

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460342

研究課題名(和文) 脊髄gap junction機能低下によって惹起される慢性疼痛の発現機序の解明

研究課題名(英文) Involvement of spinal gap junction in induction and maintenance of chronic pain

研究代表者

森岡 徳光 (Morioka, Norimitsu)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：20346505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛の一つである神経障害性疼痛のモデルマウスの脊髄後角アストロサイトにおいて、gap junctionの構成タンパク質の一つであるconnexin43(Cx43)の発現が低下していることに着目した。本研究ではin vitro、in vivo解析により、脊髄後角アストロサイト-Cx43発現低下により、グルタミン酸トランスポーターGLT-1、interleukin-6及びcyclooxygenase-2発現が変動し、疼痛を惹起させることが明らかとなった。さらに遺伝子導入やリコピンにより脊髄後角アストロサイト-Cx43発現を回復させることにより、疼痛が緩和されることも確認した。

研究成果の概要(英文)：Spinal dorsal horn astrocytic Cx43 decreased following a peripheral nerve injury. Reduction of Cx43 induced neuropathic pain through downregulation of GLT-1, upregulation of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 in spinal dorsal horn. Restoring Cx43 by an adenovirus vector expressing Cx43 or treatment with lycopene ameliorated neuropathic pain. Tumor necrosis factor (TNF) contributed to downregulation of Cx43 expression following peripheral nerve injury. In addition, the ubiquitin-proteasome system was involved in TNF-induced downregulation of Cx43 in cultured spinal astrocytes.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 アストロサイト connexin43

### 1. 研究開始当初の背景

炎症、神経損傷などにより生じる痛みは慢性化しやすく、痛みが強く感じられる痛覚過敏や触覚刺激に対して痛みを感じるアロディニアを伴う。慢性疼痛は生活の質を低下させるだけでなく、労働・学習意欲の減退など社会的問題を引き起こす。慢性疼痛はオピオイドや非ステロイド性抗炎症薬といった既存の鎮痛薬が奏効しにくいいため、新たな鎮痛作用機序に基づいた治療法の確立が必要不可欠である。そのため、複雑かつ多様な慢性疼痛の発症メカニズムを明らかにすることが重要である。我々は細胞間コミュニケーションに関する gap junction の構成タンパクの一つである connexin43(Cx43)の疼痛制御における役割に着目してきた。これまでの神経障害性疼痛モデルを用いた研究により、脊髄後角アストロサイトでの Cx43 発現低下が、疼痛惹起に寄与していることを明らかにしている。一方で、このアストロサイトでの Cx43 発現低下がどのような機序にて疼痛異常を引き起こすのかは明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では脊髄後角アストロサイトにおける Cx43 発現がどのような分子により制御され、またどのようなメカニズムを介して発現が低下するのか、さらに Cx43 発現低下がどのようなメカニズムを介して疼痛を惹起するのかを明らかにしようと試みた。また、脊髄後角での Cx43 発現を回復させることによる疼痛緩和効果についても検討を行った。以上の検討により、脊髄アストロサイトでの Cx43 発現調節を標的とした新規鎮痛薬開発への基盤を提供することを目的とした。

### 3. 研究の方法

慢性疼痛モデルとして ddy 系雄性マウスの坐骨神経を部分損傷させることによる神経障害性疼痛マウスを用いた。Cx43 に対して特異的な siRNA をセンダイウイルスベクターに封入後、脊髄くも膜下腔内へ投与し、Cx43 ノックダウンマウスを作製した。術後、一定期間経過したマウスを用いて疼痛閾値を von Frey filament により測定し、また脊髄後角部を採取して Cx43 タンパク発現量を Western blot により解析した。培養脊髄アストロサイトは新生児ラット脊髄より定法に従って作製した。これらに対して、各種薬物を処置後の Cx43 mRNA 及び protein 発現量変化を real-time PCR 及び Western blot により解析した。

### 4. 研究成果

健常マウスに対して tumor necrosis factor(TNF)を脊髄くも膜下腔内へ投与することにより、脊髄後角での Cx43 発現が低下し、疼痛が惹起された。さらに神経障害性疼痛モデルに対して TNF 拮抗薬である etanercept を脊髄くも膜下腔内へ投与する

ことにより、脊髄後角での Cx43 発現低下が抑制されるとともに、疼痛も緩和された(図1)。これらの結果は、TNF が神経障害性疼痛時における脊髄後角での Cx43 発現低下に寄与している可能性を示唆している。

