

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462384

研究課題名(和文) PACAP-PAC1誘発アストロサイトシグナル伝達を標的とする慢性疼痛治療戦略

研究課題名(英文) Chronic pain treatment strategy targeting PACAP-PAC1-induced astrocyte signaling

研究代表者

大納 哲也(Ohnou, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：60457661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドPACAPは一次感覚神経に発現し、末梢神経障害・炎症に伴い発現上昇するなど、脊髄痛覚伝達に重要な役割を持つことが示唆されていたが、関与する受容体やその下流の情報伝達系など、多くの不明な点が残されている。そこで我々は、マウスにPACAP等をも膜下腔投与し、疼痛行動の薬理学的解析、およびウェスタンブロット・免疫組織化学的解析を行った。その結果、PACAPはPAC1受容体を介して脊髄後角神経細胞およびアストロサイトを活性化させ、機械的痛覚過敏を長期間誘発することが判明した。PAC1受容体情報伝達系は疼痛の慢性化に重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is present in the spinal dorsal horn and dorsal root ganglia, and markedly upregulated in peripheral nerve injury or inflammation, suggesting an important role in the modulation of spinal nociceptive transmission. However, the involvement of PACAP type 1 (PAC1) receptor and its downstream signaling mechanism have not been clarified yet. We found that a single intrathecal injection of PACAP or maxadilan (a PAC1 receptor agonist) produced long-lasting mechanical allodynia, and the spinal PAC1 receptor stimulation also caused sustained astrocytic activation. Our data suggest that the interaction between dorsal horn neurons and astrocytes evoked by PAC1 receptor-mediated signal transduction is critically involved in the induction and maintenance of the long-lasting mechanical allodynia. The signaling pathway linking between PAC1 receptor stimulation and astroglial activation may offer a new opportunity to treat chronic pain.

研究分野：疼痛

キーワード：PACAP PAC1 アストロサイト JNK 慢性痛

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は臨床の場において最も治療に時間と費用がかかる病気の一つである。急性痛から慢性痛へ移行する疾患については数多く知られているが、その移行メカニズムについては今なお不明な点が多い。

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) は、研究分担者の宮田らがヒツジ視床下部から見出した多機能神経ペプチドである。PACAP およびその受容体は、1 次知覚神経節や脊髄後角など疼痛伝達経路に発現していること、PACAP は、1 次知覚神経損傷後約 1 週間で損傷神経における発現量が増加し、また PACAP 欠損マウスでは、難治性慢性疼痛の代表である末梢神経損傷後の神経障害性疼痛発症が著明に減弱したことから、疼痛情報、特に神経障害性疼痛伝達に重要な分子であると想定されている。しかし、作用する受容体、シグナル伝達経路、グリア細胞の関与など、その疼痛発症メカニズムに関し多くの不明点が残っていた。

2. 研究の目的

研究代表者らは以前、PACAP をマウス脊髄くも膜下腔に投与すると、数時間を越える自発性疼痛様行動 (下半身や尾を舐める・噛むなどの行動) を引き起こすことを報告したが、その作用メカニズムに関しては不明のままであった。そこで、本研究では PACAP により誘発される自発性疼痛様行動発症メカニズムを検討した。また、この自発性疼痛様行動は投与翌日には寛解しているが、何らかの後遺症が残っていないかどうか、後肢に機械的・熱的刺激を加え、逃避反応閾値を検討した。

3. 研究の方法

1) 行動学的検討

実験には雄性 ddY 系マウス(実験開始時 6 ~ 12 週齢)を使用した。

マウスくも膜下腔 (intrathecal: i.t.) 投与は、Hylden と Wilcox の方法に倣い 5 μ L 投与し、投与後 30 分間、自発性疼痛様行動を観察した。また、投与前、および投与翌日以降経時的に機械的・熱的刺激に対する逃避反応を検討した (機械刺激に対しては逃避閾値を測定し、熱刺激に対しては逃避潜時を測定した)。

