

## 神経因性疼痛ならびに炎症性疼痛発現の分子機構 — 脊髄における細胞内情報伝達を中心に —

矢 島 義 識

星薬科大学 薬品毒理学教室

### Differential involvement of a spinal nociceptive signaling pathway in neuropathic and inflammatory pain-like states in mice

Yoshinori YAJIMA

Department of Toxicology, Hoshi University, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

#### はじめに

神経因性疼痛は、自発痛、痛覚過敏反応（軽い痛み刺激をより強い刺激と感じる症状）およびアロディニア（痛みを惹起しない軽く触った程度の触刺激によっても痛みが誘発される症状）を主症状とする神経の損傷や機能障害などに起因した痛みの症候群である。神経因性疼痛の原因となる疾患には、帯状疱疹後神経痛、有痛性糖尿病神経障害、進行がんなどが挙げられるが、神経因性疼痛患者は同一の原因疾患であっても、神経の損傷、障害の程度などにより異なった症状を呈する場合があること、また他の神経因性疼痛患者と同様の症状を示しているにもかかわらず、同一の治療法で疼痛が改善されない場合があることなどから、神経因性疼痛の発症ならびにその維持機構は、非常に複雑なものであることが想定されている。このような神経因性疼痛の機序を解明する目的で、これまで様々な神経因性疼痛の動物モデルが作製され、行動薬理的検討から分子生物学的検討に至るまで、実に多角的な検討がなされている<sup>1-3)</sup>。こうした基礎研究成果から、神経因性疼痛の形成には脊髄における神経の可塑的変化が重要な役割を担っていることが想定されている<sup>4)</sup>。しかしながら、その詳細な機序に関してはいまだ不明な点が多く残されているのが現状である。一方、炎症性疼痛はリウマチに代表される慢性疼痛の一つであり、炎症局所の浮腫あるいは痛覚感受性増大などの症状により特徴づけられている。最近、この炎症性疼痛の形成には、脊髄における持続的な細胞内情報伝達系の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆されており<sup>5)</sup>、神経因性疼痛同様、脊髄における神経の可塑的変化が炎症性疼痛を引き起こす主因となっている可能性が推察されている。

炎症性疼痛は非ステロイド性抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs）やモルヒネでコ

ントロールできるのに対して、神経因性疼痛はこれらの鎮痛薬に対して抵抗性を示す場合が多く、さらには適切な治療も確立されていないことが臨床で深刻な問題となっている。こうした神経因性疼痛と炎症性疼痛との間に見られる鎮痛薬の効果の相違は、これらの疼痛が異なった機構を有することが原因であると想定されるが、その疼痛伝達機構の相違についてはいまだ明確にされていない。

そこで本研究では、神経因性疼痛ならびに炎症性疼痛の疼痛伝達機構を検討するために、これらの慢性疼痛動物モデルを用いて、脊髄を介した疼痛伝達機構について詳細に検討した。

#### 1. 神経因性疼痛の形成における脊髄内BDNFの役割

これまで神経因性疼痛を含めた疼痛伝達機構は、glutamateに代表される興奮性アミノ酸あるいはsubstance Pのような神経ペプチドなどによって説明されてきたが<sup>6,7)</sup>、最近これらの興奮性アミノ酸や神経ペプチドだけでは神経因性疼痛を含めた疼痛伝達機構を十分に説明できないことが指摘されている。こうした背景の中、神経新生、神経保護、さらにはシナプス可塑性の誘導因子の一つとして位置づけられている脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor; BDNF）が、痛覚伝達に関わる一次求心性神経末端に存在していることが報告され、疼痛伝達における役割が注目されている<sup>8-10)</sup>。

BDNFは通常、脊髄後根神経節（dorsal root ganglia; DRG）の小径細胞において合成され<sup>8,9,11)</sup>、一次求心性神経の末梢端ならびに中枢端へ順向性に輸送される<sup>8,9)</sup>。一方、BDNFの免疫活性は疼痛伝達に重要な役割を担っている脊髄後角表層部に認められるものの、脊髄後角にBDNF mRNAの発現は認められないことから<sup>12,13)</sup>、脊髄におけるBDNFの免疫活性はDRGで合成され、一次

求心性神経を順向性に輸送されたものに由来していると考えられている。摘出した脊髄組織にBDNFを処置すると脊髄後角神経の興奮性が増大することから<sup>14, 15)</sup>、一次求心性神経末端から遊離されたBDNFは、内因性神経伝達物質あるいは神経調節物質として脊髄後角神経の興奮性を調節すると考えられている<sup>16, 17)</sup>。このようなことから、神経因性疼痛の形成にも脊髄におけるBDNFが関与している可能性が示唆されるが、その役割についてはいまだ明確にされていない。そこで本研究では、坐骨神経を半周だけ強度に結紮することによって作製した神経因性疼痛モデルを用い、脊髄におけるBDNFが神経因性疼痛の形成にどのような役割を果たしているかについて検討した。

本研究で用いた神経因性疼痛モデルでは、臨床の神経因性疼痛患者で認められるのと同様に、著明かつ持続的な熱刺激に対する痛覚過敏反応ならびに触覚刺激に対するアロディニアが結紮側の後肢においてのみ観察される。このような神経因性疼痛モデルを用いて、脊髄後角におけるBDNFの免疫活性の変化を免疫組織化学的に検討したところ、坐骨神経を結紮した側の脊髄後角表層部では、非結紮側と比較してBDNF免疫活性の有意な増大が認められた。このことから、神経損傷による脊髄後角でのBDNFの遊離増加が、神経因性疼痛の形成に関与している可能性が想定される。そこで、神経因性疼痛モデルの髄腔内にBDNFの特異的抗体を投与し、神経因性疼痛の形成に及ぼす脊髄内BDNFの役割について検討した。その結果、BDNFの特異的抗体を坐骨神経結紮前および各測定前に繰り返し髄腔内投与することにより、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は著明に抑制された (Fig. 1)。さらに、このような抑制効果は、特異的BDNF抗体の繰り返し髄腔内投与を中止した後においても有意に維持されていた (Fig. 1)。こうしたことから、脊髄におけるBDNFは神経因性疼痛の形成に重要な役割を果たしている因子の一つである可能性が示唆された。

一方、neurotrophin-4 (NT-4) と呼ばれる神経栄養因子も、BDNFと同様に細胞内にprotein tyrosine kinase (PTK) ドメインを有する受容体型tyrosine kinaseのTrkBに結合することが知られている。NT-4は、DRGならびに脊髄のいずれにおいてもその発現が認められる<sup>10)</sup> ことから、脊髄のNT-4も神経因性疼痛の形成に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、神経因性疼痛の形成にNT-4が関与しているか否かについても検討した。しかしながら、NT-4の特異的抗体を繰り返し髄腔内前処置しても、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は全く抑制されなかった。近年、BDNF遺伝子ノックアウトマウスの脊髄摘出標本では、C線維刺激による脊髄反射ならびに脊髄後角神経のwind-up現象 (脊髄後角細胞の反応が刺激ごとに増強していく現象)

