

1次調査で四肢にしびれ・痛みが有ったものの中で2次調査に協力が得られた人数は2次調査の対象となった215名のうち、現時点で151名であった。これらについて対面検診あるいは詳細な聞き取りで脊髄障害性疼痛症候群の取り込み基準を満たすと考えられたものは6名であった。一方、残りの手足にしびれや痛みを訴えるものについては、画像所見などの詳細な検討を行っていないため明らかでない部分もあるが、その多くは脊柱管狭窄症もしくは絞扼性神経障害などに伴うケースであり、一部に上腕骨外顆炎や膝痛や関節痛に伴って起こる痛みを誤って神経痛と認識していたものが、混在していた。

このような実態について、琴平町社会福祉協議会を通して、自治会連合会にその結果を周知した。

D. 考察

琴平町は人の移動が少なく、町と社会福祉協議会、自治会の連携が上手くいっており、社会福祉協議会を中心とした声掛けで自治会が機能する土地柄である。その為、重度の脊髄障害性疼痛症候群患者についての見落としは非常に少ないものと考えている。現時点の結果から、琴平町の約半数の人口に対して行った調査で出てきたデータとして、およそ成人4000名において6名(0.15%)であることが示唆された。一方で、須崎市における調査では、カルテベースの調査手法であるが、4名(0.13%)の患者が本症候群であることが確認された。今後、脊髄障害性疼痛症候群患者の原因疾患、発症起点、痛みの特徴、これまで行ってきた治療の内容や効果について更に、詳細な調査を行う必要がある。疾患の頻度が少なく、同じ症状を有するものを集めることが困難なことがわかった。特に症状が多彩であり、対応方法も変更していく必要があることから、全国規模で患者のコミュニティを作るなどして、研究を行うことで患者の症状緩和に繋がる研究を行うことが出来るものと考えている。

E. 結論

地域研究においては約0.15%が脊髄障害性疼痛症候群の取り込み基準を満たすことが分

かってきた。今後は患者コミュニティを作るなどして、症状に応じた治療の確立のための研究を行う必要があるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究
脊髄障害性疼痛動物モデルの評価

研究分担者 柴田 政彦 大阪大学大学院 医学系研究科 疼痛医学寄附講座 教授
研究協力者 中江 文 大阪大学大学院 医学系研究科 麻酔集中治療講座 特任准教授

研究要旨

1. 脊髄障害性疼痛の原因には様々ある。さらに、脊髄障害で起こるのは痛みだけでなく、運動機能の変化がおこる。よって、動物においてその病態を評価するにあたってはその受傷機転、障害部位に注目し、起こりうる運動機能の変化も合わせて解釈していくことが重要である。その分子生物学的な変化が、本当に痛みや侵害刺激による変化なのか、運動機能の低下に伴う変化なのかを注意深く検討する必要がある。
2. 脊髄障害性疼痛の動物モデルの一つに脊髄挫滅モデルがある。脊髄挫滅モデルは外傷性脊髄損傷の受傷機転に最も近いことと運動麻痺が軽度で、疼痛行動の評価が後肢で可能である点で研究に適したモデルと考えられる。今回は、下行性疼痛抑制系を担うセロトニン系、その中でもセロトニン2C受容体の選択的スプライシングに注目し、その疼痛行動と制御機構の関係を明らかにした。内因性の疼痛制御機構としてのセロトニン系にはセロトニン2C受容体以外にも様々なサブタイプが関与する。今後、セロトニン系の制御機構の全般的な解明をめざし、その制御機構のメカニズムの検討を続けたいと考えている。

A. 研究目的

脊髄障害性モデルの一つに脊髄挫滅モデルがある。このモデルは、外傷性の脊髄損傷の受傷機転に近いこと、ラットにおいては運動麻痺が軽度で、疼痛行動の評価が2週間後より可能ということで、亜急性期の病態メカニズムの解明に適したモデルと言える。

内因性の鎮痛機構として下行性疼痛抑制系という仕組みがある。これは脳幹部からの神経伝達物質が脊髄を下行性に伝達し、鎮痛作用を生み出すとい

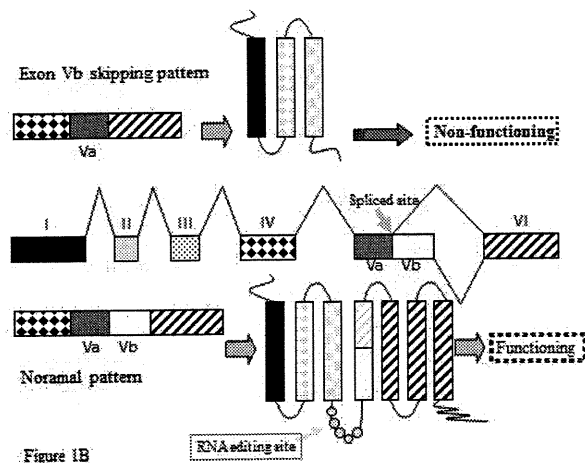
うものである。その神経伝達物質として代表的なのが、セロトニンとノルアドレナリンである。

セロトニンを伝達物質とする受容体のうちセロトニン2C受容体は、その制御機構がユニークであることが知られている。受容体の数による制御以外に、1つはRNA編集が起こり、その受容体機能が低下する仕組み、もう1つは選択的スプライシングが起こり、受容体としての体裁をなさなくなるという仕組みである。

今回我々は、脊髄障害性疼痛モデルとして、ラットの脊髄挫滅モデルを用いて、セロトニン2C受容体の選択的スプライシングによる脊髄レベルの疼痛制御機構の解明をめざし、研究を行った。

