

グリア細胞制御法の開発と慢性疼痛治療への応用

研究代表者

小泉 修一 山梨大学 大学院総合研究部医学域 教授



1. 研究目的

腰痛や神経障害性疼痛等の慢性疼痛は、原因が不明で有効な治療法が少ない疾患である。またこれらは、高齢者だけでなく生産年齢人口における罹患率も高く、社会活動の大きな損失となっており、医学的にも社会的にも重要な問題であるといえる。切り傷や打撲等の急性痛は、末梢神経終末にある痛み受容体が刺激され、知覚神経がその情報を脳に伝えることにより起こる。ところが、慢性痛の多くは、痛み受容器に依存しておらず、痛みの伝達経路に異常を来すために誘発されると考えられている。従って、急性痛が生体の警告系として重要な役割を果たすのに対し、慢性疼痛はもはや不必要な情報伝達系であるともいえる。本研究計画は、慢性疼痛の原因を体性感覚情報の最終到達点である大脳皮質に注目して研究を行う。特に、(1)大脳皮質体性感覚野 (S1) のグリア細胞の機能異常に着目した研究を展開するもので、独創性は高いといえる(Kim et al., 2016)。本成果を応用するために、(2) 経頭蓋直流刺激法 (tDCS) を用いる。慢性疼痛には神経障害性疼痛モデルマウスを用い、疼痛行動を指標とした行動薬理学的手法及びS1アストロサイト (グリア細胞) の *in vivo* Ca^{2+} イメージング法を主体に据え、tDCS の慢性疼痛及び体性感覚野アストロサイト機能に対する作用を明らかとする。これら *in vivo* 機能解析を各種 *in vitro* 解析法 (生化学、分子生物学的手法) により補完する。tDCSは既に臨床現場で使われており、うつ症状の改善、運動機能障害のリハビリテーション、認知症の改善等で一定の成果が得られている。しかし、なぜtDCSが有効であるのかに関するメカニズムは全く不明であり、ま

た慢性疼痛に対する作用はわかっていない。本研究の成果により、慢性疼痛治療に直結するtDCSの有効性に関する基礎データを得ることが期待出来る。

2. 研究概要

2.1 tDCS 反応の最適化と基礎情報の抽出

tDCSと神経障害性疼痛に関する研究はほとんど行われていない。すでにヒトで使われているtDCS装置及び自作のtDCS装置をMonaiら (Monai et al, 2016) の報告に従って作成した (図1)。まず、tDCSそのものがマウスの疼痛行動に影響するか否かを明らかにするため、tDCSを何もしていない正常マウス (naiveマウス) に負荷した。疼痛の評価は、von Frey filamentを用いて触刺激により惹起される痛み行動 (メカニカルアロディニア) を指標とした。しかし、tDCS負荷により、naiveマウスでメカニカルアロディニアが起こることが明らかになった。そこで、まずはtDCSの安全性を担保するため、この有害作用の詳細を解析することにした。

2.2 tDCS 負荷によるナীবマウスの細胞外 ATP 濃度 ([ATP]_o) の亢進

Mounaiらの先行研究により、tDCSによりアストロサイトの Ca^{2+} 上昇が惹起されることが明らかとなっている (Monai et al., 2016)。また我々は、アストロサイトの Ca^{2+} 上昇が、シナプス再編及び神経ネットワーク組み替えにより、アロディニアを誘導することを報告している (Kim et al., 2016)。そこでまず、S1領域にマイクロダイアリシチューブを取り付けたマウスにtDCSを負荷し、



図 1 tDCS の人への応用 (左図) (Miyuki Giken HP より) 及び自作のマウス tDCS 装置の写真 (右図上) 及び模式図 (右図下)

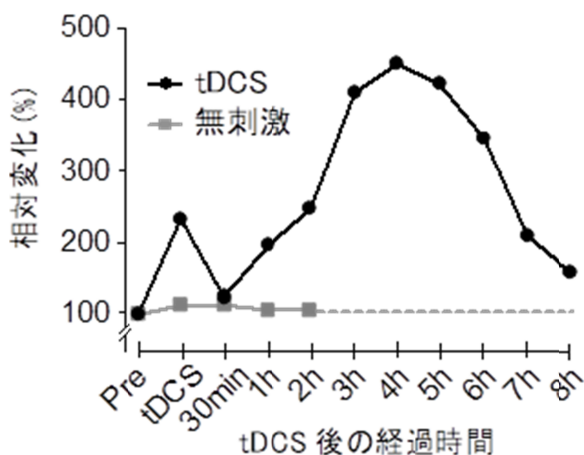


図 2. tDCS 負荷により惹起される細胞外 ATP 放出の時間経過。

マイクロダイアリシチューブを装着したマウスに tDCS を負荷し、チューブに回収される ATP を 1 時間毎に測定した。

アストロサイトの Ca^{2+} 上昇と関連した分子をスクリーニングしたところ、 $[ATP]_o$ が上昇することが明らかとなった (図2)。 $[ATP]_o$ は、アストロサイトの Ca^{2+} 興奮性を亢進させる最も重要な分子である (Koizumi et al., PNAS 2003; Kim et al., Glia 2017)。そこで、この $[ATP]_o$ 亢進と tDCS による神経障害性疼痛誘導の因果関係に関する検討を開始した。