2) ウェスタンブロット法

PACAP 等を脊髄くも膜下腔投与後、脊髄を経時的に採取し、MAP キナーゼ (ERK および JNK) と GFAP のタンパク発現変動を検討した。

3) 免疫組織化学

正常脊髄における PACAP 特異的受容体 (PAC1 受容体) の発現部位の検討を行った (神経マーカー NeuN、アストロサイトマーカー GFAP、およびミクログリアマーカー Iba1 との

共存を検討)。

また、PACAP 等を脊髄くも膜下腔投与後、経時的に MAP キナーゼ (リン酸化 ERK) および GFAP に対する免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

1) PACAP 誘発自発性疼痛様行動の薬理学的特徴

選択的 PAC1 受容体作動薬である maxadilan (Max) をくも膜下腔に単回投与すると、PACAP 投与時に観察される自発性疼痛様行動に非常によく似た疼痛様行動を濃度依存的に誘発した (図 1A, B)。一方、PACAP 関連ペプチドであり、PACAP と受容体 (VPAC1 および VPAC2 受容体) を一部共有する VIP (vasoactive intestinal polypeptide) のくも膜下腔投与 (i.t. 投与) は、そのような行動を誘発しなかった (図 1)。また、PACAP および Max で誘発される疼痛様行動は、PAC1 選択的拮抗薬 max.d.4 の同時投与 (図 1C)、あるいは後投与 (図 1D) により顕著に抑制されることから、PAC1 受容体を介した行動であることが示唆された。

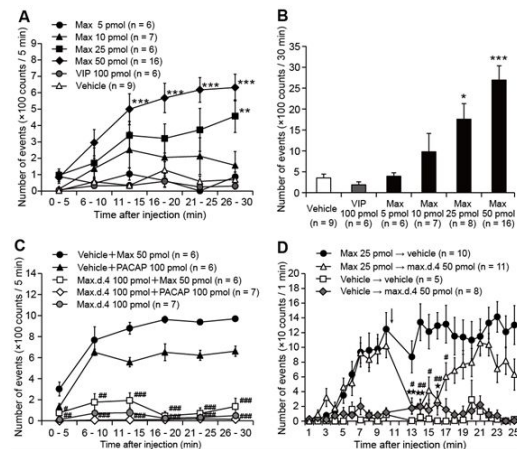


図 1: Maxadilan くも膜下腔単回投与により濃度依存的に誘発される自発性疼痛様行動 PAC1 受容体拮抗薬 max.d.4 により抑制され、VIP では誘発されないことから、PAC1 受容体を介した行動であることが示唆される。

2) 脊髄 PAC1 受容体刺激はリン酸化 ERK の発現上昇を引き起こす

PAC1 受容体刺激後、どのような細胞内シグナル伝達系を介して自発性疼痛様行動を引き起こすのか検討するため、ERK (extracellular signal-regulated kinase) の活性化状態を検討した。ERK は末梢に疼痛刺激を加えると、脊髄後角において急速にリン酸化されて (pERK: リン酸化 ERK)、活性化状態になることが知られている MAP キナーゼの 1 種である。

Max を i.t. 投与すると、5 分以内に pERK の発現上昇をもたらす (図 2A, B)、少なくとも 30 分以上持続した (not shown)。また、Max

により誘発される疼痛様行動は、PD98059 (MAPK/ERK kinase 阻害薬: MEK 阻害薬) の同時投与により顕著に阻害されることから (図 2C)、ERK の活性化が疼痛様行動誘発に関与していることが示唆された。

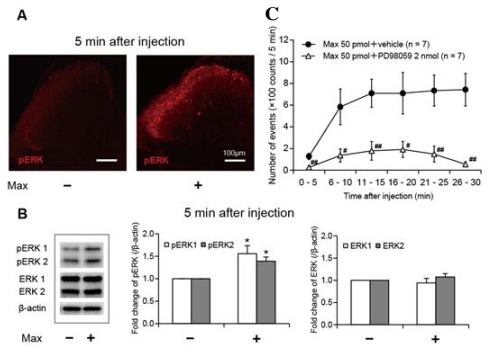


図 2: Maxadilan の i.t. 投与は脊髄後角の ERK を活性化させる

Maxadilan (Max, 50 pmol, 単回 i.t. 投与) は、投与後 5 分で ERK を活性化 (リン酸化 ERK 発現上昇) させ、自発性疼痛様行動を引き起こす。

