九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

脊髄グリア細胞およびATP受容体を切り口とした帯状疱疹痛発症メカニズムの解析

松村, 裕太

https://hdl.handle.net/2324/1806959

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

脊髄グリア細胞および ATP 受容体を切り口とした帯状疱疹痛発症メカニズムの解析

ライフイノベーション分野　3PS14013S　松村　裕太

【序論】

帯状疱疹とは、水痘・帯状疱疹ウイルスの回帰感染によって引き起こされるウイルス感染症の一つである。帯状疱疹患者の多くに見られる代表的な合併症として、疼痛が挙げられるが、その発症メカニズムについては依然不明な点が多い。臨床においては、三環系抗うつ薬、抗痙攣薬、局所麻酔薬、オピオイドなどが帯状疱疹痛治療薬として処方されているが、副作用の問題等によりこれら既存の薬物療法では十分なペインコントロールが得られない例が多数存在する。よって、既存の治療薬とは異なるターゲットに着目した新規帯状疱疹痛治療薬開発が望まれている。

近年の研究から、末梢神経損傷後の脊髄後角において、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞が増殖・活性化すること、そして、これらグリア細胞上において発現上昇する ATP 受容体が、通常の触刺激を痛みとして感じるアロディニア（異痛症）の発症と維持に関与していることが示されている。しかしながら、帯状疱疹痛における脊髄グリア細胞あるいは ATP 受容体の関与を検討した報告は少ない。そこで本研究では、帯状疱疹痛発症メカニズム解明を目的とし、まず帯状疱疹痛モデルマウスにおける脊髄グリア細胞、および ATP 受容体の発現変化を明らかにすることとした。その後、変化のあった ATP 受容体のうち、アロディニアへの関与が多く報告されている P2X4 受容体に着目し、帯状疱疹痛への関与を詳細に検討した。さらに、近年報告された新規選択的 P2X4 受容体拮抗薬を用いて帯状疱疹痛への効果を検討した。

【方法】

1. 帯状疱疹痛病態モデル作製法

右後肢及び臀部を除毛した雌性 C57BL/6J マウスの後肢足蹠を含む第 4、5 腰髄（L4、5）脊髄の皮膚節の中央部を、10 本に束ねた 27 G 注射針で乱切後、1×10^6 plaque-forming units (PFU) / site の単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）を塗布しウイルス接種を行った。

2. 皮膚病変測定法

HSV-1 接種後の皮膚病変について、以下に従い数値化を行った。なお、皮膚病変の観察は、行動実験の際に行った。

0 = 病変無し
2 = 背部に 1 ないし 2 個の疱疹
4 = 背部に複数個の疱疹
6 = 帯状に軽度の疱疹
8 = 帯状に中程度の疱疹、あるいは後肢の炎症
10 =帯状に重度の疱疹、あるいは後肢の運動麻痺

3. 痛み行動測定法

絵筆で後肢を撫でて動的機械刺激を加えた際の反応性を、以下のように 3 段階にスコア化した。

0 = 反応なし、軽度の後肢の引き上げ運動

1 = 素早く明確な後肢の引き上げ運動

2 = 後肢の振り行動あるいは舐め行動、持続的な後肢の引き上げ運動、これらの行動の反復

動的機械刺激は数秒おきに 6 回繰り返し、6 回の平均値を疼痛関連スコアとした。

4. カルシウムイメージング法

シリコン製のチャンバーを貼り付けたスライドグラスに、ラットあるいはマウス P2X4 受容体を遺伝子導入した 1321N1 細胞あるいは初代培養ミクログリアを播種後、蛍光色素 Fura 2-AM 溶液を用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。

5. 免疫組織染色法

クライオスタットを用いて、4% paraformaldehyde で固定後の脊髄サンプルを切片化し、一次抗体及び二次抗体反応を行い、共焦点レーザー顕微鏡を使用して蛍光観察を行った。

