

論 文 要 旨

Involvement of PACAP-PAC₁ receptor signaling system in spinal pain transmission脊髄疼痛伝達における
PACAP-PAC₁受容体シグナル伝達系の関与

用 皆 正 文

【序論及び目的】組織損傷の治癒期間を過ぎても持続する痛み「慢性疼痛」を呈する患者においては、自発性疼痛、非侵害刺激による疼痛（アロディニア）および侵害刺激による疼痛反応増強（痛覚過敏）が混在し、日常生活の質（quality of life; QOL）を著しく低下させる。しかし、慢性疼痛の発症・持続メカニズムは複雑であり、今なお不明な点も多いことから、臨床治療に難渋することも多い。

神経ペプチドである pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、痛覚受容を担う一次知覚神経節の小径神経細胞やその投射先である脊髄後角表層に分布し、さらに末梢神経障害や組織炎症により、その発現量が顕著に上昇することから、痛覚伝達・調節物質としての役割が示唆されてきた。以前、我々は脊髄痛覚伝達における PACAP の役割を検討する為、PACAP (100 pmol) をマウス髄腔内 (i.t.) へ単回投与し、代表的疼痛関連神経ペプチド substance P (SP; 100 pmol) の効果と比較した。SP は顕著な自発性疼痛様行動（下半身の舐めや引っ掻き）を投与直後から誘発するが、1 分程度で消失した。一方、PACAP は徐々に自発性疼痛様行動を呈し、10-15 分でプラトーに達した後、60 分以上持続させることから、PACAP は長期自発痛に寄与することが示唆された。しかし、脊髄内の PACAP 受容体には PACAP と vasoactive intestinal polypeptide (VIP) に同等の親和性を有する VPAC₁ および VPAC₂ 受容体 (VPAC₁-および VPAC₂-R)、そして PACAP 特異的 PAC₁ 受容体 (PAC₁-R) の 3 種が存在する為、脊髄レベルでの個々の受容体サブタイプと疼痛との関係やそのシグナル伝達に関しては未だ不明な点が多い。今回、我々は PACAP 特異的 PAC₁-R に注目し、脊髄 PAC₁-R 刺激が自発性疼痛様行動、そして機械および熱刺激に対する逃避閾値に影響を及ぼすか否か、検討した。

【材料及び方法】Hylden と Willcox の方法 (Eur J Pharmacol 1980) に従って、成熟雄性 ddY マウスに以下の各種薬物を i.t. 投与した。すなわち、PACAP (100 pmol)、maxadilan (5-50 pmol、選択的 PAC₁-R 作動薬)、VIP (VPAC₁-および VPAC₂-R 作動薬, 100 pmol,)、substance P (100 pmol)、calcitonin gene-related peptide (100 pmol)、N-methyl D-aspartate (NMDA, 1 nmol)、max.d.4 (PAC₁-R 選択的拮抗薬)、protein kinase A (PKA) 阻害薬 (Rp-8-Br-cAMPS, 1 nmol)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) / extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK) 阻害薬 (PD98059, 2 nmol)、c-Jun-N-terminal kinase (JNK) 阻害薬 (SP600125, 2 nmol)、アストロサイト活性化阻害薬 L- α -amino adipate (L- α -AA, 1 あるいは 0.3 nmol) である。自発性疼痛様行動評価は Shimizu らの実験 (Regul Pept 2004) を参照に、i.t. 直後にビーカー内に入れ、マウス下半身の舐め、噛みつき、引っ掻き行動数を 1 分毎に 30 分間計測した。機械刺激あるいは熱刺激に対する逃避閾値試験は、von Frey 刺激毛、あるいは輻射熱でマウス後肢足底を刺激することで行った。さらに、ERK、JNK および GFAP に対するウェスタンブロット解析、アストロサイトマーカー glial fibrillary acidic protein (GFAP) および PAC₁-R に対する蛍光免疫組織学的解析を行った。