3) 脊髄 PAC1 受容体刺激はアストロサイト活性化を早期に引き起こす

PACAP/Max で誘発される疼痛様行動は、長時間持続することから、近年疼痛の慢性化メカニズムに関与することが示唆されているアストロサイト活性化の関与の有無を検討した。

Max (50 pmol) を単回 i.t. 投与すると、30 分後には GFAP 蛋白発現量は有意に増加し (図 3)、PAC1 受容体刺激により、アストロサイトが早期に活性化されることが示唆された。

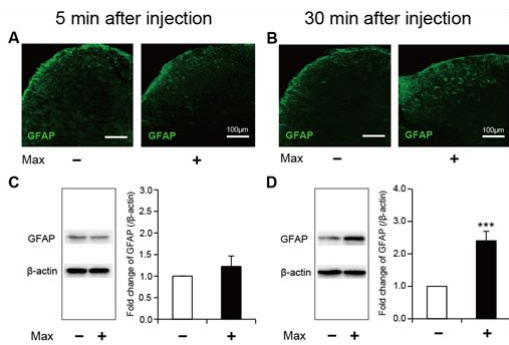


図 3: Maxadilan 誘発脊髄アストロサイト活性化

Maxadilan (Max, 50 pmol, 単回 i.t. 投与) は、投与後 30 分で GFAP タンパク発現量を上昇させた。

そこで、アストロサイト活性化が本自発性疼痛様行動発現に関与するか否かを検討するために、アストロサイト活性化阻害薬 L- -aminoadipate (L- -AA: 0.3~1 nmol) の効果を検討したところ、Max (50 pmol) 誘

発疼痛様行動の発現を顕著に抑制した (図 4A)。さらに、pERK 発現に対する効果を検討してみると、L- -AA (1 nmol) は、Max (50 pmol) 投与後 30 分に観察される pERK 発現上昇をほぼ完全に抑制した (図 4B、C)。

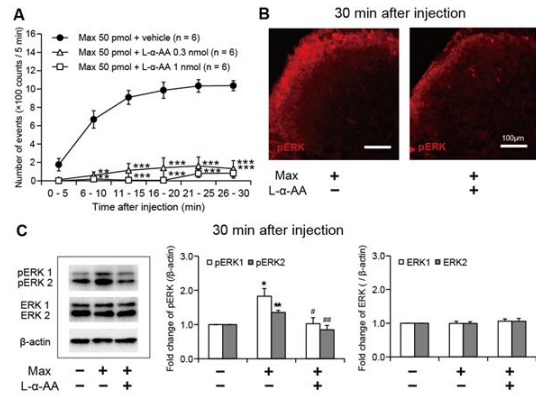


図 4: アストロサイト活性化阻害薬の効果
アストロサイト活性化阻害薬 L- -aminoadipate (L- -AA) は Max 誘発自発性疼痛様行動を抑制するとともに ERK 活性化も抑制した。

4) 脊髄 PAC1 受容体刺激はリン酸化 JNK の発現上昇を引き起こす

PAC1 受容体刺激はアストロサイト活性化を引き起こすことが示唆されたので、我々は次に、疼痛刺激により脊髄アストロサイトにおいて活性化されることが示唆されている MAP キナーゼの一種 JNK (c-Jun N-terminal kinase) の発現動態を検討した (図 5)。

Max (50 pmol) の i.t. 投与 5 分後では、JNK およびリン酸化 JNK (pJNK) の発現変動は観察されないが (図 5A)、30 分後では有意に pJNK の発現上昇が認められた (図 5B)。

そこで、JNK の活性化が Max 誘発自発性疼痛様行動発現に関与するか否かを検討するため、JNK 阻害薬 SP600125 (2 nmol) 同時投与の効果を検討したところ、Max 誘発自発性疼痛様行動発現は著明に抑制された (図 5C)。

