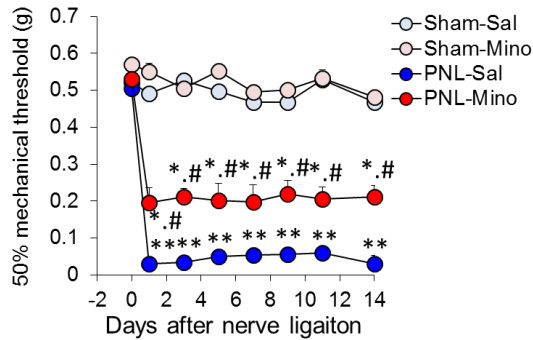


Fig.3. Effect of intra-anterior cingulate cortex (ACC) administration of minocycline on the mechanical allodynia in nerve-ligated (PNL) mice. Minocycline (5mg) or saline (0.5ml) administration was initiated just after the nerve-ligation. *P<0.05, **p<0.01 vs. respective sham-operated group. #P<0.05 vs. saline-treated PNL group.

(4) 神経障害性疼痛モデルマウスの帯状回皮質における興奮性神経伝達の変化

帯状回皮質におけるグルタミン酸 AMPA 受容体サブユニットである GluA1 の発現量に有意な変化は認められなかった。しかし、リン酸化 GluA1 の発現量は、Sham 手術群と比較して坐骨神経部分結紮群において有意に上昇していた。

坐骨神経部分結紮によりみられた帯状回皮質における GluA1 のリン酸化亢進は、ミノサイクリンを腹腔内へ処置することで、有意に抑制された。また、GluA1 の発現パターンを免疫組織化学的に解析したところ、Sham 手術群および坐骨神経部分結紮群の両群において違いはみられなかった。

(5) 神経障害性疼痛モデルマウスの帯状回皮質におけるコフィリンタンパク質発現の検討

坐骨神経部分結紮により、帯状回皮質におけるコフィリンタンパク質の発現に変化は認められなかったが、リン酸化コフィリン

タンパク質の発現は有意に上昇した(Fig.4)。このリン酸化コフィリンタンパク質の上昇は、ミノサイクリンを腹腔内処置することで、抑制された。

(6) 考察

本申請の研究結果から、坐骨神経部分結紮により生じる圧刺激に対する反応閾値の低下(痛覚過敏)は、脳内における興奮性神経伝達の亢進が関与していることが明らかになった。特に、感情の形成や処理、学習と記憶にかかわりが深い脳領域である帯状回皮質における神経伝達の亢進が一部関与して

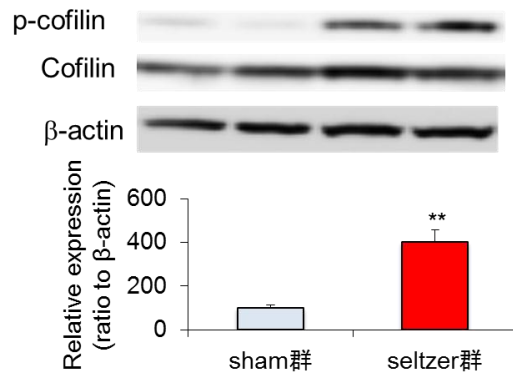


Fig.4. Expression of phosphorylated and total cofilin in the anterior cingulate cortex (ACC) in nerve-ligated and sham-operated mice. Upper panel: Representative immunoblots showing the amount of phosphorylated and total cofilin from the spinal cord of nerve-ligated and sham-operated mice. B: Quantitative densitometric analysis of phosphorylated cofilin/total cofilin ratio normalized to the sham-operated group. Each column represents the mean with S.E.M. of 5 independent experiment. **P<0.01 vs. sham-operated group.

