

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500416

研究課題名(和文)末梢神経障害後の脊髄マイクログリアでのATP受容体-Rhoを介した形態変化の解析

研究課題名(英文) RhoA/ROCK pathway mediates morphological changes downstream of P2Y12/13 receptors in spinal microglia following peripheral nerve injury

研究代表者

小林 希実子 (Kobayashi, Kimiko)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70418961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経障害後のATP受容体、特にP2Y12、P2Y13受容体の脊髄後角マイクログリアの活性化が神経障害性疼痛発生に関与することが報告されている。その細胞内シグナルカスケードは不明であったためRho/ROCK pathwayに着目し実験を行った。その結果、マイクログリアに発現するP2Y12、P2Y13受容体がRho/ROCKの活性化に関与しマイクログリアの形態変化を引き起こすこと、またRho kinase inhibitorの投与により神経因障害性疼痛における疼痛行動を軽減することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated an important role of ATP receptors in spinal microglia, such as P2Y12 or P2Y13, in the development of chronic pain. However, intracellular signaling cascade of these receptors have not been clearly elucidated. We found that P2Y12 and P2Y13 receptors could activate Rho/ROCK and contribute to pathological changes in activated spinal microglia after nerve injury, moreover Rho kinase inhibitor significantly inhibited the injury-induced tactile allodynia.

研究分野：神経解剖 疼痛学

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

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は末梢神経や中枢神経の損傷もしくは機能障害により起因し、自発痛・熱痛覚過敏・触刺激によって激痛を生ずる異痛症を主症状とする難治性の疼痛である。近年、末梢神経が損傷されると脊髄後角においてマイクログリアの活性化が起こることによって神経傷害性疼痛の発生に関与していることが明らかとなってきた。

ATP を培養マイクログリアに添加すると活性化が起きることが知られており、実際にマウスの脳を損傷させたときのマイクログリアの形態変化には ATP 受容体の P2Y₁₂ 受容体が関与することが報告されている。マイクログリアの活動には ATP が積極的に働いていることが示されている。

我々は、これまでにラットの脊髄後角で P2Y₁₂ 受容体がマイクログリアに発現していることと末梢神経損傷後には P2Y₁₂ 受容体が発現増加し mitogen-activated protein kinase (MAPK) の 1 つである p38 のリン酸化を引き起こすことで神経障害疼痛発生のトリガーとして働く可能性を報告した。また、P2Y₆, P2Y₁₃, P2Y₁₄ も末梢神経損傷後の脊髄後角の microglia で増加し、antagonist を髄腔内投与すると神経障害性疼痛を抑制することを発表した。

一般的に高等生物の細胞形態変化や移動は細胞骨格のアクチンが重合・脱重合することで引き起こされるが、そのエフェクター因子として低分子量 G タンパク質である Rho の活性化がこれらのイベントをコントロールしている。血小板での先行研究では P2Y₁₂ の下流で Rho kinase が活性化していることが報告されている。そのため、P2Y 受容体を介した ATP シグナル下流に Rho ファミリーの活性化シグナルが存在し、マイクログリアの形態変化に関与するのではないかと考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は末梢神経損傷後に活性化するマイクログリアにおける ATP 受容体(主に P2Y₁₂, P2Y₁₃)とその下流シグナルである低分子量 G 蛋白の役割を細胞骨格の改変に着目して細胞移動・形態変化のメカニズムを明らかにし、活性化マイクログリアの浸潤や移動が神経障害疼痛に及ぼす影響を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

神経障害性疼痛モデルは、雄性 SD ラット(200-250g)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)モデルを主に使用し、以下の実験を行った。

薬剤投与は椎弓切除を行い、シリコンチューブを髄腔内へ埋め込み、浸透圧ポンプ(model 2001; 7 day pump or model 1003D; 3 day pump, 1 IL/h; Alzet, Cupertino, CA)を用いて薬剤投与を行った。使用した薬剤は以下の通り。ROCK 阻害薬 H1152 (0.5 pmol/ μ L, 1 pmol/ μ L, 10 pmol/ μ L; Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany)、P2Y₁₂ 受容体アンタゴニスト MRS2395 [2,2-dimethyl-propionic acid 3-(2-chloro-6-methylaminopurin-9-yl)-2-(2,2-dimethyl-propionyloxymethyl)-propylester, 100pmol/ μ L; Sigma, Poole, UK]、P2Y₁₃ 受容体アンタゴニスト MRS2211 {2-[(2-Chloro-5-nitrophenyl)azo]-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonoxy)methyl]-4-pyridinecarboxaldehyde disodium salt, 100 pmol/ μ L; Tocris, Bristol, UK}、P2Y₁₂/P2Y₁₃ 受容体アゴニスト 2Me-SADP (trisodium salt, 5 nmol/ μ L; Tocris, Bristol, UK)、p38 MAP kinase 阻害剤 SB203580 (0.5 μ g/ μ L, Calbiochem, La Jolla, CA)