6. mRNA 発現量測定法

帯状疱疹痛病態モデルマウスの L3−6 脊髄を単離後、RNA を抽出し、定量的リアルタイム RT-PCR 法により mRNA 発現量を測定した。

【結果】

HSV-1 接種後の皮膚病変は、接種後 7 日目にピークとなりその後消失した（Figure 1A）。軽度機械刺激に対する動的アロディニアは、皮膚病変と同様に接種後 7 日目にピークを示したが、皮膚病変修復後も少なくとも 20 日目まで持続した（Figure 1B）。

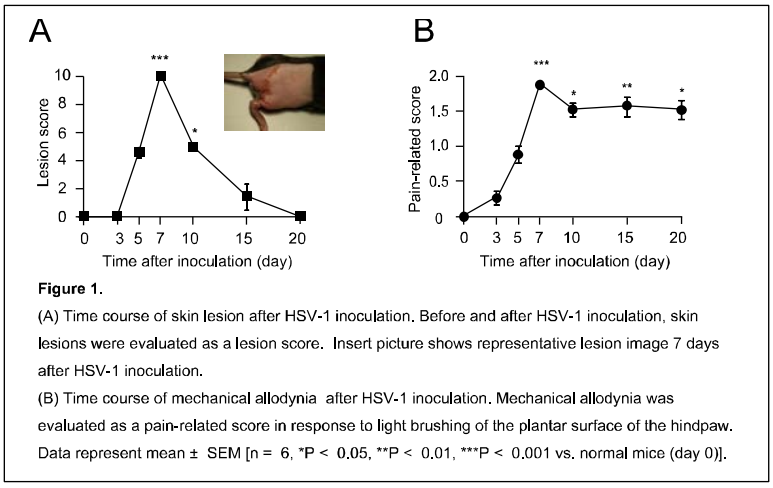

Figure 1.

(A) Time course of skin lesion after HSV-1 inoculation. Before and after HSV-1 inoculation, skin lesions were evaluated as a lesion score. Insert picture shows representative lesion image 7 days after HSV-1 inoculation.

(B) Time course of mechanical allodynia after HSV-1 inoculation. Mechanical allodynia was evaluated as a pain-related score in response to light brushing of the plantar surface of the hindpaw. Data represent mean ± SEM [n = 6, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. normal mice (day 0)].

定量的リアルタイム RT-PCR 法および免疫組織学的解析を用いて脊髄グリア細胞の発現変化を検討した。HSV-1 接種後 5 日目から脊髄後角においてミクログリアマーカーである Iba1 の有意な発現増加が認められ、その増加は 7 日目にピークを示し、その後少なくとも 20 日目まで維持された（Figure 2）。ミクログリアの経時的発現変化は、帯状疱疹痛形成と非常に相関していた。さらに、ATP 受容体の発現変化を定量的リアルタイ

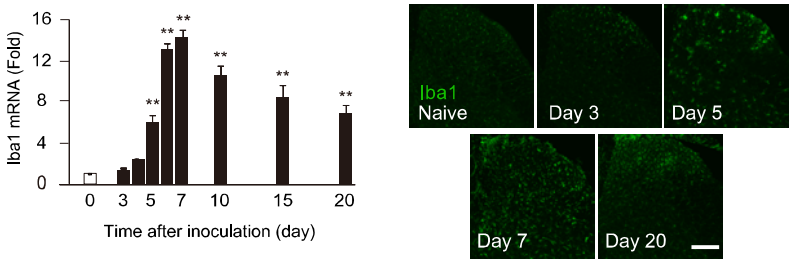

Figure 2.

Time course of mRNA expression (left) and representative images of immunofluorescence (right, scale bar, 200 μm) of Iba1, a marker of microglia, in the spinal dorsal horn before and after HSV-1 inoculation. [n = 4–5, **P < 0.01 vs. normal mice (day 0)].

