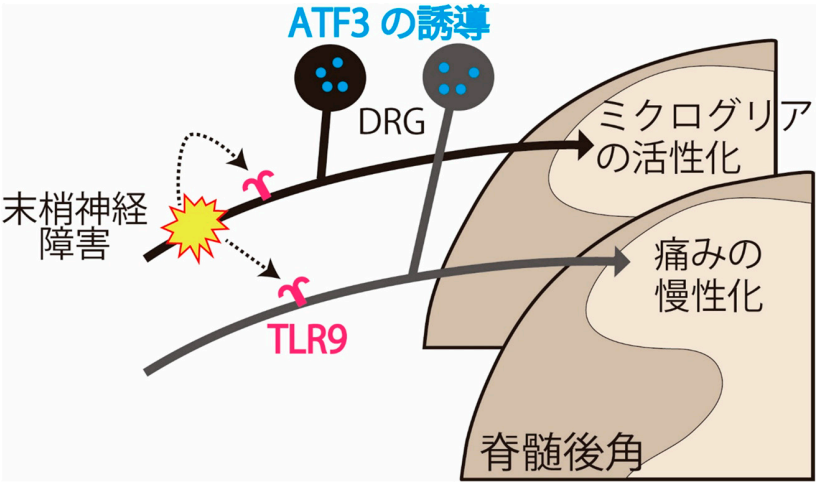
152　末梢神経制御による難治性疼痛の改善メカニズムの解明	林　良憲

【目的】神経障害性疼痛は末梢神経障害が治った後も長期的に持続する慢性痛の一種であり、中枢神経系の可塑的変化が病態の原因であるとして理解されている。神経障害性疼痛時には中枢神経系の変化に先駆けて一次求心性神経の細胞体（DRG）で Activating Transcription Factor 3（ATF3）が必ず発現誘導されることが分かっている。種々の痛みのモデルにおいても同様に DRG での ATF3 の発現誘導が認められている。しかし、中枢神経系の可塑的変化に先行した DRG での ATF3 の発現誘導がどのような役割があるのかは不明のままであった。そこで本研究では疼痛における ATF3 の役割を明らかにすることを目的とする。

【方法】第 4 腰髄（L4）神経を切断することで神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、行動学的な解析を行う。その後、これらのマウスの DRG 及び脊髄を用いて免疫組織化学的な解析を行う。また、神経障害性疼痛モデル作製 5 日目より *Atf3* に対する siRNA を脊髄腔内投与により *in vivo* ノックダウンを行う。

【結果】神経障害性疼痛モデルマウスで生じる痛みは *Atf3* の siRNA により改善された。また、*Unc93b1* 変異マウスでは神経障害性疼痛に抵抗性を示した。UNC93B1 が担う代表的な経路として TLR9 があるため、TLR9 のリガンドを L4 脊髄神経に処置することで疼痛が生じた。以上のことから、ATF3 が痛みの慢性化のスイッチとして働いていることを見出し、ATF3 の制御により痛みを改善できることが明らかとなった。また、これらの現象を開始させる起始点が末梢神経に発現する TLR9 であることが明らかとなった。

