

博士論文

スフィンゴ糖脂質による疼痛調節に関する研究

森田 元樹

2023年度

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

基礎となる報文

1. Morita, M., Watanabe, S., Oyama, M., Iwai, T., Tanabe, M., 2020. Glycosphingolipid Biosynthesis Pathway in the Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia During Inflammatory Pain: Early and Late Changes in Expression Patterns of Glycosyltransferase Genes. *Neuroscience*. 428, 217–227.
2. Morita, M., Watanabe, S., Nomura, N., Takano-Matsuzaki, K., Oyama, M., Iwai, T., Tanabe, M., 2023. Sulfatide-selectin signaling in the spinal cord induces mechanical allodynia. *J. Neurochem*. 164, 658-670.

目次

略語表.....	1
序論.....	3
第一章.....	7
1.1 背景.....	7
1.2 方法.....	9
1.2.1 使用動物.....	9
1.2.2 von Frey test.....	9
1.2.3 Hargreaves test.....	10
1.2.4 mRNAの調整とreal-time PCR.....	10
1.2.5 薬物.....	11
1.2.6 統計処理.....	11
1.3 結果.....	12
1.3.1 炎症性疼痛条件下における機械的刺激に対する感受性.....	12
1.3.2 炎症性疼痛時における脊髄の糖転移酵素の発現.....	13
1.3.3 炎症性疼痛時におけるDRGの糖転移酵素の発現.....	17
1.3.4 ガングリオシド脊髄髄腔内投与後の機械的アロディニアの評価....	21
1.3.5 スルファチド脊髄髄腔内投与後の機械的アロディニアと 熱痛覚過敏の評価.....	23
1.3.6 慢性炎症マウスに対するガングリオシド脊髄髄腔内投与後の 機械的アロディニアの評価.....	25

1.3.7 慢性炎症マウスに対するスルファチド脊髄髄腔内投与後の	
機械的アロディニアの評価.....	27
1.4 考察.....	29
1.4.1 脊髄およびDRGにおける糖転移酵素の発現量とパターンの炎症性疼	
痛の各段階においての変動.....	29
第二章.....	35
2.1 背景.....	35
2.2 方法.....	38
2.2.1 使用動物.....	38
2.2.2 von Frey test.....	38
2.2.3 Hargreaves test.....	38
2.2.4 免疫染色.....	39
2.2.5 mRNAの調整とreal-time PCR.....	39
2.2.6 NOx測定.....	40
2.2.7 脊髄におけるスルファチドの定量.....	41
2.2.8 ウェスタンブロット.....	42
2.2.9 薬物.....	42
2.2.10 統計処理.....	43
2.3 結果.....	44
2.3.1 スルファチドは脊髄のアストロサイトを活性化するか.....	44
2.3.2 スルファチドが炎症性サイトカインIL-1 β およびTNF- α のmRNA	
発現に関与するか.....	48
2.3.3 スルファチドによる機械的アロディニアはNOの産生を	

必要とするか.....	51
2.3.4 炎症性疼痛における脊髄スルファチドの定量.....	55
2.3.5 スルファチド結合タンパク質セレクチンは機械的アロディニア および熱痛覚過敏に関与するか.....	57
2.4 考察.....	61
2.4.1 スルファチドによる機械的アロディニアにグリア細胞および サイトカインが関与する.....	61
2.4.2 スルファチドによる機械的アロディニアにNOが関与する.....	63
2.4.3 スルファチドによる機械的アロディニアにセレクチンが 関与する.....	64
総括.....	68
謝辞.....	72
参考文献.....	73

略語表

略語	省略していない表現/定義
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
B4GALNT1	Beta-1,4-N-Acetyl-Galactosaminyltransferase 1
BIMO	Bimosiamose
cDNA	Complementary DNA
CFA	Complete Freund's adjuvant
cGMP	Cyclic GMP
CX43	Connexin 43
Contra	Contra lateral
DAN	2,3-diaminonaphthalene
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DRG	Dorsal root ganglion
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GalCer	Galactosylceramide
GAL3ST1	Galactose-3-O-sulfotransferase 1
Gapdh	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GlcCer	Glucosylceramide
HRP	Horseradish peroxidase
Iba-1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL-1ra	Interleukin-1 receptor antagonist
IL-1 β	Interleukin-1 beta
i.p.	Intraperitoneal injection
i.pl.	Intraplantar injection
Ipsi	Ipsi lateral
i.t.	Intrathecal injection
L-AA	L- α -aminoadipate
LC-MS/MS	Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry
L-NAME	<i>N</i> ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