いることが示された。また、坐骨神経部分結紮により帯状回皮質においてミクログリア細胞の活性化が起こり、この活性化が興奮性神経伝達の亢進に関与していることも示された。

痛み刺激は、末梢の感覚神経から脊髄を経て、大脳へ伝えられる。これまでの膨大な研究成果から、神経の障害などにより持続的な痛み刺激が脊髄へ入力すると、神経伝達の可塑的な変化が生じ、痛覚過敏が引き起こされることが明らかになっている。大脳においても、痛み刺激が持続的に入力すると神経伝達の可塑的な変化が生じることは示されていた。これまでの解剖学的解析から、脊髄へ伝わった痛覚情報は、脊髄視床路と呼ばれる、視床へ入力する神経により伝えられ、大脳皮質体

性感覚野にて疼痛として認識されると考えられていた。しかし、最近の報告(Todd AJ, Nat Rev Neurosci, 2010)から、脊髄後角第1層から2層に細胞体が存在する神経のほとんどは、外側結合腕傍核へ入力し、視床へ入力している神経は非常に少数であることが示された。外側結合腕傍核は扁桃体に入力する神経細胞の細胞体が存在し、扁桃体からは帯状回皮質へ密に入力があることが知られている。本研究結果も、この解剖学的結果を裏付けるように、坐骨神経部分結紮により、帯状回皮質でのミクログリア細胞の活性化が生じることを明らかにした。

坐骨神経部分結紮による痛覚過敏に対する帯状回皮質におけるミクログリア細胞の活性化の関与を明らかにするため、ミノサイクリンを用いて検討を行った。ミノサイクリンは、さまざまな実験においてミクログリアの抑制薬として用いられている化合物である。坐骨神経部分結紮後から14日間、ミノサイクリンを処置することで、痛覚過敏の形成が抑制された。また、ミノサイクリンは帯状回皮質へ処置しても、神経障害による痛覚過敏を改善した。このことから、帯状回皮質におけるミクログリア細胞の活性化が、痛覚過敏の原因である可能性が示された。また、ミノサイクリン処置後の帯状回皮質におけるミクログリアおよびアストロサイトの発現変化について検討を行ったところ、坐骨神経部分結紮により認められたミクログリアおよびアストロサイトの活性化は、いずれも抑制された。これは、坐骨神経部分結紮による帯状回皮質でのミクログリア細胞の活性化がアストロサイトの活性化に一部関与していることを示唆している。これまでにミクログリア細胞の活性化がアストロサイトの活性化を引き起こすことも報告されている(Kettenmann et al., Neuron. 2010)。

神経障害による痛覚過敏では帯状回皮質におけるAMPA受容体を介した反応が亢進していることが報告されている(Xu et al., J Neurosci, 2008)。また、AMPA受容体サブユニットの中でもGluA1サブユニットのser831のリン酸化が亢進していた。本研究でも坐骨神経部分結紮により帯状回皮質におけるGluA1サブユニットSer831のリン酸化が上昇していた。このSer831のリン酸化の上昇は、ミノサイクリンを処置することで改善したことから、ミクログリアの活性化がグルタミン酸神経系の神経伝達を亢進しAMPA受容体の機能亢進を引き起こしている可能性が考えられた。実際に、ミクログリアはアストロサイトからグルタミン酸を放出させるため、ミクログリアの活性化によりシナプス間隙でのグルタミン酸量が上昇すると報告されている(Kettenmann et al., Neuron. 2010)。これらのことから、帯状回皮質における興奮

性神経伝達の亢進も、ミクログリアの活性化によることが示唆された。

シナプス後に存在するコフィリンタンパク質は、AMPA受容体の細胞膜への輸送を調節しており、リン酸化によりシナプスの可塑的な変化を引き起こすことが報告されている(Gu et al., Nat Neurosci, 2010)。本研究の結果から、坐骨神経部分結紮モデルマウスの帯状回皮質において、コフィリンのリン酸化が上昇していた。また、このリン酸化コフィリンの上昇も、ミノサイクリンにより抑制された。これらのことから、コフィリンタンパク質のリン酸化もミクログリアの活性化により生じていることが明らかになった。

