

京都大学	博士（薬学）	氏名	前田 早苗
論文題目	慢性疼痛における脊髄内グリア細胞の役割に関する研究		
（論文内容の要旨） 急性疼痛は生体防御警告系として生理的に重要な役割を担うのに対し、慢性疼痛はもはや警告系としての役割を果たさないため、積極的に治療すべきと考えられている。しかし、一部の慢性疼痛、特に神経障害性疼痛は既存の鎮痛薬に対して抵抗性を示す場合があり、新しい作用機序を持つ鎮痛薬の創製が切望されている。これまでに幾つかの神経障害性疼痛モデル動物の脊髄において、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞が活性化されることが報告されているが、慢性疼痛における役割およびその分子機構については未だ不明な点が残されている。本研究において著者は、慢性疼痛の誘導・維持における脊髄内ミクログリアおよびアストロサイトの役割および関連する機能分子、さらに鎮痛薬の作用標的としての脊髄内グリア細胞について検討し、以下の新規知見を得た。 第一章 慢性疼痛の誘導および維持における脊髄内グリア細胞の役割 慢性疼痛の誘導および維持に対し、脊髄内グリア細胞活性化が関与するかを検討するため、組織損傷を最小限に抑えた新しい慢性疼痛モデルを用いて脊髄内グリア細胞の役割を検討した。ラットにATP（100 nmol）を脊髄くも膜下腔内（i. t.）投与し、アロディニアがおよそ4週間持続する長期持続性アロディニアモデルを作製した。ATP投与後の脊髄内グリア細胞の活性化状態を免疫染色により検討したところ、ミクログリアは投与1日後、アストロサイトは1、3日後をピークとして、それぞれOX-42もしくはGFAPの免疫染色性増強と活性化を示す形態変化を示した。次に、このアロディニアの誘導および維持に対する役割について、ミクログリアの活性化阻害薬ミノサイクリンおよびアストロサイトの代謝阻害薬フルオロシトレートを用いて検討した。その結果、ミノサイクリンはATPと同時、フルオロシトレートはATPと同時にもしくは翌日にi. t. 投与したところ、いずれも有意にアロディニアを抑制した。一方、ATP投与7日後においてはどちらも有意な影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ミクログリアは慢性疼痛の誘導期、アストロサイトは誘導期および維持期初期に活性化し、痛みの慢性化機構に関与すると考えられる。 第二章 慢性疼痛における脊髄内グリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1の役割 主にアストロサイトに発現するグリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1は、脊髄においてシナプス間隙に遊離されたグルタミン酸の取り込みを行う主要な分子である。アストロサイトが慢性疼痛の誘導～維持期初期に関与することが示されたことから、本研究ではアストロサイトのGLT-1に注目し検討を行った。カラゲニン/カオリン足底内投与による炎症性疼痛モデルおよび坐骨神経部分結紮（pSNL）による神経障害性疼痛モデルにおいて、脊髄後角のGLT-1発現量あるいは膜画分のGLT-1量が減少した。そこで遺伝子組み換えアデノウイルスを用い、GLT-1遺伝子の脊髄実質内導入による影響を検討した。このアデノウイルスは主にアス			

トロサイトに遺伝子を導入し、投与7日後をピークとする一過性のGLT-1発現量上昇を引き起こしたが、急性侵害受容閾値に影響を見られなかった。一方、アデノウイルス投与7日後にカラゲニン/カオリン足底内投与もしくはpSNLを行ったところ、機械的痛覚過敏あるいはアロディニアが有意に抑制された。しかし、pSNL7日後もしくは14日後にアデノウイルスを投与しても、有意な影響は認められなかった。これらの結果から、脊髄内GLT-1発現減少あるいは細胞膜での局在量減少により、アストロサイトによるグルタミン酸濃度調節機構が破綻した結果、慢性疼痛の基盤となる神経可塑的变化が引き起こされたと考えられる。