MLD	Metachromatic leukodystrophy
mRNA	Messenger RNA
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
7-NI	7-nitroimidazole
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NPA	<i>N</i> ω -propyl-L-arginine
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Poly Vinylidene Fluoride
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate –polyacrylamide gel electrophoresis
sGC	Soluble guanylyl cyclase
ST3GAIL5	beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5
ST8SIA1	Alpha- <i>N</i> -acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TLC	Thin-layer chromatography
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
UGT8A	UDP-galactosyltransferase 8A

序論

痛みは生体を危険から防ぐために有用な警告の一種であるが、長期的な痛みや耐え難い痛みは有害なため治療対象となる。痛みの刺激シグナルは、後根神経節 (Dorsal root ganglion、DRG) より伸長する軸索の末端である侵害受容器 (自由神経終末を形成する) により感知され、脊髄後角へと伝達し、二次侵害受容ニューロンへ乗り換えた後、脳に伝えられることで痛みとして認識される (Fig. 1)。そのため病態時の脊髄およびDRGの変化を知ることは重要である。痛覚は組織の損傷や炎症によって感作され、それによって動物はさらなる損傷を避けることができる。しかしながら、慢性疼痛では損傷を受けていない組織に痛みを感じるため、上記のような損傷を避けるという生理的意義は薄いものとなる。疼痛伝達経路の神経細胞が障害を受けて生じる、神経障害性疼痛では痛みを感じている部位に損傷や炎症が認められないにも関わらず、強い痛みを感じる。また、このような病態時には痛みの感受性が変化し、弱い痛みをより強く感じる痛覚過敏や、触刺激を痛みとして感じる機械的アロディニアが生じる (Fig. 1)。さらに、慢性炎症性疼痛などの慢性疼痛モデル動物では、損傷を受けていない部位にもアロディニアが発生する (Huang and Yu, 2010)。臨床では慢性疼痛を抱える患者のなかでも、両側性に炎症や神経損傷を受けた体側と対側の部位にも機械的アロデ

