

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：医療薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：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、LPA の de novo 産生機構をマウス個体解析(吸入麻酔器使用)バイオアッセイ解析により解析する。

項目2:脊髄凍結切片(ミクロトーム使用)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を行う。

項目3:脊髄機能変調に関する電気生理学的、組織化学的、生化学的、行動薬理学的解析により明らかにする。

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)を行う。

項目5:脳内局所 LPA 適用による薬理学的、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、種々の神経因性疼痛モデルにおけ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 LPA1-RohA-ROCK 感受性脱髄の脊髄後根領域での局在性を in vivo 並びに ex vivo 組織片培養実験系を用い、電子顕微鏡等により明らかにし

た。

1-2) LPA 処置に伴う脱髄現象がミエリン関連蛋白質の遺伝子低下と蛋白質分解に起因すること明らかにした。

1-3) LPA 産生測定のための高感度バイオアッセイ法を確立し、知覚神経刺激に伴う LPA 産生とその分子機構について明らかにした。

2) アロディニア現象の可視化

2-1) 各種神経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、 $A\beta$ 、 $A\delta$ 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、またこれらが LPA1 受容体感受性であることについて KO マウスを用い証明した。

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 $A\beta$ 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、種々の解析により WGA トランスジーン新法の確立に成功した。

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) 脊髄後角誤入力の証明

3-1) 神経因性疼痛特異的なニコチン鎮痛効果が ChAT 発現低下による内在性 Ach 神経の制御系の解除によることを行動薬理学知見から明らかにした。

3-2) 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。

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に特異的に発現する分子 ADS (仮称) に対するリガンド-サポリン手法を用いた機能不活性化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。

5-2) 慢性疼痛下における下降性制御系の変調を明らかにした。

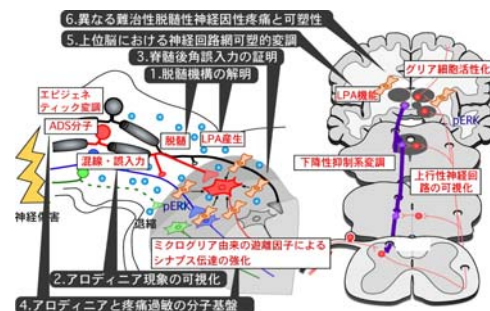
6) 異なる難治性脱髄性神経因性疼痛機構

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に関する治療方針の一部を突き止めた。

6-2) 複数の慢性疼痛モデルの確立と LPA1 受容体との関連性を突き止めた。

5. これまでの進捗状況と今後の計画

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

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

Ueda H. *Mol.Pain* 2008. Review.

Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J,

Ueda H. *Neuroscience* 2008 152, 296-8

Inoue M, Ma L, Chun J, Aoki J, **Ueda H.** *Mol.Pain* 2008 4,6

Matsumoto M, Xie W, **Inoue M**, **Ueda H.** *Mol.Pain* 2008 3,41

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.