【結 果】PAC₁-R 選択的作動薬 maxadilan (Max) をマウスに単回 i.t. 投与すると、PACAP に類似し

た自発性疼痛様行動 (下半身の舐めや噛み付き) が用量依存的 (5-50 pmol) に誘発され、少なくとも 30 分以上持続した。この Max 誘発疼痛様行動は、PAC₁-R 選択的拮抗薬 (max.d.4)や PKA 阻害薬 (Rp-8-Br-cAMPS) により顕著に抑制された。また Max (25 および 50 pmol) は、単回 i.t. 投与後 5 分から ERK を、30 分で JNK を活性化 (リン酸化 ERK および JNK の有意な発現上昇) したが、MEK 阻害薬 (PD98059)、および JNK 阻害薬 (SP600125) は Max 誘発疼痛様行動をほぼ完全に抑制するとともに、PD98059 は Max によるリン酸化 ERK および JNK の発現上昇を有意に抑制した。さらに Max (25 および 50 pmol) は、単回 i.t. 投与後 30 分の時点でアストロサイト活性マーカー GFAP の発現を著明に上昇させたが、アストロサイト活性化阻害薬 L- α -AA により Max 誘発疼痛様行動はほぼ完全に抑制された。興味深いことに、L- α -AA と SP600125 は、Max によるリン酸化 ERK 発現上昇 (単回 i.t. 投与後 30 分の時点) を有意に抑制した。

PACAP (100 pmol) あるいは Max (50 pmol) 単回 i.t. 投与後の自発性疼痛様行動は、24 時間以内にはほぼ沈静化するので、1 日目からは機械的および熱刺激に対する行動学的検討が可能である。そこで、機械的および熱刺激に対する後肢の逃避閾値に及ぼす効果を検討すると、PACAP あるいは Max の単回 i.t. 投与は、1 日目より有意な機械的逃避閾値の低下 (機械的アロディニア) を引き起こし、投与後少なくとも 84 日目まで低下は持続したが、熱刺激に対する逃避閾値の変化は認められなかった。この機械的アロディニアの発症は、max.d.4 によりほぼ完全に阻害された。PACAP は一次知覚神経における代表的疼痛関連神経ペプチドである SP や CGRP と共存するが、SP および CGRP の単回 i.t.投与は、1-2 週間で回復する短期の機械的アロディニアを誘発するのみであった。また、脊髄 NMDA 受容体の活性化は疼痛の慢性化に重要であることが示唆されているが、NMDA の単回 i.t. 投与も 2 週間程度で回復する短期の機械的アロディニアを誘発するのみであった。次に、自発性疼痛様行動誘発に寄与していたアストロサイトの活性化がこの機械的アロディニアにも寄与するか否かを検討する為に、GFAP の発現変動を検討したところ、投与後 1 日目以降も脊髄 GFAP 発現レベルの有意な上昇が認められ、少なくとも 84 日目まで持続していた。そこで、L- α -AA を PACAP あるいは Max と同時投与、あるいは単回 i.t. 投与後 84 日目の機械的アロディニア維持期に投与すると、PACAP/Max 誘発機械的アロディニアが顕著に阻害された。また、ERK や JNK の活性化もこの機械的アロディニア発症に寄与するか検討したところ、PD98059 あるいは SP600125 の同時投与は、PACAP/Max 誘発機械的アロディニアの発症をほぼ完全に阻害した。

【結論及び考察】 脊髄 PACAP/PAC₁-R シグナル伝達活性化は、自発性疼痛様行動や長期機械的アロディニアの発症および維持に寄与することが示唆された。すなわち、PACAP は主にニューロンに発現する PAC₁-R を刺激することで、脊髄後角ニューロン内の ERK の活性化を早期に引き起こし、さらに JNK の活性化を含めたアストロサイトの持続的活性化を生じさせることが示唆された。JNK 活性化には、おそらくそれに先立つ ERK の活性化が必要と考えられるが、自発性疼痛様行動維持期における ERK 活性化維持には、JNK 活性化を含むアストロサイト活性化が重要性であることが示唆された。ERK および JNK の活性化の持続期間に関しては、その発現細胞種の経時的変化の可能性も含め、今後の検討課題であるが、PAC₁-R 刺激によるアストロサイト活性化が長期に渡って持続し、機械的アロディニアの維持に寄与することが示唆された。

【結語】 脊髄 PACAP-PAC₁-R シグナル伝達活性化は、脊髄後角ニューロンとアストロサイトの相互作用を誘発し、自発性疼痛様行動や機械的アロディニアの発症および慢性化に寄与することが示唆された。本シグナル伝達経路は、慢性疼痛治療の新規治療ターゲットとなり得ることが予想される。