

パクリタキセル誘発性および脳卒中後神経障害性疼痛におけるリゾホスファチジン酸シグナルの役割

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 矢野 亮

【目的】

疼痛は生体における警告系として、恒常性維持の為の重要な役割を果たしている。しかしながら何らかの原因により疼痛伝達系に關与する神経系が障害を受けた場合に発生する神経障害性疼痛は本来の警告系としての痛みの範疇を逸脱しており、痛みそのものが疾患の本態となっている。本研究ではこれらの痛みのうち、末梢神経障害性疼痛としてパクリタキセル誘発性神経障害性疼痛、および中枢神経障害性疼痛として脳梗塞後神経障害性疼痛におけるリゾホスファチジン酸の關与を検討した。

本研究室ではこれまでに、坐骨神経部分結紮モデルマウスを用いた検討から脂質メディエーターの一種であるリゾホスファチジン酸(LPA)が初発原因分子であることを報告している。LPAは末梢側からの非生理的刺激によって脊髄後角で産生され、逆行性シグナルとして後根神経上にLPA₁受容体を介して脱髓を引き起こす。脱髓により絶縁性を失った神経線維は他の神経線維と直接的な接触(エファプス)、もしくは神経発芽(スプラウティング)を介して他の神経線維と接触し、電気的信号の混線を引き起こす。これらが原因となり、神経障害性疼痛特有の触覚と痛覚の誤認現象(アロディニア)が発生していると考えられている。また一旦産生されたLPAがLPA₃受容体を介して更に産生を増加させるFeed-forward機構の存在も報告している。

パクリタキセルはタイヘイヨウイチイ(*Taxus brevifolia*)の樹皮から得られた抗腫瘍活性を有する化合物であり、現在は乳がん、子宮がん、卵巣がんおよび非小細胞肺癌の化学療法剤として広く用いられている。更に近年適応拡大がなされるなど、臨床における重要性は増してきている。しかし同時にタキサン系薬剤には特有の末梢神経障害が高率に発生することが知られている。これらは予防可能な副作用であるにも関わらず治療法が未確立であり、重篤な場合は投薬拒否に繋がるなど治療上看過できない問題となっている。

そこで本研究の第一章ではパクリタキセル誘発性神経障害性疼痛におけるLPAシグナルの關与を検討する為、電子顕微鏡を用いた神経線維の形態観察およびToluidine blue染色を用いた脱髓の定量的解析を行った。また、第二章ではシュワン細胞におけるLPA₁受容体以降の脱髓の分子機構としてプロテアーゼの一種であるCalpainの關与を検討した。第三章ではLPA合成経路の解明としてMALDI-TOF MSを用いたLPAの定量的解析を行い、さらにLPA産生増幅機構の解明の一端として炎症性サイトカインの一種であるIL-1 β の關与を検討した。

第四章では新たに中枢神経障害性疼痛におけるリゾホスファチジン酸シグナルの關与を検討した。脳血管疾患(脳卒中)は日本人の死因第四位と患者数が非常に多く、特に寝たきりの原因疾患としては第一位となっている。その中で約7割を占める脳梗塞は血栓による脳血管の閉塞であり、閉塞部位から先の神経細胞の壊死が原因とされている。死亡率は約15%であるが、回復後の運動障害、感覚障害、慢性痛、高次脳機能障害など多様な後遺症が残ることが知られている。しかしながら疼痛発現のメカニズムに関して、その多くは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、脳卒中後

神経障害性疼痛のモデルとして一過性中大脳動脈塞栓モデルを用い、その疼痛責任線維の特定を行った。

【実験方法】

第一章から第三章までのパクリタキセル誘発性神経障害性疼痛モデルは、パクリタキセル(4mg/kg)を隔日で4回腹腔内(i.p.)投与して作製した。また、LPAの単独効果を検討するためにLPAを脊髄くも膜下(i.t.)投与を行い、モデルマウスとした。これらを用いてElectrical stimulation-induced Paw Withdrawal (EPW)試験法による疼痛責任線維の特定を行い、また透過型電子顕微鏡による形態観察またはToluidine blue染色法による軸索直径の分類を行った。更にLPAの産生増加を指標としてMALDI-TOF MSを用いたLPA合成経路の検討も試みた。

第四章の脳卒中後神経障害性疼痛モデルは一過性中大脳動脈結紮モデルを用いた。このモデルを用いてクリニカルスコア等の神経学的スコア等を確認した上で、パクリタキセル同様にEPW試験法を用いて疼痛責任線維の特定を行った。

【結果】

第一章：パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛における行動薬理的解析による疼痛責任線維の特定とLPA依存性脱髄

本章ではパクリタキセル投与により惹起される熱性刺激及び機械性刺激に対する疼痛閾値の低下を確認し、初回投与から14日後にEPW試験法による疼痛責任線維の同定を試みた。その結果、通常は触覚刺激を伝導するA β 線維特異的なLPAシグナルの関与を明らかにした。次に同じく14日後の後根神経、脊髄神経、坐骨神経を回収し透過型電子顕微鏡による形態観察およびToluidine blue染色を用いた定量的解析を行った。その結果、野生型マウスではより軸索直径の大きい神経線維での脱髄が増加しており、これらの脱髄はLPA₁受容体遺伝子およびLPA₃受容体遺伝子欠損マウスで抑制された。

第二章：パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛の脱髄機構におけるCalpainの関与

本章ではCalpain阻害剤E64-dの投与を行い、後根神経上の脱髄に与える影響を検討した。第一章と同じくEPW試験法を行い、A β 線維特異的な閾値の回復を確認した。また、透過型電子顕微鏡による形態観察およびToluidine blue染色を用いた定量的解析から脱髄の抑制が認められた。