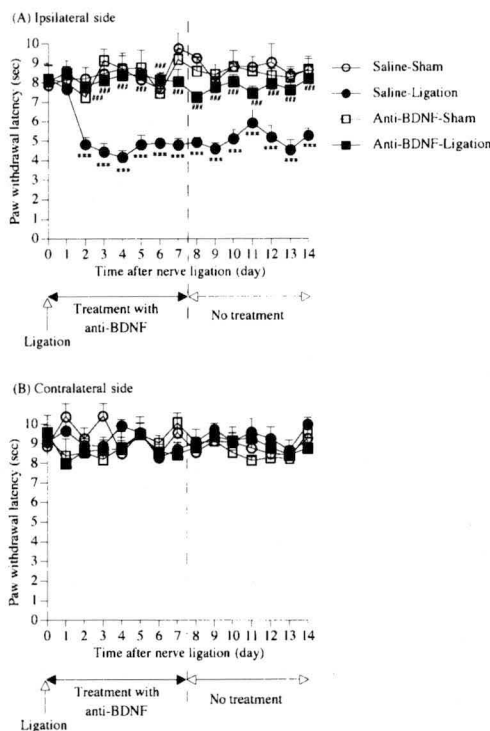


Fig. 1. Effect of repeated intrathecal (i.t.) treatment with a specific antibody to BDNF on thermal hyperalgesia induced by nerve ligation in mice. Groups of mice were repeatedly treated i.t. with a specific BDNF antibody (Anti-BDNF; 1:100) or saline 1 hr prior to surgery (day 0) and once a day for first 7 days after surgery. From day 8 to day 14 after nerve ligation, mice were not treated with the antibody. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 7-8 mice. \*\*\* $p < 0.001$  vs. Saline-Sham group, ### $p < 0.001$  vs. Saline-Ligation group.

が抑制されるのに対し、NT-4遺伝子ノックアウトマウスの脊髄摘出標本ではこのような抑制は認められないことが報告されている<sup>13)</sup>。こうした知見から、脊髄におけるNT-4は神経因性疼痛の形成にはほとんど関与しておらず、神経損傷により脊髄において増加したBDNFが神経因性疼痛の形成に重要な役割を果たしているものと思われる。そこでさらに、BDNFの (+/-) ヘテロノックアウトマウスを用いて、神経因性疼痛の形成におけるBDNFの直接的な関与について検討したところ、野生型マウスで認められる坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応ならびにアロディニアは、BDNF (+/-) ヘテロノックアウトマウスでは有意に抑制された。これらの結果から、BDNFが神経因性疼痛の形成に関与する因子であることが遺伝子レベルでも明らかとなった。

ここまでの研究成果から、神経損傷により一次求心性神経末端からの遊離が増加したBDNFが脊髄後角の可塑的变化を引き起こし、それにより神経因性疼痛が惹起された可能性が考えられる。一方、BDNFはglutamateの

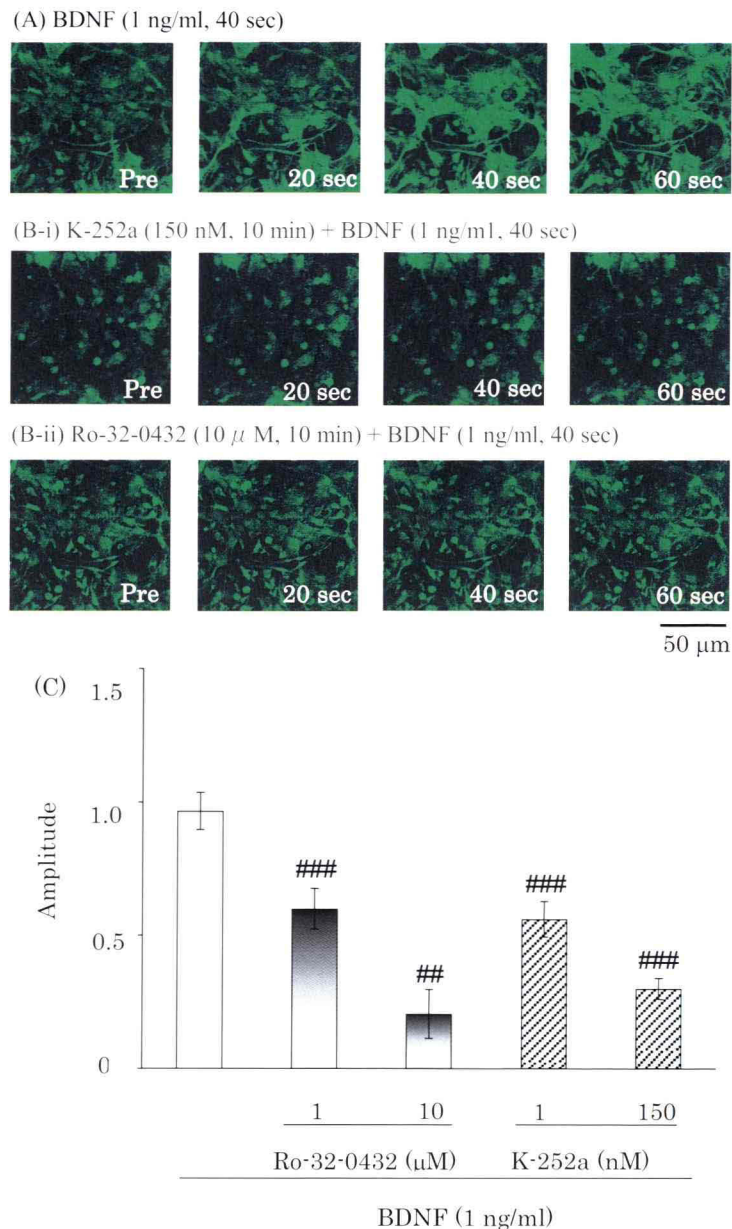


Fig. 2. Effect of K-252a or Ro-32-0432 on the BDNF-induced increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in cultured spinal neurons. (A, B-i and B-ii) Sequential images of increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by BDNF (1 ng/ml) in cultured spinal neurons. BDNF at 1 ng/ml was applied by superfusion for 40 s. K-252a (15 and 150 nM) or Ro-32-0432 (1 and 10  $\mu\text{M}$ ) was pretreated in cultured spinal neurons 10 min prior to BDNF (1 ng/ml) application. (C) Amplitude of the BDNF-induced increases in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in spinal neurons. K-252a (15 and 150 nM) or Ro-32-0432 (1 and 10  $\mu\text{M}$ ) was pretreated in cultured spinal neurons 10 min prior to BDNF (1 ng/ml) application. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 54-126 cells from three separated observations. ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  vs. BDNF-treated cells.