2.3 S1 における $[ATP]_o$ と疼痛行動

まず S1 真上の頭蓋骨に歯科用ドリルで丁寧に穴を開

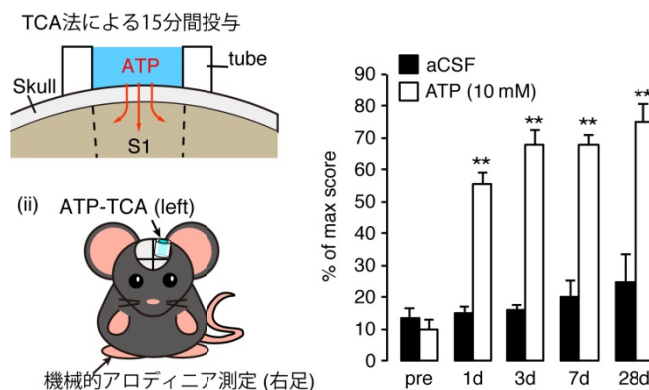


図 3. TCA 法による ATP の S1 投与とメカニカルアロディニア

ATP/S1 15 分間の投与により (左図)、その翌日から少なくとも 4 週間 (28 d) 持続するメカニカルアロディニアが誘導された (右)。

け、ATP を直接投与した (TCA; trans cranial application)。TCA により $[ATP]_o$ を S1 にわずか 15 分間投与する (ATP/S1) だけでシナプス再編と 4 週間以上持続するメカニカルアロディニアが誘導された (図3)。現在、この $[ATP]_o$ 上昇が、S1 のどの細胞種に作用するのか、どの受容体サブクラスに作用するのか、さらにはどのような分子メカニズムでメカニカルアロディニアを誘導するのかを解析中である。また、tDCS が $[ATP]_o$ を上昇させることを考慮すると、tDCS は $[ATP]_o$ を介して疼痛行動に影響を与える可能性が強く示唆された。現在、tDCS による $[ATP]_o$ 上昇から

アロディニアに至る分子メカニズムの解析を開始し、両者の因果関係を明らかにしている。

以上、tDCSが予期しないアロディニアを誘導したことにより、当初の目的の達成には至っていない。しかし、tDCSの強度、作用時間、頻度等の条件検討を十分に行うことで、本問題の解決は可能であると考えられる。また逆に、tDCSがシナプス可塑性分子[ATP]_oを上昇させることは、tDCSによりシナプス再編や神経の活動が長期変化を誘導させる可能性を示唆する (Kim et al., 2016; Kinoshita et al., 2018)。従って、tDCSは慢性疼痛等の中枢疾患に介入する手段として、依然として有用なツールであり、最適化条件を探し出す必要の重要性が示唆された。

参考文献

- 1) Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J. (2016) Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. **J Clin Invest.**, 126, 1983-97.
- 2) Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H. (2016) Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. **Nat Commun.**, 7, 11100.
- 3) Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K. (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100, 11023-8
- 4) Kim SK, Nabekura J, Koizumi S. (2017) Astrocyte-mediated synapse remodeling in the pathological brain. **Glia**, 65, 1719-1727.
- 5) Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, Shigetomi E, Takeda A, Le HPN, Hayashi H, Hiasa M, Moriyama Y, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S. (2018) Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes. **EBioMedicine.** 32, 72-83.

3. 発表 (研究成果の発表)

- 1) Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, Shigetomi E, Takeda A, Le HPN, Hayashi H, Hiasa M, Moriyama Y, Ikenaka K, Tanaka KF, *Koizumi S. (2018) Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes. **EBioMedicine.** 32, 72-83.
- 2) Saito, K.#, Shigetomi, E. #, Yoshida, T. #, Tanaka, K.F., Ikenaka, K., Mikoshiba, K., Nakagawa, N., Mizuno, T. and *Koizumi, S. (2018) Astrocyte aberrant Ca²⁺ signals “AxCa” exacerbate the pathological alterations in an Alexander disease model. **GLIA.** 66, 1053-1067, 2018
- 3) Morizawa, Y.M., #Hirayama, Y., #Ohno, N., Shibata, S., Shigetomi, E., Sui, Y., Nabekura, J., Sato, K., Okajima, F., Takebayashi, H., K., Okano, H. and *Koizumi, S. (2017) Reactive astrocytes function as a phagocyte after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. **Nat Commun**, 8, 28. doi: 10.1038/s41467-017-00037-1