

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 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：24590737

研究課題名(和文) GDNFを介した後索核経由の神経障害性疼痛のメカニズム解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of anti-allodynic effect of GDNF in the rat neuropathic pain model

研究代表者

福岡 哲男 (Fukuoka, Tetsuo)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90399147

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)：第5腰髄神経結紮モデルで生じる機械的知覚過敏の分子メカニズムを調べた。末梢神経を障害すると、触覚や筋固有感覚を司る有髄の一次知覚神経細胞で自発発火が起こると同時にBDNFやNPYといった神経ペプチドの発現が増加し、これらは延髄後索核に運ばれて放出され触覚の神経伝達を変化させて機械的知覚過敏を起こしていることが示唆された。加えて、筋肉を支配している一次知覚神経細胞は正常では電位依存性ナトリウムチャンネルの一つNav1.7を発現していないが、神経障害後には新たに発現することが分かった。Nav1.7は自発発火の発生に重要な役割をしているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanisms of mechanical allodynia using the rat L5 spinal nerve ligation model. Following peripheral nerve damage, the injured heavily myelinated primary afferent neurons up-regulated BDNF and NPY expression. Our data suggested that these neuropeptides were released in the ipsilateral gracile nucleus by spontaneous firing of these neurons and facilitated touch sense processing causing mechanical allodynia. Additionally, we found that muscle-innervating primary afferent neurons normally lacked Nav1.7, an alpha-subunit of voltage-gated sodium channel, but began to express this channel following nerve injury. Nav1.7 may exert an important role for spontaneous firing.

研究分野：神経障害性疼痛の分子メカニズム

キーワード：GDNF BDNF NPY 機械的知覚過敏 ナトリウムチャンネル 神経障害性疼痛 後索核

1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢神経を切断すると、普段は痛みに関係していない有髄の一次知覚神経線維に NPY, BDNF といった神経ペプチドが新たに発現すること、又、これらの神経線維では自発発火が見られるようになることはこれまでに知られていた。

(2) 第5腰髄神経結紮(L5 SNL)モデルは現在広く用いられているラット神経障害性疼痛モデルである。このモデルで腰髄レベルの脊髄クモ膜下腔にグリア細胞由来神経成長因子(GDNF)を持続投与すると、本来痛みを起こさないような弱い機械的刺激に対する逃避反応(機械的アロディニア)が改善することは2000年に報告された。そのメカニズムとして、神経障害後に発生する一次知覚神経細胞の自発発火を減らすため、と説明されてきたが、神経ペプチドの発現に対する効果は知られていなかった。

(3) 临床上、ヒトの神経に直接障害が及ぶ外傷の後、神経因性疼痛が起きるかどうかが予測が困難であり、治療は飽くまで神経因性疼痛が生じてから開始されることを考えると、ラットのモデルにおいても、神経因性疼痛が発症してから、その症状を緩和できる治療法とそのメカニズムが解明されるべきである。

2. 研究の目的

GDNF の鎮痛作用のメカニズムとして、NPY, BDNF の発現調節が関わっていないかどうかを調べる。派生した実験として、自発発火を起こすメカニズムとして、これまでに報告されているナトリウムチャンネル Nav1.3 以外に障害された一次知覚神経細胞で発現が増加するナトリウムチャンネルはないかどうか?を mRNA レベルおよびタンパクレベルで調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)動物;全部で38匹の雄 Sprague-Dawley ラット(220~230g)を用いた。実験方法の倫理的問題については予め具体的実験方法を兵庫医科大学動物実験委員会に提出し、その承諾を得た。又、米国 NIH による実験動物の取り扱いに関するガイダンスに基づき、使用動物の数とその苦痛が最小になるように努力した。

(2)動物に対する手術操作はいずれもペントバルビタールによる適切な麻酔深度で行った。まず、腰髄レベルの脊髄クモ膜下腔薬物を投与するために、第1~2仙骨レベルで椎弓を切除し、約5cmの長さのポリエチレンチューブ(外径0.64mm)を頭側に向けてクモ膜下腔に挿入し、先端が第5腰髄(L5)後根神経節(DRG)レベルに来るようにした。チューブの反対側は皮下に埋め込み、傷を縫合した。3日後、足底に与えた非侵害レベルの機械的