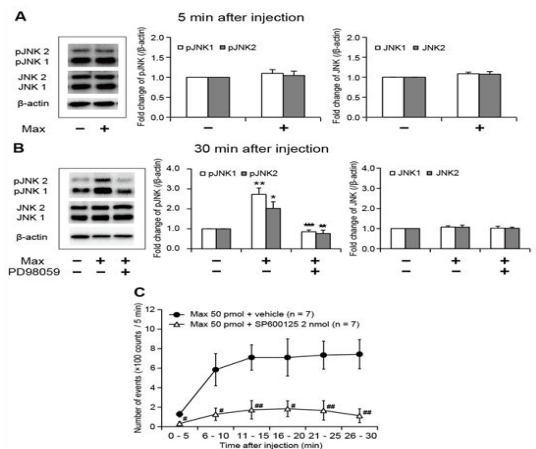


図 5: Maxadilani . t. 投与は JNK を活性化させる

Maxadilani (Max, 50 pmol, 単回 i. t. 投与) は、投与後 30 分で JNK を活性化 (リン酸化 JNK 発現上昇) させ、自発性疼痛様行動を引き起こす。

5) 脊髄 PAC1 受容体刺激は長期機械的アロディニア現象を引き起こす

PACAP および Max をくも膜下腔投与することによって誘発される自発性疼痛様行動は少なくとも数時間持続することを確認しているが、投与翌日にはほぼ寛解している。そこで、自発性疼痛様行動寛解後も何らかの影響が認められるかを検討するため、機械および熱刺激に対する後肢の逃避行動閾値に対する効果を検討した。

PACAP (100 pmol) あるいは Max (50 pmol) の単回 i. t. 投与は、少なくとも 84 日間持続する長期機械的閾値の低下 (機械的アロディニア現象) をもたらしたが、VIP (100 pmol) の投与はほとんど影響を与えなかった (図 6A)。一方、熱刺激に対する潜時には有意な影響を与えなかった (図 6B)。また、PACAP および Max による機械的アロディニアの発症は、PAC1 受容体拮抗薬 max.d.4 (100 pmol) により完全に阻害されることから、PAC1 受容体を介していることが示唆された (図 6C)。

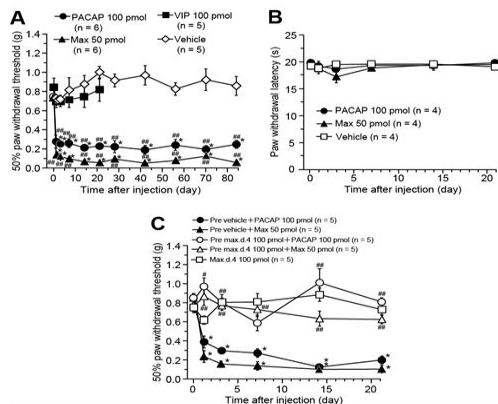


図 6: PAC1 受容体刺激により誘発される長期機械的アロディニア

PACAP (100 pmol) あるいは Max (50 pmol) の単回 i. t. 投与は、少なくとも 84 日間持続する長期機械的アロディニアを引き起こすが、熱性痛覚過敏は生じない。この機械的アロディニア発症は、PAC1 受容体拮抗薬 max.d.4 により抑制され、VIP では誘発されないことから、PAC1 受容体を介した行動であることが示唆される。

このような長期機械的アロディニア現象の発症は、現在のところ PAC1 受容体刺激特異的であり、PACAP 同様 1 次知覚神経に含有され、従来より疼痛伝達における重要性が示唆されていた神経ペプチドサブスタンス P (SP) や CGRP (calcitonin-gene-related

peptide) の同用量 (100 pmol) 投与や、疼痛慢性化に重要とされている NMDA 受容体の活性化 (1 nmol の NMDA を i. t. 投与) は 1~2 週間程度持続する機械的アロディニア現象を誘発するのみであった (図 7)。