ム RT-PCR 法にて解析した結果、P2X4 受容体の発現が増加することを見出した（Figure 3A）。P2X4 受容体の発現増加は、ミクログリアの活性化の経時変化と相関していた。P2X4 受容体の発現細胞種を免疫組織学的解析により検討したところ、ミクログリアマーカーである Iba1 と共局在を示したのに対し、アストロサイトマーカーである GFAP やニューロンマーカーである NeuN あるいは MAP2 とは異なる局在を示した（Figure 3B）。

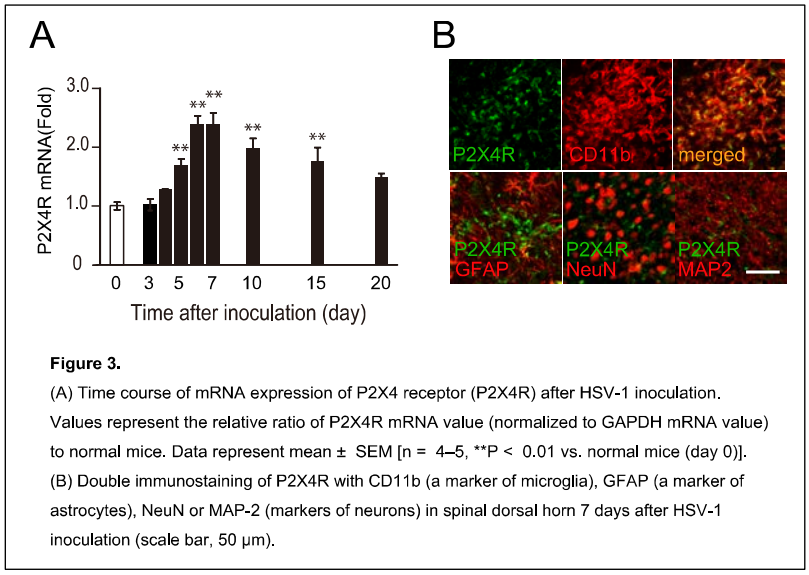

Figure 3.
(A) Time course of mRNA expression of P2X4 receptor (P2X4R) after HSV-1 inoculation. Values represent the relative ratio of P2X4R mRNA value (normalized to GAPDH mRNA value) to normal mice. Data represent mean ± SEM [n = 4–5, **P < 0.01 vs. normal mice (day 0)].
(B) Double immunostaining of P2X4R with CD11b (a marker of microglia), GFAP (a marker of astrocytes), NeuN or MAP-2 (markers of neurons) in spinal dorsal horn 7 days after HSV-1 inoculation (scale bar, 50 μm).

帯状疱疹痛に対する P2X4 受容体の役割を検討するため、近年日本ケミファ株式会社（共同研究製薬企業）で開発された新規 P2X4 受容体拮抗薬 NP-1815-PX（Figure 4A）を用いた。まず、同拮抗薬の P2X4 受容体阻害作用を検証するため、ATP 受容体を発現しない 1321N1 細胞に、ラットあるいはマウス P2X4 受容体を遺伝子導入後、ATP 刺激による細胞内カルシウム応答をカルシウムイメージング法により測定した。その結果、NP-1815-PX は、ATP 誘発カルシウム応答を用量依存的に抑制した（Figure 4B）。同様に、ラット初代培養ミクログリア細胞を用いて、NP-1815-PX による ATP 誘発カルシウム応答抑制効果を検討した。その結果、NP-1815-PX 処置により ATP 誘発カルシウム応答が有意に抑制され、また P2X4 受容体の