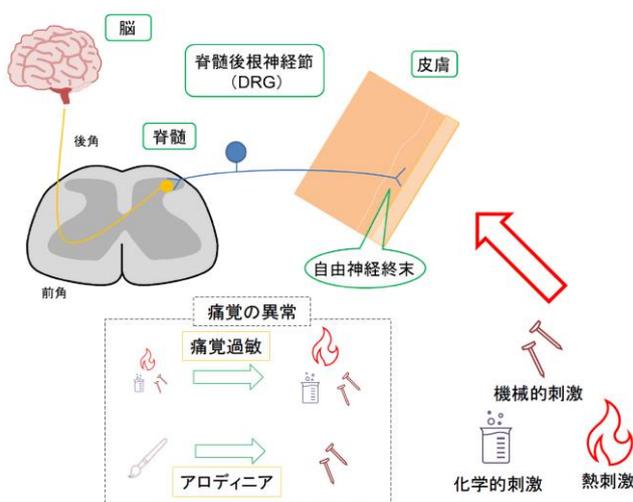


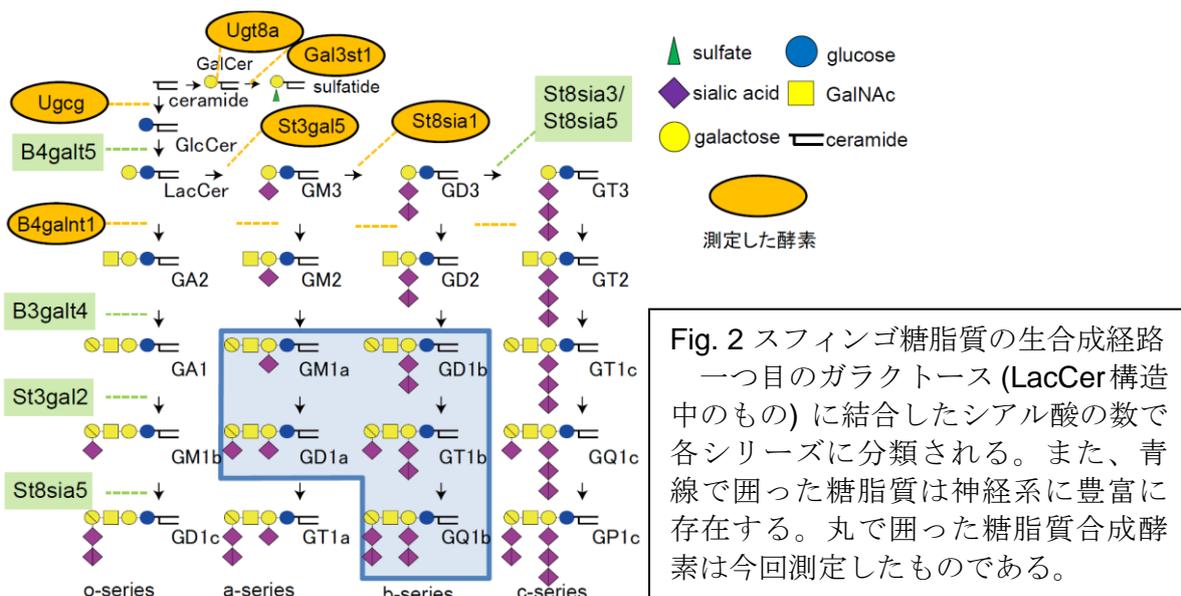
Fig. 1 疼痛伝達経路と痛覚の異常
疼痛刺激は DRG より伸びる軸索の末端 (自由神経終末) で感知され、脊髄後角へ入力する。
また、痛覚は病態等によって感受性が変化する。触刺激など痛みではない刺激を痛みとして感じるアロディニアが生じる。

イニアが出現する患者は少数派であるが、再発を繰り返すことが多い (Huang and Yu, 2010)。痛みを治療する際は薬物治療が中心であり非ステロイド性消炎鎮痛薬、オピオイド、ステロイドなどが一般的に使用されるが、服部らの報告によれば慢性疼痛患者のうち満足の行く程度に痛みが和らいでいる患者は20%程度である (Hattori, 2006)。

また、痛みの感受性の変化には、受容体やトランスポーターなどの膜タンパク質の制御を介することが必要である。生体膜にはリン酸エステル部位を持つリン脂質が主要な脂質として含まれるが、その他にもコレステロールとスフィンゴ糖脂質が含まれる。コレステロールとスフィンゴ糖脂質は互いに集積し、脂質ラフト構造という特殊な膜内ドメインの形成に関与している。脂質ラフトを構成する脂質に親和性の高い膜タンパク質が集積する、あるいは排除されることで、タンパク質間相互作用が制御される。そのため、脂質ラフトは真核細胞の膜機能を制御する装置であるとして注目されており、細胞間における情報伝達や接着、分化などを制御している (Simons and Ehehalt, 2002)。

このような機能を有しているスフィンゴ糖脂質は、セラミドにグルコースかガラクトースのいずれかの単糖が付加することで生合成が開始される。セラミドにグルコースが付加するとほとんどの糖脂質の前駆体であるグルコシルセラミド (GlcCer) となり、さらにシアル酸を含む糖鎖が付加することによってガングリオシドが生合成される。ガングリオシドは酸性糖であるシアル酸が付加する数と位置により o-, a-, b-, c-シリーズと分類され、中でも長鎖のガングリオシド (Fig. 2 中、青線で囲った糖脂質) は神経系に多く含まれており、軸索の分化と神経突起の伸長調節 (Mutoh *et al.*, 1998; Chiricozzi *et al.*, 2017)、軸索-ミエリン間相互作用 (Lopez and Schnaar, 2009)、神経細胞の生存 (Ledeen and Wu, 1992; Takamiya *et al.*, 1996; Kawai *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2005; Susuki *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2010) 等の機能を有していることも知られている。一方、セラミドにガラクトースが付加されることで生成するガラクトシルセラミド (GalCer) とその硫酸化物であるスルファチド (3-