刺激に対する逃避閾値を測定し、明らかな異常のあるものは除いた上で、もう一度ペントバルビタールで麻酔をかけ、定型的な L5 SNL 若しくは sham operation を行った。モデルを作製し、機械的知覚過敏が生じた3日目に、予め皮下に埋め込んでいたポリエチレンチューブの遠位端を見つけ、皮下に埋め込んだミニ浸透圧ポンプに繋いで、GDNF(0.5 μg/μl)若しくは生理食塩水を 1 μl/h で7日間に亘って持続投与した。この GDNF 投与量は過去の論文と同一である。

(3)引き続き術後4,6,8,10日目に機械的刺激に対する逃避閾値を測定した。10日目にペントバルビタール深麻酔下に断頭し、新鮮なままの L5 後根神経節、後索核を含む延髄を取り出し、直ちにドライアイスで凍結し、そのまま-20~-22で凍結切片を作成し、スライドグラスに融解圧着することで組織標本を作成した。

(4)組織標本における細胞レベルの mRNA 発現を調べるため、放射性同位元素でラベリングした RNA プローブを用いた in situ hybridization 法を行い、乳剤とオートラジオグラフィによって、mRNA を発現している細胞を銀粒子の集積として可視化した。RNA プローブを作成するための部分的 cDNA テンプレートは以下のものを作成した。

| Gene name | Accession No. | bases |
|------------|---------------|-----------|
| Rat NPY | M20373 | 42-420 |
| Rat Y1 | BC089981 | 149-569 |
| Rat Y2 | AY004257 | 624-958 |
| Rat Y4 | U42388 | 161-684 |
| Rat Y5 | AF044264 | 816-1255 |
| Rat Nav1.7 | AF000368 | 6031-6571 |

(5)組織標本の免疫組織化学的染色には次の抗体を用いた。いずれもウサギの抗体で、洗浄には TBS、ブロッッキングには正常やぎ血清、第二抗体にはやぎ抗ウサギ IgG を用いた。

| 抗体 | Catalog No. | Supplier |
|---------------------|-------------|----------|
| Anti-Nav1.7 | ASC-008 | Alomone |
| Anti-3Na+/K+ ATPase | 06-172 | Milipore |
| Anti-NPY | RPN1702 | Amersham |

(6)末梢神経障害後後索核において増加する BDNF と NPY の神経因性疼痛への関与を調べるため、別に作成したラット L5 SNL モデルを用いて、術後7日目に後索核を含む頸部大槽内に NPY レセプターに対するアンタゴニストや BDNF 吸収薬である TrkB-fc を一回投与して、機械的知覚過敏が変化するかを調べた。

(7)軸索障害前後の後根神経節における Nav1.7 の発現の変化は、別に作成した術後7日目の L5 SNL および sham operation モデルラットから取り出した L5 DRG を2~3連続の

新鮮凍結切片にして in situ hybridization 法と免疫組織化学法によって同一神経細胞での Nav1.7 mRNA と 3Na⁺/K⁺ ATPase 免疫反応の共存を調べた。

4. 研究成果

(1) L5 SNL により術後 3 日目までに同側足底部に機械的知覚過敏が生じ、術後 3 日目から 7 日間腰髄くも膜下に GDNF を持続注入することによって術後 10 日目に機械的知覚過敏が完全に消失した。このことは、GDNF はそれ自身が鎮痛作用を持つのではなく、後述する障害を受けた DRG ニューロンでの分子発現の変化を元に戻すことで間接的に抗アロディニア作用を引き起こしていることが示唆された。生理食塩水投与群では機械的知覚過敏は術後 10 日目でも相変わらず観察された。

(2) この術後 10 日目において、生理食塩水をくも膜下投与された群では、障害を受けた L5 後根神経節において主に大型ニューロンにおいて NPY mRNA と BDNF mRNA の発現増加が認められた。以前我々は、L5 SNL 3 日目にはこれらの増加が既に起こっていることを英文論文で発表しているが、GDNF 投与群ではこの増加が見られなかった。このことは、L5 SNL により術後 3 日目には増加していた NPY, BDNF mRNA がその時点から 7 日間にわたる GDNF 投与によってリバースされたことを意味している。

