

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成18年度採択分

平成21年5月1日現在

研究課題名（和文）神経因性疼痛発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Research for the mechanism of the expression of neuropathic pain

研究代表者

氏名 井上 和秀 (Inoue, Kazuhide)

所属研究機関・部局・職 九州大学大学院・薬学研究院・教授



推薦の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要：世界にはモルヒネも効きがたい痛み「神経因性疼痛」等に罹患する患者が千数百万人以上も存在し、苦しんでいるが、知覚神経損傷後に起こること以外詳細なメカニズムは不明である。本研究の目的は、この「最悪の痛みを引き起こす張本人」がグリアであること、ならびにその発症メカニズムを明らかにする事である。そのために、グリア細胞がいつ、どこで、どのようにして神経損傷情報を受け取り、その結果何を介して、痛み情報伝達を変調させ、神経因性疼痛を引き起こすのかを、3次元空間および時間軸を正確に把握した4D解析と行動薬理学的解析により明らかにする。

研究分野：医歯薬学

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：脳神経疾患、痛み、シグナル伝達、ミクログリア、アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

痛みは危険回避の大切な情報であるが、過剰な痛みは抑えなければならない。現在、世界にはモルヒネも効き難い痛み「神経因性疼痛」等に罹患する患者が千数百万人以上も存在し、救われ難い痛みに苦しんでいる。知覚神経損傷後に起こること以外、詳細なメカニズムは不明である。このような状況の中、我々は「神経因性疼痛が脊髄内ミクログリアの異常な活性化と、そこに発現するATP受容体P2X4の刺激によりミクログリアから神経栄養因子が放出され、神経因性疼痛を引き起こす」ことを報告した(Nature, 2003 & 2005)。しかし、ミクログリアがいつ、どこで、どのようにして神経損傷情報を受け取り、その結果何を介して、痛み情報伝達を変調させ、神経因性疼痛を引き起こすのかという本質的な多くの問題が未解明のまま残されていた

2. 研究の目的

本研究の目的は、いつ、どこで、どのようにしてグリア細胞が神経損傷情報を受け取り、その結果何を介して、痛み情報伝達を変調させ、神経因性疼痛を引き起こすのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

つぎの5つの研究課題を設定した。

(1) 脊髄ミクログリア活性化の時空解析：まず神経因性疼痛発症に関して、ミクログリア活性化プロセスでの時間・空間解析(4D解析)を精密に行う。2006年度～2010年度。

(2) 活性化ミクログリア由来疼痛因子解析：神経因性疼痛に関与するミクログリア関連因子の同定、因子放出部位、放出メカニズムの時空解析を行う。2006年度～2010年度。

(3) In vivo 電気生理解析：前述の2課題により明らかになったミクログリア由来疼痛関連因子について、痛みシナプス伝達における影響を、末梢刺激誘発電流を中枢脊髄神経でのin vivo 電気生理実験で検証する。2009年度～2010年度。

(4) In vivo イメージング技術での解析：神経因性疼痛発症モデル動物での中枢脊髄神経におけるミクログリアやアストロサイト活性化をin vivo イメージング技術で4D解析する。2009年度～2010年度。

(5) 病態モデル動物での総合解析：神経因性疼痛発症モデル動物脊髄でのアストロサイト活性化の時空解析を、ミクログリアでの解析と同様に研究を進め、両者を対比することにより(2008年度～2010年度)、さらに、in vivo 電気生理解析およびin vivo イメー

ジング 4 D 解析での成果 (2009 年度~2010 年度) を含めて、神経因性疼痛発症メカニズムの総合理解を実現する。

4. これまでの成果

(1) 脊髄ミクログリア活性化の時空解析

L5 脊髄神経損傷モデルで、ミクログリアの活性化を OX42 をマーカーとして経時的に確認したところ、痛みの経時変化と一致して、術後 7, 14 日をピークに L5 脊髄後角にて活性化が認められた。後角では表層と深層では活性化の程度が異なり、内側では外側よりも活性化が顕著であった。加えて、術後 7 日目では、L5 のみならず、L2~L4 および L6 後角でもミクログリアの活性化が確認され、神経損傷の影響が 3 次元的に敷衍していることが分かった。次に、形態学的特徴から活性化を検討した結果、脊髄ミクログリアは、神経損傷後 12 時間後から、突起の退縮・肥大化が起こり、24 時間後には典型的な活性化型へと変化した。細胞増殖は、末梢神経損傷後 28 時間後から 32 時間後にかけて急激に始まり、3.5 日後までに終わった。

