

〔第四回千葉医学会奨励賞〕

ラット坐骨神経圧挫モデルの疼痛行動と脊髄グリア活性に対する抗p75受容体（神経栄養因子受容体）抗体投与の効果

和 泉 允 基

要 旨

近年、神経障害性疼痛の一因として脊髄でのグリア活性の関与が示唆されている。また、障害部位で産生される神経成長因子（NGF）が疼痛を惹起するといわれており、NGF阻害剤はすでに臨床試験が行われているが、副作用の報告もある。本研究ではラット坐骨神経圧挫モデルに対してNGFの低親和性受容体であるP75受容体抗体を投与し、疼痛行動や脊髄でのグリア細胞活性の変化、有害事象を検討した。

Key words: NGF, TrkA, p75, Rat, 神経因性疼痛

I. はじめに

最近、神経因性疼痛において、脊髄でのグリア活性が重要な役割を担っていることが報告されている。またそのグリア細胞から産生される神経成長因子（NGF）は本来なら神経伸長に作用する因子であるが、その反面、疼痛を惹起する因子であると報告されている。NGFは高親和性受容体チロシンキナーゼA以下TrkAと低親和性受容体p75の2種類の受容体を介することが知られているが、疼痛を惹起する系としてはTrkAが主因と考えられている。2008–2010年、米国でのヒト難治性関節症、腰痛への抗NGF抗体静注試験ではその効果はオピオイドを凌駕するものであった。しかし感染、頭痛、感覚異常など40%以上の有害事象が報告され、さらに患者に骨壊死を認めたことにより、現在、臨床試験の継続は見合わせられている。このことはNGFと高親和性受容体TrkAの正の因子の抑制によるものと考えられた。それらを打開すべく、諸家によりラット炎症性疼痛に対

するNGFの低親和性受容体p75も疼痛伝達に大きく関与し、その抑制によっても有害事象は認められない事が報告されている。しかし、疼痛伝達における詳細はいまだに不明であり、また脊髄でのグリア活性との関係は評価されていない。

本研究の目的はラット坐骨神経圧挫モデルを使用して疼痛行動、脊髄グリア活性を評価し、その機序の解明と、p75神経成長因子受容体（以下p75NTR）阻害の効果を検討することである。

II. 方 法

実験1

1. 実験材料及び実験モデル

雄性の6週齢のWisterラット（195–230g）を使用した。ペントバルビタール40mg/kgを腹腔内に注入した後、左坐骨神経を展開し、幅2mmの鑷子（せっし）で坐骨神経を2秒間ピンチし坐骨神経圧挫モデルとした[1]。坐骨神経を展開しただけのsham群、圧挫した坐骨神経に抗p75NTR抗

体をそれぞれ 1ul, 10ul, 50ul 投与した 1ul p75群, 10ul p75群, 50ul p75群, 圧挫した坐骨神経に生食10ulを投与したpinch群の5群を作成した(各群n=5)。ラットは常温で飼育し, 通常の餌と水を与えるが, 抗生剤を含めていっさいの薬剤は投与しなかった。本研究中に自傷行動は認められず, また死亡したラットはいなかった。

2. 行動学的評価

術前, 術後2日, 4日, 6日, 8日, 10日, 12日, 14日に Von Frey Filamentを用いた行動学的評価を行った。2gの Von Frey Filamentで左後足底を刺激し, 無反応: 0点, 後肢を引く: 1点, 後肢を挙上またはなめる: 2点として記録し, ラット1匹につき5分間隔を開けて5回刺激し, それぞれの平均値を評価した。

実験2

1. 実験材料及び実験モデル

実験1と同様に雄性の6週齢のWisterラット(195–230g)を使用した。ペントバルビタール40mg/kgを腹腔内に注入した後, 左坐骨神経を展開し, 幅2mmの鑷子(せっし)で坐骨神経を2秒間ピンチし坐骨神経圧挫モデルとした[1]。坐骨神経を展開しただけのsham群, 圧挫した坐骨神経に抗p75NTR抗体を10ul投与したp75群, 圧挫した坐骨神経に生食10ulを投与したpinch群の3群を作成した(各群n=10)。ラットは常温で飼育し, 通常の餌と水を与えるが, 抗生剤を含めていっさいの薬剤は投与しなかった。本研究中に自傷行動は認められず, また死亡したラットはいなかった。

