

神経因性疼痛モデルにおける 知覚神経線維機能変調の多様性とその分子機構

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 松本みさき

【目的】

一次知覚神経束は、細径で神経伝導速度の遅い無髄C線維、中径で伝導速度の速い有髄A線維、太径で伝導度の最も速い有髄A線維によって構成されており、知覚受容はこうした神経線維の複合的な活性化によって成されている。このような異種混合性の神経束に傷害が生じると、知覚神経は遺伝子発現変化や形態学的変化を含め多様な可塑的変調を呈し、結果として、侵害性刺激に対する過敏応答やアロディニア現象（触覚性の刺激が灼熱痛として感じられる知覚異常）を誘発する。こうした病態は神経因性疼痛として知られるが、複雑な神経線維応答変調が生じているため、その神経機能解析および分子機構の解明には困難を極める。

本研究では、こうした問題を第一に考え、新たに知覚神経選択的な神経機能解析法を確立し、神経障害に対する各種知覚神経線維の機能変調を比較解析することを目的とした。さらに、機能変調に関わる分子機構を明らかにし、治療に向けて新規標的分子となる疼痛関連遺伝子の探索を行うことを目的とした。

【結果・考察】

第1章 一次知覚神経線維における選択的な神経機能解析法の確立と各種線維応答の薬理学的性格付け

本章では、以下3項目について明らかにした。

1. ニューロメーターは、異なる周波数の正弦波電気刺激により、それぞれ、無髄C線維応答、有髄A線維応答、有髄A線維応答を選択的に刺激することができる装置であり、これを導入してEPF (Electrical stimulation-induced Paw Flexion) 試験法、及びEPW (Electrical stimulation-induced Paw Withdrawal) 試験法を確立した。これにより、選択的な知覚神経機能解析が可能となった。
2. EPF 試験法及びEPW 試験法を用いて、各種神経線維応答が異なる薬理学的特性をもつことを見出した。すなわち、無髄C線維はカプサイシン感受性であり、サブスタンスP (NK1) 受容体及びNMDA受容体を介する脊髄伝達機構をもつこと、有髄A線維はNMDA受容体を介する脊髄伝達機構をもつこと、有髄A線維はnon-NMDA受容体を介する脊髄伝達機構をもつことを明らかにした。

第2章 神経因性疼痛モデルにおける知覚神経線維の機能変調とその分子機構

本章では、3種の神経因性疼痛モデルを用いて、以下3項目について明らかにした。

1. 抗ガン剤パクリタキセル投与による神経因性疼痛モデルマウスを確立し、その線維機能変調解析を行ったところ、有髄A線維 (A_δ, A_β線維)の過敏応答が確認された。なお、無髄C線維は無変化であった。さらに、パクリタキセル投与後に神経伝達物質の遊離促進に関わるカルシウムチャネルの $\alpha_2\delta-1$ サブユニット (Ca $\alpha_2\delta-1$) が有髄A線維に

発現上昇することを見出した。

2. 坐骨神経部分結紮性神経因性疼痛モデルにおいて、無髄C線維の反応鈍麻と有髄A線維 (A \cdot , A \cdot 線維 $\cdot\cdot$)の過敏応答が確認された。さらに、無髄C線維の脊髄伝達物質であるサブスタンスPの免疫活性が脊髄後角で減少していること、及びCa \cdot 2 \cdot -1が有髄A線維に発現上昇することを見出した。神経因性疼痛初発因子であるリゾホスファチジン酸 (LPA) 投与モデルにおいても同様に、無髄C線維応答の反応鈍麻と有髄A線維 (A \cdot , A \cdot 線維 $\cdot\cdot$)の過敏応答が確認された。
3. 坐骨神経部分結紮性神経因性疼痛モデルマウスに認められる A \cdot 線維過敏応答は NMDA 受容体拮抗薬により遮断された。さらに、神経刺激に応じて特異的に見出される ERK1/2 リン酸化反応を指標として、各種線維応答に関連する神経細胞を可視化したところ、神経因性疼痛モデルでは、A \cdot 線維刺激により脊髄後角神経細胞に異所性の神経活動が観察された。これらの活性化は NMDA 受容体拮抗薬により遮断された。このことから、神経因性疼痛モデルでは、非侵害性 A \cdot 線維活性化が侵害性線維の活動を惹起し NMDA 受容体を介した脊髄入力機構に変換されることが明らかになった。