遊離を促進させることが報告されていることから<sup>18,19</sup>、BDNFは一次求心性神経末端からのglutamateの遊離を介して、神経因性疼痛を惹起している可能性も考えられる。そこで、BDNFが神経細胞に直接作用して神経細胞を興奮させる作用を有するか否かを明確にするために、生後1日齢のマウスの脊髄から作製した脊髄初代培養神経細胞を使用し、BDNFによる神経細胞の興奮性を蛍光

指示薬であるfluo-3 AMを用いて $\text{Ca}^{2+}$ イメージングを行った。その結果、BDNFを脊髄初代培養神経細胞に処置すると、著明かつ一過性の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加が観察されたことから (Fig. 2)、BDNFは脊髄後角神経細胞を直接興奮させ、上位中枢へと痛覚を伝達している可能性が示唆された。そこでさらに、BDNFを正常マウスの髄腔内に投与することにより、痛みが惹起されるか否かについて

検討したところ、BDNFの単回髄腔内投与により、投与後6日間も持続する著明な熱痛覚過敏反応ならびにアロディニアが観察された。このように脊髄におけるBDNFは疼痛伝達に非常に重要な因子の一つであることが明らかとなり、一次求心性神経末端からのBDNFの遊離増加が、神経因性疼痛の形成に深く関与している可能性が示唆された。

## 2. 神経因性疼痛の形成における脊髄内TrkBの役割

BDNFはその受容体であるTrkBに作用し、様々なシグナル伝達を引き起こすことが知られている。そこで本研究では、神経因性疼痛の形成におけるTrkBの関与について検討するために、TrkBのリガンド結合ドメインとヒトIgGのFc領域を結合させたTrkB/Fcキメラタンパク質を用いて検討した。TrkB/Fcキメラタンパク質は、自身が有するリガンド結合ドメインにより内因性のBDNFを捕獲し、内因性のTrkBとBDNFとの結合を阻害することでTrkBを介した反応を抑制する物質である。このようなTrkB/Fcキメラタンパク質を繰り返し髄腔内前処置すると、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応ならびにアロディニアは著明に抑制された。したがって、神経因性疼痛の形成には脊髄におけるBDNF/TrkB経路の活性化が関与している可能性が示唆された。

BDNFの受容体であるTrkBには、細胞内にPTKドメインを有するfull-length TrkBとPTKドメインが欠損しているtruncated TrkBの2種類の存在が知られている<sup>20,21)</sup>。Full-length TrkBは通常、単量体として存在するが、BDNFが結合すると二量体を形成し、これによりfull-length TrkBのPTK活性が上昇して、自身のチロシン残基をリン酸化する。さらに、src homology 2 (SH2) ドメインを有する様々な細胞内タンパク質が、このリン酸化されたチロシン残基に結合し、PTKによるチロシンリン酸化を受け、他の細胞内分子との結合を促進することにより細胞内へ次々と情報を伝えていくことが明らかとなっている。一方、truncated TrkBはPTKドメインが欠損していることから、これまでシグナル伝達能を有していないと考えられてきた<sup>22)</sup>。しかしながら近年、このtruncated TrkBにも独自のシグナル伝達経路が存在することが示唆されている<sup>23,24)</sup>。さらに、full-length TrkBのみならず、truncated TrkBも疼痛伝達に重要な役割を担う脊髄後角に存在していることが報告されている<sup>25)</sup>。そこで本研究では、神経因性疼痛の形成にどちらのタイプのTrkBが関与しているかについて、それぞれの特異的抗体を用いて行動薬理的に検討した。その結果、full-length TrkBの特異的抗体の繰り返し髄腔内前処置では、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は著しく抑制されたのに対し、truncated TrkBの特異的抗体を繰り返し髄腔内前処置しても、坐骨神経結

紮による熱痛覚過敏反応は抑制されなかった (Fig. 3)。さらに、Trk (TrkA, TrkBおよびTrkC) を介したPTKの阻害薬であるK-252aを用いて、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応に対する影響について検討したところ、K-252aの繰り返し髄腔内前処置により坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は著明に抑制された。また、正常動物の髄腔内にBDNFを単回投与することにより認められる疼痛様症状も、K-252aの前処置により著明に抑制された。これら一連の結果から、神経損傷によって引き起こされる神経因性疼痛の形成には、脊髄におけるfull-length TrkBのPTKの活性化を介した細胞内情報伝達系の亢進が深く関与している可能性が示唆された。

一方、神経因性疼痛モデルの脊髄において、full-length TrkB量がどのように変化しているのかを検討するために、神経因性疼痛動物の脊髄から細胞膜分画標本作製し、脊髄における膜結合型full-length TrkB量をWestern blot法により検討した。その結果、坐骨神経を結紮することにより、坐骨神経を結紮した側の脊髄において膜結合型full-length TrkB量の著明な増加が認められた。最近、BDNF刺激により、full-length TrkBのPTKを介して、細胞内に存在するfull-length TrkBが細胞膜へと移行する(トランスロケーション)現象が報告されている。そのため、本研究で得られた坐骨神経結紮による脊髄の膜結合型full-length TrkB量の増加も、このトランスロケーションに一部起因している可能性が推察される。そこで、神経因性疼痛動物にBDNFの特異的抗体を繰り返し髄腔内投与し、神経因性疼痛の形成を抑制した動物から脊髄細胞膜分画標本作製して、脊髄における膜結合型full-length TrkB量の変化について検討した。その結果、BDNFの特異的抗体を繰り返し髄腔内投与することにより、神経因性疼痛の形成と同様に、坐骨神経結紮による膜結合型full-length TrkB量の増加は著しく抑制された (Fig. 4)。これらのことから、神経損傷によって引き起こされる神経因性疼痛の形成には、脊髄におけるBDNF刺激を介したfull-length TrkBの細胞膜へのトランスロケーションが一部関与している可能性が示唆された。

## 3. 神経因性疼痛の形成における脊髄内PKCの役割

BDNFの受容体であるfull-length TrkBの下流には、生体内の細胞内応答において非常に重要な役割を担う種々の酵素が存在しており、これらの酵素の活性化により様々な生理反応が引き起こされることが知られている。Full-length TrkBの下流に存在するこのような酵素のうち、phospholipase C (PLC)  $\gamma$  1はその構造中にSH2ドメインを有していることから、前述したような機序を介してPTKによる直接的な活性化を受ける<sup>26)</sup>。PLC  $\gamma$  1は、他のPLCアイソフォームと同様に基質となるphospho-