B. 研究方法

6週齢のオスのSDラットので脊髄挫滅モデルを作成した。その対照群として、椎弓切除のみを行い脊髄挫滅を行わないシャム手術群、何も外科的処置を行わないナイーブ群での比較を行うこととした。手術方法は、椎弓切除後、5cmの高さから10gの錘を、0.5cm四方の先端に荷重が集中するように落とし、受傷させた。受傷後2週間で逃避行動をとれ



るレベルまでの運動機能の回復状況を確認し、von Frey Filament を用いて疼痛行動を測定した。

術後 2 週間で過剰麻酔により安楽死させた後、脊髄の取り出しを行った。脊髄は受傷部位周囲 1 cm (Injury-Core)、受傷部位より頭側 (Rostral) 1 cm、受傷部位より尾側 (Cauda) 1 cm に分けて取り出した。取り出したのち RNA 抽出を行った後逆転写後、リアルタイム PCR 法でセロトニン 2 C 受容体の数、選択的スプライシング後の mRNA の定量を行った。統計は JMP9.01 を使い、Tukey-Cramer 検定で行った。

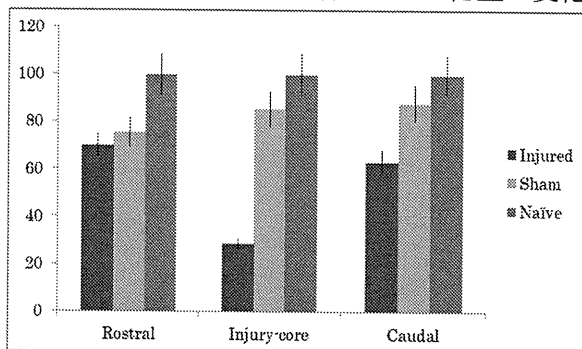
(倫理面への配慮)

本研究は、動物を対象とした研究である。よって、大阪大学動物実験倫理審査委員会において承認を受けている。使用する動物の数はできるだけ少なく済むように計画を立て、動物が苦痛を伴う時は安楽死させることを徹底した。

C. 研究結果

術後 2 週間で障害モデルの後肢の評価で疼痛域との低下を認めた。(p<0.05)

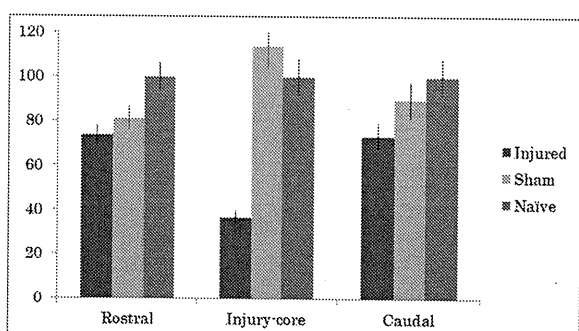
1) セロトニン 2 C 受容体 mRNA の総量の変化



障害モデルサンプルにおいてすべての部位でセロトニン 2 C 受容体 mRNA の量はナীবに比べ、Injury-Core ではさらにシャムとの比較においても減少した。(p<0.05)

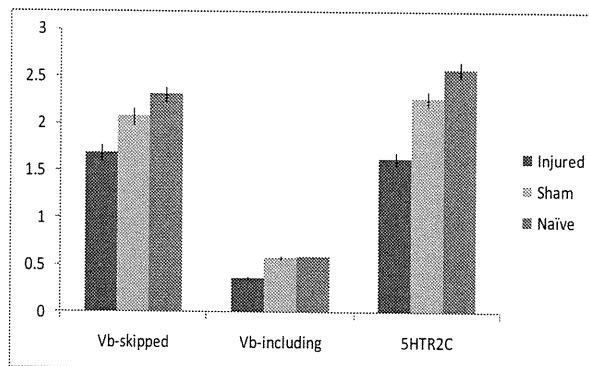
2) スプライシング後の無機能化する受容体 mRNA による影響の検討

①無機能化した受容体 mRNA の割合

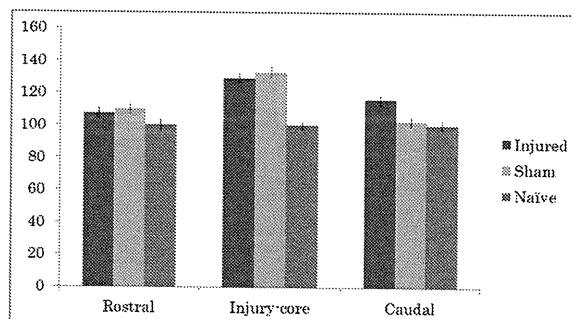


まず、無機能化した mRNA の割合そのものを調べた。セロトニン 2 C 受容体そのものの影響が無視できないと考えられたため、セロトニン 2 C 受容体全体に対する無機能化した mRNA の割合を検討する必要がある。

②セロトニン 2 C 受容体の総量に対する無機能なスプライシングバリエーションの割合



無機能な受容体の割合は障害モデルの尾側サンプルで高く (p<0.05) 疼痛行動との関連が示唆された。



3) スプライシングバリエーションの絶対量の比較

ナীবサンプルでもスプライシングのおこっている割合が高い。

D. 考察

脊髄挫滅モデルにおいて、疼痛行動を評価することは可能で、術後 2 週間で疼痛を感じている可能性がある。

運動麻痺からの回復は疼痛行動の評価には十分ではあるが、術前よりは弱い状況での評価がなされており、今回の変化に一部には運動機能の変化に伴う分子生物学的な変化がおこっている可能性は否定できない。

