

# 神経障害性疼痛を担う脊髄および上位脳における リゾホスファチジン酸合成

長崎大学医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 分子薬理学分野 永井 潤

## 〔緒言〕

神経損傷などに起因する神経障害性疼痛は代表的な慢性痛であり、疼痛過敏や触覚刺激を痛みと感じるアロディニアなどの特徴的症状を示す。近年、Ueda 等の研究グループは、坐骨神経障害時に産生される脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸 (LPA) が神経障害性疼痛の初発原因分子であることを初めて明らかにし、その分子機構として LPA<sub>1</sub> 受容体を介する脱髄現象ならびに一次知覚神経や脊髄後角細胞における疼痛関連遺伝子群の発現上昇を見出した。最近では神経障害によって産生される LPA の産生機構が明らかにされており、一次知覚神経障害によって生じるサブスタンス P とグルタミン酸の痛み刺激が脊髄後角に入力することにより、LPA 産生が誘発することが示唆されている。このような背景のもと、第 1 章では後根神経における LPA 特異的な脱髄の局在性を見出し、第 2 章ではこの後根神経に生じる LPA 依存的な脱髄を手がかりに脊髄で産生されるリゾリン脂質の定量に成功した。第 3 章ではフィードフォワード分子である LPA 合成と痛みの双方向性の制御機構を検討した。そして、第 4 章では LPA の合成のメカニズムを考えたとき、同様の LPA を介する機構が疼痛伝達の第二次シナプスである上位脳(視床)でも観察されるのではないかという類推が成立するので、本仮説のもと末梢神経傷害性神経障害性疼痛モデルの研究をするうちに感覚性の疼痛伝達制御とは異なる新たな可塑性機構を見出し、その機構が上位脳における LPA シグナリングを介することを初めて明らかにした。

## 〔方法〕

使用動物:6 週齢以降(18~22g)の C57BL/6J 系雄性マウス

神経障害性疼痛モデル: マウスを麻酔科、右側後肢部分の皮膚を切開し、露出させた坐骨神経の半分を縫合針で通してすくいあげ、縫合糸で完全に結紮した。

脱髄評価法: 洗浄した組織片をグルタルアルデヒドに室温で前固定し、緩衝液で洗浄後、1% 四酸化オスミウムを用いて後固定を行った。透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) 観察に用いる試料においては洗浄および脱水後、エポン樹脂に浸透させ、包埋した。ミクロトームにセットしたブロ

ックをトリミングし、ダイヤモンドナイフを用いて厚さ 80 nm の超薄切片を製作した。試料に酢酸ウラニール染色を施し、TEM 観察を行った。

リゾリン脂質定量法: 組織から脂質抽出を行い、NALDI-TOF-MS (Nanostructure-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)法を用い、リゾホスファチジルコリン(LPC)の定量を行なった。

疼痛評価法: 機械刺激性疼痛試験としてデジタル式 von Frey 試験法を、熱刺激性疼痛試験として thermal paw withdrawal 試験法を用いた。

## 【結果および考察】

### 1) 後根神経特異的 LPA<sub>1</sub> 受容体介在性脱髄

坐骨神経障害によってひき起こされる LPA<sub>1</sub> 受容体依存的な脱髄およびミエリン関連タンパク質の発現低下は後根神経のみで観察され、脊髄神経および坐骨神経では認められなかった。しかしながら、組織片培養系を用いた実験では、LPA による脱髄は全ての領域で一様に観察されたので、LPA が脱髄を誘発するのに必要な機構は全ての領域で備わっていると考えられる。従って、後根神経特異的 LPA<sub>1</sub> 受容体依存的な脱髄は神経障害によって脊髄で LPA が産生され、それが後根神経に移行し脱髄を誘発することが示唆された。

### 2) 脊髄リゾリン脂質合成

LPA の前駆体である LPC の定量法を NALDI-TOF-MS 法を用いて確立した。この方法を用いて、坐骨神経障害後の LPC を定量したところ、75 分後をピークに脊髄と後根神経で増加した。LPA 合成酵素であるオートタキシン(ATX)ヘテロ欠損マウスではその産生ピークは 120 分後にシフトし、LPC 量も増加した。神経障害によって産生された LPC は 75 – 120 分の間に ATX によって LPA へと転換された。