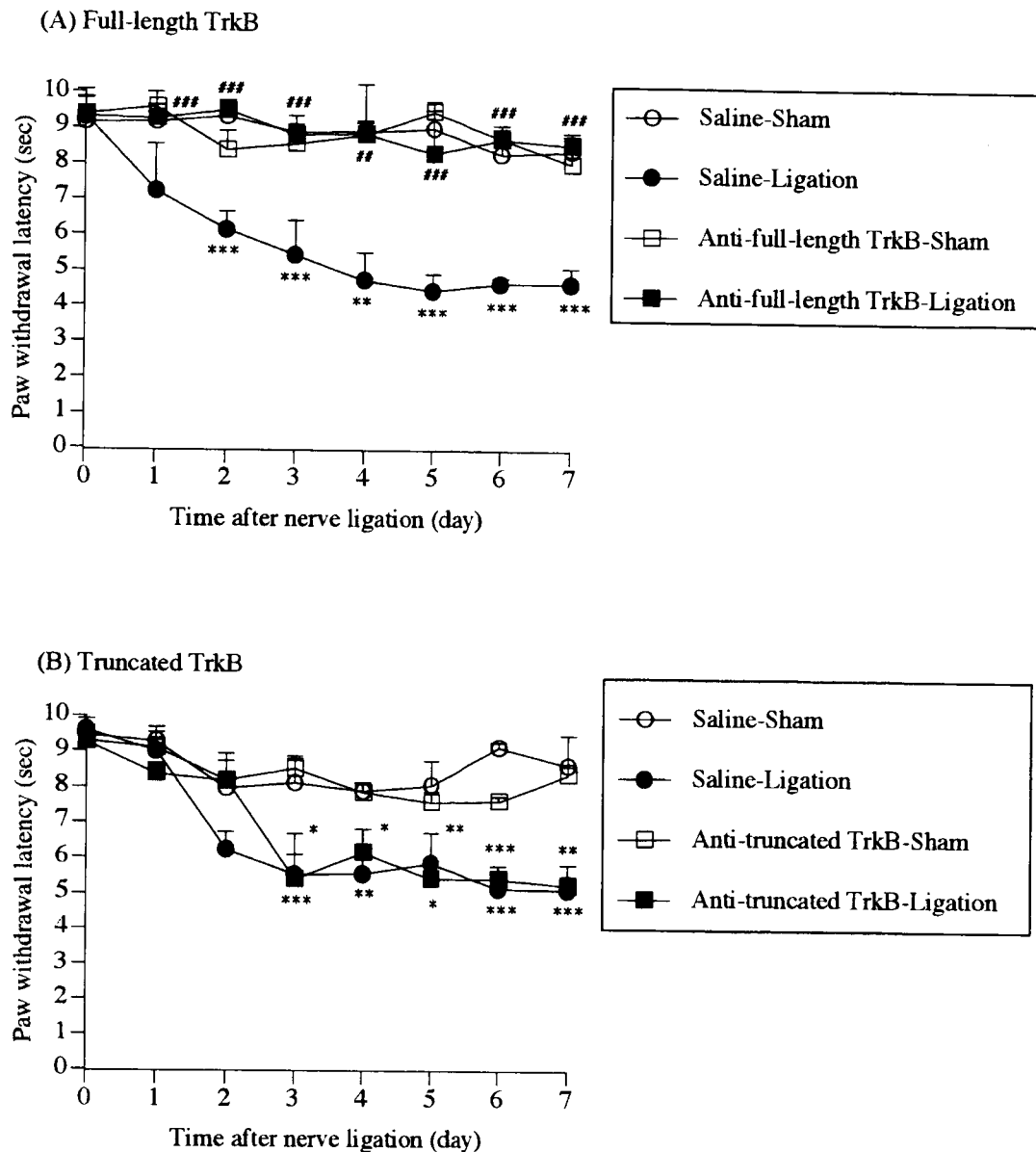


Fig. 3. Effects of repeated i.t. treatment with specific antibodies to full-length TrkB (A; Anti-full-length TrkB) and truncated TrkB (B; Anti-truncated TrkB) on thermal hyperalgesia induced by nerve ligation in mice. Groups of mice were repeatedly treated i.t. with these TrkB antibodies (1:100) or saline 1 hr prior to surgery (day 0) and at every assay for 7 consecutive days after surgery. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Saline-Sham group, ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  vs. Saline-Ligation group.

inositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) を加水分解し、inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) 産生を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加やdiacylglycerolを介したprotein kinase C (PKC) の活性化を引き起こす。PKCは、その活性上昇により、慢性疼痛の基盤をなすと考えられているwind up現象やcentral sensitization (脊髄後角細胞が過敏状態になり、弱い刺激に対しても過剰に反応するようになる状態) といった脊髄後角の可塑的变化を惹起することが知られている<sup>6)</sup>。そこで本研究では、神経因性疼痛動

物の脊髄におけるPKCの活性変化を、PKCの活性化の指標となるリン酸化型PKCの特異的抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。その結果、脊髄後角表層部におけるリン酸化型PKCの免疫活性は、坐骨神経を結紮することにより著明かつ有意に増大した (Fig. 5)。さらに、その免疫活性は脊髄後角の内層部にまで浸潤していることが明らかとなった。そこで選択的PKC阻害薬を用いて、神経因性疼痛の形成における脊髄内PKCの役割について行動薬理学的に検討したところ、神経因性疼

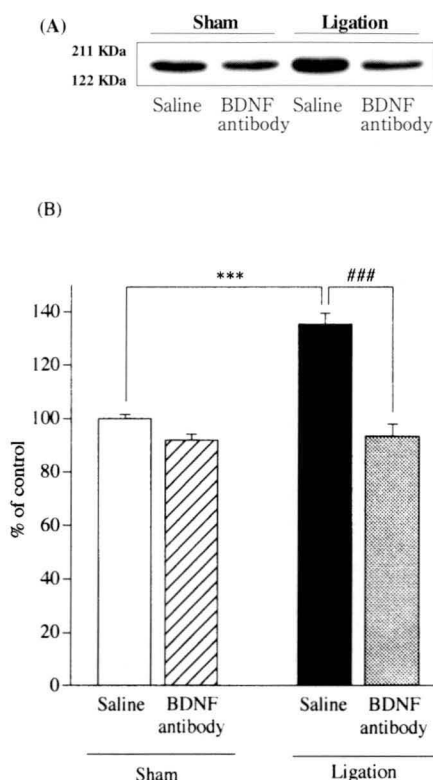


Fig. 4. (A) Representative Western blot of full-length TrkB protein. (B) Changes in membrane-located protein levels of full-length TrkB on the ipsilateral side of spinal cords (L4-L6) obtained from sham-operated or nerve-ligated mice. Groups of mice were repeatedly treated i.t. with a specific BDNF antibody or saline just before surgery and once a day for 7 days after surgery. Samples were prepared 24 hr after the last i.t. injection. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 4 samples. \*\*\* $p$ <0.001 vs. Saline-Sham group, ### $p$ <0.001 vs. Saline-Ligation group.

