

## 脱髄性神経損傷に起因する難治性神経因性疼痛の 治療標的分子の同定

Identification of molecular targets to cure intractable neuropathic pain with nerve injury-induced demyelination

植田 弘師 (UEDA HIROSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授



### 研究の概要：

難治性神経因性疼痛における異常疼痛であるアロディニアは傷害により産生されるリゾホスファチジン酸がミエリン形成シュワン細胞における「脱髄」とそれに続く神経間の混線（エファプス）、神経異常発芽（スプラウティング）により脊髄後角における誤入力により生じることを見出している。本研究ではこの詳細な分子機構を明らかにし、時間・病態特異的な治療標的分子の探索を試みる。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

医療薬学／外科系臨床医学、麻酔・蘇生学／脳・神経、脂質、神経因性疼痛、脱髄、神経回路

### 1. 研究開始当初の背景・動機

難治性神経因性疼痛は本来の急性の痛みとは仕組みが全く異なり、抗炎症薬やモルヒネにより除痛されにくく、そのメカニズム解明は殆どなされていない。本研究申請者は疼痛過敏やアロディニアを伴う脱髄性のギランバレー症候群やI型シャルコマリーツース病をその解明の手がかりとして、最近、**神経因性疼痛の発症機構**を明らかにした(Nature Medicine, 2004)。この研究を含む一連の研究から脂質メディエーターである**リゾホスファチジン酸(LPA)**がミエリン形成シュワン細胞における「脱髄」、それに続く神経間の混線(エファプス)、神経異常発芽(スプラウティング)を誘発し、触情報を伝達する侵害受容神経が灼熱性疼痛受容に関する脊髄後角二次神経に「**誤入力**」し、いわゆる「**アロディニア**」を示すことを証明した。こうした研究は慢性疼痛の分子機構の全貌解明の基礎的概念作りに大いに貢献したが、疼痛治療を求める創薬基礎となるさらなる詳細な分子機構解明は残されている。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまで構築してきた基礎概念に基づいた戦略に従い、創薬基礎研究を目指した神経因性疼痛の責任分子同定を中心課題とした以下の6つの計画、1)脱髄機構の分子基盤解明、2)アロディニア現象の可視化、3)脊髄後角誤入力の証明、4)アロディニアと疼痛過敏の分子基盤、5)

上位脳における神経回路可塑的変調の解明、6)異なる難治性脱髄性神経因性疼痛と可塑性の解明、を5年の期限内に完遂することを目的にしている。

### 3. 研究の方法

- 項目 1: 神経傷害(実体顕微鏡使用)に伴う脱髄機構を組織化学的、生化学的(分子間相互作用定量 QCM 装置 Affinix 等使用)、行動薬理学的解析、
- 項目 2: 脊髄凍結切片(マイクロトーム使用)におけるリン酸化 ERK を使用にした誤入力の可視化と大量精製した WGA 蛍光蛋白質遺伝子(高速大容量冷却遠心機、PCR 装置使用)による神経回路の可視化、
- 項目 3: 脊髄機能変調に関するパッチクランプ法による解析、
- 項目 4: マイクロアレイによる遺伝子解析とミクログリア機能解析(冷却 CCD カメラ、ARV0mx-12 システム使用)、
- 項目 5: 脳内局所 LPA 適用による薬理的、組織化学的変調の解析、
- 項目 6: 遺伝子改変動物や薬剤処置した動物におけるバイタルサインを評価(ポリグラフ使用)しつつ、神経因性疼痛に対する薬物効果の解析を行う。

### 4. これまでの成果

#### 1) 脱髄機構の解明

- 1-1) 神経傷害による脱髄の局在性を電子顕微鏡等を用いた解析より明らかにし、LPA1 受容体および Rho-ROCK 系を介

する系であることを明らかにした。

1-2) Ex vivo 脱髄評価系を立ち上げ、LPA 処置に伴うミエリン関連蛋白質の遺伝子・蛋白質発現低下機構を明らかにし、脱髄機構を解明しつつある。

1-3) LPA 産生測定のための高感度バイオアッセイ法の確立し、知覚神経刺激に伴う LPA 産生を証明した。

## 2) アロディニア現象の可視化

2-1) 各種神経線維(Aβ、Aδ、C 線維)特異的侵害性応答を評価する系(EPF 法、EPW 法)を立ち上げ、Aβ、Aδ線維応答のアロディニア・過敏現象、C 線維機能の低下を確認し、神経因性疼痛責任線維が A 線維であることを明らかにした。

