

## 神経障害性疼痛におけるグリア機能の解明

The role of glial cells in neuropathic pain

井上 和秀 (INOUE KAZUHIDE)

九州大学・大学院薬学研究院・教授



### 研究の概要

神経障害性疼痛発症に脊髄での活性化ミクログリアおよびアストロサイトが重要な役割を担っている。しかし、神経障害性疼痛発症維持回復機構におけるミクログリアおよび同時に認められるアストロサイトの活性化メカニズムの詳細と相互関係、そして各グリア細胞種に特異的な疼痛関連分子群の機能と相互影響など不明の部分が極めて多い。本研究はこれらを解明する。

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：神経障害性疼痛、グリア

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、神経障害性疼痛発症に脊髄活性化ミクログリアが重要であること、さらに、ATP受容体サブタイプ P2X4 刺激によりミクログリアが脳由来神経栄養因子 (BDNF) を放出し、その BDNF が脊髄後角二次ニューロンのアニオン制御を変調させアロディニア発症を引き起こすことを明らかにし (Nature 2003, 2005)、世界の疼痛研究に大きなトレンドを創出した。その後、神経障害性疼痛メカニズムに関し、ATP や UDP 等のヌクレオチドおよびその受容体、サイトカイン類、ケモカイン類など多くの分子が関与することを明らかにした (Nature 2007; PNAS 2009; J. Neurosci 2000, 2001, 2003, 2004a, b, 2006, 2008 等) が、多くは未だ謎に包まれていた。

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛発症維持回復機構におけるミクログリアおよび同時に認められるアストロサイトの活性化メカニズムの詳細、それらの相互関係、そして各グリア細胞種に特異的な疼痛関連分子群の機能と相互影響など、多くの未解明の部分を、高難度の実験技術を確立し、それらを用いて解明する。

### 3. 研究の方法

アストロサイト特異的に活性化する分子群をトランスクリプトーム解析により同定する。次に神経障害性疼痛と深く関与する分子群を行動薬理的に厳選し機能を解析す

る。厳選された分子群について、ミクログリア活性化との関連性を時系列で解析し、神経障害性疼痛との関係を明確にする。各種分子欠損動物を用い、厳選された疼痛関連分子について痛み神経シナプス伝達における役割を電気生理的手法及び二光子イメージング技術により解明する。神経障害性疼痛に関与する ATP 等ヌクレオチドの放出に重要な小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) の発現パターン解析、神経障害性疼痛への関与を明らかにする。

### 4. これまでの成果

①病態モデルラットで、神経障害性疼痛と関係の深い IL-6 の産生に係わる重要な転写因子 STAT ファミリーの一つ STAT3 が、末梢神経損傷後、アストロサイトの増殖を引き起こし、アストロサイト限局的に活性化することを見いだした (Brain 2011)。STAT3 の活性化を JAK 阻害剤で抑制すると、神経損傷後に一旦形成されたアロディニアでさえも著明に抑制された。このことは、神経障害性疼痛の維持に、JAK-STAT3 を介するシグナル伝達経路が重要な役割を担っていることを示唆する。

②GFAP-Cre マウスおよび STAT3<sup>f/f</sup> マウスを交配しアストロサイト特異的 STAT3 欠損マウス (GFAP-Cre/ STAT3<sup>f/f</sup>) を作製し行動薬理的解析を行った結果、アストロサイト特異的 STAT3 欠損マウスでは損傷後 10 日目から 14 日目と神経障害性疼痛が著明に減弱した。ま

た、アデノ随伴ウイルスを用いてアストロサイト特異的に恒常的活性化型 STAT3 を正常マウスに遺伝子導入することでアロディニアが発症した。これらの事実は、アストロサイトの JAK-STAT3 系シグナルが神経障害性疼痛維持に特異的に関与していることを更に強固にするデータである。そこでこの JAK-STAT3 系シグナルに深く関連する遺伝子を明らかにするために、神経損傷後 14 日目にアストロサイト特異的 STAT3 欠損マウスを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、野生型マウスにおいて神経損傷側の脊髄後角において 64 遺伝子が発現増加し、そのうちアストロサイト関連遺伝子の上位 5 遺伝子全てにおいてアストロサイト特異的 STAT3 欠損マウスで発現増加の抑制が見られた。今後は各遺伝子の機能解析を行い、神経障害性疼痛維持への関与と相互関連を明確にする。