痛動物において認められる熱痛覚過敏反応は、選択的PKC阻害薬であるRo-32-0432の繰り返し髄腔内前処置により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 6)。一方、PKCアイソフォームの中でもCa<sup>2+</sup>依存性PKCファミリーに属するPKC  $\gamma$ は、神経特異的で脳および脊髄にのみ存在しており、活性化されると細胞膜にトランスロケーションする性質を有している。また、近年、Tonegawaらのグループにより作製されたPKC  $\gamma$ の遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討から、PKC  $\gamma$ はシナプス長期増強を調節する主要因子の一つであることが明らかとなった<sup>27)</sup>。Malmbergらは、このPKC  $\gamma$ 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、神経因性疼痛の形成におけるPKC  $\gamma$ の役割について検討を行い、PKC  $\gamma$ が神経因性疼痛の形成に関与する主要因子の一つであることを見出した<sup>28)</sup>。そこで本研究では、このPKC  $\gamma$ に着目し、神経因性疼痛モデルの脊髄における膜結合型PKC  $\gamma$ 量の変化をWestern blot法に従って検討したところ、神経因

性疼痛動物の脊髄では膜結合型PKC  $\gamma$ 量の有意な増加が認められた。これらの結果から、神経因性疼痛の形成には脊髄におけるPKC、特にCa<sup>2+</sup>依存性PKCの活性化が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

一方、脊髄初代培養神経細胞にBDNFを処置することにより引き起こされる細胞内Ca<sup>2+</sup>応答は、Trk依存的なPTK阻害薬であるK-252aならびに選択的PKC阻害薬であるRo-32-0432の前処置により著明に抑制された (Fig. 2)。さらに、BDNFの単回髄腔内投与により引き起こされる疼痛様症状も、K-252aならびにRo-32-0432の前処置により著しく抑制された。こうした結果から、脊髄におけるBDNF/full-length TrkB経路の活性化に伴ったPKCの活性化は、脊髄後角の可塑的变化を惹起し、神経因性疼痛を引き起こしている原因となっている可能性が示唆された。

#### 4. 炎症性疼痛の形成における脊髄内BDNFおよびPKCの役割

近年、炎症誘発物質であるcomplete Freund's adjuvant (CFA) の足蹠皮下投与による炎症性疼痛動物のDRGおよび脊髄において、BDNFならびにTrkBの発現量が増加することが報告されている<sup>29)</sup>。また、TrkB抗体の髄腔内投与により炎症誘発物質であるformalin投与後の即時性の疼痛関連行動が抑制されることや<sup>14)</sup>、BDNFならびにTrkBのアンチセンス核酸の髄腔内投与によりcarrageenan投与による炎症性疼痛モデルにおける熱痛覚過敏反応が抑制されることが報告されている<sup>30)</sup>。そのため、神経因性疼痛のみならず、炎症性疼痛の形成においても脊髄におけるBDNFが重要な役割を担っている可能性が示唆される。そこで、炎症性疼痛の形成にもこの経路の活性化が関与しているか否かを明らかにするために、CFAの単回足蹠皮下投与による炎症性疼痛モデルを作製し、炎症性疼痛の形成における脊髄内BDNFの関与について検討した。しかしながら、神経因性疼痛モデルとは異なり、炎症性疼痛モデルに対してBDNFの特異的抗体を繰り返し髄腔内前処置しても、熱痛覚過敏反応は抑制されず、さらに脊髄における膜結合型full-length TrkB量にも変化が認められなかった。こうした結果は過去の報告と矛盾するものであるが、これまでの報告のほとんどが炎症誘発物質投与数時間後から数日間後に急性的な検討をしているのに対して、本研究ではCFAを投与してから少なくとも7日間にわたって炎症性疼痛の形成における脊髄内BDNFやfull-length TrkBの関与を慢性的に検討している。そのため、神経因性疼痛と比較して炎症性疼痛の形成には、脊髄におけるBDNF/full-length TrkB経路の関与は非常に少ない可能性が示唆される。さらに、BDNFの下流に存在するPKCの関与についても検討したが、CFA投与による熱痛覚過

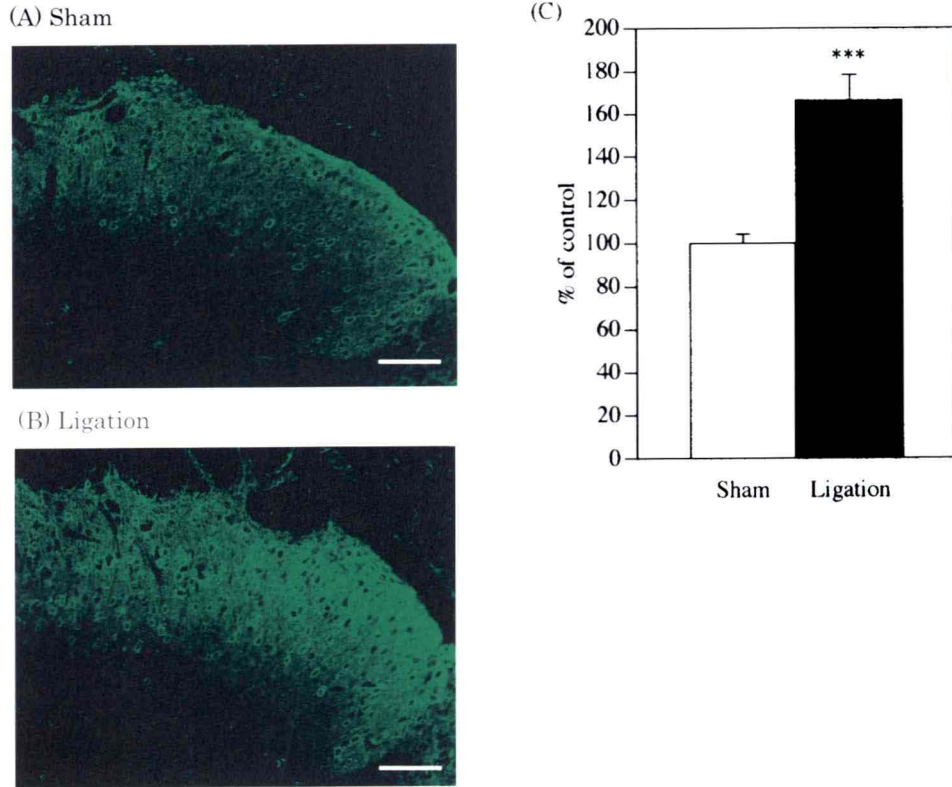


Fig. 5. Increase in the immunoreactivity (IR) to phosphorylated-conventional PKC (p-cPKC) at 7 days after nerve ligation (B) on the superficial laminae of the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord compared to that in sham-operated (A) mice. Scale bars; 50  $\mu$ m. (C) The density of p-cPKC-like IR in each spinal cord slice was measured using NIH Image. The level of p-cPKC-like IR in the superficial dorsal horn of the spinal cord in nerve-ligated mice is expressed as a percent increase (mean  $\pm$  S.E.M.) with respect to that in sham-operated mice. \*\*\* $p$ <0.001 vs. Sham group.