第三章 オピオイドおよび抗うつ薬の反復投与による神経障害性疼痛および脊髄内グリア細胞に対する効果の比較検討

神経障害性疼痛の治療では約半数の患者がモルヒネに抵抗性を示すといわれており、アミトリプチリンなどの三環系抗うつ薬が鎮痛薬として主に使用されている。一方、トラマドールは弱オピオイドに分類される鎮痛薬であるが、三環系抗うつ薬と同様にセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害活性を併せ持つ。本研究では、pSNL誘発神経障害性疼痛モデルラットにモルヒネ、アミトリプチリンあるいはトラマドールを結紮直前～21日後、もしくは結紮7～21日後にわたり連日投与し、アロディニアに対する鎮痛効果および脊髄内グリア細胞の活性化に対する影響を比較検討した。その結果、いずれの投与スケジュールでも、モルヒネは投与直後の急性鎮痛効果を示したが、アロディニアの維持には影響を与えなかった。一方、アミトリプチリンおよびトラマドールは投与開始から5日目以降でアロディニアの維持を有意に抑制した。pSNL7日後に脊髄内グリア細胞の活性化状態を免疫染色にて検討したところ、モルヒネはミクログリアおよびアストロサイトの染色強度および活性化を示す形態変化を増強したのに対し、アミトリプチリンはいずれも抑制し、トラマドールはミクログリアにはほとんど影響を与えなかったが、アストロサイトの染色強度および形態変化を抑制した。そこで各薬物のアストロサイトに対する直接作用を検討するため、初代培養アストロサイトを用い、TNF- α 処置による炎症性サイトカイン発現誘導に対する効果を検討した。その結果、IL-1 β mRNA発現誘導に対して、モルヒネは影響を与えなかったが、アミトリプチリンおよびトラマドールは抑制作用を示した。以上の結果から、モルヒネと異なり、アミトリプチリンおよびトラマドールはアロディニア改善作用を示し、その作用機序の一部に、神経傷害時の脊髄内グリア細胞活性化に対する抑制作用が関与することが示唆される。

以上、著者は慢性疼痛の誘導および維持に脊髄内ミクログリアおよびアストロサイトの活性化が必要であること、その分子機構の一部としてアストロサイトのGLT-1発現低下によるグルタミン酸取り込み能の低下が関与することを明らかにした。さらに、アミトリプチリンおよびトラマドールのアロディニア改善作用について、アストロサイトに対する抑制作用が関与することを明らかにした。本研究成果は、慢性疼痛の誘導および維持機構の解明に寄与するものであり、グリア細胞を標的とした新しい鎮痛薬の創製に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

急性疼痛は生体防御警告系として生理的に重要な役割を担うのに対し、慢性疼痛はもはや警告系としての役割を果たさないため、積極的に治療すべきと考えられている。しかし、一部の慢性疼痛、特に神経障害性疼痛は既存の鎮痛薬に対して抵抗性を示す場合があり、新しい作用機序を持つ鎮痛薬の創製が切望されている。これまでに幾つかの神経障害性疼痛モデル動物の脊髄において、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞が活性化されることが報告されているが、慢性疼痛における役割およびその分子機構については未だ不明な点が残されている。本論文において著者は、慢性疼痛の誘導・維持における脊髄内ミクログリアおよびアストロサイトの役割および関連する機能分子、さらに鎮痛薬の作用標的としての脊髄内グリア細胞について検討以下の検討を行った。

第一章では、慢性疼痛の誘導および維持に対し、脊髄内グリア細胞活性化が関与するかを検討するため、組織損傷を最小限に抑えた新しい慢性疼痛モデルを用いて脊髄内グリア細胞の役割を検討した。ラットにATP (100 nmol) を脊髄くも膜下腔内 (i. t.) 投与し、アロディニアがおよそ4週間持続する長期持続性アロディニアモデルを作製した。ATP投与後の脊髄内グリア細胞の活性化状態を免疫染色により検討したところ、ミクログリアは投与1日後、アストロサイトは1、3日後をピークとして、それぞれOX-42もしくはGFAPの免疫染色性増強と活性化を示す形態変化を示した。次に、このアロディニアの誘導および維持に対する役割について、ミクログリアの活性化阻害薬ミノサイクリンおよびアストロサイトの代謝阻害薬フルオロシトレートを用いて検討した。その結果、ミノサイクリンはATPと同時に、フルオロシトレートはATPと同時もしくは翌日にi. t. 投与したところ、いずれも有意にアロディニアを抑制した。これらの結果から、ミクログリアは慢性疼痛の誘導期、アストロサイトは誘導期および維持期初期に活性化し、痛みの慢性化機構に関与すると結論した。