選択的スプライシングは、特に障害部位より尾側のサンプルで増えており、スプライシングによる影響が考えられた。

脊髄挫滅モデルにおける変化では、もともとス

ライシングがおこっている割合が一定量存在する。よって、セロトニン2C受容体による制御を考える上では、スプライシングによる影響を考え、数による制御やRNA編集による影響を論じていく必要があると考えられた。

E. 結論

脊髄挫滅モデルにおいて、セロトニン2C受容体による疼痛行動の制御機構は3つある。①受容体の数の変化による制御。②RNA編集でGタンパク結合能の変化により、セロトニンの伝達のしやすさが異なることによる制御。③選択的スプライシングにより受容体の体裁をなさないタンパクが賛成されることによる制御が存在する。選択的スプライシングによる制御について以下のことが明らかになった。①セロトニン2C受容体は脊髄においてナイーブな状態でスプライシングがおこっている。②障害部位(Injury-Core)ではセロトニン2C受容体のスプライシングによる制御より、数の変化によるインパクトの方が大きい。③障害部位より尾側(Caudal)では選択的スプライシングによる受容体機能の無機能化のインパクトがある程度存在する。④障害部位ではシャム個体においてもモデル個体と同様の無機能化がおこり、脊髄挫滅による純粋な効果でない可能性がある。RNA編集がおこらない(受容体機能が高い状態)では選択的スプライシングによる受容体の無機能化がおこりやすいという報告もある。よって、セロトニン2C受容体による制御は我々が思っている以上に細かな調節機構が働いている可能性があることが分かった。セロトニン系はセロトニン2C受容体以外にも様々なサブタイプが存在する。よって、それらすべてがどのように制御されているのかは不明である。今後、それらがどのような制御機構を持っているが、そしてそれらを制御する因子が何かかわかれば、新しい創薬ターゲットとなる。このように本研究の発展により、痛みのメカニズム、鎮痛薬の新たな作用点を見極めることは、医療行政上、大変有意義であり、国民の保健において多大なる貢献ができると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Kenji Yano, Ko Hosokawa, Masahiko Shibata, and Takashi Mashimo. The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011 (2011), Article ID 939023, 11 pages

2. 学会発表

- 1) 石田 葉子、田中 達哉、中江 文、中井 國博、三上 晶子、吉田 真理、柴田 政彦、矢野 健二、細川 互、眞下 節、脊髄挫滅モデルにおけるセロトニン2C受容体選択的スプライシングの関与、日本分子生物学会、神戸、12月、2010、ポスター
- 2) 吉田真理、田中達哉、石田葉子、中江文、中井國博、三上晶子、大場創介、柴田政彦、眞下節、上田晃一、核小体RNA、RBII-52の神経因性疼痛でのセロトニン2C受容体に対する役割、第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日～12日、2009. ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究

研究分担者 井上 和秀 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

神経障害性疼痛はオピオイドやNSAIDs等の既存の鎮痛薬が奏効しないため、臨床上問題となっている。我々は、神経障害性疼痛発症に脊髄活性化ミクログリアとP2X4受容体が重要な役割を演じていることを報告したが、しかし、損傷神経から何が出てミクログリアに働きかけるのかは謎であった。本研究により、その一つがケモカインCCL21であり、損傷神経で産生放出されて、ミクログリア活性化とP2X4過剰発現に重要な働きをすることが明らかになった。

A. 研究目的

神経障害性疼痛は、軽い触刺激を激しい痛みとして誤認する病態（アロディニア）を主徴とする難治性慢性疼痛であり、物理的損傷、癌、糖尿病、帯状疱疹などにより末梢および中枢神経が損傷することにより発症する。オピオイドやNSAIDs等の既存の鎮痛薬が奏効しないため、臨床上問題となっており、発症機序の解明と治療薬の開発が急務となっている。我々は、「神経障害性疼痛発症モデル脊髄では、ミクログリアが活性化し、そこに過剰発現するP2X4受容体の刺激により放出された脳由来神経栄養因子が後角二次ニューロンに働き、KCC2の発現を抑制し、細胞内陰イオン濃度を異常に高める。この二次ニューロンに対して、触刺激により介在ニューロンから放出されたGABAが作用して脱分極を引き起こし、それが痛みシグナルとなる」との仮説を提出した。しかし、損傷神経から何が出てミクログリアに働きかけるのかは謎であった。一方、ケモカインは炎症・免疫系に重要な役割を担う8~10kDaの小さなタンパク質で、CX3CL1 (fractalkine)、CCL2(MCP-1)、CCL3が神経障害性疼痛に関与していることが示唆されていた。そのうち、CCケモカイン類のCCL21は、脊髄損傷時や神経障害時に増加すること、ミクログリアのケモ

タキシスを引き起こすことが報告されていたが、神経障害性疼痛における役割に関しては分かっていなかった。そこで本研究では、神経障害性疼痛における脊髄CCL21の役割を解明することを目的とし、神経障害性疼痛発症メカニズムの解明を目指した。

B. 研究方法

神経因性疼痛病態モデルラットの作製には、脊髄神経損傷モデル(Kim and Chung, 1992)の作製法を改変して行った。触刺激に対する痛み行動の測定は von Frey filament を用いた Up and down 法 (Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994) により行った。脊髄腔内カテーテル留置手術を施したラットで痛み行動を前測定した後、PBS(-)で適時希釈した薬物を5 μ l 脊髄腔内に注入した。

