

## &lt;教育講演 3&gt;

## 神経障害性疼痛発症メカニズムとその制御

井上 和秀

要旨：痛みを伝える末梢神経の損傷や機能異常は神経障害性疼痛という耐えがたい慢性疼痛をひきおこす。しかし、その発症メカニズムが不明のために有効な治療法がなく、モルヒネなどの鎮痛薬も奏功しがたく、全世界で2,200万人以上の患者が苦しんでいるとされている。われわれは、末梢神経損傷後に脊髄で活性化したミクログリア細胞にイオンチャンネル型P2プリン受容体サブタイプP2X<sub>4</sub>受容体が過剰発現し、その受容体刺激が神経障害性疼痛に重要であること、更に、P2X<sub>4</sub>受容体の活性化によりミクログリアから脳由来神経栄養因子(BDNF)が放出され、それが痛覚二次ニューロンのCl<sup>-</sup>イオンくみ出しポンプの発現低下をひきおこし、それゆえ、触刺激により放出されたGABAの二次ニューロンに対する作用が抑制性から興奮性へと変化し、このようにして、触刺激が疼痛をひきおこすことを示した。その後更に、P2X<sub>4</sub>受容体過剰発現メカニズムや、ミクログリアの活性化がインターフェロンガンマによりひきおこされることをみいだした。また、活性化ミクログリア細胞にはP2Y<sub>12</sub>受容体が発現し、独特のメカニズムで神経障害性疼痛に関与する。これらの事実は、神経障害性疼痛発症におけるP2プリン受容体—ミクログリア—ニューロン連関の重要性を示唆している。

(臨床神経, 49: 779—782, 2009)

Key words: 神経障害性疼痛, ミクログリア, ATP受容体

モルヒネも効きがたい難治性疼痛の代表格・神経障害性疼痛は人類史上最悪の痛みといわれているが、その発症メカニズムとして、脊髄後角の活性化型ミクログリアに発現するP2プリン受容体の役割が注目されている。P2プリン受容体はATP受容体とも呼ばれ、イオンチャンネル型受容体(P2X)ファミリーとGタンパク質共役型受容体(P2Y)ファミリーに大別される。現在までに報告されているサブタイプは、それぞれ7種類(P2X<sub>1</sub>~P2X<sub>7</sub>)および8種類(P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>~P2Y<sub>14</sub>)である(Fig. 1)。本編では、神経障害性疼痛に関与するP2X<sub>4</sub>受容体とP2Y<sub>12</sub>受容体について概説する。

1. 脊髄ミクログリアのP2X<sub>4</sub>受容体刺激による神経因性疼痛発症

中枢神経系の免疫担当細胞ミクログリアは、中枢や末梢神経の損傷に反応して、細胞肥大等の形態学的変化や細胞増殖をおこし、活性化型ミクログリアになる。神経障害性疼痛モデルラット(Chung model 変法)の脊髄後角のミクログリアでは、アロディニア強度の経時変化によく相関して活性化し、正常状態では非常に低いレベルに維持されているP2X<sub>4</sub>受容体の発現もいちじるしく上昇する<sup>1)</sup>。このアロディニアは、P2X<sub>4</sub>受容体にも有効な拮抗薬TNP-ATP、あるいはP2X<sub>4</sub>受容体アンチセンスの脊髄くも膜下腔内投与により抑制され、さらにATP刺激したミクログリア培養細胞を正常ラットの脊髄くも膜下腔内へ投与するだけで再現できた<sup>1)</sup>。そして、このラットの脊髄第I層ニューロン標本では、陰イオンに対する逆転電位( $E_{\text{anion}}$ )が脱分極側へシフトすること、および抑制性伝達

