

研究テーマ**ミクログリアにおけるATP受容体の発現を誘導するニューロン由来疼痛関連因子****1. はじめに**

癌や糖尿病患者などで見られる神経障害性の慢性疼痛は、モルヒネさえも著効しない難治性の痛みである。その発症機序は不明で、有効な治療薬もないのが現状である。我々は、神経障害性疼痛動物モデルの脊髄において、イオンチャネル内蔵型ATP受容体(細胞外ATPの膜受容体)サブタイプであるP2X4受容体が、グリア細胞の一つであるミクログリア細胞特異的に過剰発現し、その活性化によって放出された脳由来神経栄養因子が脊髄後角ニューロンの異常興奮を引き起こすことで痛みを誘発するという新しい疼痛メカニズムを発見した(Nature 2003, Nature 2005)。これらの成果は、ミクログリアにおけるP2X4受容体の発現誘導が痛みの難治化に極めて重要であることを示唆している。最近我々は、ミクログリア細胞でのP2X4発現増加因子として細胞外マトリックス分子であるフィブロネクチンを見出した(Glia 2006, Glia 2008)。しかし、その関与は部分的であり、さらに、神経障害性疼痛の発症原因が神経損傷に起因することから、損傷ニューロンに由来する何らかの重要なP2X4発現誘導メカニズムがあると思われる。そこで本研究では、損傷ニューロンに由来する新たなP2X4発現誘導因子の特定を到達目標とした。

2. 方法

本研究では、C57BL/6Jマウスおよびpltマウス(CCL21を欠損)を使用した。神経障害性疼痛モデルには、疼痛基礎研究で汎用されているChungモデル(第5腰椎脊髄神経を損傷して作製)を採用した。痛みの測定には、von Freyフィラメントを用いた。このフィラメントで動物の後肢足底部を刺激し、動物がフィラメントから足を退ける逃避行動を起こす閾値を測定した。候補因子(CCL21)の発現変化および分布は、損傷および非損傷DRG(後根神経節)の免疫組織染色法により解析を行った。P2X4発現におけるCCL21の効果は、培養ミクログリア細胞を用いたウエスタンブロット法で検討した。さらに、CCL21のin vivoにおける役割は、CCL21機能阻害抗体およびpltマウスを用いた疼痛行動測定とP2X4の免疫組織染色により行った。

3. 結果

第5腰椎脊髄神経を損傷したDRGにおける解析から、CCケモカインの一つであるCCL21の発現が顕著に増加することを見出した。損傷前のDRGにおけるCCL21の発現は非常に低いが、神経損傷12時間後には既に明らかな発現が認められ、24時間後でピークとなり、72時間後にかけて徐々に減少していくというタイムコースであった。さらに、DRGでの発現細胞を同定するため、ニューロンマーカーMAP2との二重免疫染色を行ったところ、ほぼ全てのCCL21陽性細胞が共染色された。また、CCL21陽性ニューロンの細胞体の大きさはほぼ全て小型であったことから、感覚神経の中でも特に痛覚伝達に関わるC-線維であることが示唆された。さらに、DRGニューロンは脊髄後角へ神経線維を投射しているが、神経損傷後にDRGニューロンでの発現に伴って、脊髄後角でもCCL21陽性の神経線維が多数出現した。したがって、DRGニューロンの細胞体で発現したCCL21が脊髄後角へ軸索輸送され、神経終末に局在することが示唆された。

神経障害性疼痛におけるCCL21の役割を明らかにするために、CCL21を欠損するpltマウスを用いて検討した。野生型マウスでは、第5腰髄脊髄神経の損傷後に持続的な痛み行動が発現したのに対して、pltマウスでは、そのような痛み行動が著しく減弱していた。また、CCL21が脊髄後角で増加する時期に、CCL21機能阻害抗体を脊髄くも膜下腔内へ投与したマウスでも、やはり神経障害性疼痛の有意な減弱が認められた。さらに、CCL21が脊髄後角で増加する時期に、CCL21リコンビナントタンパク質を外因的にpltマウスへ投与することで、疼痛行動が再出現した。この結果は、pltマウスの表現型をCCL21の外因的補充によってレスキューできたことを示している。

中枢神経系におけるCCL21はミクログリアへ作用することが報告されているので、神経損傷後に脊髄後角で見られるミクログリアの活性化と同細胞でのP2X4受容体発現をpltマウスを用いて検討した。野生型マウスでは、神経損傷により、脊髄後角でミクログリアの著明な活性化とP2X4タンパク質の発現が認められたが、pltマウスではミクログリアの活性化は野生型と変わらないものの、P2X4の発現が明らかに弱かった。さらに、CCL21を初代培養ミクログリア細胞へ処置すると、P2X4タンパク質の発現が増加した。最期に、CCL21による疼痛がP2X4依存的かどうかをP2X4欠損マウスで検討したところ、CCL21を脊髄へ投与することで発現する疼痛反応が、P2X4欠損マウスでは殆ど認められなかった。

4. 考察とまとめ

本研究から、末梢一次求心性感覚神経の損傷に起因するミクログリアP2X4受容体の発現増加因子としてCCL21を見出すことに成功した。損傷ニューロンにおけるCCL21の発現は比較的早い時期に短期間で起こること、さらにCCL21欠損マウスでは疼痛行動が発症しないことから、CCL21は神経障害性疼痛の発症に必須の因子であることが示唆される。ニューロンで発現したCCL21は、神経軸索を介して、脊髄後角へ輸送され、ミクログリアでのP2X4の発現を引き起こすものと考えられる。興味深いことに、pltマウスでは、神経損傷後のミクログリアでのP2X4の発現は抑制されていたものの、同細胞の形態学的活性化には影響がなかった。このことは、CCL21のミクログリアへの作用は、P2X4受容体の発現増加メカニズムに特異的に関与している可能性が考えられる。実際に、初代培養ミクログリア細胞へのCCL21刺激でも、細胞の形態はほとんど変化しなかった。ミクログリアに発現するCCL21の受容体については今後の研究課題であるが、過去の報告からCXCR3あるいはCCR7であろうと予想している。また、神経損傷がどのようにCCL21を発現させるのか、CCL21がどのようなメカニズムでミクログリアでのP2X4発現を増加するのかについては今後の更なる検討が必要と思われる。

本研究は、難治性疼痛である神経障害性疼痛の重要イベントであるミクログリアのP2X4受容体発現因子を新たに特定し、さらに慢性疼痛のメカニズムに損傷ニューロンとグリア間の情報伝達が重要であることも明らかにした。正常状態におけるCCL21のDRGニューロンにおける発現は非常に低く、またpltマウスは生理的な痛み応答は正常に発現することから、CCL21機能を阻害する薬物が神経障害性疼痛の発症を抑制する可能性が考えられる。

5. 発表論文、参考文献

本成果は学術論文として現在投稿中である。