2. 行動学的評価

術前, 術後2日, 4日, 6日, 10日, 14日に CatWalk[®]を用いた歩行解析を用いて行動学的評価を行った。CatWalk[®]ではラット1匹につき5回の歩行解析を行い, 各群におけるそれぞれのパラメーターの平均値を評価した。

3. 免疫組織学的評価

各群5匹ずつを術後4日および14日に再度ペントバルビタールで腹腔内麻酔をかけて, 灌流固定。後束レベルでの脊髄を採取した。免疫組織化学染色法を用いGFAP(アストロサイトのマーカー)及びIba1(ミクログリアのマーカー)にて染色

を行った。脊髄の後角におけるGFAP, Iba1の単位面積あたりの陽性細胞数をラット1匹あたり10スライスで計測し, その平均値を用いて3群間の比較を行った。

4. 有害事象の評価

有害事象として, 各群とも食事飲水量, 糞便量, 体重, 感染等の評価を行った。

5. 統計学的評価

統計学的検討にはNon-repeated measures ANOVAを用い, $P<0.05$ を有意差ありとした。

Ⅲ. 結 果

実験1

行動学的評価

Von Frey filamentの刺激に対する反応では, 2日目に pinch群, 全てのp75群においてpain scoreがsham群より有意に高くなった。p75群では濃度依存的にpain scoreが低くなった。10ulと50ulの群で術後2日～8日まで有意に生食群よりも低く, 最小有効用量は10ulであると考えた(図1)。

実験2

行動学的評価

CatWalk[®]では左後肢の平均接地圧において pinch群, p75群ともに6日目まではsham群よりも有意に接地圧が低くなった($P<0.05$)。術後10日目では, p75群の接地圧がsham群と同等になり, 術後14日目には3群間に有意差は認めなくなった(図2)。

免疫組織学的評価

GFAP・Iba1を使用した免疫組織化学染色をそれぞれ図3, 図4に示す。単位面積あたりの陽性細胞数は術後4日目の結果でGFAP・Iba1は共に, sham群に比し pinch群では有意に増加しており($P<0.01$), p75群は, pinch群に比し有意に減少していた($P<0.05$)(図5)。また14日目でも4日目と同じく, GFAP・Iba1陽性細胞数は共に, sham群に比し pinch群では有意に増加し($P<0.01$), p75群は, pinch群に比し有意に減少していた($P<0.01$)(図6)。

