

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592186

研究課題名(和文) 神経障害性慢性難治性疼痛における網羅的遺伝子解析による疼痛原因物質の特定

研究課題名(英文) Intra-thecal Noggin Injection For Chronic Constriction Injury partially Ameliorates Neuropathic Pain State In the Rat.

研究代表者

村田 淳(MURATA, ATSUSHI)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20344997

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)：ラット坐骨神経結紮(CCI)モデルとコントロールを競合的にマイクロアレイにハイブリダイズして遺伝子発現の違いを調べた。発現低下遺伝子Nogginについて、CCI後2週経過時点でも膜下腔にNogginタンパクをAlzet pumpを用いて持続注入しアロジニアの改善がみられるか検討した。NogginをCCI後2週でも膜下腔持続投与したところ、投与後1週後でアロジニアの改善がみられた。そこでNoggin投与、BMP4投与、BMP4+Noggin投与3群に分けてCCI後2週時点でも膜下腔投与を行ったところ、Noggin投与においてのみ投与後1週間でアロジニアの改善が得られた。

研究成果の概要(英文)：We find that Noggin mRNA is down-regulated in the lumbar enlargement two weeks after Chronic Constriction injury (CCI) in the rats by a Microarray and RT-PCR study. In the present study, we injected Noggin protein intrathecally using Alzet-mini pump for CCI model and see the neuropathic pain state using von Frey test for five weeks. Two weeks after CCI, Alzet-mini pump (14 days) with Noggin was inserted intrathecally. Rats whose Noggin concentration was 2microg/ml showed significantly less hyper-sensation compared with control. We next compared intrathecal Noggin injection (2microg/ml) with BMP4 (2microg/ml), or BMP4 (4microg/ml) +Noggin (4microg/ml) injection, and compared statistically with control. Noggin injection only showed statistically significant less hyper-sensation than others. Fluorescent immunohistochemistry showed Noggin injection partially decreased astrocytes accumulation in the dorsal horn compared with PBS control one week after intrathecal Noggin injection.

研究分野：神経科学

キーワード：neuropathic pain CCI mRNA microarray Noggin Alzet pump rats astrocytes

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎手術、脊髄損傷などで続発する神経障害性疼痛は難治性であり、臨床の現場で治療は困難を極めている。中枢神経、末梢神経の障害如何に関わらず、最終的に大脳の帯状回で認知された痛みは神経障害性疼痛といわれ、さまざまな医療に抵抗性であることが多い。動物実験レベルでは JAK-STAT シグナルが脊髄後角においてグリオーシスを促進しアロジニアを促進しており、これをブロックすることにより疼痛が軽減したという報告はある (Tsuda M et al., 2011)。しかしながらグリオーシスを制御する BMPs/smads のシグナルに関する研究は未だされておらず治療法の選択肢を広げる必要がある。今回の研究では神経障害性疼痛の原因を坐骨神経結紮モデルにより解析し、アストロサイトのグリオーシスを含むシグナル伝達機構のより上流を明らかにしたうえで、そのシグナルを阻害することにより疼痛軽減が得られるか検討したいと考えた。

今回の研究でターゲットとする神経障害性疼痛は末梢神経系や中枢神経系の損傷から起こる。その中で特に腰下肢痛の有病率は 9.9-25%といわれていることは (Van Bxem K et al., 2010)、医療経済面で重要な問題となっている。腰椎由来の神経障害性疼痛は allodynia といわれるように、下肢の触覚、痛覚刺激に対して過敏に反応する状態となることが多く難治性である。保存的治療 (理学療法、物理療法) や薬物療法の効果に関するエビデンスは無いに等しいに関わらず (Van Bxem K et al., 2010)、治療は薬物療法が中心となっている。

また脊髄損傷患者は本邦に現在約 10 万人いると言われ、95%に神経障害性疼痛があるといわれ後遺症に苦しんでいる。大部分の脊髄損傷患者の神経障害性疼痛は損傷後 6 カ月以内におこり (Siddall et al.,

2003)、長い年月の間、同様な痛みのパターンを呈するといわれている (Widerstrom-Noga et al., 2001)。神経障害性疼痛を呈する脊髄損傷患者の大半は疼痛が難治性であり、多くは NSAIDs、筋弛緩薬などを長期に使用せざるをえない。

これら難治性の神経障害性疼痛に対してまずは病態把握が重要であり、第一にわれわれの予備実験として坐骨神経結紮モデルラットと、コントロールを比較して網羅的遺伝子発現に差異が無いかどうか検討した。結果としてアストロサイトや免疫細胞に関する遺伝子が上昇し、Noggin が低下しているという結果が得られた。その後の PCR で Noggin 遺伝子が有意に減少しているという結果が得られた。BMP は neural stem cell がアストロサイトまたはオリゴデンドロサイトを分化誘導する際、アストロサイトの分化を促進する物質であり (Wang et al., 2011)、グリオーシスに関連する物質である (Fuller ML et al., 2007)。一方 Noggin は BMP の receptor antagonist であるため、Noggin が減少した代わりに BMP が活性化、アクアポリン 4、Timp3、CD68、CD38 などの遺伝子発現が増加し、それによりグリオーシスが促進され神経障害性疼痛につながったと考えた。これらより神経障害性疼痛の解明にはまずグリオーシスの原因物質である BMP シグナルの関与と、antagonist である Noggin の関係を解明する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