末梢神経障害により DRG で誘導される ATF3 は痛みの慢性化を規定する



152. 末梢神経制御による難治性疼痛の改善メカニズムの解明

林　良憲

九州大学 大学院歯学研究院 口腔機能分子科学分野

Key words：神経障害性疼痛，一次求心性神経，ATF3，Toll-like receptor 9

緒　言

神経障害性疼痛は器質的障害の改善にも関わらず、本来の生体防御機能を逸脱した異常な慢性痛に苦悩する疾患である。帯状疱疹、糖尿病、脳卒中後疼痛など、複数の疾患において併発する症状であり、その患者数は全世界で2,000万人以上と推察されている。既存の鎮痛薬ではその効果が乏しいために、有効な治療薬の確立が社会的に望まれている。これらの慢性疼痛は脊髄のミクログリアの機能異常に起因する［1］という報告を皮切りに多くの研究がこれまでに行われてきたが、どのようにしてミクログリアに異常が生じ痛みを慢性化させていくのかは未だ不明であった。ミクログリアの活性化を引き起こす因子として一次求心性神経の神経節（DRG）で産生されるコロニー刺激因子（CFS-1）が脊髄後角へ輸送されることが原因である可能性が提示され、その際にDRGでActivating Transcription Factor 3（ATF3）の発現誘導が認められている［2］。ATF3のDRGでの発現誘導は前述の種々の疾患においても認められる現象であり、神経障害のマーカーとして広く認知された分子であるが、疼痛における ATF3 の役割に関しては不明であった。そこで、本研究ではDRGのATF3の役割に着目し、神経障害性疼痛の分子メカニズム探索を行った。

方　法

1. 疼痛モデルの作製および行動測定

Unc93b1変異マウスおよびC57BL/6Jマウス（8～10週齢、オス）を使用し、九州大学動物実験規定に沿って実験を実施した。神経障害性疼痛モデルはマウスの左側の第4腰髄（L4）神経を周囲の神経から剥離した後に切断することで作製した。また、一部のマウスは L4 神経に損傷を与えることなく、神経に toll-like receptor 9 のリガンドであるODN1826（1 μg, InvivoGen）を処置した。疼痛閾値の測定はvon Freyフィラメントをマウスの後肢足裏に押し当てることで行った。

2. *in vivo* での siRNA の導入

マウス *Atf3* のsiRNAはThermo Scientificより購入し、Lipofectamin RNAiMaxを用いて導入した。siRNA（20 pmol/5 μl）は神経障害性疼痛モデルを作製して5日目から1日1回、4日間に渡って30G針を用いてマウスの脊髄腔内に投与を行い、DRGでのATF3の染色性の消失によりsiRNAのノックダウン効果を確認した。

3. 免疫組織化学染色

マウスは行動実験の後に4% PFAで固定し、抗Iba1抗体（1 : 1,000、Wako）および抗ATF3抗体（1 : 2,000、Santa Cruz）でL4脊髄およびL4DRGの免疫染色をそれぞれ行った。

結　果

1. ATF3 は痛みの慢性化に必要である

DRG で発現誘導される ATF3 が痛みに重要であるか否かを検討するために、神経障害性疼痛を起こして 5 日目から *Atf3* に対する siRNA の脊髄腔内投与により *Atf3* の *in vivo* ノックダウンを行った。その結果、疼痛の改善が認められると共に、痛みの慢性化に重要であるミクログリアの活性化が抑制された（図 1）。つまり、DRG の ATF3 が痛みの状態を制御することを示唆している。

2. ATF3 の誘導は TLR9 を介して生じる

ATF3 は神経障害性疼痛時に DRG で発現誘導されるが、障害を被った神経の投射する DRG のみならず、これに隣接する健康な神経の投射する DRG でも ATF3 の発現誘導が認められることが報告されている［3］。これは、障害された神経から漏出した物質が隣接する神経束を活性化し、DRG での ATF3 の発現誘導をもたらしている可能性が考えられる。障害された神経から漏出する物質の候補として Damage associated molecular patterns（DAMPs）が挙げられ、主にパターン認識受容体である Toll-like 受容体（TLR）を介したシグナルを発生させる。そこで、代表的なパターン認識受容体の TLR3、7、9 が機能しない *Unc93b1* 変異マウスを用いて検討を行った。その結果、*Unc93b1* 変異マウスでは神経障害性疼痛がほとんど生じず、脊髄ミクログリアの活性化も観察されなかった（図 2）。UNC93B1 は 3 種の TLR のゴルジ体から小胞体への輸送に関わることで TLR の機能を制御している［4］。この中でも特に TLR9 は DAMPs の主な受容体として知られている。そこで、TLR9 の慢性痛における関与を検討するために、TLR9 リガンドを L4 神経に投与することで慢性痛が生じるか否か検討を行った。リガンド処置 1 日目から疼痛行動が確認され、DRG での ATF3 の発現誘導および脊髄ミクログリアの活性化が認められた（図 3）。