③神経障害性疼痛モデル動物の脊髄後角では、アロディニア発現の時間経過に呼応してケモカイン CCL3 とその受容体 CCR5 の発現増加をリアルタイム PCR で確認した。CCL3 のもう一つの受容体である CCR1 は不思議なことに増加していなかった。この CCL3 とその受容体 CCR5 の発現増加の意義を知るために、CCL3 をラット髄腔内に投与した結果、投与後 1 時間目をピークとする初期の痛みがまず発現し、それが消失した後、再度痛みが出現し、なんと投与後 7 日間も持続した。この 2 相性の痛みのうち、前者の初期疼痛は CCR1 阻害剤 BX513 により抑制され、後者の持続するアロディニアは CCR5 阻害剤 Maraviroc (抗エイズ薬) によって抑制された。さらに既に形成された痛みに対する効果も、CCR1 阻害剤は初期疼痛のみを抑制し、CCR5 阻害剤は長期的疼痛のみを抑制した。また、末梢神経障害後のアロディニアは CCL3 の中和抗体の髄腔内投与で抑制された。CCL3、CCR1、CCR5 各遺伝子の転写産物に対する in situ hybridization を行った結果、CCR1 は主に神経細胞に、CCR5 はミクログリアに発現することがわかった。さらに CCL3 の発現増加が脊髄ミクログリアで確認された (Anesthesiology, 2014)。以上により、神経障害性疼痛モデル動物における内因性 CCL3 の作用はケモカインシグナルを介して長期に亘る疼痛形成に関与していると考えられた。

④我々は、神経損傷後きわめて初期に転写因子 MafB が脊髄ミクログリアで増加し、MafB の制御で特定分子群の発現増加を促し神経障害性疼痛に関与することをすでに明らかにしていたが、MafB 増産メカニズムは不明であった。非常に興味深いことに、末梢神経損傷後 24 時間以内にマイクロ RNA miR-152 の発現が低下し、それと逆比例して MafB が発現増加することがわかった。合成 miR-152 の髄腔内投与を内在性 miR-152 の減少を補うよ

うに連続投与すると疼痛形成が劇的に抑制され、その効果は 1 週間持続した。

⑤末梢神経損傷後、脊髄後角では ATP の放出に重要な小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) の顕著な発現増加が観察され、VNUT 欠損マウスや siRNA を用いた検討により、アロディニア発症に脊髄内 VNUT の重要性が明らかになった。

## 5. 今後の計画

①JAK-STAT3 系シグナルに深く関連する遺伝子のうちアストロサイト関連遺伝子の上位 5 遺伝子の機能解析と、神経障害性疼痛維持への関与と相互関連、作用機序を明確にする。

②神経障害性疼痛モデル動物での CCL3 作用機序解明、脊髄後角ミクログリア-アストロサイト間のケモカインリンクを検証する。

③脊髄組織サンプルで見られたマイクロ RNA miR-152 の発現変化が脊髄内のどの細胞種に因るものなのかをセルソーティング、もしくは in situ hybridization の手法等を用いて、特にアストロサイトに注目し、エピジェネティックな制御メカニズムを含め、検討する。

④細胞種特異的 VNUT 欠損マウスを作製し、アストロサイト、ミクログリアあるいは神経細胞のうち、どの細胞の VNUT がアロディニア発症に重要かを明らかにする。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(1)K. Matsushita, K.Inoue et al. C-C chemokine receptor type 5 is an important pathological regulator in the development and maintenance of neuropathic pain. **Anesthesiology** 2014, in press

(2)M.Nakaya, K.Inoue et al. GKR6-deficient mice exhibit reduced recycling of senescent red blood cells and impaired apoptotic cell clearance causing autoimmunity. **Nature Commun** 4:1532, 2013

(3) T. Masuda, K.Inoue et al. IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. **Cell Rep** 1(4):334-40, 2012

(4) K.Biber, K.Inoue et al. Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. **EMBO J** 30:1864-73, 2011

(5) M. Tsuda, K.Inoue et al. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. **Brain** 134(4): 1127-1139, 2011

等 42 報 (総説含む)

[受賞]

九州大学研究産学官連携活動表彰 2011 年、2012 年、2013 年

平成 25 年度日本薬学会賞 2013 年 3 月 27 日

[ホームページ等]

<http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/>