これまでの我々の研究より、坐骨神経結紮モデルの髄節レベルでの遺伝子発現を比較して、Noggin が低下しているという結果が得られている。Noggin はアストロサイトを分化誘導する BMP に拮抗する物質であり、Noggin の低下により BMP が増加、アストロサイトが増殖し、グリオーシスが

増強していると予測される。坐骨神経結紮モデルに低下した Noggin を補うことにより神経障害性疼痛が軽減するかどうか検討することが目的の一つである。

またレセプターアンタゴニストの BMP4 を単独あるいは Noggin と同時に使用することにより、Noggin の効果が減弱するかどうかを調べる。最後に Noggin 投与により神経障害性疼痛が軽減したとするとアストロサイトによるグリオシスも低下している可能性がありこれについても検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) これまでの研究成果 ラット坐骨神経結紮モデルにおける網羅的遺伝子発現解析
- (2) Real-time RT-PCR による増加、減少遺伝子の確認により Noggin が減少していた。
- (3) Western blot による Noggin の拮抗物質である BMP2 のタンパク発現をみる。
- (4) ラット坐骨神経結紮モデルの作成、BMPs と Noggin の硬膜外持続投入後にアロジニアの評価
- (5) 免疫染色にて BMPs 下流の smads や GFAP(グリオシス)の定量を行う。

ラット坐骨神経結紮モデルを作成し、コントロール群との比較でマイクロアレイにて網羅的遺伝子解析を行った。t-test または 2 × hold change にて有意な遺伝子のうち、Timp3, Aquaporine4, CD38, CD68 などアストロサイト、免疫細胞に発現する遺伝子が上昇し(つまりグリオシスに関係する遺伝子が上昇)、Noggin が低下していた。RT-PCR によっても有意な遺伝子発現が得られた。

Western Blot : 坐骨神経結紮モデルを作成し、2 週後に von Frey test を行いアロジニアがでていることを確認後、ネプター

ル深麻酔下にて腰膨大部組織を切り出し、タンパク質の抽出を行う。タンパクの定量は色素にクーマシーブルーを用いて Bradford 法にて定量する。Western blot にて BMP が上昇、Noggin が低下していることを確認する。同時に smad1 抗体を用いて BMP シグナルの下流因子が動いているかどうか確認する。

BMP と Noggin の坐骨神経結紮モデルへ投与 : 坐骨神経結紮モデルを作成し、作成 2 週後に Alzet mini pump を用いて BMP4 タンパクと BMP の拮抗薬 Noggin を腰膨大部遠位から硬膜外に投与する。5 週後のアロジニアの評価を、生食を Alzet pump に入れた群と比較する。

免疫染色: 組織学的検討においては Noggin 投与後 5 週後に還流固定し、凍結切片を作成、GFAP を用いて細胞数、細胞面積に定量的に差異があるか検討する。

### 4. 研究成果

CCI ラットくも膜下腔への Noggin 投与  
CCI 後 2 週経過時点で Noggin を Alzet pump (2 週用) にいれて、くも膜下腔にチューブを留置した。最初に行ったパイロットスタディを参考に Noggin 濃度を 10 ng, 2 $\mu$ g, 10 $\mu$ g/ml と決定し、PBS をコントロールとした。  
Noggin 濃度 2 $\mu$ g/ml において投与後 1 週間にて、分散分析にて PBS に対して統計学的有意差を認めた。

CCI ラットくも膜下腔への Noggin と antagonist BMP4 の投与  
Noggin 群, BMP4 群, Noggin + BMP4 群に分け、CCI 後 2 週時点でくも膜下腔に Alzet ポンプ投与を行った。投与後 1 週において Noggin 群で有意にアロジニアが改善した。

有意差の得られた Noggin 投与後 1 週時点で組織切片を作成し脊髄後角において CGRP の局在を比較した。後角深層において PBS 投与に比較して Noggin 投与で CGRP の局在が低下している像が得られた。

同様に脊髄後角において GFAP の局在を比較した。細胞数、細胞面積に関して Scion Image を用いて解析した結果、下図に示すように細胞数、細胞面積について Noggin 投与により GFAP の局在が低下する傾向がみられた。

Western blot については Noggin, BMP4, smad1 とともに C C I とコントロールで有意差はみられなかった。

## 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)

Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats.

Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M, Matsuse D, Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M.

J Spinal Cord Med. 2013 Mar;36(2):134-9.  
査読有

[学会発表](計 2 件)

Intrathecal Noggin Injection For Chronic Constriction Injury partially Ameliorates Neuropathic Pain State In the Rat.

Masayuki Hashimoto, Masao Koda, Atsushi Murata, Kazuhisa Takahashi

CSRS 2013/12/5-7 CSRS Annual Meeting 41st Annual Meeting Los Angeles (U.S.A.)

神経障害性慢性難治性疼痛における網羅的遺伝子解析による疼痛原因物質の検索  
橋本将行 国府田正雄 加藤啓 萬納寺誓人 古矢丈雄 大河昭彦 山崎正志  
高橋和久

日本脊椎脊髄病学会 2013/4/25-27  
沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 淳 (MURATA, ATSUSHI)  
千葉大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 20344997

### (2) 研究分担者

山崎 正志 (YAMAZAKI, MASASHI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 50281712