サイトカインの一種であるインターフェロン(IFN) γ が神経障害の後に脊髄後角で増加し、それがミクログリアを活性化させ、Lyn 活性化と P2X₄ 過剰発現、痛み惹起という一連のメカニズムを明らかにした。

(2) 活性化ミクログリア由来疼痛因子解析

① P2X₄ 受容体過剰発現メカニズム

フィブロネクチンはインテグリン-Lyn-PI3K および ERK 情報伝達系を介して、ミクログリアにおける P2X₄ 受容体過剰発現に重要な役割を担っていることを明らかにした。

② P2X₇ 受容体と CCL3 放出

細胞外 ATP は P2X₇ 受容体を介し NFAT を活性化させ、ケモカインの一種 CCL3 の発現上昇と放出を誘発する。

③ P2Y₁₂ 受容体と神経因性疼痛発症

ミクログリアに発現する P2Y₁₂ 受容体は走化性に関与しているが、神経因性疼痛とも深く関わっていることを明らかにした。

④ P2Y₆ 受容体と貪食作用

神経因性疼痛モデルラットでは、P2Y₆ 受容体も術後経時的に高度な発現を呈したので、痛みとの関係について研究を開始したが、思いがけずに、P2Y₆ 受容体刺激によりミクログリアは強度の貪食作用を示すことが明らかになった。

⑤ カンナビノイド CB₂ 受容体と神経因性疼痛発症

末梢神経損傷により脊髄内で CB₂ 受容体の発現が亢進し、これがアロディニアの抑制に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(3) 病態モデル動物での総合解析

末梢神経傷害によるアストロサイト活

化の時空解析を行った。その結果、アストロサイトの増殖 (リン酸化 histone H3 陽性) は、損傷側脊髄においてのみ、ミクログリア増殖終了後にあたる術後 4 日付近より顕著となり、7 日目には終わった。末梢神経損傷-ミクログリア活性化-アストロサイト活性化という流れが見えてきたが、痛み発症の正確なルート解明にはまだ遠い。

5. 今後の計画

In vivo イメージング技術によるミクログリア活性化の時空解析に二光子励起顕微鏡によるリアルタイム解析を導入する。ミクログリアのマーカーである Iba1 タンパク質と高感度緑色蛍光タンパク質 EGFP が共発現するように遺伝子改変させたトランスジェニックマウス (Hirasawa et al., J. Neurosci. Res. 2005) の大脳皮質および脊髄内ミクログリアを二光子励起顕微鏡により可視化し、活性化のプロセスを in vivo 下リアルタイムに観察する。大脳皮質は、痛みの認知、情動等を司る中枢であるが、そこでのミクログリアの役割はなお不明であるため、次なる神経因性疼痛メカニズム解明のために、上位脳でのミクログリアやアストロサイトの役割を生きた動物から情報を得る。これは、神経因性疼痛発症メカニズム解明の大きなブレークスルーとなる。その他は計画通り。

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、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

1. M. Tsuda, T. Masuda, J. Kitano, H. Shimoyama, H. Tozaki-Saitoh, **K. Inoue**. IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA*, in press

2. M. Tsuda, H. Tozaki-Saitoh, T. Masuda, E. Toyomitsu, T. Tezuka, T. Yamamoto, **K. Inoue**. Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*. 56:50-58, 2008.

3. H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, H. Miyata, K. Ueda, S. Kohsaka, **K. Inoue**. P2Y₁₂ receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J.Neurosci*. 28:4949-56, 2008

4. S.Koizumi, Y.Shigemoto-Mogami, K. Nasu-Tada, Y.Shinozaki, K.Ohsawa, M. Tsuda, B.V. Joshi, K.A.Jacobson, S.Kohsaka, **K.Inoue**. UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091-1095, 2007

など原著 32 報、総説 34 報、招待講演 54 回。

ホームページ等

<http://210.233.60.66/~yakkou/>