C. 研究結果

L5 脊髄神経損傷により、損傷側(ipsilateral) DRG ニューロンにおいてのみ、神経損傷 12 時間後から CCL21 の発現が認められた。一方、脊髄後角においては、CCL21 の発現は神経損傷 12 時間後では認められず、24 時間後および 48 時間後に認められた。このことから損傷 DRG ニューロンで増産された CCL21 が中枢側への軸索を介して後角まで輸送されたと推測さ

れるが、実際にその中間位置の、軸索小丘及びL5 脊髄後根神経の軸索において CCL21 が神経損傷 24 時間後に確認された。

次に神経損傷動物でのアロディニア発現には CCL21 が必要であるか否かを検討した。L5 脊髄神経損傷後、野生型マウス (WT) では、術後 3 日目から軽度機械刺激に対する後肢逃避閾値の低下 (つまりアロディニア) が損傷側 (ipsilateral) に発現したが、遺伝的に CCL21 が欠損している plt マウスでは疼痛閾値は損傷前とほぼ変わらず、アロディニアの発現は観察されなかった。次いで、脊髄後角での CCL21 の作用を明らかにするために、CCL21 の機能を阻害する中和抗体 0.3 μ g を神経損傷直前と、神経損傷後 3 日目まで一日二回、髄腔内投与したところ、IgG 投与対照群のアロディニアと比較して著明に抑制された。これらのことから、神経損傷動物でのアロディニア発現には CCL21 が必要であると考えられる。なお、CCL21 は熱刺激と機械的侵害刺激に対する急性痛反応に対しては特段の機能は有していなかった。

さらに、CCL21 によるミクログリア P2X4 過剰発現と神経障害性疼痛発症の関係について検討した。神経損傷後に脊髄後角ミクログリア P2X4 受容体の過剰発現が報告されているが、野生型マウス (WT) ではそれが再確認された。一方、plt マウスでは、その発現がかなり抑制されていた。CCL21 が P2X4 発現に関与している可能性が出てきたので、初代培養ミクログリアに CCL21 (10 nM) を処理したところ、24 時間目に P2X4 受容体タンパク量が無処置群 (Ctl) の約 1.5 倍に増加した。さらに、plt マウスでは末梢神経を損傷しても、神経障害性疼痛が発症しなかったが、神経損傷後 2 日目に plt マウスへ、リコンビナント CCL21 の髄腔内投与を行った結果、損傷側 (ipsilateral) において神経損傷後 14 日目まで続くアロディニアが発現した。つまり、plt マウスでも神経障害性疼痛を引き起こす条件は CCL21 以外全てそろっており、そこに外因的に CCL21 を補給することでアロディニアを発症することができたわけである。一方、P2X4 受容体欠損マウスでは神経損傷による神経障害性疼痛

が発症しないことは既に報告しているが、CCL21 を P2X4 受容体欠損マウスに投与しても、一過性の疼痛過敏以外、持続的なアロディニアは観察されなかった。以上のデータは、CCL21 は神経障害性疼痛に関する必須アイテムであり、その神経障害性疼痛発症には P2X4 受容体の発現が不可欠であることが明らかとなった。

D&E. 考察および結論

本研究により、損傷を受けた DRG ニューロンの細胞内で CCL21 が発現し、軸索小丘、神経軸索を経て、脊髄後角まで輸送されること、そしてその後、CCL21 がミクログリアに作用して P2X4 受容体の過剰発現に寄与し、神経障害性疼痛の発症に深く関与している可能性が示唆された。本研究の成果が、神経障害性疼痛のメカニズム解明と治療薬開発の一助となることを期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Tsuda, Y. Kohro, T. Yano, T. Tsujikawa, J. Kitano, H. Tozaki-Saitoh, S. Koyanagi, S. Ohdo, R-R Ji, M. W. Salter, K. Inoue. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 134(4): 1127-1139, 2011
- 2) Biber K, Tsuda M, Saitoh-Tozaki H, Tsukamoto K, Toyomitsu E, Masuda T, Boddeke H, Inoue K. Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. *EMBO J* 30:1864-73, 2011
- 3) M. Nishida, M. Ogushi, R. Suda, M. Toyotaka, S. Saiki, N. Kitajima, M. Nakaya, K.-M. Kim, T. Ide, Y. Sato, K. Inoue, and H. Kurose. Heterologous down-regulation of angiotensin type 1 receptors by purinergic P2Y2 receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- κ B, *PNAS* 108(16):6662-7,