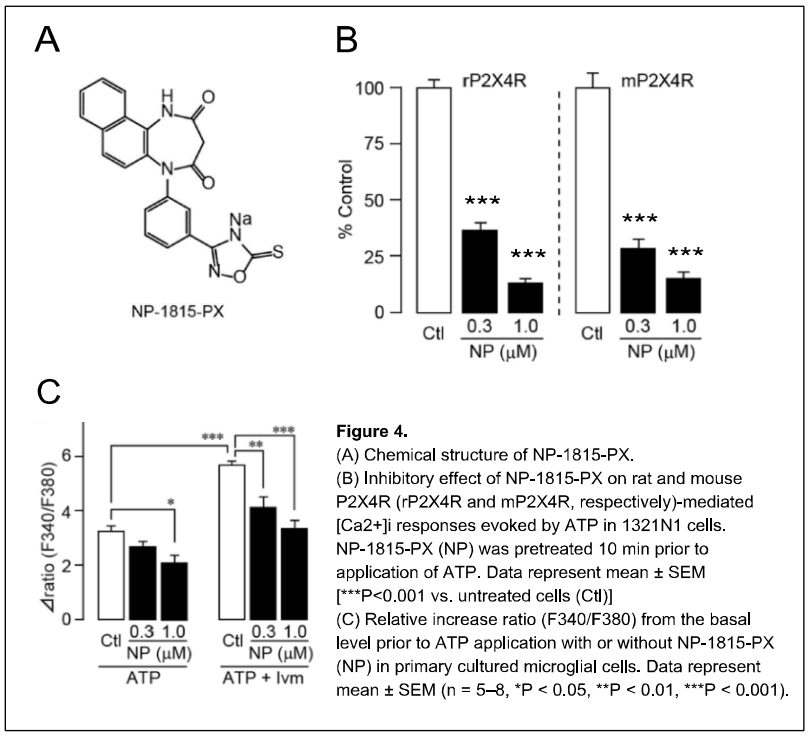

Figure 4.
(A) Chemical structure of NP-1815-PX.
(B) Inhibitory effect of NP-1815-PX on rat and mouse P2X4R (rP2X4R and mP2X4R, respectively)-mediated [Ca2+]i responses evoked by ATP in 1321N1 cells. NP-1815-PX (NP) was pretreated 10 min prior to application of ATP. Data represent mean ± SEM [***P<0.001 vs. untreated cells (Ctl)]
(C) Relative increase ratio (F340/F380) from the basal level prior to ATP application with or without NP-1815-PX (NP) in primary cultured microglial cells. Data represent mean ± SEM (n = 5–8, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

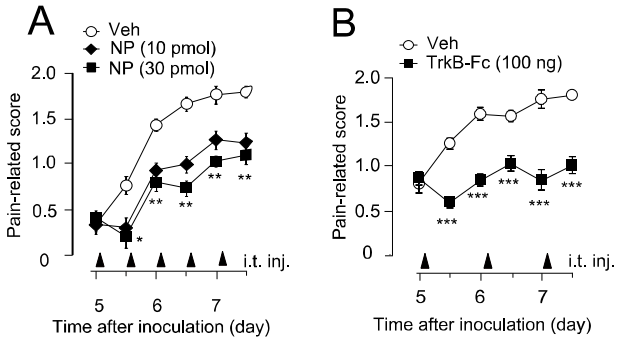

Figure 5.
(A) Effect of intrathecal administration of NP-1815-PX on induction of mechanical allodynia on day 5 to 7 after HSV-1 inoculation in mice. NP-1815-PX (NP) or vehicle (Veh: PBS) was intrathecally administered (i.t. inj.) twice a day from day 5 to 7 (closed triangles indicated on horizontal X-axis). Data represent mean ± SEM (n = 5–6, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. Veh).
(B) Effect of intrathecal administration of TrkB-Fc on induction of mechanical allodynia on day 5 to 7 after HSV-1 inoculation in mice. TrkB-Fc or vehicle (Veh: PBS) was intrathecally administered (i.t. inj.) once a day from day 5 to 7 (closed triangles indicated on horizontal X-axis). Data represent mean ± SEM (n = 7–8, ***P < 0.001 vs. Veh).