第三章：MALDI-TOF MSを用いたLPA合成機構の解明

本章ではMALDI-TOF MSによるLPA産生の解析を試みた。その結果、パクリタキセル初回投与から24時間後に産生量のピークが確認された。この産生増加は二次ニューロンにおいて一次知覚神経からの刺激を受容するNMDA受容体およびNK1受容体に対する拮抗薬により抑制された。また、LPA産生増強に関与するLPA₃受容体遺伝子欠損マウスでも産生抑制を確認したが、今回新たにLPA₁受容体遺伝子欠損マウスでもLPA産生増加の抑制を確認した。更に新たなLPA産生増強機構の一端として、LPA脊髄くも膜下投与モデルマウスからIL-1 β を介したLPA産生増強機構の

存在を見出した。

第四章：中枢性神経障害性疼痛モデルとしての一過性中大脳動脈結紮モデルマウスを用いた疼痛責任線維の同定と LPA の関与

本章では脳卒中後神経障害性疼痛の機序解明の端緒として一過性中大脳動脈塞栓モデルを用いて疼痛閾値に対する LPA₁ 受容体シグナルの関与を検討した。EPW 試験法による検討から処置後 2 週間に及ぶ持続的かつ有髄線維特異的な疼痛閾値の低下が観察されたが、この閾値低下は LPA₁ 受容体遺伝子欠損マウスにより抑制された。

【考察】

今回の検討において、パクリタキセル誘発性末梢神経障害における発生メカニズムの一端として行動薬理的解析および形態学的解析の結果から通常は触覚を伝達している軸索直径の大きい Aβ線維で LPA に対する感受性の高いことが明らかになった。これは神経障害性疼痛に特有のアロディニアに対するエビデンスを与えるものである。加えて、これらの可塑的变化はパクリタキセルの直接暴露を受けない後根神経領域での二次的かつ長期的な影響であることが明らかになり、痛みの慢性化メカニズムの一端を担っているものと考えられる。また、LPA の合成に関して既に報告されている LPA₃ 受容体などを介したメカニズムの他に今回、LPA₁ 受容体および IL-1β の関与を明らかにした。また、脳卒中後神経障害性疼痛においても有髄線維特異的な LPA シグナルの関与が明らかになった。

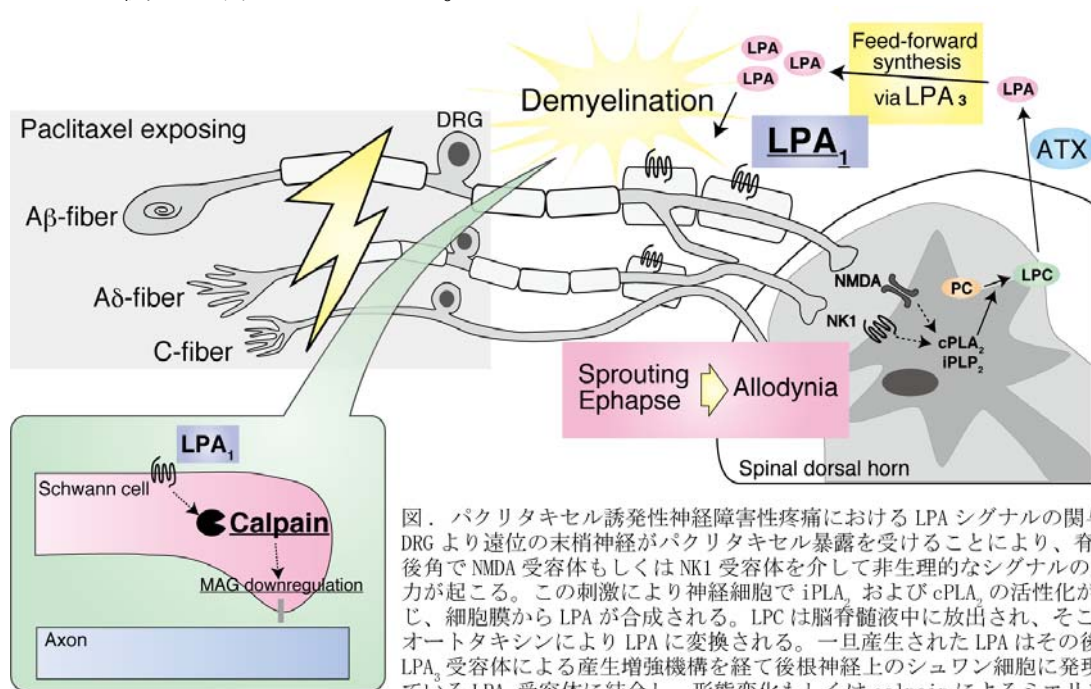


図. パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛における LPA シグナルの関与
DRG より遠位の末梢神経がパクリタキセル暴露を受けることにより、脊髄後角で NMDA 受容体もしくは NK1 受容体を介して非生理的なシグナルの入力が起こる。この刺激により神経細胞で iPLA₂ および cPLA₂ の活性化が生じ、細胞膜から LPA が合成される。LPC は脳脊髄液中に放出され、そこでオートタキシンにより LPA に変換される。一旦産生された LPA はその後、LPA₃ 受容体による産生増強機構を経て後根神経上のシュワン細胞に発現している LPA₁ 受容体に結合し、形態変化もしくは calpain によるミエリン関連タンパク質の分解を伴って脱髄が完成する。脱髄により他の神経線維との接触が生じ、アロディニアを起こす。

【基礎となった学術論文】

S. K. HALDER, R. YANO, J. CHUN, AND HIROSHI UEDA: INVOLVEMENT OF LPA₁ RECEPTOR SIGNALING IN CEREBRAL ISCHEMIA-INDUCED NEUROPATHIC PAIN. *Neuroscience*. 235(2013) 10-15.