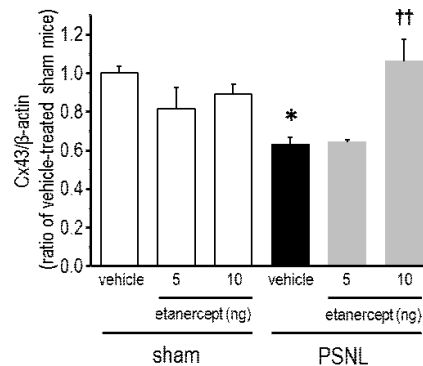


図1 神経障害性疼痛モデル(PSNL)における etanercept 脊髄くも膜下腔内投与による Cx43発現に対する影響

次に脊髄後角での Cx43 発現を増加・回復させることによる疼痛緩和効果を検討した。神経障害性疼痛モデルに対して Cx43 発現アデノウイルスベクターを脊髄くも膜下腔内へ投与することにより、脊髄後角での Cx43 発現回復に伴って疼痛が緩和されることを明らかにした。さらに Cx43 発現増加作用を有する化合物を探索し、トマトの含有成分の一つである lycopene を見出した。培養脊髄アストロサイトに lycopene を処置することにより Cx43 protein 発現が有意に増加したが、Cx43 mRNA 発現は変化しなかった。また神経障害性疼痛モデルに対して lycopene を脊髄くも膜下腔内へ慢性的に投与することにより、Cx43 発現が回復するとともに疼痛が緩和されることを明らかにした。

続いて、脊髄後角アストロサイトでの Cx43 発現低下がどのようなメカニズムにより疼痛を惹起するのか検討した。Cx43 siRNA を脊髄くも膜下腔内へ投与することにより脊髄後角での Cx43 発現を低下させたマウス(Cx43 ノックダウンマウス)における疼痛は、グルタミン酸 NMDA 受容体拮抗薬、AMPA 受容体拮抗薬により抑制されたが、神経伝達物質遊離に直接関与する Ca<sup>2+</sup>チャネル<sub>2</sub> サブユニットの阻害薬では無影響であった。これらの結果から、Cx43 発現低下によりグルタミン酸クリアランスが変化し、疼痛が惹起されている可能性が想定されたため、脊髄後角でのグルタミン酸トランスポーター発現を解析した。その結果、グルタミン酸トランスポーターの一つである GLT-1 発現が Cx43 発現低下に伴って減少していることが明らかとなった(図2)。さらに、Cx43 ノックダウンマウスの脊髄シナプトソームを用いた解析により、Cx43 発現低下によりグルタミン酸取り込み能が低下していることも見出した。

脊髄アストロサイトにおける Cx43 発現低下に伴って変動する分子のさらなる解析を

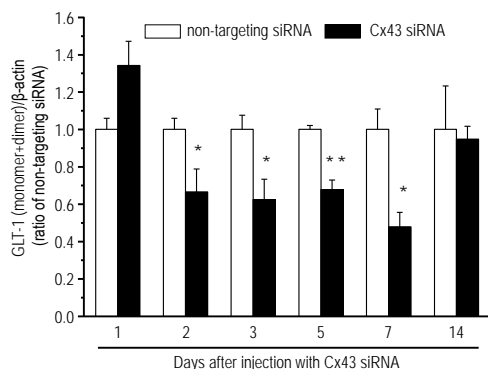


図2 Cx43 ノックダウンマウスにおけるGLT-1発現変化

行った。培養脊髄アストロサイトに Cx43 siRNA を処置した結果、interleukin-6(IL-6) 及び cyclooxygenase-2(COX-2)発現が増加することが明らかとなった。さらに Cx43 ノックダウンマウスの脊髄後角においても同様に IL-6 及び COX-2 発現が増加することが明らかとなった(図3)。また Cx43 ノックダウンマウスにおける疼痛は、IL-6 中和抗体及び COX-2 阻害薬をそれぞれ投与することにより、著明に緩和された。神経障害性疼痛モデルに対して Cx43 発現アデノウイルスベクターを脊髄くも膜下腔内へ投与することにより、IL-6 及び COX-2 発現の増加は有意に拮抗された。次に Cx43 発現低下がどのようなメカニズムを介して IL-6 及び COX-2 発現を増加させるのかを検討した。その結果、Cx43 発現をノックダウンさせた培養脊髄アストロサイトならびにマウス脊髄後角における IL-6 及び COX-2 発現の増加は glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) 阻害薬により、有意に拮抗された。さらに Cx43 発現をノックダウンさせた培養脊髄アストロサイトならびにマウスの脊髄後角において GSK-3 が活性化していることも明らかにした。