有害事象

有害事象では各群とも食事飲水量, 糞便量, 体

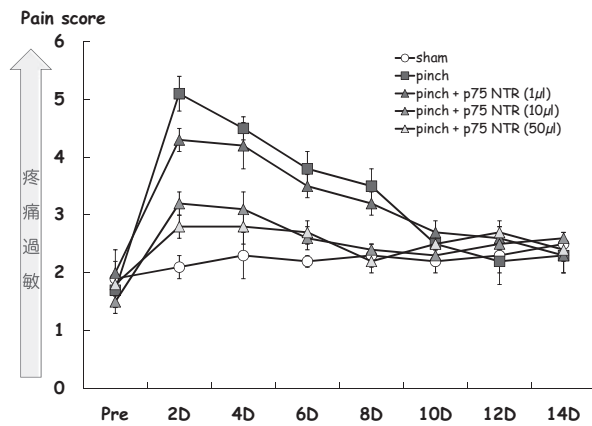


図1 von Frey filaments

pain scoreが高くなるほど疼痛過敏を呈していると考えられる。p75群では濃度依存的にpain scoreが低くなっている。

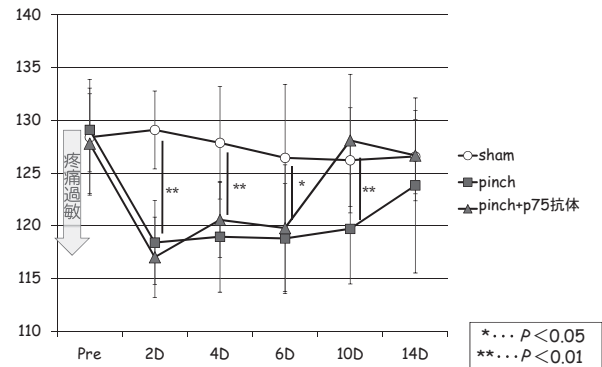


図2 CatWalk（左後肢の平均接地圧）

接地圧が低くなるほど疼痛過敏を呈していると考えられる。pinch群, p75群ともに術後6日目まではsham群よりも有意に接地圧が低く, 術後10日目で, p75群の接地圧がsham群と同等になり, 術後14日目には3群間に有意差は認めない。