続く第二章においては、アストロサイトが慢性疼痛の誘導～維持期初期に関与することが示されたことから、本論文ではアストロサイトに発現するグリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1に注目し検討を行った。カラゲニン/カオリン足底内投与による炎症性疼痛モデルおよび坐骨神経部分結紮 (pSNL) による神経障害性疼痛モデルにおいて、脊髄後角のGLT-1発現量あるいは膜画分のGLT-1量が減少した。そこで遺伝子組み換えアデノウイルスを用い、GLT-1遺伝子の脊髄実質内導入による影響を検討した。このアデノウイルスは主にアストロサイトに遺伝子を導入し、投与7日後をピークとする一過性のGLT-1発現量上昇を引き起こしたが、急性侵害受容閾値に影響は見られなかった。一方、アデノウイルス投与7日後にカラゲニン/カオリン足底内投与

もしくはpSNLを行ったところ、機械的痛覚過敏あるいはアロディニアが有意に抑制された。しかし、pSNL7日後もしくは14日後にアデノウイルスを投与しても、有意な影響は認められなかった。これらの結果から、脊髄内GLT-1発現減少あるいは細胞膜での局在量減少により、アストロサイトによるグルタミン酸濃度調節機構が破綻した結果、慢性疼痛の基盤となる神経可塑的变化が引き起こされたと結論した。

最後に、第三章においては、臨床での薬物治療に着眼点を移した。神経障害性疼痛の治療では約半数の患者がモルヒネに抵抗性を示すといわれており、アミトリプチリンなどの三環系抗うつ薬が鎮痛薬として主に使用されている。一方、トラマドールは弱オピオイドに分類される鎮痛薬であるが、三環系抗うつ薬と同様にセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害活性を併せ持つ。本論文では、pSNL誘発神経障害性疼痛モデルラットにこれら薬物を結紮直前～21日後、もしくは結紮7～21日後にわたり連日投与し、アロディニアに対する鎮痛効果および脊髄内グリア細胞の活性化に対する影響を比較検討した。その結果、いずれの投与スケジュールでも、モルヒネは投与直後の急性鎮痛効果を示したが、アロディニアの維持には影響を与えなかった。一方、アミトリプチリンおよびトラマドールは投与開始から5日目以降でアロディニアの維持を有意に抑制した。pSNL7日後に脊髄内グリア細胞の活性化状態を免疫染色にて検討したところ、モルヒネはミクログリアおよびアストロサイトの染色強度および活性化を示す形態変化を増強したのに対し、アミトリプチリンはいずれも抑制し、トラマドールはミクログリアにはほとんど影響を与えなかったが、アストロサイトの染色強度および形態変化を抑制した。そこで各薬物のアストロサイトに対する直接作用を検討するため、初代培養アストロサイトを用い、TNF- α 処置による炎症性サイトカイン発現誘導に対する効果を検討した。その結果、IL-1 β mRNA発現誘導に対して、モルヒネは影響を与えなかったが、アミトリプチリンおよびトラマドールは抑制作用を示した。以上の結果から、モルヒネと異なり、アミトリプチリンおよびトラマドールはアロディニア改善作用を示し、その作用機序の一部に、神経傷害時の脊髄内グリア細胞活性化に対する抑制作用が関与することが示唆された。

以上、著者は慢性疼痛の誘導および維持に脊髄内ミクログリアおよびアストロサイトの活性化が必要であること、その分子機構の一部としてアストロサイトのGLT-1発現低下によるグルタミン酸取り込み能の低下が関与することを明らかにした。さらに、アミトリプチリンおよびトラマドールのアロディニア改善作用について、アストロサイトに対する抑制作用が関与することを明らかにした。本研究成果は、慢性疼痛の誘導および維持機構の解明に寄与するものであり、グリア細胞を標的とした新しい鎮痛薬の創製に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成２３年２月２１日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 ２４年 ３月 ２０日以降