O-スルホガラクトシルセラミド) はミエリンに豊富に存在し、ミエリンの維持に必要である (Dupree *et al.*, 1998; Hoshi *et al.*, 2007)。以上のようなスフィンゴ糖脂質は多くのステップの糖転移酵素により生合成されることで発現する (Fig. 2に各ステップの糖転移酵素名を記した)。スフィンゴ糖脂質の含量は、例えば発達段階の脳においては、対応する糖転移酵素の発現量のバランスに依存して変化する (Ngamukote *et al.*, 2007)。一方、病態時にもスフィンゴ糖脂質と糖転移酵素の発現量が変化していることが報告されている。パーキンソン病では、黒質ニューロンにおいてガングリオシド組成やガングリオシド生合成に関わる糖転移酵素遺伝子発現が変化している (Schneider, 2018)。筋萎縮性側索硬化症患者および筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの脊髄では、ガングリオシドの組成および濃度の異常が観察される (Dodge *et al.*, 2015; Henriques *et al.*, 2015)。また、異染性白質ジストロフィー (Metachromatic leukodystrophy, MLD) (Eckhardt *et al.*, 2007; Dali *et al.*, 2015) やパーキンソン病 (Seyfried *et al.*, 2018) のモデルマウスや患者の神経系組織においてスルファチド含量の変化も認められる。さらに、肝細胞がん患者においてはスルファチドの合成が亢進し、がん細胞の生存に関与している (Takahashi and Suzuki, 2012)。このように、スフィンゴ糖脂質は正常な神



経細胞の機能に重要であるだけでなく、神経変性疾患やがんの発症、維持に寄与していることが予想される。

そこで、本研究では重要な神経機能の一つである、痛みの感知と伝導に糖脂質がどのように関与しているか検討を行うこととした。まず、炎症により痛みを生じているマウスモデルにおいて、疼痛伝導路である DRG および脊髄の糖転移酵素発現量を解析した。本研究では、片側足底への完全フロイントアジュバンド (**complete Freund's adjuvant, CFA**) 投与により炎症を惹起されたマウスを用いた。このモデルでは、炎症が持続すると CFA 投与の対側足底にも機械的アロディニアが生じることが知られている (**Gao et al., 2010**)。そのため、本研究ではこのモデルを用いることで、炎症組織のみ痛みが発生する状態と、炎症が生じていない組織においても痛みが生じる状態の、痛みの発症メカニズムの違いの一端を糖脂質の機能という観点から明らかにすることができるとはならないかと考えた。さらに、糖転移酵素の発現パターンの違いから増減したと考えられる糖脂質を **naïve** マウス、または慢性炎症マウスに脊髄髄腔内投与することで脊髄において実際にどのような糖脂質が痛みに関与しているか検討した。

第一章

炎症性疼痛の早期と慢性期における糖転移酵素発現量の解析

1.1 背景

痛みにおいて糖脂質が関与している可能性については、いくつかの研究で報告されている。マウスで b-シリーズガングリオシド合成の出発物質である GD3 を合成する糖転移酵素遺伝子 *St8sia1* をノックアウトすると、熱による痛みに対して感受性が増大する一方で、足底へのホルマリンによる痛みが減少する (Handa *et al.*, 2005)。ガングリオシド GM1a の脊髄髄腔内あるいは腹腔内投与は、神経障害性疼痛モデルラットにおいて鎮痛をもたらす (Hayes *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 1992a-c)。また、GM1a の腹腔内投与は老化ラットにおける異常な痛みの感受性を回復させる (Goettl *et al.*, 2000)。我々の以前の研究においては、ガングリオシド GT1b の足底内投与は、機械的アロディニアや、マウスへの低用量 (0.05%) ホルマリンによる痛みに対する痛覚過敏を誘発することを明らかにした (Watanabe *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2017)。以上のように、糖脂質が痛みに影響を与えていることから、その合成を担う遺伝子の発現も変動すると考えられる。しかし、疼痛モデル動物において、糖転移酵素の遺伝子発現が影響を受けるかどうかは知られていない。そこで、本研究では炎症性疼痛モデルマウスの、疼痛の伝達経路である DRG および脊髄において糖脂質合成に関わる合成酵素の遺伝子発現を naïve マウスと比較した。本研究では、6 つの糖転移酵素遺伝子、*Ugt8a*、*Gal3st1*、*Ugcg*、*St3gal5*、*St8sia1*、*B4galnt1* に注目した (Fig. 2)。