物質のGABAにより脱分極が誘発されることがみいだされた<sup>2)</sup>。同様な現象が、正常ラットの脊髄くも膜下腔内へBDNFを投与することにより観察され、それらの作用は、BDNFの機能阻害抗体やsiRNAにより共に抑制された<sup>2)</sup>。また、ミクログリアをATPで刺激することにより、BDNFが遊離され、その放出がP2X<sub>4</sub>を遮断するTNP-ATPで抑制された。以上の事実から次の仮説が提唱された(Fig. 2)。触刺激は $\beta$ を介して一部が脊髄後角介在ニューロンへ入力しており、介在ニューロンからは抑制性の神経伝達物質・GABAなどが放出される。正常時にはGABAは二次ニューロンへ抑制的に働き、痛み伝達を抑制している。しかし、アロディニア病態では、P2X<sub>4</sub>刺激により活性化型ミクログリアがBDNFを放出し、BDNFは痛覚二次ニューロンの $E_{\text{anion}}$ を脱分極側へシフトさせるために、触刺激により放出されたGABAは痛覚二次ニューロンへ興奮性に作用してしまい、その結果、二次ニューロンでスパイクが発生し、それが大脳皮質知覚領へと伝わり激痛として認識される。

BDNF放出メカニズムに関しては、P2X<sub>4</sub>刺激によるCa<sup>2+</sup>流入により、刺激5分および1時間後をピークとする2相性の放出があり、前者は細胞内に蓄積されていたBDNFの放出、後者はp38MAPK活性化を介するBDNF生合成促進によるものであり、いずれもSNARE蛋白に依存した放出であると報告されている<sup>3)</sup>。

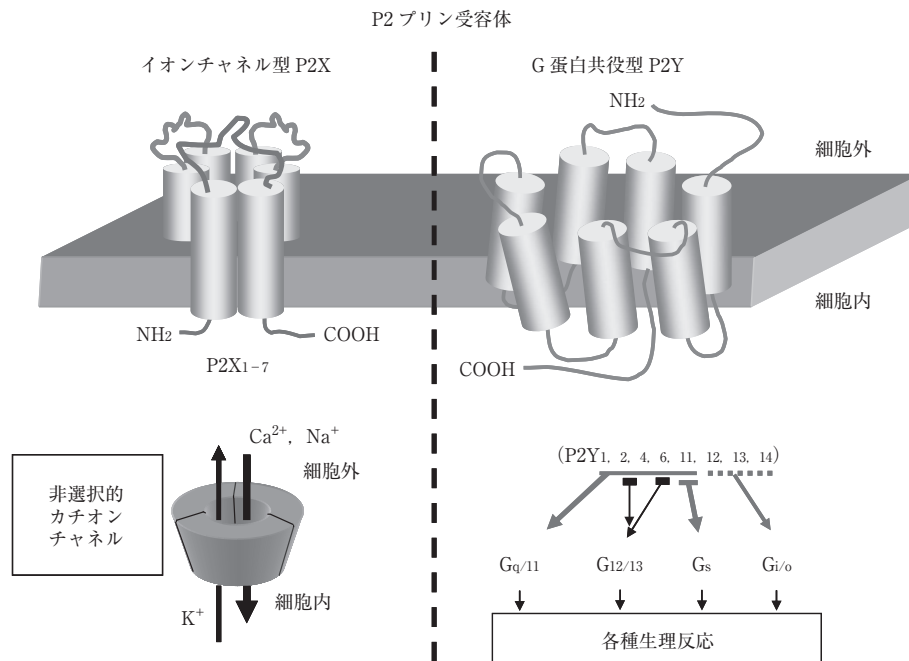


Fig. 1 P2 プリン受容体サブタイプ

P2 プリン受容体 (ATP 受容体) は、イオンチャネル型受容体 (P2X) ファミリーと G タンパク質共役型受容体 (P2Y) ファミリーに大別される。P2X ファミリーはイオンチャネル型 ATP 受容体であり、これまでに P2X<sub>1</sub> から P2X<sub>7</sub> までの 7 種類が認知されている。トポロジーとしては膜 2 回貫通型というイオンチャネルとしては非常に特徴的な形態をとり、3 分子がホモ (同一サブタイプで構成) あるいはヘテロ (2 種のサブタイプで構成) に会合して 1 個の非選択性陽イオンチャネル (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> いずれも通す穴) を形成すると考えられている。現在報告されている P2Y ファミリーは 8 種類 (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub> ~ P2Y<sub>14</sub>) であり、その内因性アゴニストは ATP, UTP など多種のヌクレオチドである。G<sub>q/11</sub> と共役しているのは P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub> 受容体、G<sub>s</sub> と共役しているのは P2Y<sub>11</sub>, G<sub>i/o</sub> と共役しているのは P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> 受容体、G<sub>12/13</sub> と共役しているのは P2Y<sub>6</sub> 受容体である。