2-2) 神経活動バイオマーカーである脊髄後角でのリン酸化 ERK シグナル検出法解析により、非侵害性 Aβ線維刺激応答の侵害性神経への誤入力を証明した。

2-3) Cre-loxP システムによる WGA-蛍光蛋白質遺伝子の構築し、神経培養細胞における蛍光法による簡便な経シナプス投射の可視化に成功した。また、その関連トランスジェニックマウスの作成にも成功し、知覚神経線維の脊髄—脳への投射経路を可視化する準備が整った。

2-4) In vivo 及び ex vivo 実験における脊髄後根線維レベルにおける神経間の混線を電子顕微鏡レベルで明らかにした。

## 3) 脊髄後角入力細胞における電気生理学的解析

3-1) 神経因性疼痛特異的なニコチン鎮痛効果の分子基盤を拮抗薬やアンチセンスを用いた行動薬理学知見と脊髄後角細胞のパッチクランプ法による電気生理学的知見から明らかにし、神経傷害時のアセチルコリン神経による GABA 神経機能亢進効果の消失がその基盤をなすことが明らかになった。

3-2) 脊髄後角入力を担う脊髄後根線維レベルにおける混線現象の電気生理学的証明を行うための準備を整えた。

## 4) アロディニアと疼痛過敏の分子基盤

4-1) LPA 処置並びに神経傷害後のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析により、複数の GPCR、プロテアーゼ、神経接着誘因分子、神経栄養因子等の著明な発現上昇と一部の分子に関する機能阻害によりアロディニアの抑制を確認し、責任分子候補分子を突き止めつつある。

4-2) 神経因性疼痛の責任線維である Aδ線維に発現する特異的分子 ADS (仮称) リガンドを明らかにし、それを標的とした機能不活性化によるミサイル療法によるアロディニアの消失を確認した。

4-3) 培養マイクログリア細胞においては LPA による Ca 動員を確認し、それが ATP 遊離を

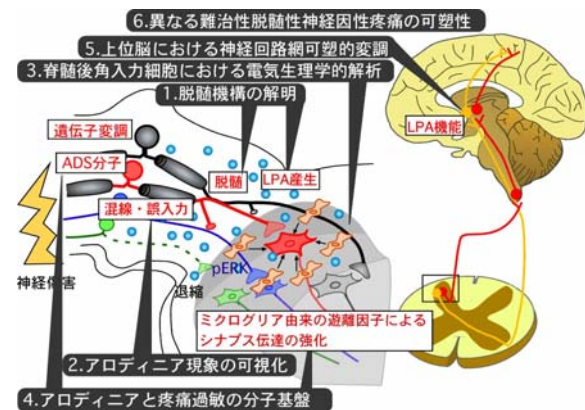
介する機構であることを見出し、神経因性疼痛時の脊髄でのマイクログリア活性化を介する維持機構に LPA が関与する可能性を突き止めた。

## 5) 上位脳における神経回路可塑的変調

5-1) 脳内 LPA 投与により中枢性の慢性疼痛とマイクログリア活性化を観察し、脳内における LPA の役割を解明しつつある。

## 6) 異なる難治性脱髄性神経因性疼痛と可塑性

6-1) 糖尿病、がん、抗がん剤パクリタキセルによる神経因性疼痛病態と脱髄機構との関連性を評価ししつつあり、治療方針の一部を突き止めた。



## 5. 進捗状況と計画

研究項目 1-6 に関して予定通りの進行状況で研究が進んでおり、今後、これまでに同定している神経因性疼痛基盤をもとに、時間・病態特異的な治療標的分子を分子機構の面から同定することを計画している。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- Nagai J, Kurokawa M, Takeshima H, Kieffer BL, **Ueda H**. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007, 321(1):195-201.
- Fujita R, Kiguchi N, **Ueda H**; *Neurochem Int*. 2007, 50(2):351-5.
- Inoue M, Yamaguchi A, Kawakami M, Chun J, **Ueda H**. *Mol Pain*. 2006, 16;2:25
- Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, **Ueda H**. *Pain*. 2006, 125(1-2):125-35.
- Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Xie W, **Ueda H**. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006,318(2):735-40.
- Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Yamaguchi A and **Ueda H**. *Molecular Pain* 2006, 16(1):16
- Matsumoto M, Inoue M, **Ueda H**. *Neurosci Lett*. 2006, 397(3):249-53.
- Ueda H**. *Pharmacol Ther*. 2006 109(1-2):57-77. Review.