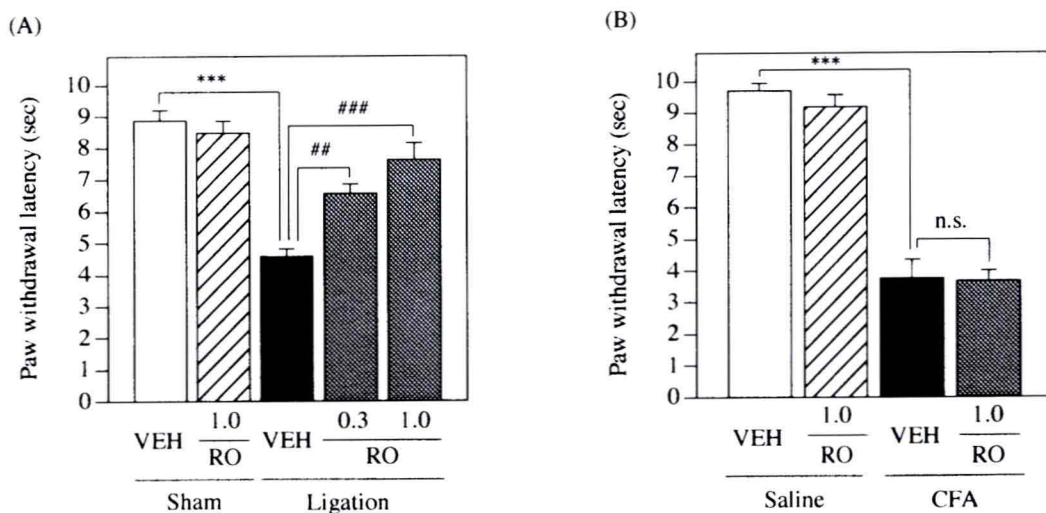


Fig. 6. Effect of repeated i.t. treatment with the selective PKC inhibitor Ro-32-0432 on thermal hyperalgesia induced by nerve ligation (A) and CFA injection (B) in mice. Groups of mice were repeatedly treated i.t. with Ro-32-0432 (RO; 0.3 and 1.0 nmol/mouse) or vehicle (VEH) 30 min prior to nerve ligation (A) or CFA injection (B), and once a day for 7 consecutive days after nerve ligation or CFA injection, respectively. Data show the latency of paw withdrawal in response to a thermal stimulus on the ipsilateral side 7 days after nerve ligation or CFA injection in mice. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice. \*\*\* $p$ <0.001 vs. VEH-Sham or VEH-Saline group, ## $p$ <0.01 and ### $p$ <0.001 vs. VEH-Ligation group. n.s.; not significant.

敏反応は選択的PKC阻害薬であるRo-32-0432を繰り返し髄腔内前処置してもほとんど抑制されず (Fig. 6)、脊髄におけるPKCの免疫活性ならびに膜結合型PKC  $\gamma$  量にも変化が認められなかった。これらの結果から、神経因性疼痛と比較して、炎症性疼痛の形成には脊髄におけるPKCの関与も少ない可能性が推察される。

### 5. 神経因性疼痛ならびに炎症性疼痛の形成における脊髄内PKAの役割

最近、炎症時の脊髄後角においてprostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) の遊離が引き起こされ、これが痛覚過敏反応を誘導する原因の一つであることが示唆されている<sup>31)</sup>。当教室でも、CFAの足蹠皮下投与による炎症性疼痛モデルの脊髄において、PGE<sub>2</sub>の反応性が亢進していることを確認している。また、炎症時の脊髄において誘導型cyclooxygenase (COX) であるCOX-2のmRNAが増加することや炎症性疼痛動物における熱痛覚過敏反応が、COX-2阻害作用の強いNSAIDsの繰り返し髄腔内投与により抑制されることを明らかにしている。そのため、炎症性疼痛の形成には、脊髄におけるCOX-2/PGE<sub>2</sub>経路の活性化が重要な役割を担っている可能性が示唆される。一方、このPGE<sub>2</sub>の受容体サブタイプの一つであるEP<sub>2</sub>受容体は、Gsタンパク質共役型の受容体であり、脊髄にもその局在が認められている<sup>32)</sup>。したがって、局所の炎症により脊髄後角において遊離されたPGE<sub>2</sub>が、EP<sub>2</sub>受容体を介してその下流に存在するprotein kinase A (PKA) を活性化し、炎症性疼痛を惹起させる可能性が推察される。そこで、炎症性疼痛動物の脊髄凍結切片を作製し、PKAの活性化の指標となるリン酸化型PKA免疫活性の変化について免疫組織化学的に検討した。その結果、炎症性疼痛モデルの脊髄後角では、リン酸化型PKAの免疫活性の有意な増大が認められ (Fig. 7)、またPKAの基質であり、遺伝子発現を誘導するcyclic AMP-response binding protein (CREB) のリン酸化型免疫陽性細胞数も有意に増加していた。さらにはこうした結果を支持するように、選択的PKA阻害薬であるKT-5720の繰り返し髄腔内前処置により、炎症性疼痛モデルで認められる熱痛覚過敏反応は著明に抑制された (Fig. 8)。近年、PKAの調節サブユニットの一つであるRI  $\beta$  サブユニット遺伝子ノックアウトマウスでは、formalinの足蹠投与により引き起こされる即時性の疼痛関連行動が、野生型マウスに比べて著明に減少することが報告されている<sup>33)</sup>。これらのことから、急性の炎症性疼痛のみならず、持続的な炎症性疼痛にも脊髄におけるPKAの活性化が関与しているものと考えられる。

一方、脊髄におけるPKAが、神経因性疼痛の形成にも関与しているか否かについて検討したが、神経因性疼痛モデルにおける熱痛覚過敏反応は、選択的PKA阻害

薬であるKT-5720を繰り返し髄腔内前処置しても抑制されず (Fig. 8)、脊髄後角におけるリン酸化型PKAの免疫活性にも変化は認められなかった。こうした結果は、PKA RI  $\beta$  サブユニット遺伝子ノックアウトマウスでは、神経損傷による痛覚過敏反応が抑制されないという報告に非常によく対応している<sup>33)</sup>。これらのことから、脊髄におけるPKAの活性化は神経因性疼痛よりも、炎症性疼痛の形成に深く関与しているものと考えられる。