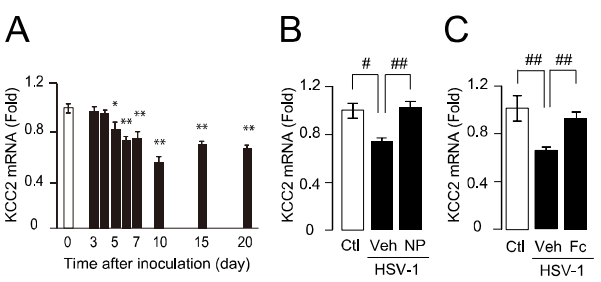

Figure 6.
(A) Real-time PCR analysis of KCC2 mRNA expression in spinal dorsal horn before and after HSV-1 inoculation. Values represent the relative ratio of KCC2 mRNA value (normalized to GAPDH mRNA value) to normal mice (day 0). Data represent mean ± SEM [n = 4–5, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. normal mice (day 0)].
(B) Changes in KCC2 mRNA expression in spinal dorsal horn (day 6) of normal mice (Ctl) and of HSV-1-inoculated mice intrathecally treated with NP-1815-PX (NP: three times from day 5 to 6) or vehicle (Veh: PBS), respectively. Values represent the relative ratio of KCC2 mRNA value (normalized to GAPDH mRNA value) to normal mice (Ctl). Data represent mean ± SEM [n = 3–4, #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. vehicle-treated HSV-1 mice (Veh)].
(C) Changes in KCC2 mRNA expression in spinal dorsal horn (day 6) of normal mice (Ctl) and HSV-1-inoculated mice intrathecally treated with TrkB-Fc (Fc: once a day at day 5) or vehicle (Veh), respectively. Values represent the relative ratio of KCC2 mRNA value (normalized to GAPDH mRNA value) to normal mice (Ctl). Data represent mean ± SEM [n = 3–6, ##P < 0.01 vs. vehicle-treated HSV-1 mice (Veh)].

ポジティブアロステリックモジュレーターである ivermectin 処置により増強された ATP 誘発カルシウム応答についても用量依存的な抑制効果が観察された（Figure 4C）。そこで、NP-1815-PX を、P2X4 受容体の発現増加が見られた HSV-1 接種後 5 日目から連日脊髄腔内投与した。その結果、NP-1815-PX 投与群において、溶媒投与群と比較し動的アロディニア形成が有意に抑制された（Figure 5A）。また、P2X4 受容体シグナルの下流因子である脳由来神経栄養因子（BDNF）に対する中和抗体である recombinant human TrkB Fc chimera（TrkB-Fc）の脊髄腔内投与によっても、NP-1815-PX と同様に疼痛関連スコアの有意な低下が見られた（Figure 5B）。次に、P2X4 受容体-BDNF 経路のターゲット因子である K^+-Cl^-共輸送体 2（KCC2）の発現変化を検討した。HSV-1 接種後の脊髄後角における KCC2 の発現は、ミクログリアの増加が観察された HSV-1 接種後 5 日目から有意に減少し、その後少なくとも 20 日目まで減少した（Figure 6A）。そこで、HSV-1 接種後 5 日目から NP-1815-PX を脊髄腔内投与したところ、6 日目の脊髄後角における KCC2 mRNA の発現低下は NP-1815-PX 投与により非接種群レベルにまで回復した（Figure 6B）。また、KCC2 発現回復効果は、TrkB-Fc の脊髄腔内投与においても観察された（Figure 6C）。

【考察】

本研究より、帯状疱疹痛形成期に脊髄後角においてミクログリアが活性化すること、それらミクログリアは P2X4 受容体-BDNF 経路を介し、KCC2 の発現減少を引き起こすことで帯状疱疹痛形成に関与していること、また帯状疱疹痛形成期に P2X4 受容体シグナルを阻害することで、帯状疱疹痛が有意に改善されることが明らかとなった。本結果は、脊髄ミクログリアにおける P2X4 受容体が、帯状疱疹痛治療薬の新規ターゲットとなりうることを示唆している。

【発表論文】

A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain

Yuta Matsumura, Tomohiro Yamashita, Atsushi Sasaki, Eriko Nakata, Keita Kohno, Takahiro Masuda, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Toshiyasu Imai, Yasushi Kuraishi, Makoto Tsuda & Kazuhide Inoue

Scientific Reports, 6: 32461, 2016