UGT8A は、GalCer 合成経路の第 1 段階で、セラミドにガラクトースを付加する反応を触媒する酵素である。GAL3ST1 は、GalCer に硫酸基を導入する活性を有し、GalCer とともにミエリンに多く含まれるスルファチドの合成を担う酵素である。

UGCG は、ほとんどの糖脂質の生合成の出発物質である GlcCer の合成酵素である。

ST3GAL5 は a-シリーズガングリオシド合成の出発物質である GM3 の合成を担う酵素であり、ST8SIA1 は、b-シリーズガングリオシド合成の第一段階である GD3 合成を担う酵素である。さらに、B4GALNT1 は、複雑な糖鎖を有するガングリオシドの基本構造である GA2/GM2/GD2/GT2 ガングリオシドの合成に関与している。

これらの糖転移酵素発現量を CFA により炎症を惹起してから 1 日目を早期、対側の機械的アロディニアが出現する 15 日目を慢性期として解析した。さらに、増加、あるいは減少すると予測される糖脂質をマウスへ脊髄髄腔内投与し、痛みの感受性がどのような糖脂質により変化するか検討を行った。

1.2 方法

1.2.1 使用動物

実験には、雄の Jcl:ICR マウス (5~7 週齢 ; CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用した。マウスは、12 時間サイクルで明暗が変わる環境下で飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。実験は明期中に行った。すべての動物実験は、北里大学薬学部動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 : AR13-4、FR13-2、17-5、17-7、20-8)。CFA (Sigma Aldrich, MO, USA) は 20 μ L をマウス片側後肢足底皮下に投与 (Intraplantar injection, i.pl.) した。また、CFA 以外の薬物の投与はすべてブラインドで行った。麻酔が痛みの感作に及ぼす影響を避けるため、無麻酔で薬物の投与および von Frey test、Hargreaves test を行った。CFA 以外の薬物および溶媒は、マイクロシリンジ (Hamilton company, NV, USA) に取り付けられた 30 G 針を用いて、L4-5 椎間関節腔に 5 μ L 髄腔内投与 (intrathecal, i.t.) した。

1.2.2 von Frey test

マウスの機械的刺激に対する感受性を評価するために von Frey test を行った。疼痛閾値 (50% thresholds) は up-down 法 (Dixon, 1980) を用いて算出した。測定開始の少なくとも 60 分前に、個別にチャンバーに入れた。まず 0.16 g のフィラメントをマウスの足底へ押し当て、逃避反応が認められた場合はより弱い力を与える細いフィラメントに、逃避反応が認められない場合はより強い力を与える太いフィラメントに交換し、同様にマウスの逃避反応を観察した。測定には、8 種類の太さ (0.02 - 1.4 g の力をマウスの足底へ与える) のフィラメントを使用し、Chaplan らの方法に従って疼痛閾値 (50% thresholds) を算出した (Chaplan *et al.*, 1994)。baseline の 50% thresholds (閾値) を求めた後、5 週齢のマウスの右後肢足底部に CFA を 20 μ L 投与した。CFA 投与の 1 日後と 15 日後に、von Frey test を実施し、機械的アロディニアを測定した。ま

た、naïve マウスの脊髄腔内へ各種糖脂質を投与し、所定の時間で1回 von Frey test を行った。

1.2.3 Hargreaves test

熱痛覚は、Hargreaves test (Hargreaves *et al.*, 1988) を用いて評価した。装置は Plantar Analgesia Meter (IITC Life Science Inc., CA, USA) を用いた。測定開始の少なくとも 60 分前にマウスを個別にチャンバーに入れ、ランプからの放射熱光源をチャンバーの下から後肢の足底面に焦点を当てることで熱刺激を与えた。その後、マウスが熱からの逃避行動をとるまでの時間を記録し、各時間 3 回の値の平均をとった。また、組織損傷を避けるため足底へ照射後、ランプが 20 秒後に消灯するように設定した。