### 6. おわりに

本研究成果により、神経因性疼痛の形成には脊髄におけるBDNF/full-length TrkB経路の活性化に伴ったPKCの活性化が深く関与していることが明らかとなった。一方、炎症性疼痛の形成には脊髄のPKAに関連した疼痛伝達機構が存在することが明らかとなり、神経因性疼痛と炎症性疼痛の脊髄を介した疼痛伝達機構には、異なる細胞内情報伝達系が関与する可能性が明らかとなった。そのため、このような脊髄を介した疼痛伝達機構の相違が、神経因性疼痛と炎症性疼痛時に認められるモルヒネの感受性の違いを生み出している可能性が想定される。しかしながら、これらの疼痛伝達機構に関してはいまだ不明な点が多く残されているため、今後、神経因性疼痛と炎症性疼痛形成機構の相違やそれらの共通因子をより詳細に探索することにより、これらの疼痛伝達機構の全貌や神経因性疼痛時に認められるモルヒネ抵抗性の原因が解明されることを期待したい。

### 謝 辞

本研究に対し、平成16年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜りましたことを深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました薬品毒性学教室 鈴木 勉教授ならびに成田 年助教授に心より御礼申し上げます。最後に本研究にご協力くださいました薬品毒性学教室の教室員の皆様方に御礼申し上げます。



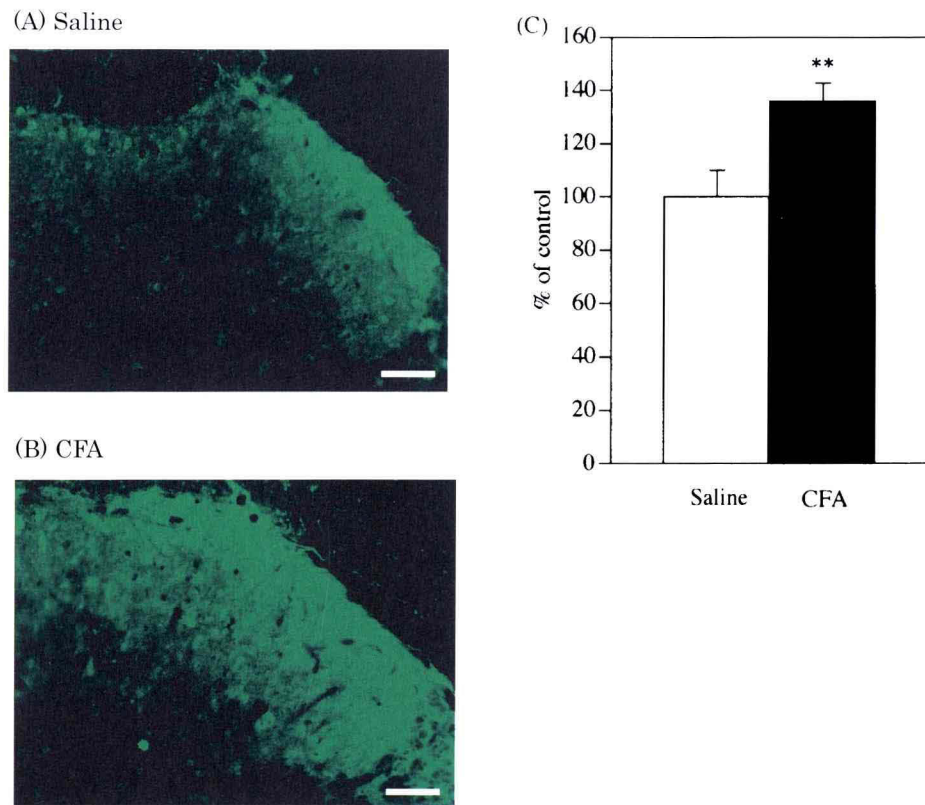


Fig. 7. Increase in immunoreactivity (IR) to phosphorylated-PKA (p-PKA) at 7 days after CFA injection (B) in the superficial laminae of the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord compared to that in saline-injected (A) mice. Scale bars; 50  $\mu$  m. (C) The density of p-PKA-like IR in each spinal cord slice was measured using NIH Image. The level of p-PKA-like IR in the superficial dorsal horn of the spinal cord in CFA-injected mice is expressed as a percent increase (mean  $\pm$  S.E.M.) with respect to that in saline-injected mice. \*\* $p < 0.01$  vs. Saline group.

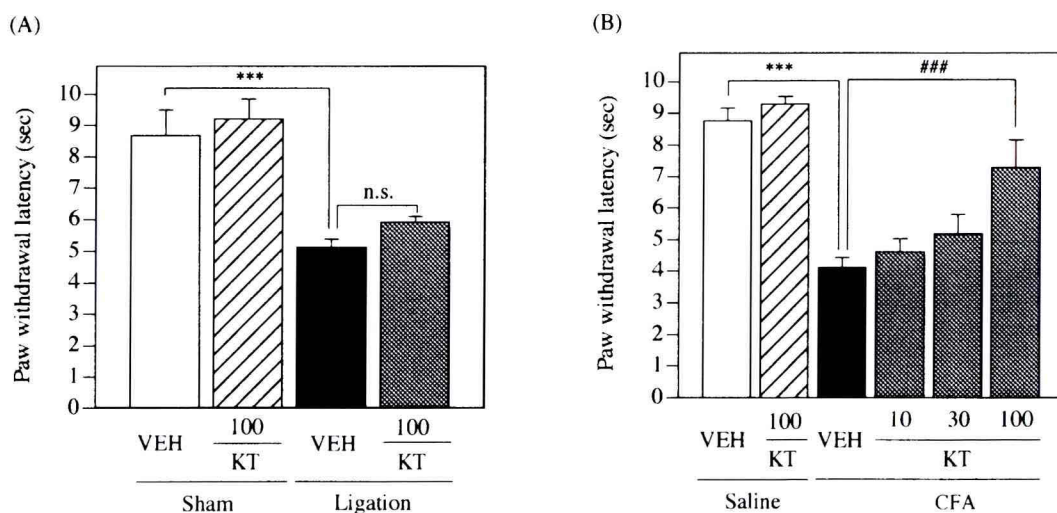


Fig. 8. Effect of repeated i.t. treatment with the selective PKA inhibitor KT-5720 on thermal hyperalgesia induced by nerve ligation (A) and CFA injection (B) in mice. Groups of mice were repeatedly treated i.t. with KT-5720 (10, 30 and 100 pmol/mouse) or vehicle (VEH) 30 min before nerve ligation (A) or CFA injection (B), and once a day for 7 consecutive days after nerve ligation or CFA injection, respectively. Data show the latency of paw withdrawal in response to a thermal stimulus on the ipsilateral side 7 days after nerve ligation or CFA injection in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice. \*\*\* $p < 0.001$  vs. VEH-Sham or VEH-Saline group, ### $p < 0.001$  vs. VEH-CFA group. n.s.; not significant.