薬理行動実験は dynamic plantar anesthesiometer (Ugo Basile, Comerio, Italy)を用い、機械疼痛閾値を測定した。

免疫組織化学法は ABC 法を用いて DAB 発色を行った。ラットを 1%FA 0.1MPB で灌流後、4%FA 0.1MPB で灌流固定を行い、L4-5 脊髄を取り出した後 4 日後固定を行った後、4 日で 2 日間 20% sucrose 0.1M PB に置換し、パウダードライアイスで凍らせ、クリオスタットを使用して 30 μ m 厚の浮遊切片の作成を行った。これを各抗体で ABC 法を用いて DAB 発色した。使用した抗体は以下の通りである。一次抗体; rabbit-anti-phospho-p38 MAPK (p-p38) polyclonal antiserum (1:1,000, Cell signaling Technology, Beverly, MA)、goat anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) polyclonal antiserum (1:2,000, Abcam, Cambridge, MA)、二次抗体; biotinylated anti-rabbit or anti-goat IgG (1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA)

免疫組織化学法を施した後の組織定量には NHI image、Image J とそのプラグインを用いた。2D スタックイメージは 1 μ m おきに 6~10 枚の連続写真を撮影し、Image J でスタックを行ったものを使用して突起の長さ、本数を計測した。

4. 研究成果

(1) 正常ラットへの ADP と P2Y 受容体阻害薬同時髄腔内投与による疼痛行動と p38 MAPK 活性化への影響

これまでの我々の研究で、(Kobayashi K. et al, J. Neurosci. 2008) P2Y₁₂, 13 受容体のアゴニストである 2Me-SADP を正常ラットに髄腔内投与すると、疼痛行動を引き起こし、脊髄マイクログリアで MAP kinase のひとつである p38 がリン酸化されることを報告している。そこで、2Me-SADP により引き起こされるリン酸化 p38 は P2Y₁₂ と P2Y₁₃ 受容体のどちらの受容体が関与するのかを確認するため、P2Y₁₂ 受容体特異的アンタゴニストである MRS2395 と P2Y₁₃ 特異的アンタゴニストの MRS2211 を 2Me-SADP と同時に浸透圧ポンプを用いて髄腔内投与し、疼痛行動を測定し、疼痛行動が見られたタイムポイントで脊髄後角におけるリン酸化 p38 陽性細胞の定量化を行った。その結果、2Me-SADP により引き起こされた機械刺激に対する逃避行動は、P2Y₁₂ もしくは P2Y₁₃ アンタゴニストを投与した群で抑制され、P2Y₁₂ と P2Y₁₃ アンタゴニストを共投与した群ではさらに抑制されていた。また脊髄後角における 2Me-SADP によりおこる p38MAPK のリン酸化も P2Y₁₂・P2Y₁₃ アンタゴニスト投与に抑制効果が見られた。

(2) 正常ラットへの ADP と Rho kinase (ROCK) 阻害剤同時髄腔内投与による疼痛行動と p38 MAPK 活性化への影響

(1)の実験結果を受け、2Me-SADP と ROCK 阻害剤である H11152 を同時に髄腔内投与すると濃度依存的に ROCK 阻害剤投与により疼痛行動が抑制された。また ROCK 阻害剤は末梢神経損傷により誘導される脊髄後角リン酸化 p38 陽性細胞の増加を抑制することがわかった。

(3) 神経障害性疼痛モデルラットにおける P2Y_{12/13} アンタゴニスト投与による p38 MAPK リン酸化抑制

SNI モデルを作成時に P2Y₁₂、P2Y₁₃ アンタゴニストを浸透圧ポンプを用いて髄腔内への持続投与を行い、損傷後三日目の脊髄後角マイクログリアの変化を観察した。リン酸化 p38 の陽性細胞数を計測したところ、末梢神経損傷により増加したリン酸化 p38 を P2Y₁₂、P2Y₁₃ アンタゴニスト投与により有意に抑制した。