3. 図表の挿入

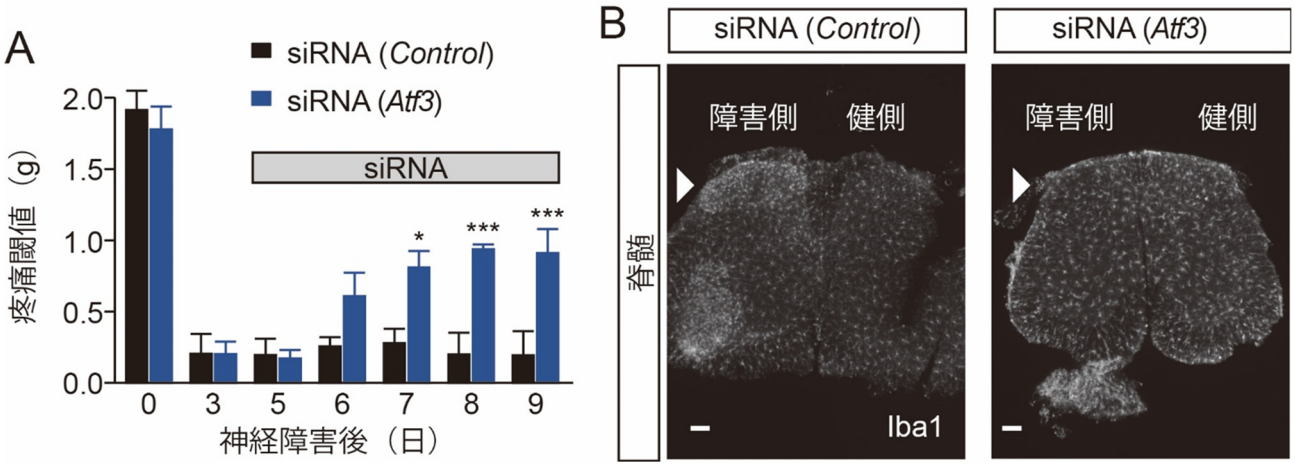


図 1. 痛みの慢性化における ATF3 の関与

（A）神経障害後に脊髄腔内に *Atf3* の siRNA を処置すると低下した疼痛閾値が改善した。**P*< 0.05，****P*< 0.001 vs. siRNA（Control）n = 3～6（2 way ANOVA，Sidak's multiple comparisons test）。（B）siRNA 投与 4 日後の脊髄の Iba1（ミクログリアのマーカー）の染色像を示す。神経の障害側で認められるミクログリアの染色性の亢進は siRNA（*Atf3* ）の処置により消失した。矢頭は脊髄後角を示す。Scale bar，100 µm。