## 参考文献

- 1) Bennett G.J. and Xie Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87-107 (1988).
- 2) Seltzer Z., Dubner R. and Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**, 205-218 (1990).
- 3) Kim S.H. and Chung J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355-363 (1992).
- 4) Petersen-Zeitz K.R. and Basbaum A.I. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. *Pain Suppl* **6**, S5-12 (1999).
- 5) Smith J.A., Davis C.L. and Burgess G.M. Prostaglandin E2-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur J Neurosci* **12**, 3250-3258 (2000).
- 6) Dickenson A.H. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 307-309 (1990).
- 7) Nichols M.L., Allen B.J., Rogers S.D., Ghilardi J.R., Honore P., Luger N.M., Finke M.P., Li J., Lappi D.A., Simone D.A. and Mantyh P.W. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* **286**, 1558-1561 (1999).
- 8) Zhou X.F. and Rush R.A. Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neuroscience* **74**, 945-953 (1996).
- 9) Michael G.J., Averill S., Nitkunan A., Rattray M., Bennett D.L., Yan Q. and Priestley J.V. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci* **17**, 8476-8490 (1997).
- 10) Luo X.G., Rush R.A. and Zhou X.F. Ultrastructural localization of brain-derived neurotrophic factor in rat primary sensory neurons. *Neurosci Res* **39**, 377-384 (2001).
- 11) Zhou X.F., Chie E.T., Deng Y.S., Zhong J.H., Xue Q., Rush R.A. and Xian C.J. Injured primary sensory neurons switch phenotype for brain-derived neurotrophic factor in the rat. *Neuroscience* **92**, 841-853 (1999).
- 12) Scarisbrick I.A., Isackson P.J. and Windebank A.J. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the adult rat spinal cord: regulation by the glutamate receptor agonist kainic acid. *J Neurosci* **19**, 7757-7769 (1999).
- 13) Heppenstall P.A. and Lewin G.R. BDNF but not NT-4 is required for normal flexion reflex plasticity and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8107-8112 (2001).
- 14) Kerr B.J., Bradbury E.J., Bennett D.L., Trivedi P.M., Dassan P., French J., Shelton D.B., McMahon S.B. and Thompson S.W. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci* **19**, 5138-5148 (1999).
- 15) Thompson S.W., Bennett D.L., Kerr B.J., Bradbury E.J. and McMahon S.B. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7714-7718 (1999).
- 16) Pezet S., Malcangio M. and McMahon S.B. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res Brain Res Rev* **40**, 240-249 (2002).
- 17) Malcangio M. and Lessmann V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 116-121 (2003).
- 18) Jovanovic J.N., Czernik A.J., Fienberg A.A., Greengard P. and Sihra T.S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* **3**, 323-329 (2000).
- 19) Matsumoto T., Numakawa T., Adachi N., Yokomaku D., Yamagishi S., Takei N. and Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J Neurochem* **79**, 522-530 (2001).
- 20) Klein R., Conway D., Parada L.F. and Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* **61**, 647-656 (1990).
- 21) Middlemas D.S., Lindberg R.A. and Hunter T. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* **11**, 143-153 (1991).
- 22) Eide F.F., Vining E.R., Eide B.L., Zang K., Wang X.Y. and Reichardt L.F. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* **16**, 3123-3129 (1996).
- 23) Baxter G.T., Radeke M.J., Kuo R.C., Makrides V., Hinkle B., Hoang R., Medina-Selby A., Coit D., Valenzuela P. and Feinstein S.C. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J Neurosci* **17**, 2683-2690 (1997).
- 24) Rose C.R., Blum R., Pichler B., Lepier A., Kafitz K.W. and Konnerth A. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* **426**, 74-78 (2003).
- 25) Lee S.L., Kim J.K., Kim D.S. and Cho H.J. Expression of mRNAs encoding full-length and truncated TrkB receptors in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Neuroreport* **10**, 2847-2851 (1999).
- 26) Yuen E.C. and Mobley W.C. Early BDNF, NT-3, and NT-4 signaling events. *Exp Neurol* **159**, 297-308 (1999).
- 27) Abeliovich A., Chen C., Goda Y., Silva A.J., Stevens C.F. and Tonegawa S. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* **75**, 1253-1262 (1993).

- 28) Malmberg A.B., Chen C., Tonegawa S. and Basbaum A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* **278**, 279-283 (1997).
- 29) Mannion R.J., Costigan M., Decosterd I., Amaya F., Ma Q.P., Holstege J.C., Ji R.R., Acheson A., Lindsay R.M., Wilkinson G.A. and Woolf C.J. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9385-9390 (1999).
- 30) Groth R. and Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain* **100**, 171-181 (2002).
- 31) Samad T.A., Moore K.A., Sapirstein A., Billet S., Allchorne A., Poole S., Bonventre J.V. and Woolf C.J. Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**, 471-475 (2001).
- 32) Donaldson L.F., Humphrey P.S., Oldfield S., Giblett S. and Grubb B.D. Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins* **63**, 109-122 (2001).
- 33) Malmberg A.B., Brandon E.P., Idzerda R.L., Liu H., McKnight G.S. and Basbaum A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* **17**, 7462-7470 (1997).

Differential involvement of a spinal nociceptive signaling pathway in neuropathic and inflammatory pain-like states in mice

Yoshinori YAJIMA

Department of Toxicology, Hoshi University, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Neuropathic pain, which is characterized by spontaneous burning pain, hyperalgesia (exaggerated pain in response to painful stimuli) and allodynia (pain caused by normally innocuous stimuli), is the most difficult pain to manage in the pain clinic, because the pain is often refractory to general analgesics such as non-steroidal anti-inflammatory drugs and morphine, which are usually used for inflammatory pain. Therefore, there seems to be differences in the mechanisms of pain processing between neuropathic and inflammatory pain. However, the respective detailed mechanisms are not fully understood. The present study was then undertaken to investigate the differences in the mechanisms of pain processing between neuropathic and inflammatory pain using behavioral, biochemical and immunohistochemical approaches. The present findings demonstrated that the activation of a brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB/protein kinase C-mediated signaling pathway in the spinal cord might be responsible for the development of a neuropathic pain-like state. In contrast, the activation of protein kinase A in the spinal cord may predominantly contribute to the development of an inflammatory pain-like state in mice. Conclusively, these findings provide evidence that there are different mechanisms of pain processing in the spinal cord between neuropathic and inflammatory pain-like states.