1.2.4 mRNAの調製とreal-time PCR

CFA投与1日後または15日後にマウスにペントバルビタールナトリウム (70- 80 mg/kg、腹腔内投与、intraperitoneal, i.p.) 麻酔下に、RNA解析のための脊髄の腰部膨大部およびL4-L5のDRGを採取した。RNAの安定化のため、採取した組織をRNAlater 溶液 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)に浸し、脊髄を縦に二等分して同側と対側 (すなわち、CFAを投与した側を同側) とした。Total RNAサンプルはSepasol-RNA I Super G solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて単離した。cDNAは PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いてtotal RNAをテンプレートとして合成した。Real-time PCRは、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いてPowerUp SYBR Green Master Mixポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) により行った。プライマーは以下のものを使用した。

gene	forward	reverse
<i>Gapdh</i>	CTTTGGCATTGTGGAAGGGC	TCAGCTCTGGGATGACCTTG
<i>Ugcg</i>	TGCCATGCAAACTCTGGTTC	TCTGAATACATGGTGGGCTGC
<i>St8sia1</i>	TGGGAAACGGTGGGATTCTG	TGGCGAATTATGCTGGGGTT
<i>St3gal5</i>	AAGTCCCCTCCAGCCAAAG	CTGCCAGGCTGACTTCATCA
<i>B4galnt1</i>	ATCAAGGAGCAAGTGGTGGG	TCAGCTCCTCAGCGTCAAAG
<i>Ugt8a</i>	CTGCAGAGGTGGGTAAGTGG	GCAGGTCATTTTGAGGCAGCC
<i>Gla3st1</i>	CAAGGGGTTACTGCTGGGAG	GTTGACACCCTCCTGCTGAG

PCRは、50°C 2分、95°C 2分から開始し、95°C15秒、60°C1分を45サイクル行った。

各糖転移酵素遺伝子の発現量は*Gapdh*で標準化した。CFA投与マウスの結果は、週齢を合わせたnaïveマウスと比較した。

1.2.5 薬物

GM3 は Nagara Science Co., LTD (Gifu, Japan) から購入し、GD3 と GD1a は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) のものを使用した。GM1a は Carbosynth LTD (Berkshire, UK)、GD1b と GalCer は Cayman Chemical (MI, USA)、GT1b は IsoSep AB (Tullinge, Sweden)、スルファチドは Avanti Polar Lipids, Inc. (AL, USA) からそれぞれ購入した。

1.2.6 統計処理

結果は平均値 ± SEMで表示し、統計処理のためにGraphPad Prism ver.7 (GraphPad, CA, USA) を使用した。2群間の比較には、unpaired Student's *t* test もしくはMann-Whitney U-testを用いた。多重検定としてFriedman testもしくはKruskal Wallis test を使用し、さらに、post-hoc test としてDunn's multiple comparison test を

行った。0.05未満のP値を示した場合に統計的に有意であるとした。

1.3 結果

1.3.1 炎症性疼痛条件下における機械的刺激に対する感受性

いくつかのグループは、炎症性疼痛モデルマウスにおいて、CFA投与の対側足底で機械的アロディニアが引き起こされることを報告している (Schreiber *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2017)。本実験系においては、CFA投与から15日後においては、対側でもCFAを投与した同側と同程度の機械的アロディニアが生じた (Fig. 3)。CFA投与した足底では、投与1日後から顕著な機械的アロディニアが観察され、15日後においてもアロディニアは持続していた。