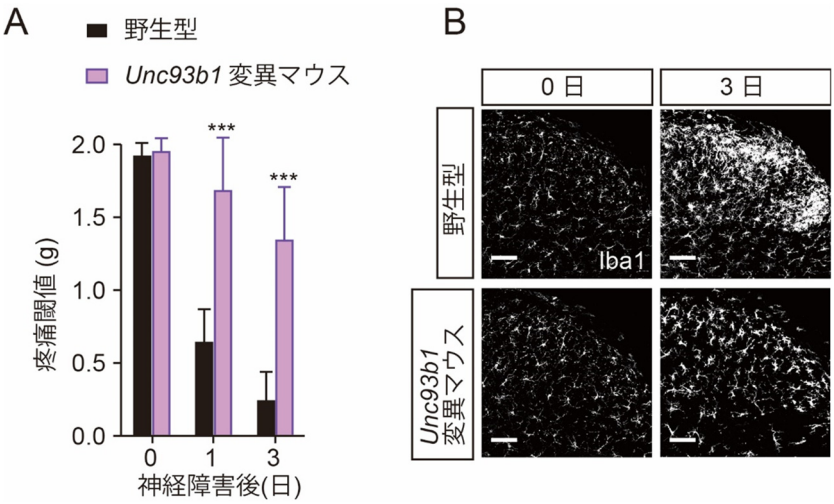


図 2. 神経障害性疼痛における DAMPs の関与

（A）神経障害性疼痛は *Unc93b1* 変異マウスでは抵抗性を示した。***P < 0.001 vs. 野生型 n = 3～6（2 way ANOVA，Sidak's multiple comparisons test）。（B）神経障害側の脊髄後角のミクログリア活性化は *Unc93b1* 変異マウスでは認められなかった。Iba1：ミクログリアのマーカー。Scale bar，100 µm。

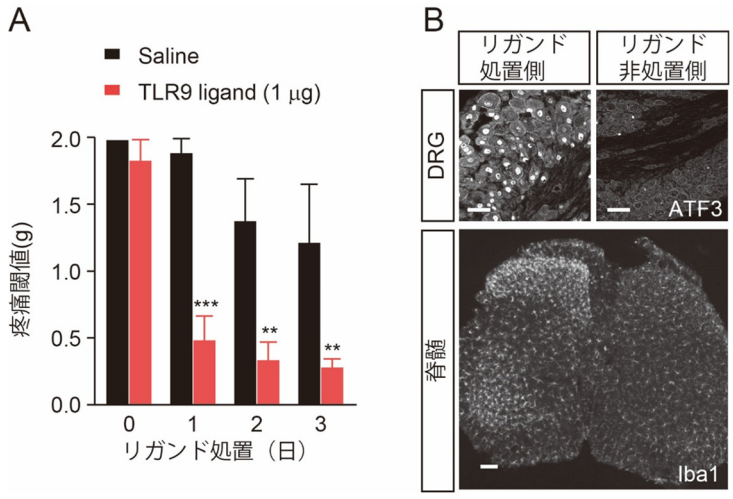


図 3. TLR9 を介した ATF3 の誘導およびミクログリアの活性化

（A）L4 脊髄神経に TLR9 のリガンドである ODN1826 （1 µg）を処置することで、速やかに疼痛が誘導された。***P < 0.001 vs. 野生型 n = 3～6（2 way ANOVA，Sidak's multiple comparisons test）。（B）ODN1826 の神経への処置により DRG での ATF3 の発現誘導および脊髄後角でのミクログリアの活性化が認められた。Iba1：ミクログリアのマーカー。Scale bars，　50 µm（DRG）、100 µm（脊髄）。

考　察

本研究のモデルマウスの解析から、末梢組織で TLR9 シグナルが生じることで DRG での ATF3 の発現誘導が起こり、これが痛みの慢性化につながっていることが分かった。これまでは中枢神経系のみで考えられてきた痛みの慢性化メカニズムは、末梢性の因子によって制御可能であるということを示唆することができた。しかし、DAMPs の実態が何であるのか、そしてこのような現象がその他の疼痛でも生じているのかどうかといった点が未解明であり、今後の研究により解明していきたい課題である。本研究の発展は、今後の難治性疼痛の治療薬開発に役立つことが期待される。

文　献

1） Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactileallodynia after nerve injury. Nature. 2003 Aug 14;424(6950):778-83. PMID:12917686

2） Guan Z, Kuhn JA, Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, Guan AK, Evans-Reinsch Z, Braz J, Devor M, Abboud-Werner SL, Lanier LL, Lomvardas S, Basbaum AI. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglialproliferation and DAP12-dependent pain. Nat Neurosci. 2016 Jan;19(1):94-101. PMID:26642091

3） Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, Yi D, Tokunaga A, Hashimoto N, Yoshikawa H, Noguchi K. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. Pain. 2003 Jan;101(1-2):65-77. PMID:12507701

4） Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits AA, Portnoy DA, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE, Grinstein S, Beutler B. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. Nat Immunol. 2006 Feb;7(2):156-64. PMID:16415873