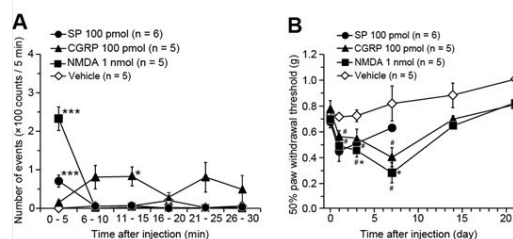


図 7: SP、CGRP あるいは NMDA の単回 i. t. 投与は短期の自発性疼痛様行動、および機械的アロディニアしか誘発しない

6) 脊髄 PAC1 受容体刺激は長期のアストロサイト活性化を引き起こす

3) で述べたように PACAP および Max の i. t. 投与は、投与後 30 分以内にアストロサイト活性化の一つの指標である GFAP 発現上昇を引き起こした。そこで、GFAP 発現上昇はどの程度持続するのか検討したところ、少なくとも 84 日間持続していることがウエスタンブロット法および免疫組織化学的手法により観察された (図 8)。

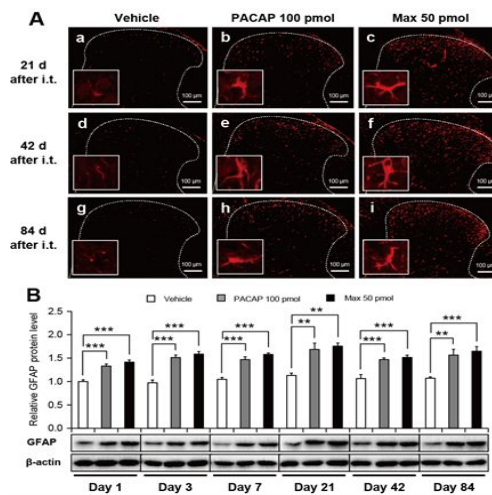


図 8: PACAP あるいは maxadilani の単回 i. t. 投与は 84 日間持続する GFAP タンパク発現量上昇を誘発する

一方、ミクログリアマーカーである Iba1 を発現する細胞の形態に変化は認められなかった (図 9)。

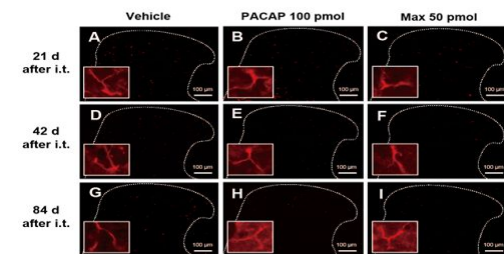


図 9: PACAP/maxadilan の単回 i.t. 投与は Iba1 発現細胞の形態および発現量を変化させない

7) アストロサイト活性化阻害薬 L-α-AA は PAC1 受容体誘発長期機械的アロディニア現象発症および維持を抑制する

L-α-AA (0.3~1 nmol) と Max (50 pmol) の同時 i.t. 投与は Max 誘発自発性疼痛様行動発症を抑制した (図 4)。そこで、L-α-AA は PACAP/Max 誘発長期機械的アロディニア現象発症に影響を与えるか否か検討した (図 10)。

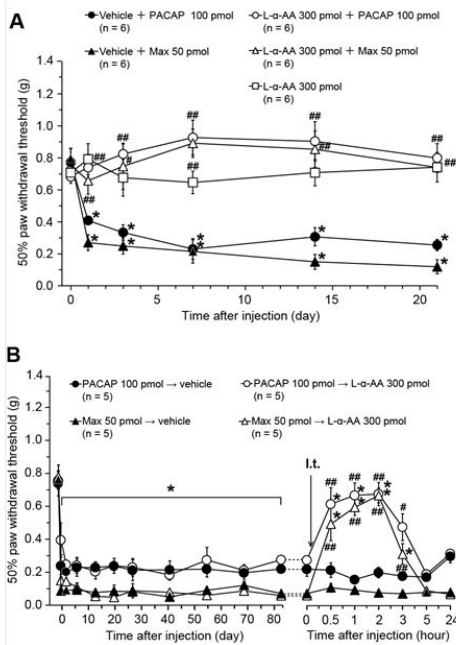


図 10: アストロサイト活性化阻害薬 L-α-AA の同時投与は PAC1 受容体誘発機械的アロディニアの発症を抑制し、後投与は機械的アロディニアの維持を抑制する