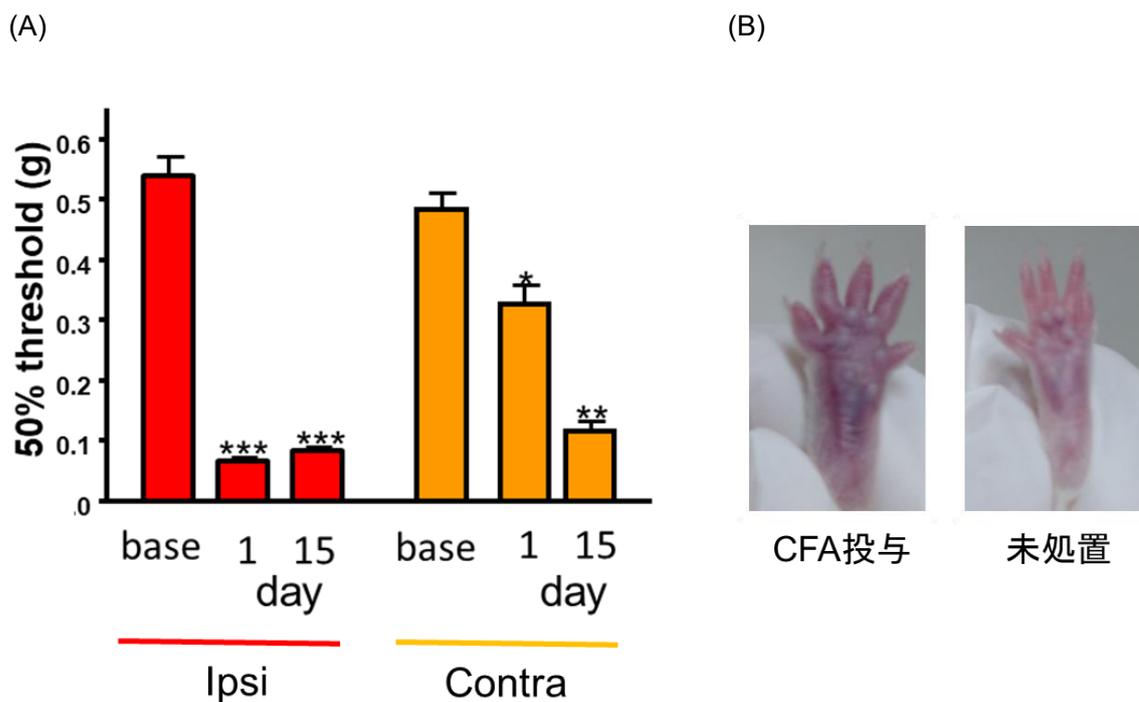


Fig. 3 CFA投与後の機械的アロディニアおよび足底の様子

(A) CFA投与後の同側および対側の機械的アロディニアを示している。CFAを投与した側を同側 (Ipsi)、投与していない側を対側 (Contra) とした。CFAを投与した足底は浮腫を伴う炎症が見られた。1日後、同側は有意な機械的アロディニアを示し、対側は閾値がわずかに低下していた。CFA投与から15日後、同側と同様に、対側にも有意な機械的アロディニアが認められた。(B) CFA投与8日後の足底の様子。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. baseline, Friedman test followed by Dunn's multiple comparison test, $n=18$ mice.

1.3.2 炎症性疼痛時における脊髄の糖転移酵素の発現

各糖転移酵素遺伝子発現を測定し週齢を合わせたnaïveマウスと比較した。炎症初期には、*Ugcg*、*St8sia1*、*B4galnt1*遺伝子の発現が同側脊髄 (CFAを投与した足と同側) で有意に上昇し、GlcCer由来の糖脂質、特に複雑なb-シリーズガングリオシドの生成が増加していることが示唆された。GlcCer由来経路の*Ugcg*と*St3gal5*遺伝子にコードされる糖転移酵素も、対側脊髄で増加傾向を示した (Fig. 4)。GalCer由来の糖脂質合成に関与する糖転移酵素遺伝子については、*Gal3st1*の発現が両側で増加しており、対側の機械的アロディニアが出現する前にスルファチドが脊髄で増加することが示唆された。CFA投与後15日目には、*St8sia1*以外は、同側と反対側で差は認められなかった (Fig. 5)。*Ugcg*の発現が減少し、*Ugt8a*の発現が変化しないことは、GalCer由来の糖脂質が増加することを示している。また、*St3gal5*と*B4galnt1*の発現低下から、CFA投与後、a-シリーズとb-シリーズの複雑なガングリオシドも減少すると予想される。対側脊髄では*St8sia1*の発現が減少しており、慢性炎症期には、対側脊髄のb-シリーズガングリオシドの量が同側脊髄のそれよりも少なくなることが示唆された。以上の結果は、Fig. 6に生合成経路の図とともにまとめた。