(4) 正常ラットへの ADP と ROCK 阻害剤同時髄腔内投与による疼痛行動とマイクログリア形態変化の影響

正常ラットに ADP を投与したときのマイクログリアの形態変化を観察するためにマイクログリアのマーカーである Iba1 を免疫組織化学法により染色し、末梢神経損傷後のマイクログリアの形態を比較した。Vehicle 群では、マイクログリアは平

均 7 本の長い突起と多数の枝分かれが見られた。2Me-SADP の髄腔内投与によりその突起の本数は平均 8 本に増加し、また突起の長さも短くなっていた。2Me-SADP と ROCK 阻害剤を同時投与したところ、突起の本数の増加・短縮を抑制した。また、2Me-SADP による疼痛行動は ROCK 阻害剤投与により抑制された。

(5) 神経障害性疼痛モデルラットにおける P2Y_{12/13} アンタゴニスト、ROCK 阻害剤投与によるマイクログリア形態変化への影響

末梢神経損傷後のマイクログリアの形態変化に ADP-P2Y 受容体-Rho kinase のカスケードが考えられたため、SNI モデル作成時に P2Y_{12/13} アンタゴニストもしくは ROCK 阻害剤を髄腔内投与することでマイクログリアの形態変化の観察を行った。Iba1 抗体を用いて SNI モデル作製 3 日後のマイクログリアの形態を観察したところ Vehicle 投与群では細胞体の肥大、突起の退縮が見られた。P2Y₁₂・P2Y₁₃ アンタゴニスト投与群では Vehicle 軍と比較すると、突起の長さの短縮を有意に抑制した。Rho kinase inhibitor 投与群では細胞体は肥大したままであったが、突起の退縮が有意に抑制された。

末梢神経損傷後の脊髄後角ではマイクログリアの数が増加することが知られているが、これらの阻害剤、アンタゴニストでは抑制されなかった。

また、モデルラットの疼痛行動は P2Y₁₂・P2Y₁₃ アンタゴニストもしくは ROCK 阻害剤投与により抑制された。

(1)~(5)の結果から、マイクログリアの形態変化、特に突起の退縮には ATP 受容体-Rho kinase を介したシグナルが関与する事が示唆される。

(6) p38 MAPK リン酸化阻害によるマイクログリア形態変化

P2Y_{12/13} アンタゴニスト、ROCK inhibitor 投与によりリン酸化 p38 発現細胞数が減少していたため、形態変化に p38 MAPK が関与するかどうかを検討するため、p38 MAPK 阻害薬である SB203580 を投与した時のマイクログリアの形態変化について検討した。その結果、Iba1 陽性のマイクログリアの突起の長さや本数は vehicle 群と比較しても差がなかった。

以上、マイクログリアの形態変化には ATP 受容体-Rho kinase を介したシグナルが関与する事、ATP 受容体下流シグナルと Rho kinase 下流シグナルには p38 MAP kinase が関与すること、末梢神経損傷後の疼痛行

動が ROCK inhibitor により抑制されることを明らかにした。p38 MAPK の活性化により炎症性サイトカインやケモカインの産出が起きることが多数報告されていることから、RhoA/ROCK シグナルを阻害することで、p38 MAPK リン酸化が阻害され、これらのサイトカイン/ケモカインの産出抑制が神経因性疼痛の抑制につながっているのではないかと考えられる。

(3)連携研究者

山中 博樹(YAMANAKA Hiroki)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20340995

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)

Tatsumi E, Yamanaka H, Kobayashi K, Yagi H, Sakagami M, Noguchi K. *Glia*. 2015 Feb;63(2):216-28. doi: 10.1002/glia.22745. RhoA/ROCK pathway mediates p38 MAPK activation and morphological changes downstream of P2Y12/13 receptors in spinal microglia in neuropathic pain. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

山中 博樹, 巽 恵美子, 小林 希実子, 阪上 雅史, 野口 光一. 脊髄 microglia に対する Rho キナーゼ阻害剤の影響と神経傷害性疼痛への関与 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 2014.3.29 自治医科大学 (栃木 下野市)

巽 恵美子, 山中 博樹, 小林 希実子, 阪上 雅史, 野口 光一. 脊髄 microglia に対する Rho キナーゼ阻害剤の影響と神経障害性疼痛への関与 第 35 回日本疼痛学会 2013.7.13 さいたま市大宮ソニックシティ (埼玉県 大宮市)

Takahashi E, Yamanaka H, Sakagami M, Noguchi K. Effect of Rho kinase inhibitor on the morphology of glial cells in the rat spinal cord of neuropathic pain model. The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2012), 2012.10.14, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, U.S.A)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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