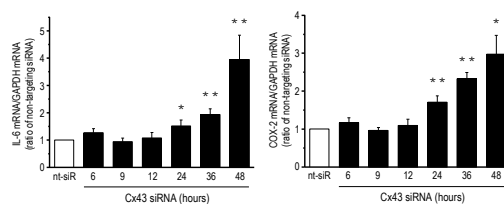


図3 培養脊髄アストロサイトにおけるCx43 siRNA処置によるIL-6及びCOX-2 mRNA発現変化

さらに培養脊髄アストロサイトを用いて、Cx43 発現低下に關するメカニズムの検討を行った。Cycloheximide を用いた chase analysis により、TNF 及び interferon-(IFN-) による Cx43 発現の低下にはタンパク分解の促進が関与していることが明らかとなった。さらに TNF 及び IFN- 処置による Cx43 発現の低下はプロテアソーム阻害薬により抑制された。また TNF 及び IFN- 処置により、Cx43 のユビキチン化が促進されていることも明らかとなった。以上の結果より、脊髄アストロサイトにおける TNF 及び IFN- に

よる Cx43 発現低下にはユビキチン-プロテアソーム系が関与していることが示唆された。

## 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 3 件)

1) Zhang F.F., Morioka N., Kitamura T., Fujii S., Miyauchi K., Nakamura Y., Hisaoaka-Nakashima K., Nakata Y.: Lycopene ameliorates neuropathic pain by upregulating spinal astrocytic connexin 43 expression. *Life Sci.*, 155:116-122, 2016. 査読有, DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.021.

2) Zhang F.F., Morioka N., Kitamura T., Hisaoaka-Nakashima K., Nakata Y.: Proinflammatory cytokines downregulate connexin 43-gap junction in rat spinal astrocytes via ubiquitin-proteasome system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464: 1202-1208, 2015. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.105.

3) Morioka N., Zhang F.F., Nakamura Y., Kitamura T., Hisaoaka-Nakashima K., Nakata Y.: Tumor necrosis factor-mediated downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to increased glutamatergic neurotransmission and neuropathic pain in mice. *Brain Behav. Immun.*, 49: 293-310, 2015. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbi.2015.06.015.

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 藤井志織, 張 芳芳, 中島一恵, 仲田義啓, 森岡徳光: 脊髄アストロサイトにおける connexin43 の発現低下は IL-6 及び COX-2 の発現増加を介して痛みを誘発する. 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 11 月 19 日, 京都大学百周年時計台記念館(京都市)

2) 藤井志織, 張 芳芳, 中島一恵, 仲田義啓, 森岡徳光: 神経障害性疼痛発症時における脊髄アストロサイト Connexin43 の新たな役割. 第 129 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 6 月 24 日, 広島県医師会館(広島市)

3) 藤井志織, 森岡徳光, 張 芳芳, 中島一恵, 仲田義啓: A role of spinal astrocytic connexin43 in maintenance of neuropathic pain. 脊髄アストロサイト Connexin43 発現低下による神経障害性疼痛発症メカニズムの解析. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9 日, パシフィコ横浜(横浜市)

4) 藤井志織, 森岡徳光, 張 芳芳, 中島一恵, 仲田義啓: 脊髄アストロサイト Connexin43 発現低下による神経障害性疼痛発症メカニズムの解析. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015, 2015 年 8 月 29 日, 東京大学薬学部(東京都)

5) 森岡徳光, 張 芳芳, 北村智哉, 中島一

惠, 仲田義啓: 神経障害性疼痛に寄与する脊髄後角アストロサイト-connexin43 発現低下. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸サンボホール(神戸市)

6) 北村智哉, 森岡徳光, 張 芳芳, 藤井志織, 中島一恵, 仲田義啓: 脊髄アストロサイト Connexin43 の神経障害性疼痛発症への関与. 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会・中国四国支部学術大会, 2014 年 11 月 8 日, 広島国際会議場(広島市)

7) 張 芳芳, 森岡徳光, 北村智哉, 藤井志織, 中島一恵, 仲田義啓: 神経障害性疼痛に対する脊髄後角におけるアストロサイト Cx43 の関与. 第 126 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 10 月 24 日, 和歌山県 JA ビル(和歌山市)

8) 北村智哉, 森岡徳光, 張 芳芳, 中島一恵, 仲田義啓: 脊髄アストロサイト Connexin43 の神経障害性疼痛における機能解析. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 30 日, 近畿大学薬学部(東大阪市)

9) 張 芳芳, 森岡徳光, 北村智哉, 藤井志織, 中島一恵, 仲田義啓: 脊髄アストロサイト gap junction-Cx43 発現低下に対する proteasome 系の役割. 第 125 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 6 月 20 日, 岡山コンベンションセンター(岡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等  
広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門薬効解析科学  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha/>

(1) 研究代表者

森岡 徳光 (MORIOKA NORIMITSU)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号: 20346505

(2) 研究分担者

中島 一恵 (NAKASHIMA KAZUE)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号: 20393431

仲田 義啓 (NAKATA YOSHIHIRO)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・名誉教授  
研究者番号: 40133152