### 3) 痛みと LPA の双方向性制御

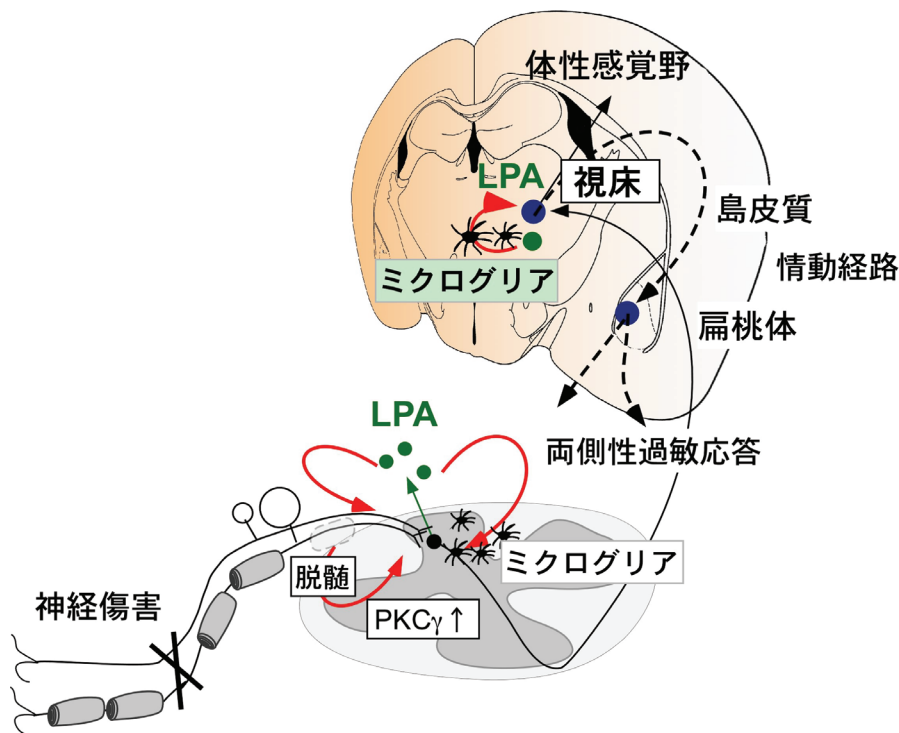
神経障害によって LPA 産生が強い痛み刺激によって産生されているかを検討するために、脊髄レベルで痛み刺激の入力を抑制するモルヒネを神経障害前投与しておく、神経障害によって産生される LPC 産生増加は完全に抑制された。また、ATX 阻害剤である depletion ATX 抗体および 2ccPA は、神経障害性疼痛の形成を抑制/治療効果が認められ、痛みを抑制することを明らかにした。

### 4) ミラーイメージペインと上位脳における LPA 合成

神経障害性疼痛モデルにおいて、特に左側坐骨神経が障害を受けたときは非障害部位である右足にも過敏が生じるミラーイメージペインが発症することを見出した。このメカニズムが LPA<sub>1</sub>KO マウスおよび depletion ATX 抗体や LPA<sub>1</sub> アンチセンスの脳室内投与により、抑制されたことから上位脳での LPA 産生が関与していることが明らかになった。

## [まとめ]

神経障害によって引き起こる LPA 特異的な脱髄は後根神経でのみ起こる。このことは、脊髄での LPA 産生を示唆する事実であり、実際に脊髄および後根神経で LPC の産生上昇を NALDI-TOF-MS 法を用いて定量に成功した。さらにこの LPA(LPC)の産生上昇は、痛み刺激を抑制すると産生上昇が抑制されたことから、痛み刺激によって産生されることを示唆している。また、産生された LPA は痛みを誘発させたので、LPA は痛み増幅機構を介して、自身の産生を増加させていると考えられる。そして、この LPA フィードフォワード機構が上位脳においても成立することを明らかにし、このメカニズムが左側神経障害時に観察される非障害側ミラーイメージペインに関与することが明らかになった。慢性痛の持続化に痛みが痛みを誘発する「痛みの悪循環」が関与することが示唆されているが、脊髄および上位脳での LPA 産生増幅が痛みの悪循環形成に関与していると考えられる。本研究が、今後の慢性痛研究の基盤となり、更なる発展に繋がることを期待したい。



## [基礎となった学術論文]

1) Nagai J, Uchida H, Matsushita Y, Yano R, Ueda M, Niwa M, Aoki J, Chun J, Ueda H: Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. Mol Pain 2010, 6:78.