まず、PACAP (100 pmol) あるいは Max (50 pmol) との同時 i.t. 投与を検討してみると、長期機械的アロディニア現象発症をほぼ完全に抑制した (図 10A)。さらに、PACAP あるいは Max を i.t. 投与後 84 日目に機械的アロディニアを観察し、その後 L-α-AA (300 pmol) を i.t. 投与しても、機械的アロディニア現象を顕著に抑制した (図 10B)。

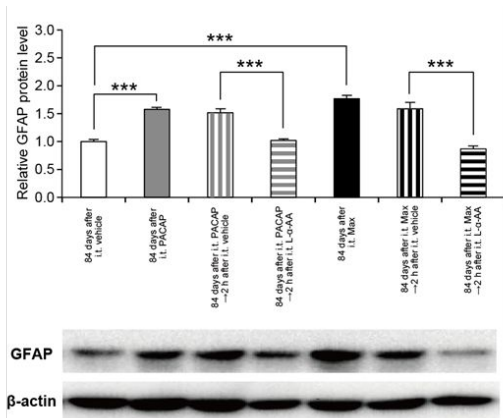


図 11: PACAP/Max i.t. 投与後 84 日目における L-α-AA (300 pmol) の GFAP タンパク発現量に対する効果

この疼痛行動変化に平行して、GFAP 発現量も変化した (PACAP あるいは Max の i.t. 投与後 84 日目において、GFAP 発現量は vehicle control に比べ上昇しているが、L-α-AA の投与後 2 時間目に有意に抑制された: 図 11)

8) PAC1 受容体誘発機械的アロディニア現象発症には ERK や JNK 活性化が関与する

MEK 阻害薬 PD98059、あるいは JNK 阻害薬 SP600125 と Max の同時 i.t. 投与は、Max 誘発自発性疼痛様行動発症を抑制した (図 2, 5)。そこで、ERK あるいは JNK の活性化が PACAP/Max 誘発長期機械的アロディニア現象発症に関連しているか否か検討した (図 12)。

PD98059 (2 nmol) あるいは SP600125 (2 nmol) と PACAP (100 pmol) あるいは Max (50 pmol) の同時 i.t. 投与は、機械的アロディニア現象発症をほぼ完全に阻害した。

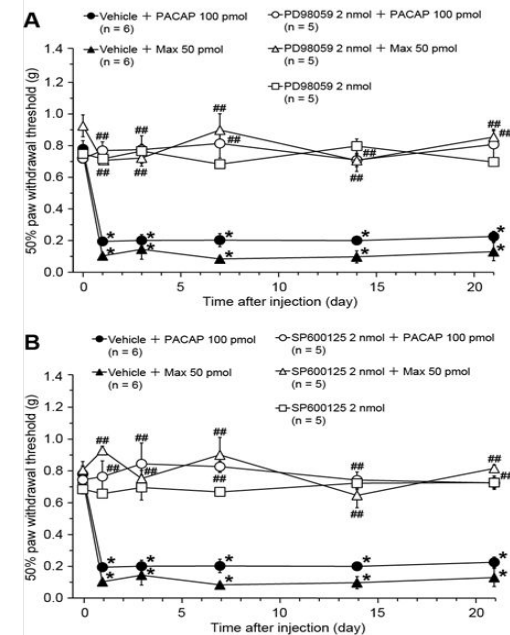


図 12: MEK 阻害薬あるいは JNK 阻害薬は PAC1 受容体誘発長期機械的アロディニア発症を阻害する

9) 脊髄における PAC1 受容体発現細胞の同定

脊髄における PAC1 発現細胞の検討はこれまでラットにおいて数例報告されているが、不完全なものであり、またマウス脊髄における検討は報告されていなかった。そこで我々は、PAC1 受容体特異的抗体と神経細胞、アストロサイト、ミクログリアそれぞれのマーカーに対する抗体を用い、二重免疫染色を行った (図 13)。

その結果、PAC1 受容体免疫活性は脊髄後角に広く分布し、主に神経細胞に認められるが、ミクログリアにはほとんど存在しないこと、アストロサイトにはしばしば認められるこ