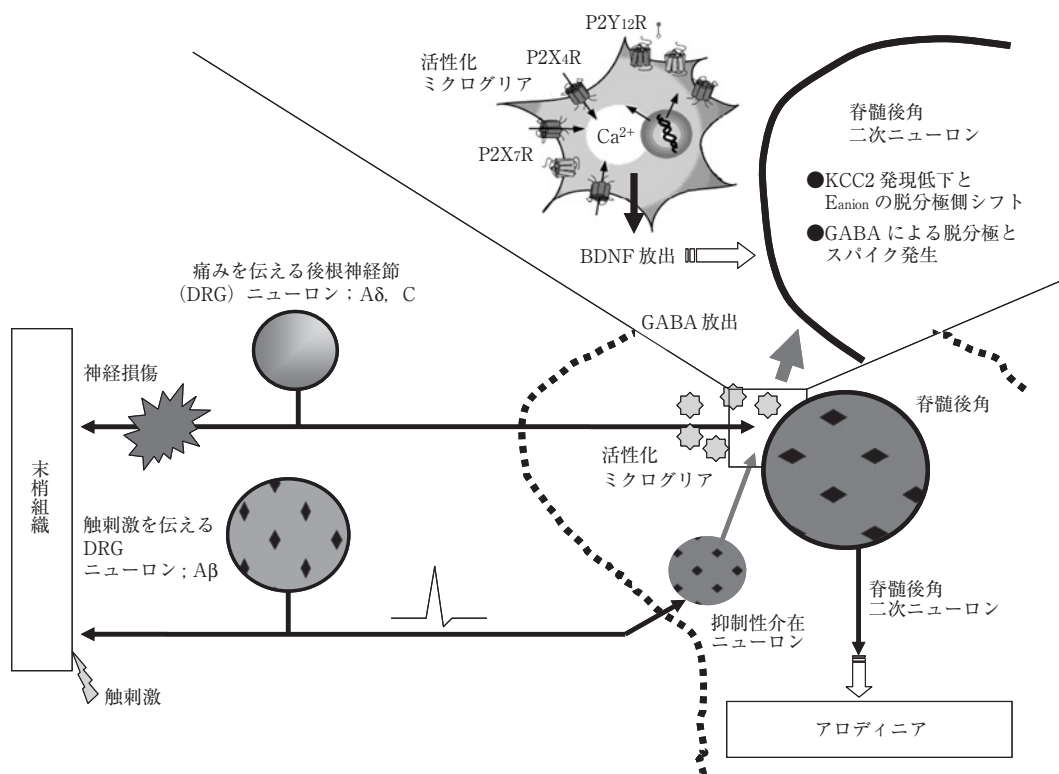
## 2. 脊髄マイクログリア P2X<sub>4</sub> 受容体の過剰発現メカニズム

神経障害性疼痛モデルの脊髄後角では、神経損傷後 3~7 日にフィブロネクチン発現レベルの増加がみとめられ、選択的  $\beta_1/\beta_3$  インテグリン拮抗薬のエチスタチン投与により P2X<sub>4</sub> 受容体の発現増加とアロディニアの形成が阻害された<sup>4)</sup>。マイクログリア培養細胞をフィブロネクチンで処置すると、P2X<sub>4</sub> の mRNA およびタンパクの増加、さらに P2X<sub>4</sub> 受容体介在性の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 応答の増大が生じ、これらの作用はエチスタチンと、 $\beta_1$  インテグリン機能阻害抗体で抑制された<sup>4)</sup>。また、フィブロネクチンを正常動物の脊髄にも膜下腔内へ投与することだけでアロディニアが発現し、一方、P2X<sub>4</sub> 欠損マウスではアロディニアは生じなかった<sup>4)</sup>。さらに、Src ファミリーキナーゼ (SFK) 分子の一つである Lyn が脊髄においてマイクログリア特異的に発現し、P2X<sub>4</sub> 過剰発現と神経障害性疼痛に重要であることをみいだした<sup>5)</sup>。以上の事実は、フィブロネクチンがインテグリン-Lyn 情報伝達系を介して、マイクログリアにおける P2X<sub>4</sub> 受容体過剰発現に非常に重要な役割を担っている事