- 4) K. Kuboyama, H. Harada, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Ushijima and K. Inoue. Astrocytic P2Y₁ receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31(9):1930-41, 2011 (表紙を飾る)
- 5) Kataoka A, Koga Y, Uesugi A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways. *Purinergic Signal.* 2011 May 13. [Epub ahead of print]
- 6) K. Kuboyama, M. Tsuda, M. Tsutsui, Y. Toyohara, H. Tozaki-Saitoh, H. Shimokawa, N. Yanagihara and K. Inoue. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain* 7:50 2011.
- 7) Y. Hayashi, K. Kawaji, L. Sun, X. Zhang, K. Koyano, T. Yokoyama, S. Kohsaka, K. Inoue, and H. Nakanishi. Microglial Ca²⁺-activated K⁺ Channels Are Possible Molecular Targets for the Analgesic Effects of S-ketamine on Neuropathic Pain. *J. Neurosci* 31(48):17370-82, 2011
- 8) Toyomitsu E, Tsuda M, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tanaka Y, Inoue K. CCL2 promotes P2X₄ receptor trafficking to the cell surface of microglia. *Purinergic Signal.* 2012 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 9) Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection. *Adv Pharmacol.* 2011;61:495-528.
- 10) Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Platelet-activating factor and pain. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(8):1159-62.
- 11) Inoue K, Tsuda M. Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia. *Exp Neurol.* 2011 Sep 17. [Epub ahead of print]
- 12) Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Purinergic system, microglia and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol.* 2011 Oct 27. [Epub ahead of print]
- 13) 井上和秀、痛み研究の最前線, 臨床と研究 2012 in press
- 14) 今井利安、中田恵理子、井上和秀. ギラン・バレー症候群モデル動物における脊髄ミクログリアと P2X₄ 受容体の神経因性疼痛への関与, *Pain Research* in press
- 15) H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Inoue. P2Y receptors in microglia and neuroinflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews on Membrane Transport and Signaling,*
- 16) 井上和秀. 神経障害性疼痛とミクログリアの ATP 活性化イオンチャネル. 細胞 印刷中
- 17) 井上和秀. 神経障害性疼痛における CC-Chemokine Ligand 21 (CCL21) の役割, 実験医学 in press
- 18) 井上和秀. 痛みと ATP 脳 21 in press
2. 学会発表
- 1) 津田誠, 井上和秀, 痛みの慢性化を抑制するグリア細胞制御. 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 神戸, 2011. 5. 19-21
- 2) Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue. Spinal microglia: crucial non-neuronal cells for neuropathic pain. 2nd KPRC Seoul Pain Symposium Program, Seoul, 2011. 6. 17
- 3) 津田誠, 井上和秀. 脊髄グリア細胞から探る神経障害性疼痛メカニズム. 第 16 回日本緩和医療学会学術大会, 札幌, 2011. 7. 29-30

- 4) K. Inoue. Glial functions in neuropathic pain. ISN Satellite meeting: Glial cells in (patho) physiology, リュブリャナ (スロヴェニア) Slovenian Academy of Sciences and Arts, 2011/08/23 — 2011/08/28
- 5) Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Kazuhide Inoue. Microglia in pain signaling. 10th Euroglia Meeting on Glial Cells in Health and Diseases, Prague, Czech Republic, Sep 13-17, 2011 (Inoue: Organizer)
- 6) 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀. Interferon regulatory factor-8 は、神経損傷後に見られる脊髄ミクログリアの過活動状態への移行に重要な転写因子である。第54回日本神経化学学会大会、石川県山代、2011.9.26-28
- 7) 吉永遼平, 津田誠, 増田隆博, 西本奈央, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀. 脊髄ミクログリアの interferon regulatory factor-5 は神経障害性疼痛の発現に重要な転写因子である。第54回日本神経化学学会大会、石川県山代、2011.9.26-28
- 8) 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀. 初代培養ミクログリアにおける P2Y12 受容体を介したケモカインの発現制御。第54回日本神経化学学会大会、石川県山代、2011.9.26-28
- 9) 上杉歩未, 片岡彩子, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀. UDP 誘発性のミクログリアによるマクロピノサイトーシスへの PKD の関与。第54回日本神経化学学会大会、石川県山代、2011.9.26-28
- 10) K. Inoue, Glia in neuropathic pain after peripheral nerve injury. Milan Pain Symposium "New insights in the pharmacological control of pain" Milan, 2011/09/29 — 2011/10/04
- 11) K. Inoue. Microglial P2 receptor functions in neuropathic pain. The 9th IASP Research Symposium. Shanghai, 2011/10/15 — 2011/10/18
- 12) 津田誠, 井上和秀. 神経障害性疼痛とグリア細胞～その役割と分子メカニズム～。第4回日本運動器疼痛学会、大阪、2011.11.19-20
- 13) 増田潤哉, 齊藤秀俊, 米田聡介, 津田誠, 井上和秀. 神経障害性疼痛モデルにおいて脊髄ミクログリア特異的に発現する転写因子 MafB の役割。第64回日本薬理学会西南部会、福岡、2011.11.20
- 14) 津田誠, 増田隆博, 齊藤秀俊, 井上和秀. 神経障害性疼痛に重要なミクログリア転写因子。第39回薬物活性シンポジウム、福岡、2011.11.21
- 15) 津田誠, 高露雄太, 辻川智子, 矢野貴之, 北野順子, 齊藤秀俊, 井上和秀. 神経障害性疼痛の維持における JAK-STAT3 シグナリングの役割。第39回薬物活性シンポジウム、福岡、2011.11.21
- 16) 米田聡介, 増田潤哉, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀. 神経障害性疼痛におけるミクログリアの転写因子 MafB の役割。第39回薬物活性シンポジウム、福岡、2011.11.21
- 17) 齊藤秀俊, 宮田広行, 津田誠, 井上和秀. 神経障害性疼痛におけるミクログリア P2Y12 受容体の関与。第39回薬物活性シンポジウム、福岡、2011.11.21
- 18) Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Kazuhide Inoue. IRF8 is a critical transcription factor required for microglia activation. 第34回分子生物学会、横浜、2011.12.13-16
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |
- 11) K. Inoue. Microglial P2 receptor functions in