とが観察された。

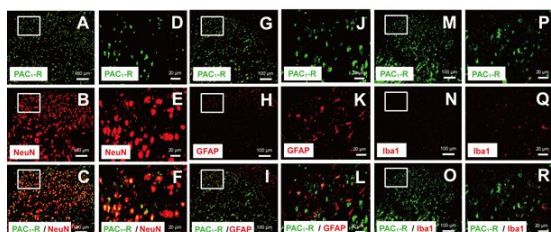
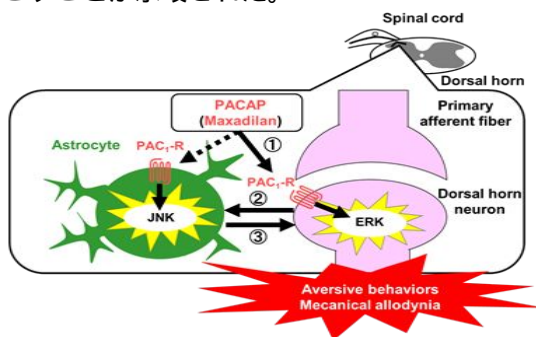


図 13: PAC1 受容体特異的抗体および各種細胞マーカーを用いた蛍光 2 重染色画像

10) 結論

以上の結果から、脊髄 PAC1 受容体刺激は、後角神経細胞上に発現する PAC1 受容体を介して ERK を早期に活性化させ()、その後何らかの情報伝達分子(あるいはアストロサイト上に発現する PAC1 受容体を介して)がアストロサイトに作用することで JNK を活性化させる()。活性化アストロサイトも何らかの情報伝達分子を介して神経細胞の活動を維持することによって疼痛の慢性化を引き起こすことが示唆された。



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 2 件)

1. Ohnou, T., Yokai, M., Kurihara, T., Hasegawa-Moriyama, M., Shimizu, T., Inoue, K., Kambe, Y., Kanmura, Y., Miyata, A. (2016)

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor signaling evokes long-lasting nociceptive behaviors through the activation of spinal astrocytes in mice.

Journal of Pharmacological Sciences, 130: 194-203. DOI: 10.1016/j.jphs.2016.01.008. 査読有

2. Yokai, M., Kurihara, T., Miyata, A. (2016)

Spinal astrocytic activation contributes to both induction and maintenance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor-induced long-lasting mechanical allodynia in mice.

Molecular Pain, 12: 1-13.

DOI:10.1177/1744806916646383. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Youkai M, Kurihara T, Asada T, Kambe Y, Miyata A. Spinal PACAP-PAC1-receptor signaling pathway induces long-lasting mechanical allodynia through the activation of astrocytes in mice. Society for Neuroscience 2014. 2014/11/20~25. 米国・ワシントン.

2. 用皆正文、栗原 崇、神戸悠輝、高崎一郎、宮田篤郎. 脊髄における PACAP 特異的受容体の刺激はアストロサイト活性化を介して長期機械的アロディニア反応を誘発する. 第 88 回日本薬理学会年會. 2015/3/18~20. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

3. 神戸悠輝、栗原 崇、用皆正文、前田辰則、高崎一郎、宮田篤郎. PACAP 誘発性長期機械的アロディニアの発症における脊髄アストロサイト-ニューロン乳酸シャトルの関与. 第 13 回 GPCR 研究会 2016/5/13~14. 日本科学未来館 (東京都江東区).

4. Kurihara, T., Yokai, M., Kambe, Y., Takasaki, I., Miyata, A. Spinal astrocyte activation triggered by PACAP-PAC1 receptor signaling pathway contributes to both induction and maintenance of long-lasting mechanical allodynia. IASP2016. 2016/9/26~30. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

5. 栗原 崇、用皆正文、八坂敏一、神戸悠輝、前田辰則、原 博満、高崎一郎、宮田篤郎. PACAP 誘発長期機械的アロディニア現象発症における Cyr61/CCN1 の関与. 第 69 回日本薬理学会西南部会. 2016/11/26. 松山大学 (愛媛県松山市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ana-cm/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大納哲也 (Ohnou, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号: 60457661

(2) 研究分担者

栗原 崇 (Kurihara, Takashi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号: 60282745

宮田篤郎 (Miyata, Atsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 60183969

上村裕一 (Kanmura, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 30211189