を示唆している。

## 3. 脊髄マイクログリアに発現する P2Y<sub>12</sub> 受容体と神経因性疼痛との関係

マイクログリアに発現する P2Y<sub>12</sub> 受容体がマイクログリアの走化性に関与していることはすでに報告されていたが、最近、神経障害性疼痛とも深く関わっていることが明らかとなった<sup>6)</sup>。神経障害性疼痛モデル (Chung 変法) ラットの脊髄活性化マイクログリアでは、P2Y<sub>12</sub> 受容体の発現が術後経時的に増大した。P2Y<sub>12</sub> 受容体の選択的拮抗薬 ARC69931 の髄腔内への連日投与によりアロディニアが著明に抑制され、P2Y<sub>12</sub> 受容体欠損マウスではアロディニア発現が著明に抑制された。一端形成されたアロディニアに対しても ARC69931 は鎮痛作用を示す<sup>6)</sup> ことから、アロディニア抑制作用は、患部へのマイクログリアの集積を阻止することによると考えるよりも、走化性とは別のメカニズムが働いていると考えた方が自然である。



**Fig. 2** 脊髄マイクログリアに発現する ATP 受容体サブタイプと神経障害性疼痛との関係 (仮説)  
 後根神経節 (DRG) ニューロンは痛みを伝える A $\delta$  や C 線維, 触刺激を伝える A $\beta$  などで構成される。末梢組織に入力している DRG ニューロン末梢端で発生した痛みインパルスは中枢端に伝わり, その情報はシナプス伝達により脊髄後角の二次ニューロン, さらに上位脳へと伝えられ, 痛覚となる。触刺激の一部は A $\beta$  を介して脊髄後角の抑制性介在ニューロンにも伝わり, そこから GABA など抑制性神経伝達物質を放出させる。生理的条件下では, 放出された GABA は DRG ニューロンから二次ニューロンへ伝わる痛みシグナルを抑制する。神経障害性疼痛発症モデル動物の脊髄後角では神経障害により静止型マイクログリアが活性化型マイクログリアへと変化し, ついで P2X $_4$  受容体が過剰発現する。P2X $_4$  受容体刺激によりマイクログリアから脳由来神経栄養因子 (BDNF) が放出され, BDNF は脊髄後角第一層の二次ニューロンに働き, 陰イオン排出ポンプ (KCC2) の発現をおさえる。その結果, 細胞内 Cl $^-$  濃度が高まり, 陰イオンに対する逆転電位 (E $_{anion}$ ) が脱分極側にシフトする。この病態条件下では, 介在ニューロンから放出された GABA により Cl $^-$  チャンネルが開くと Cl $^-$  イオンは細胞内から細胞外へ流出してしまい, ニューロンは脱分極する。つまり, 抑制的に働くべき GABA の二次ニューロンへの作用が興奮性となってしまい, その結果, 触刺激が痛みとなるアロディニア状態を呈すると考えられる。活性化マイクログリアには P2X $_4$ , P2Y $_{12}$  受容体の他に P2X $_7$  などの ATP 受容体サブタイプも発現しており, それぞれ神経障害性疼痛に関与する。

#### 4. 脊髄マイクログリア活性化メカニズム

末梢神経傷害後のマイクログリア活性化メカニズムは長い間不明であったが, 2005 年に神経障害性疼痛発症モデルの脊髄では IFN- $\gamma$  の mRNA 含量が高いことが報告された。そこで IFN- $\gamma$  とマイクログリア活性化の関係について検討した結果, IFN- $\gamma$  を正常ラットの脊髄腔内に投与することにより, 脊髄マイクログリアの活性化と 10 日以上も持続するアロディニアが観察された<sup>7)</sup>。IFN- $\gamma$  投与ラットの脊髄内で活性化型 STAT1 (p-STAT) のシグナルがマイクログリアにおいてのみ観察された。さらに, IFN- $\gamma$  によるマイクログリアの活性化およびアロ