第3章 慢性疼痛治療薬の作用点解析と新たな標的分子の探索

本章では、脊髄伝達機構に着目して、以下4項目について明らかにした。

1. Ca \cdot 2 \cdot -1 阻害剤であるギャバペンチンは、坐骨神経結紮性及びパクリタキセル誘発性神経因性疼痛モデルにおける有髄A線維過敏応答を有意に抑制した。このことから、Ca \cdot 2 \cdot -1 は有髄A線維過敏応答に機能的に関連することが示唆された。
2. アセチルコリン合成酵素 (Choline acetyltransferase: ChAT) 遺伝子ノックダウンにより正常閾値の減少が認められたが、低用量ニコチンによって顕著に回復した。さらに、無髄C線維や有髄A線維において広汎な ChAT 活性が観察され、その終末部位である脊髄後角 I-III 層領域に繊維状の免疫活性が観察された。このことから、神経因性疼痛モデルの一次知覚線維において同様にアセチルコリン神経活性が減弱し、ニコチンの強い鎮痛効果に関連すると考えられた。
3. 様々な生理活性物質を用いて侵害性応答を選択的に比較評価できる末梢性疼痛 (Allogenic stimulation-induced Paw Flexion: APF) 試験法を用いて、NSAID の一種であるザルトプロフェンがブラジキニン B2 受容体拮抗作用を持つことを明らかにした。ブラジキニンは無髄C線維を介する侵害性応答を誘発することから、ザルトプロフェンは強力に炎症性疼痛を抑制することが期待される。
4. LPA-RhoA を介して駆動される遺伝子発現変化について、脊髄後根神経節 (DRG) におけるマイクロアレイ解析を行い、軸索ガイダンス分子である ephrinB1 が LPA 誘発性過敏応答に関連することを遺伝子ノックダウン法により証明した。

【まとめ】

本研究ではこれまで解析不能であった有髄A \cdot 線維応答を含めて評価できる、選択的な神経機能解析法 (EPF 試験法、EPW 試験法) を確立した。さらに、リン酸化 ERK1/2 を指標とした組織機能学的解析を組み合わせることによって、有髄A \cdot 線維が侵害性応答 (無髄C線維 \cdot 有髄A \cdot 線維) とは明らかに異なる特性をもつことを見出し、異種混合性の神経束である一次知覚神経を、無髄C線維 \cdot 有髄A \cdot 線維 \cdot 有髄A \cdot 線維それぞれについて特性を理解し、区別化することができた。

この新たな神経機能評価系を利用し、神経因性疼痛モデルでは、有髄 A・線維と有髄 A・線維に $Ca\cdot2\cdot-1$ が発現上昇し、ともに神経機能が亢進しており、過敏応答を呈するという知見が得られた。一方、無髄 C 線維機能はモデルにより異なるが、減弱あるいは無変化であった。この事から、正常時における C 線維及び A・線維を介した侵害受容は、神経傷害により有髄 A ($A\cdot A\cdot$) 線維によって伝達されるという侵害受容機能のモードシフトが生じていると結論される。特に、有髄 A・線維では、神経傷害時に、侵害性線維の特徴である NMDA 受容体を介して異所性に脊髄入力するという知見が得られたことから、非侵害性刺激が痛み刺激に変換するアロディニア現象に関連すると示唆される (図 A-C)。このことについて、神経因性疼痛モデルの脊髄後根部位では脱髄を生じることが報告されていることから、脱髄により発生する電氣的混線 (エファプス) あるいは神経発芽 (スプラウティング) によって神経線維間相互作用が生じていると考えられる。

以上のことから、神経傷害に対する神経線維応答は各々に異なることが明らかになった。この多様性を説明するそれぞれの分子機構変調は、神経因性疼痛治療薬の創薬の標的として重要である。この点について、神経因性疼痛形成機構に関わる LPA-RhoA に視点をおいたマイクロアレイ解析により同定した ephrinB1 遺伝子も新たな標的分子である。本研究で見出された各種知覚線維の特性と病態時における変調への理解が、今後の研究の基盤となり、更なる発展に繋がることを期待したい。