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究
脊髄及び脊髄根損傷に伴う疼痛メカニズムの解明

研究分担者 野口 光一 兵庫医科大学解剖学神経科学部門 教授

研究要旨：

脊髄障害性疼痛の分子メカニズムを解明する基礎的研究の一端として、神経根及び脊髄神経障害性疼痛に特異的な病態の解明を目指している。神経の障害に伴い、脊髄グリア細胞において Lipid Mediators とその受容体の発現変化（PAF）が生じること、P2X7 ATP 受容体も発現増加し、両者とも痛みに関与することを今年度発見した。さらに神経根（前根）傷害モデルにおいても、脊髄において変化が観察された。

A. 研究目的

脊髄障害性疼痛のメカニズムを解明する基礎的研究の一環として、脊髄や脊髄神経根の損傷・圧迫・炎症に伴う疼痛メカニズムを解明することを目的としている。腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄による神経根症は腰・下肢痛を主訴とする事が多く、この病態の一面は神経根に対する圧迫や髄核への炎症反応の神経への波及である。しかし神経根の微小切断を含めた損傷の要素が脊髄後角にどのような影響をおよぼしているかは不明である。また、末梢神経損傷後の神経障害性疼痛モデルの解明で得られてきた脊髄におけるグリア細胞の関与という新しい概念が、脊髄や脊髄根損傷後の疼痛にどのように適応できるか、という点ではほとんどデータがない。本研究ではその第一歩として、神経根及び脊髄神経損傷時の脊髄グリア細胞の動態と、その疼痛メカニズムへの関与を解明することをめざしている。

B. 研究方法

脊髄根損傷と後根神経節（DRG）より末梢の脊髄神経損傷において、脊髄における種々の分子の遺伝子発現の変化を検討し、差があるか否かについて調べる。

1. ラットを用いた神経根及び脊髄神経損傷に伴う疼痛モデルの確立

疼痛関連動作（heat/cold hyperalgesia、

mechanical allodynia）の確認：SD 雄性ラットを用いて坐骨神経痛モデルである神経根損傷モデル及び選択的 L5 脊髄神経損傷モデルの両者を作成し、疼痛関連動作(thermal hyperalgesia、mechanical allodynia) を経時的に観察する。

また、グリアの発現においては末梢神経の障害による神経障害性疼痛モデル（SNI）も使用した。

2. 神経根損傷に伴う種々のグリアマーカー、イトカイン、tPA、ATP 受容体各種サブタイプ等の免疫組織化学的变化の解析

SD ラットの L5 神経根損傷モデルを作成し、脊髄後角における種々の細胞内情報伝達因子、サイトカイン、グリアマーカー、P2X7 など ATP 受容体サブタイプ等の発現を免疫組織化学法、Western blot 法を用いて解析する。さらに発現の経時的な変化も検索する。

3. 疼痛関連因子としての脂質受容体の関与

新規疼痛関連分子として末梢神経障害時の脊髄グリア細胞及び後根神経節におけるロイコトリエン合成酵素及びその受容体、さらに PAF(platelet-activating factor)やその受容体に関して、in situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学法を用いて検討する。

C. 研究結果

1. ラットを用いた神経根及び脊髄神経損傷に伴う疼痛モデルの確立

L4,5 レベルの神経根を結紮することで安定した疼痛行動を得ることができた。選択的 L5 脊髄神経結紮モデルと比較して、やや疼痛行動のレベルは弱いものの安定したモデルと判断できた。以後の解析はこの両者を用いて、結果の比較や新しい分子の動態の解析を行った。

2. 神経根損傷に伴う種々のグリアマーカー、サイトカイン、tPA 等の免疫組織化学的变化の解析

マイクログリアのマーカーである Iba-1、アストロサイトの GFAP の免疫組織化学法を施行した。安定して、Iba-1、GFAP の上昇を確認することができた。新しい所見として、神経根のうち前根のみを結紮するモデルにおいても脊髄マイクログリアやアストロサイトの活性化が観察されたことである。これは後根の損傷を慎重に除外したモデルにおいても同様の変化が観察された。前根損傷モデルにおける DRG における分子の変化については、特に疼痛に関わる大きな変化は現時点では観察されなかった。

3. グリア細胞での P2X7ATP 受容体発現

末梢神経障害性疼痛モデルの脊髄マイクログリアにおいてイオンチャンネル型 ATP 受容体の一つである P2X7 の mRNA と蛋白が発現増加することを発見した。さらに P2X7 阻害剤投与にて疼痛行動の抑制が明らかとなった。

4. 疼痛関連因子としての脂質受容体の関与

A.ロイコトリエン(LT)合成酵素 (5-LO、FLAP、LTC4s) 及び BLT1 および CysLT1 受容体の発現増加を発見し、疼痛メカニズムに関わっていることを発見した。

B.DRG ニューロンにおいても CysLT2 の発現が増加し、ATP 受容体 P2X3 との強い関係を発見した。

C.今年になり、末梢神経障害性疼痛モデル

の脊髄において、PAF 合成酵素及びその受容体が、マイクログリアにおいて発現増加し、疼痛メカニズムに関与していることを発見して発表した。

D & E. 考察・結果

整形外科疾患に特に多い後根神経節より中枢側で脊髄までの解剖学的要素に対する神経損傷による疼痛メカニズムを調べ、末梢神経障害との比較検討するのが本研究の一つの目的である。過去の本研究において、神経根損傷において脊髄後角グリア細胞でダイナミックな遺伝子発現の変化が見られることが明らかとなった。

末梢神経障害時のマイクログリアにおいて新規の分子が関与していることを今年度発見した。一つは、イオンチャンネル型 ATP 受容体 P2X7 であり、もう一つは脂質受容体関係の一つである PAF である。どちらの発見も新規性が高く、今後とも精力的に検討を続ける予定である。