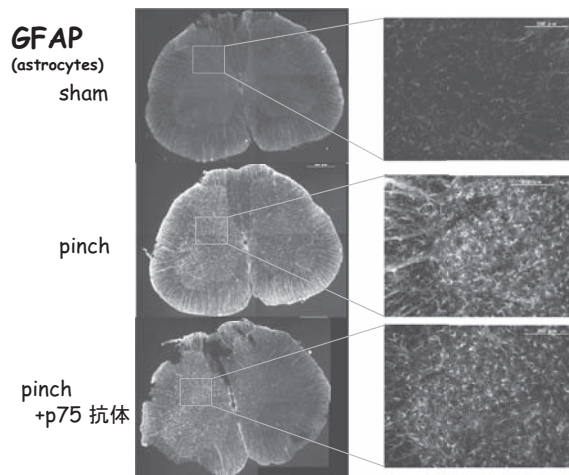


図3 アストロサイトのマーカーであるGFAPを用いた各群の免疫組織化学染色

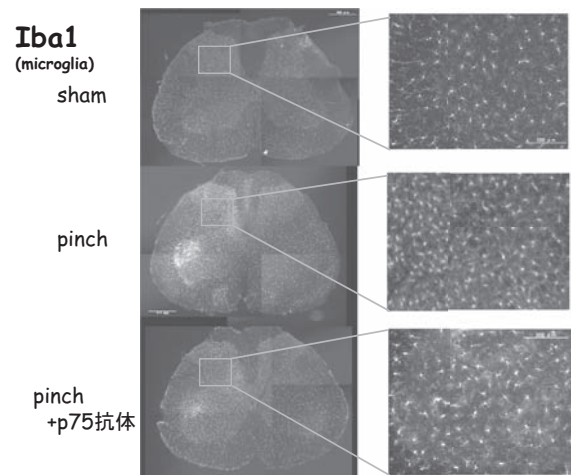


図4 ミクログリアのマーカーであるIba1を用いた各群の免疫組織化学染色

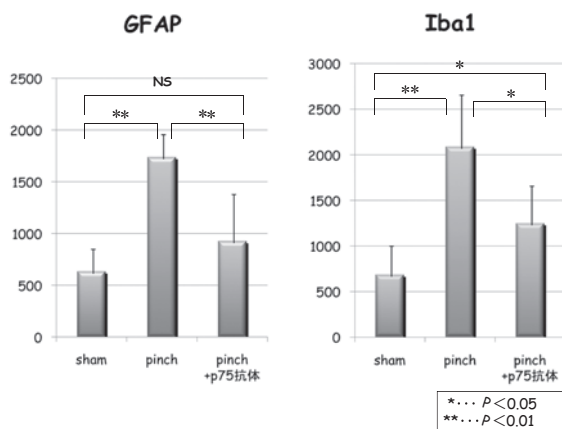


図5 術後4日目のGFAP, Iba1の単位面積当たりの陽性細胞数

sham群に比しpinch群では有意に増加し, p75群はpinch群に比し有意に減少

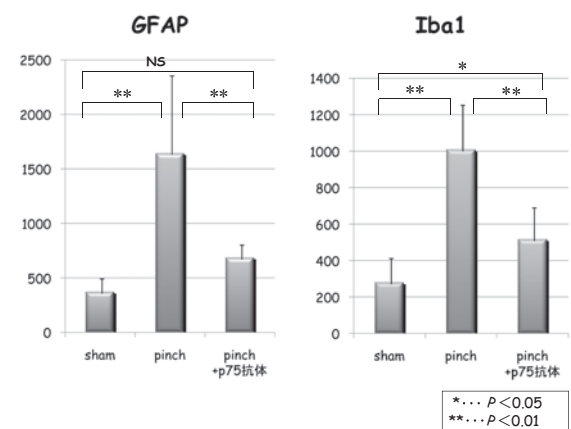


図6 術後14日目のGFAP, Iba1の単位面積当たりの陽性細胞数

重変化において観察期間中に有意差は認めなかった。また各群とも創部の感染徴候は認めなかった。

IV. 考 察

以上の結果よりラット坐骨神経圧挫モデルは疼痛過敏を呈し、p75NTRを局所に投与することで、疼痛過敏を抑制した。また組織学的にも脊髄でのアストロサイト、ミクログリアのグリア活性を抑制した。

NGF受容体には高親和性受容体であるTrkAと低親和性受容体であるp75NTRがある。NGFは炎症性疼痛、神経傷害性疼痛の際に重要な役割を果たしていると言われており、多くの研究者によってTrkAを介して疼痛が伝達されることが確認されている[2-4]。

抗NGF抗体はNGFを阻害することでTrkAならびにp75受容体を介するシグナル伝達を阻害し、疼痛抑制効果を発揮するとされている。マウス腕神経損傷モデルに抗NGF抗体を局所投与または腹腔内投与し、疼痛行動を抑制したとの報告もある[5]。また臨床的にもNGF阻害剤が変形性膝関節症患者へ投与され、オピオイドを凌駕する効果があったと2010年に報告された。しかし、頭痛、悪心、呼吸器感染症などの合併症が発生し、さらに16名の患者に骨壊死を認め人工関節置換術を要したことより、現在、臨床試験の継続は見合わせられている[6]。一方で、NGFのTrkAを介した生体に必要な機能も報告されており[7,8]、抗NGF抗体によってTrkAを介した機能を抑制することで疼痛を抑制することは可能であるが、生態における重要な機能も阻害するため有害事象が生じやすい可能性があると考えられる。

一方、近年p75NTRを抑制することで炎症性疼痛、神経障害性疼痛が抑制されたとの報告も散見される[9,10]。抗p75NTR抗体はp75NTRを介したシグナル伝達のみを抑制し、TrkA受容体を介したNGFの生理活性を温存することが可能である。以前の基礎配属の実験において坐骨神経圧挫モデルのマウスおよび椎間板性疼痛モデルのマウスに抗p75NTR抗体を局所投与すると疼痛行動が抑制される事を確認している[11,12]。今回の我々のラット坐骨神経圧挫モデルは、廣瀬らが報

告した[1]ように一時的な疼痛過敏を呈した。この疼痛過敏は抗p75NTR抗体を局所に投与することによって疼痛行動が抑制された。さらにアストロサイト、ミクログリアなどのグリア細胞は神経損傷の際などに活性化されることが報告されている[13,14]が、本モデルにおいて抗p75NTR抗体を局所に投与することによって脊髄後角でのミクログリアならびにアストロサイトの活性も抑制された。

抗p75NTR抗体による脊髄グリア活性の抑制機序としてはDRGを介した抑制が考えられる。福井らはマウス坐骨神経圧挫モデルにおいて局所に抗p75NTR抗体を投与することでDRGでのCGRPが抑制され、さらにp75NTRの発現も抑制されたと報告している[11]。この結果脊髄でのCGRPも減少して脊髄グリア活性が抑制される可能性が考えられる。第2に血中からSystemicに抑制する経路であり、局所に投与された抗p75NTR抗体が血中に移行し脊髄のグリア細胞を抑制する可能性が考えられる。