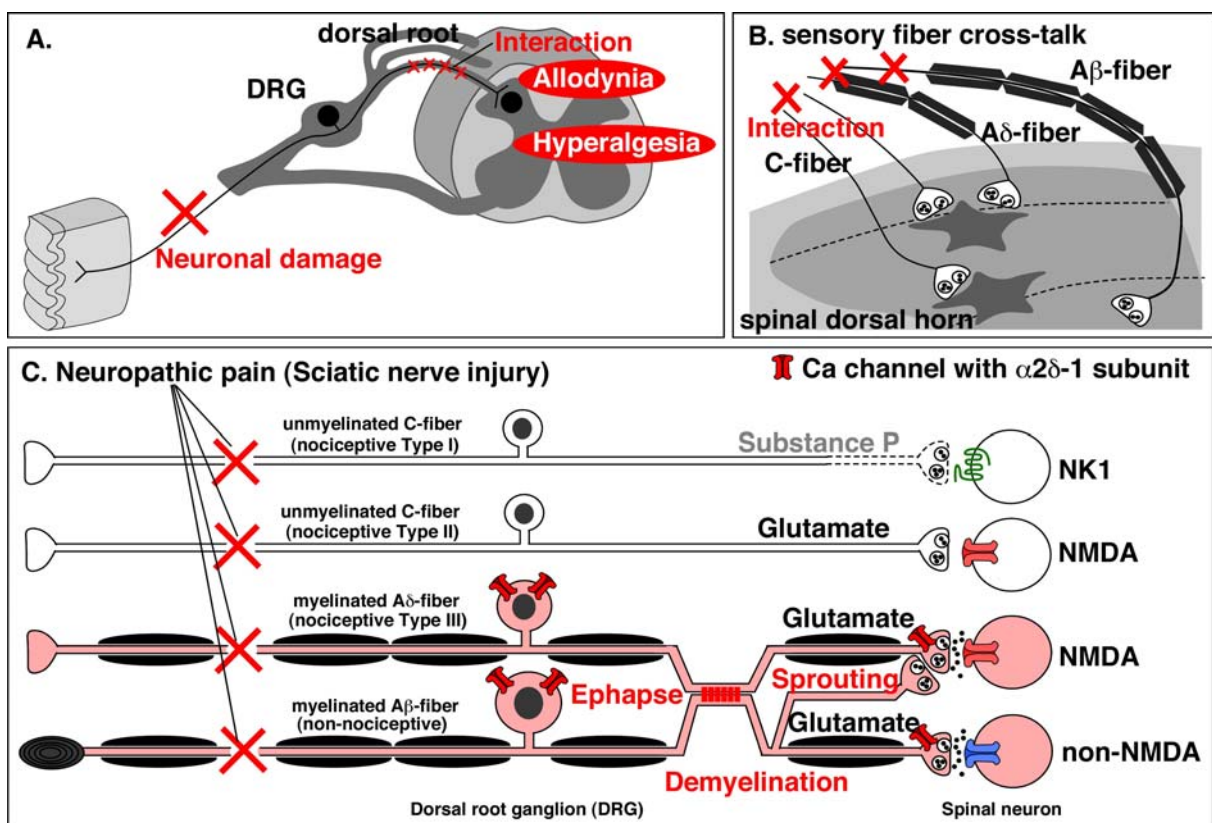


図. 神経因性疼痛モデルにおける各種線維応答の可塑的変調

A. 神経傷害時、神経線維混線が生じると示唆される後根部位。B. 後根部位において、混線が生じた結果、線維選択性の消失した脊髄入力が発生する。C. 無髄 C 線維では疼痛関連分子の発現低下や神経末端退縮による機能低下が生じるのに対し、有髄 A 線維では $Ca\cdot2\cdot-1$ 分子の発現上昇による機能亢進が生じる。さらに、A・線維では、後根部位に生じる脱髄により、エファプスやスプラウティングを介した神経混線が生じ、NMDA 受容体を介したアロディニア現象を招く。