本研究を発展させて腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄による疼痛病態を解明し、治療の対象分子としても新しいアプローチとなることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masamichi Okubo, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Hirosato Kanda, Yi Dai and Koichi Noguchi, Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury, Mol Pain, In Press.
- 2) Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Masamichi Okubo, Kan Miyoshi, Yi Dai, and Koichi Noguchi, Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 DRG neurons following L5

spinal nerve ligation, Pain, 153, 68-79, 2012

- 3) Kimiko Kobayashi, Emiko Takahashi, Yasuko Miyagawa, Hiroki Yamanaka and Koichi Noguchi, Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model, Neurosci. Lett., 504, 57-61, 2011
- 4) Naoki Yoshida, Kimiko Kobayashi, Lina Yu, Shenglan Wang, Rengaowa Na, Satoshi Yamamoto, Koichi Noguchi and Yi Dai, Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin, Mol Pain, 7, 41, 2011.
- 5) Koichi Noguchi, Masamichi Okubo, Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain, Biol. Pharm. Bull, 34, 1163-9, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
内田研造, 馬場久敏	外側型腰椎椎間板ヘルニア		アトラス骨・関節画像診断 5. 脊椎・脊髄	中外医学社		2011	24-25
内田研造, 中嶋秀明, 馬場久敏	変性疾患; 椎間孔狭窄に対する顕微鏡下除圧術		OS NOW Instruction 腰椎の手術 ベーシックからアドバンストまで必須テクニック	株式会社メジカルビュー社		2011	52-57
内田研造, 渡邊修司, 馬場久敏	腰椎		整形外科臨床パサージュ 8 運動器のペインマネジメント	株式会社中山書店		2011	79-87
上野雄文	VBM	加藤敏・神庭重信 他 5名	現代精神医学事典	株式会社弘文堂	東京都	2011	86
上野雄文	SPM	加藤敏・神庭重信 他 5名	現代精神医学事典	株式会社弘文堂	東京都	2011	106
上野雄文	fMRI (機能的MRI)	加藤敏・神庭重信 他 5名	現代精神医学事典	株式会社弘文堂	東京都	2011	112
上野雄文	人工知能	加藤敏・神庭重信 他 5名	現代精神医学事典	株式会社弘文堂	東京都	2011	525
上野雄文	ペリオドグラム	加藤敏・神庭重信 他 5名	現代精神医学事典	株式会社弘文堂	東京都	2011	948

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikemoto T, Kawasaki M, Kato T, Takemasa R, Ushida T, Tani T, et al.	Dangerous cervical radiculopathy by Lemierre's syndrome	J Orthop Sci	4		2011
Ikeuchi M, Ushida T, Izumi M, Tani T.	Percutaneous radiofrequency treatment for refractory anteromedial pain of osteoarthritic knees	Pain Med	12(4)	546-51	2011
Nakamura M, Nishiwaki Y, Ushida T, Toyama Y.	Prevalence and characteristics of chronic musculoskeletal pain in Japan	J Orthop Sci	16(4)	424-32	2011
Nishihara M, Inui K, Motomura E, Otsuru N, Ushida T, Kakigi R.	Auditory N1 as a change-related automatic response	Neurosci Res	71(2)	145-8	2011
Shimo K, Ueno T, Younger J, Nishihara M, Inoue S, Ikemoto T, et al.	Visualization of painful experiences believed to trigger the activation of affective and emotional brain regions in subjects with low back pain	PLoS One	6(11)	e26681	2011
Ushida T, Nishihara M, Arai K, Inoue S.	Conservative therapy for neuropathic pain	Rinsho Shinkeigaku	51(11)	939	2011
Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H.	Tumor necrosis factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury	Spine	36(1)	1350-1358	2011
Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Rodriguez Guerrero A, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H.	High-mobility group box-1 and its receptors contribute to proinflammatory response in the acute phase of spinal cord injury in rats	Spine	36(2)	2122-2129	2011

Uchida K, Yayama T, Sugita D, Nakajima H, Rodriguez Guerrero A, Watanabe S, Roberts S, Johnson WE, Baba H	Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy)	Eur Spine J	21(1)	149-155	2012
Uchida K, Yayama T, Cai HX, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Kobayashi S, Yoshida A, Chen KB, Babars H.	Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors	Arthritis Res Ther	13(9)	R144	2012
Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Yayama T, Guerrero AR, Inukai T, Hirai T, Sugita D, Johnson WE, Babars H.	Apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy): possible pathomechanism of human cervical compressive myelopathy	Eur Spine J	21(3)	490-497	2012
Uchida K, Yayama T, Cai CH, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Yoshida A, Baba H.	Cyclic Tensile Strain Facilitates the Ossification of Ligamentum Flavum Through β -Catenin Signaling Pathway. In Vitro Analysis	Spine		in press	
Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H.	Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice	J Neuroinflammation		in press	
Sugimoto N, Miwa S, Ohno-Shosaku T, Tsuchiya H, Hitomi Y, Nakamura H, Tomita K, Yachie A, Koizumi.	Activation of tumor suppressor protein PTEN and induction of apoptosis are involved in cAMP-mediated inhibition of cell number in B92 glial cells	NeurosciLett.	497(1)	55-59	2011
Hirota R, Ngatu NR, Miyamura M, Nakamura H, Suganuma N.	Goishi tea consumption inhibits airway hyperresponsiveness in BALB/c mice	BMC Immunol.	12	45	2011
Usui C, Hatta K, Doi N, Kubo S, Kamigaitani R, Nakanishi A, Nakamura H, Hattori N, Arai H.	Improvements in both psychosis and motor signs in Parkinson's disease, and changes in regional cerebral blood flow after electroconvulsive therapy	ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry.	35(7)	1704-1708	2011