ディニア発症は, ミクログリア活性化抑制剤 minocycline 同時投与や IFN- $\gamma$  受容体欠損マウスでは抑制された。さらに, IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与によりマイクログリア特異的に Src ファミリーキナーゼ (SFK) の Lyn の発現が増加し, 活性化がみとめられたことから, 発現増加した Lyn は活性化型となっていることが示唆された。Lyn 欠損マウスでは, ミクログリアの形態変化や細胞増殖, さらにアロディニアの発現が有意に抑制された。さらに, IFN- $\gamma$  誘発性アロディニアの発症にマイクログリアの P2X $_4$  受容体の関与が示唆された。以上の結果より, 末梢神経損傷後に損傷側脊髄内で発現増加した IFN- $\gamma$  は, ミクログリアに特異的に作用し, Lyn の発現増加・活性化を介してマイクログリアの形態変化や細胞増殖を誘発し, さらに P2X $_4$

受容体の発現増加を介して、神経因性疼痛発症に重要な役割を果たしているものと考えられる。

### 終わりに

神経障害性疼痛と脊髄後角ミクログリアに発現する ATP 受容体サブタイプとの関係についてとくに P2X<sub>4</sub>受容体および P2Y<sub>12</sub>受容体について概説したが、ミクログリアには P2X<sub>7</sub>受容体も発現しており、神経障害性疼痛と深い関係があることが報告されている。さらに、末梢神経の一部である後根神経節ニューロンでは P2X<sub>3</sub>および P2X<sub>2/3</sub>受容体の刺激が cPLA<sub>2</sub> 依存的な脂質メディエーター産生を介して神経障害性疼痛に対して重要な役割を担っているとの報告がある。このように、神経障害性疼痛と ATP 受容体サブタイプとの関係は非常に興味深く、ここに新薬開発のシーズも存在すると思われる。

### 文 献

- 1) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al: P2X<sub>4</sub> receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424: 778—783
- 2) Coull JA, Beggs S, Boudreau D, et al: BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying

ing neuropathic pain. *Nature* 2005; 438: 1017—1021

- 3) Trang T, Beggs S, Wan X, et al: P2X<sub>4</sub>-Receptor-Mediated Synthesis and Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Microglia Is Dependent on Calcium and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *J Neurosci* 2009; 29: 3518—3528
- 4) Tsuda M, Toyomitsu E, Komatsu T, et al: Fibronectin/integrin system is involved in P2X<sub>4</sub> receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury. *Glia* 2008; 56: 579—585
- 5) Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Masuda T, et al: Lyn tyrosine kinase is required for P2X<sub>4</sub> receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia* 2008; 56: 50—58
- 6) Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, et al: P2Y<sub>12</sub> receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2008; 28: 4949—4956
- 7) Tsuda M, Masuda T, Kitano J, et al: IFN- $\gamma$  receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8032—8037

### Abstract

#### The mechanism and control of neuropathic pain

Kazuhide Inoue, Ph.D.

Department of Molecular and System Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Neuropathic pain is a debilitating pain that occurs after nerve injury and is generally resistant to currently available treatments including morphine. Such pain involves aberrant excitability in dorsal horn neurons after nerve injury. Emerging evidence indicate that the enhanced activity of dorsal horn neurons requires a communication with microglia. Results of our laboratory have shown that activating P2X<sub>4</sub>R upregulated in spinal microglia after nerve injury contributes to neuropathic pain through a release of BDNF from microglia, which is a crucial factor to signal to dorsal horn neurons to cause neuronal hyperexcitability. Activated spinal microglia also express P2Y<sub>12</sub>R, and P2Y<sub>12</sub>R-KO mice display impaired neuropathic pain. The mechanisms of microglia activation are unknown, but our recent study shows that interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) can be an important factor that causes spinal microglia activation after nerve injury. IFN- $\gamma$  upregulates P2X<sub>4</sub>R in microglia and causes P2X<sub>4</sub>R-dependent allodynia. These findings suggest that purinoceptors in spinal microglia is crucial for pathological intractable pain.

(*Clin Neurol*, 49: 779—782, 2009)

**Key words:** Neuropathic pain, microglia, ATP receptors