本研究の限界は、坐骨神経損傷直後に抗p75NTR抗体を投与しており実際の臨床には即していないこと、術後14日までの短期間の評価であること、動物実験であり有害事象において頭痛、感覚異常などは評価できないことが挙げられる。

坐骨神経圧挫モデルに対しp75受容体の中和抗体を投与した結果、疼痛行動とグリア細胞活性が抑制された。p75受容体の中和抗体を投与することによる有害事象は認めなかった。脊髄でのグリア細胞活性は、神経障害部位のp75受容体を介して疼痛伝達に関与することが示唆された。

謝 辞

本研究に際し、直接ご指導頂いた大鳥精司先生、鴨田博人先生、岩倉葉穂子先生に厚く御礼申し上げます。学生である私が、千葉医学雑誌に研究内容を寄稿出来る栄誉に預かれたのも、全ては先生方の丁寧かつ熱心なご指導・ご鞭撻あってこそでした。また高橋和久教授を始め、千葉大学整形外科教室の諸先生方からは多くのご指摘を頂きました。御世話になった皆様へ心からの感謝を込めて、謝辞にかえさせていただきます。

SUMMARY

Activation of spinal glia, such as microglia and astrocytes, has been shown to play an important role in neuropathic pain. In 2010, a clinical trial reported that a high-affinity nerve growth factor (NGF) receptor inhibitor is efficacious for severe knee osteoarthritis and low back pain, but there were several adverse events such as infection. The low-affinity NGF receptor, p75 neurotrophin receptor (p75NTR) is an important pain mediator. The purpose of this study was to examine the effect of p75NTR on pain behavior using gait analysis (CatWalk) and expression of spinal glia in a rat sciatic nerve crush model.

文 献

- 1) Hirose K, Iwakura N, Orita S, Ohtori S, et al. Evaluation of behavior and neuropeptide markers of pain in a simple, sciatic nerve-pinch pain model in rats. *Eur Spine J* 2010; 19: 1746-52.
- 2) Woolf CJ, Safi eh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 1994; 62: 327-31.
- 3) McMahon SB, Bennett DL, Priestley JV, et al. The biological effects of endogenous nerve growth factor on adult sensory neurons revealed by a trkA-IgG fusion molecule *Nat Med* 1995; 1: 774-80.
- 4) Sah DW, Ossipov MH, Porreca F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 460-72.
- 5) Quintao NL, Santos AR, Campos MM, Calixto JB. The role of neurotrophic factors in genesis and maintenance of mechanical hypernociception after brachial plexus avulsion in mice. *Pain* 2008; 136: 125-33.
- 6) Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, et al. Tanezumab for the Treatment of Pain from osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med* 2010; 363: 1521-31.
- 7) Miller FD, Kaplan DR. On Trk for retrograde signaling. *Neuron* 2001; 32: 767-70.
- 8) Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR: live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15: 49-57.
- 9) Obata K, Katsura H, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, et al. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci* 2006; 26: 11974-86.
- 10) Watanabe T, Ito T, Inoue G, Ohtori S, Kitajo K, Doya H, et al. The p75 receptor is associated with inflammatory thermal hypersensitivity. *J Neurosci Res* 2008; 86: 3566-74.
- 11) Fukui Y, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, et al. Low Affinity NGF Receptor (p75 Neurotrophin Receptor) Inhibitory Antibody Reduces Pain Behavior and CGRP Expression in DRG in the Mouse Sciatic Nerve Crush Model *J Orthop Res* 2010; 28: 279-83.
- 12) Sugiura A, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, et al. Effect of applying p75NTR saporin to a punctured intervertebral disc on calcitonin gene-related peptide expression in rat dorsal root ganglion neurons. *J Orthop Sci* 2010; 15: 407-13.
- 13) Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA, et al. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Experimental Neurology* 1999; 157: 289-304.
- 14) Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM, et al. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal-cord increases following a sciatic-nerve constriction injury. *Brain Research* 1991; 565: 1-7.