Fukutomi Y, Taniguchi M, Watanabe J, Nakamura H, Komase Y, Ohta K, Akasawa A, Nakagawa T, Miyamoto T, Akiyama K.	Time trend in the prevalence of adult asthma in Japan: Findings from population-based surveys in Fujiyama City in 1985, 1999, and 2006	Allergol Int.	60(4)	443-448	2011
Tadashi Konoshita, Yasukazu Makino, Tomoko Kimura, Miki Fujii, Norihiro Morikawa, Shigeyuki Wakahara, Kenichiro Arakawa, Isao Inoki, Hiroyuki Nakamura, Isamu Miyamori and The Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators	A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types of calcium channel blockers	Int J Cardiol.		in press	
Tanaka T, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Fukutomi Y, Shibata S, Sugimoto S, Hattori K, Eboshida A, Konoshita T, Nakamura H.	The differences in the involvements of loci of polymorphic region and IL50V in interleukin-4 receptor α chain gene between atopic dermatitis and Japanese cedar pollinosis	Allergol Int.		in press	
Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Kanazawa T, Ito K, Yamamoto Y, Nakamura H, Nakajima T, Nishioka K. : The Fibromyalgia Symptom Scale:	The Japanese version of the 2010 American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale: reliability and validity	Mod Rheumatol.		in press	
芦澤健、芦原睦、田口敏彦	痛みと心	Practice of Pain Management	2(3)	148-159	2011
田口敏彦	痛み、しびれの治療 神経ブロック療法	脊椎脊髄ジャーナル	24(5)	403-410	2011
吉田紘二、加藤圭彦、田口敏彦	ラット頸神経の解剖学的検討	整形外科と災害外科	60(1)	13-15	2011
竹下克志	運動器疾患における神経障害性疼痛	分子リウマチ治療	5	5-7	2012

M. Tsuda, Y. Kohro, T. Yano, T. Tsujikawa, J. Kitano, H. Tozaki-Saitoh, S. Koyanagi, S. Ohdo, R-R Jatsi, M. W. Salter, K. Inoue	JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats	Brain	134(4)	1127-1139	2011
Biber K, Tsuda M, Saitoh-Tozaki H, Tsukamoto K, Toyomitsu E, Masuda T, Boddeke H, Inoue K	Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development	EMBO J	30	1864-1873	2011
M. Nishida, M. Ogushi, R. Suda, M. Toyotaka, S. Saiki, N. Kitajima, M. Nakaya, K.-M. Kim, T. Ide, Y. Sato, K. Inoue, and H. Kurose	Heterologous down-regulation of angiotensin type 1 receptors by purinergic P2Y2 receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- κ B	PNAS	108(16)	6662-6667	2011
K. Kuboyama, H. Harada, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Ushijima and K. Inoue	Astrocytic P2Y1 receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia	J Cereb Blood Flow Metab.	31(9)	1930-1941	2011
Kataoka A, Koga Y, Uesugi A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K	Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways	Purinergic Signaling			2011
K. Kuboyama, M. Tsuda, M. Tsutsui, Y. Toyohara, H. Tozaki-Saitoh, H. Shimokawa, N. Yanagihara and K. Inoue	Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases	Mol Pain	7	50	2011
Y. Hayashi, K. Kawajiri, L. Sun, X. Zhang, K. Koyano, T. Yokoyama, S. Kohsaka, K. Inoue, and H. Nakanishi	Microglial Ca ²⁺ -activated K ⁺ Channels Are Possible Molecular Targets for the Analgesic Effects of S-ketamine on Neuropathic Pain	J. Neurosci	31(48)	17370-17382	2011
Toyomitsu E, Tsuda M, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tanaka Y, Inoue K	CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia	Purinergic Signaling			2012

Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K	Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection	Adv Pharmacol	61	495-528	2011
Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K	Platelet-activating factor and pain	Biol Pharm Bull	34(8)	1159-1162	2011
Inoue K, Tsuda M	Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia	Exp Neurol			2011
Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K	Purinergic system, microglia and neuropathic pain	Curr Opin Pharmacol			2011
井上和秀	痛み研究の最前線	臨床と研究		in press	2012
今井利安、中田恵理子、井上和秀	ギラン・バレー症候群モデル動物における脊髄ミクログリアとP2X4受容体の神経因性疼痛への関与	Pain Research		in press	
H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Inoue	P2Y receptors in microglia and neuroinflammation	Wiley Interdisciplinary Reviews on Membrane Transport and Signaling		in press	
井上和秀	神経障害性疼痛とミクログリアのATP活性化イオンチャンネル	細胞		in press	
井上和秀	神経障害性疼痛におけるCC-2-Chemokine Ligand 21 (CCL21) の役割	実験医学		in press	
井上和秀	痛みとATP	脳21		in press	
Okubo M, et. al.	Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury	Mol Pain		in press	2012

Fukuoka T, et. al.	Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 DRG neurons following L5 spinal nerve ligation	Pain	153	68-79	2012
Kobayashi K, et. al.	Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model	Neurosci. Lett.	504	57-61	2011
Yoshida N, et. al.	Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin	Mol Pain	7	41	2011
Noguchi K, et. al.	Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain	Biol. Pharm.	B34	1163-1169	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