(3) 同じ L5 SNL 10 日目の時点で、生理食塩水投与群では後索核における NPY 免疫陽性線維が著明に増加していたが、GDNF 投与群ではこの増加は観察されなかった。末梢神経障害後、後索核での NPY 免疫陽性線維の増加は障害後 3 日目には完成されているという過去の論文があることから、GDNF クモ膜下投与は、一旦増加した NPY 免疫陽性線維の増加もリバースすることが分かった。

(4) これまでに発表されている組織化学的研究では、後索核の神経細胞には Y1 を初めとする NPY レセプターはいずれも発現していないことになっているが、同じ L5 SNL モデルにおいて、後索核に Y1 レセプターアンタゴニスト BIB0 3304 をマイクロインジェクションすると、機械的アロディニアが改善したという報告がある。我々が In situ hybridization 法で調べたところ、後索核の神経細胞には Y1 レセプター mRNA のみが発現しており、Y2, Y4, Y5 レセプター mRNA は発現していなかった。Y1 レセプターの存在は、抗体を用いた免疫組織化学的にも確かめることができた。このことは、Y1 レセプターアンタゴニストが作用する上で重要な裏付けとなる所見である。

(5) さらに、後索核を含む大槽内に Y1 レセプターアンタゴニストである BIBP-3226 や

BDNF を吸収する TrkB-fc を一回投与すると、L5 SNL で生じた機械的アロディニアが一時的にリバースされた。特に、BIBP-3226 の抗アロディニア作用は用量依存性であった。これらのことから、末梢神経障害後、直接軸索障害を受けた恐らく触覚を伝える大型ニューロンが、NPY や BDNF を新たに発現し、後索核に運ばれて放出され、後索核 2 次ニューロンへの触覚伝達を亢進させることで機械的アロディニアが生じること、そして、神経障害後 3 日目のアロディニアが発症してからの腰髄クモ膜下への GDNF 投与が、これらの神経ペプチドの発現増加を元に戻すことで、抗アロディニア作用を発揮していることを強く示唆する。以上の研究成果は英文論文として現在投稿中である。

(6) 正常後根神経節において、ナトリウムチャンネル サブユニットの一つ Nav1.7 は一部の大型ニューロンを除き全てのニューロンに発現していること、この Nav1.7 を持たないニューロンは A 線維ニューロンに特異的なマーカーである NF200 に染まり、更に侵害受容ニューロンのマーカーである TrkA を持たないことは我々がこれまで 2 本の論文で明らかにしてきた。

今回、我々はこの正常では Nav1.7 を持たないニューロンが Na⁺/K⁺ ATPase 3 免疫陽性の筋支配神経細胞であることを発見した。更に、末梢神経障害後にはこれらの細胞で新たに Nav1.7 が発現すること、更にこれらのニューロンの中枢側軸索が投射する後索核において、神経障害後に Nav1.7 免疫陽性線維が増加することを証明した。この成果は、過去 20 年間の『末梢神経障害後の後根神経節細胞で増加するのは Nav1.3 だけである』という定説を覆すものであり、既に Nav1.3 のノックアウトマウスで、Nav1.3 の増加は障害を受けた一次知覚神経の自発発火の必要条件ではないことが証明されていることから、なぜ、軸索を切断された A 線維にのみ自発発火が起こるのか？という謎を説明する一助となり得るものと考えられる。この研究成果は以下の英文雑誌に掲載された。

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 1 件)

Fukuoka, T., Miyoshi, K., Noguchi, K.
De novo expression of Nav1.7 in injured putative proprioceptive afferents: Multiple tetrodotoxin-sensitive sodium channels are retained in the rat dorsal root after spinal nerve ligation. *Neuroscience* 査読有り 284, 2015, 693-706

[学会発表](計 2 件)

福岡哲男、神経損傷時の一次求心性神経の可

塑性：電位依存性ナトリウムチャネル、日本
麻酔科学会 第 60 回学術集会 招請講演、
2013 年 5 月 24 日、ロイトン札幌（札幌市）

福岡哲男、痛みの基礎；どれくらい理解して
いますか？ 日本ペインクリニック学会
リフレッシャーコース プレオープニング
シンポジウム、2013 年 7 月 13 日、大宮ソニ
ックシティ（さいたま市）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 哲男（Fukuoka, Tetsuo）
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90399147

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：