帯状回皮質は、感覚情報の処理よりも感情の形成に重要であることから、疼痛の情緒的な側面にかかわっていると考えられる。疼痛が、身体情報と情緒情報が融合したものと考えると、帯状回皮質における神経伝達の亢進は、疼痛の不快な感覚を増幅している可能性が考えられる。本研究結果は、痛み情報の持続的な入力がかかわる脳領域での神経系細胞の変化ならびに神経伝達の亢進を引き起こすことを明らかにした。また、その発現には脊髄などと同様にミクログリアの遠隔活性化が関与している可能性も見出した。これらの結果は、損傷部位における神経系細胞の機能変化に加え、遠く離れた部位での神経系細胞の遠隔活性化が痛覚伝達を亢進する可能性を提唱している。損傷部位付近でのミクログリアやアストロサイトの活性化は、損傷部位の修復という重要な役割を果たしていることから、この部位でのこれら神経系細胞の機能を抑制することよりも、損傷により遠隔部位で活性化している神経系細胞の機能を抑制することが、慢性疼痛を効率よく緩和する手段であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Ohsawa M, Miyabe H, Katsu H, Yamamoto S, Ono H: Identification of the sensory nerve fiber responsible for lysophosphatidic acid-induced allodynia in mice. *Neuroscience*, 2013 (In press) 査読あり
- ② Yamamoto S, Ohsawa M, Ono H: Contribution of TRPV1 receptor-expressing fibers to spinal ventral root after-discharges and mechanical hyperalgesia in a spared nerve injury (SNI) rat model. *J Pharmacol Sci*, 2013, 12, 9-16. 査読あり
- ③ Ohsawa M, Mutoh J, Yamamoto S, Ono H, Hisa H: Effect of spinally administered

simvastatin on the formalin-induced nociceptive response in mice. J Pharmacol Sci, 2012, 119, 102-106.査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 大澤匡弘、山本昇平、小野秀樹：慢性疼痛発現における脳内痛覚伝達系の亢進の関与. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日-30 日, 横浜
- ② 鈴木悠馬, 山本昇平, 大澤匡弘, 小野秀樹:長期増強下および神経因性疼痛下におけるラット脊髄後角 C-線維誘発性フィールドポテンシャルに対するシルニジピンの作用. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 23 日, 福岡
- ③ 鈴木悠馬, 山本昇平, 大澤匡弘, 小野秀樹:末梢神経障害モデルマウスにおける N および L 型カルシウムチャネル阻害薬シルニジピンの機械痛覚過敏に対する作用. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012. 2012 年 9 月 1 日, 神戸
- ④ 鈴木悠馬, 山本昇平, 大澤匡弘, 小野秀樹:末梢神経障害モデルマウスにおける N および L 型カルシウムチャネル阻害薬シルニジピンの機械痛覚過敏に対する作用. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012 年 3 月 14 日, 京都
- ⑤ 山本昇平, 大澤匡弘, 小野秀樹 :Contribution of TRPV1 receptor-expressing fibers in spinal ventral root discharges and hyperalgesia after mechanical noxious stimuli in spared nerve injury (SNI) model rats. 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2011 年 11 月 27 日, 名古屋
- ⑥ 竹渕直希, 大澤匡弘, 山本昇平, 小野秀樹:神経因性疼痛モデルにおける痛覚過敏に対する gabapentin 脳室内投与の影響. 第 120 回日本薬理学会近畿部会. 2011 年 11 月 11 日, 京都
- ⑦ 山本昇平, 宮辺裕輔, 大澤匡弘, 小野秀樹:Lysophosphatidic acid 誘発アロディニアにおける有髄感覚神経の関与. 第 119 回日本薬理学会近畿部会. 2011 年 7 月 8 日, 名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/neuro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大澤匡弘 (Masahiro Ohsawa)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80369173