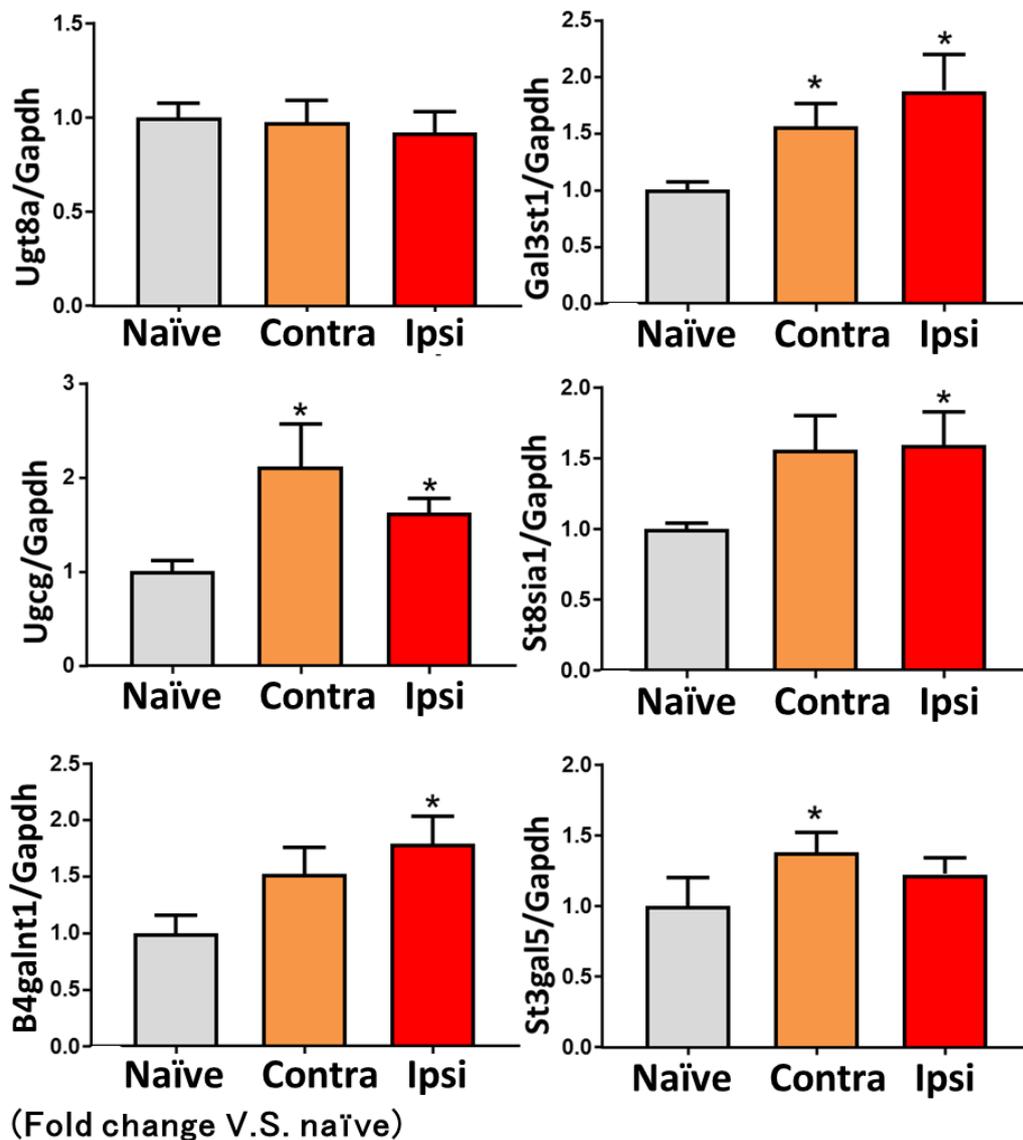


Fig. 4 CFA投与1日後の脊髄における糖転移酵素の遺伝子発現

各グラフは遺伝子発現量を、週齢を対応させたnaïveマウスの発現量に対して標準化したものである。* $P < 0.05$ vs. naïve, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, $n=9-10$ hemi-spinal cords.

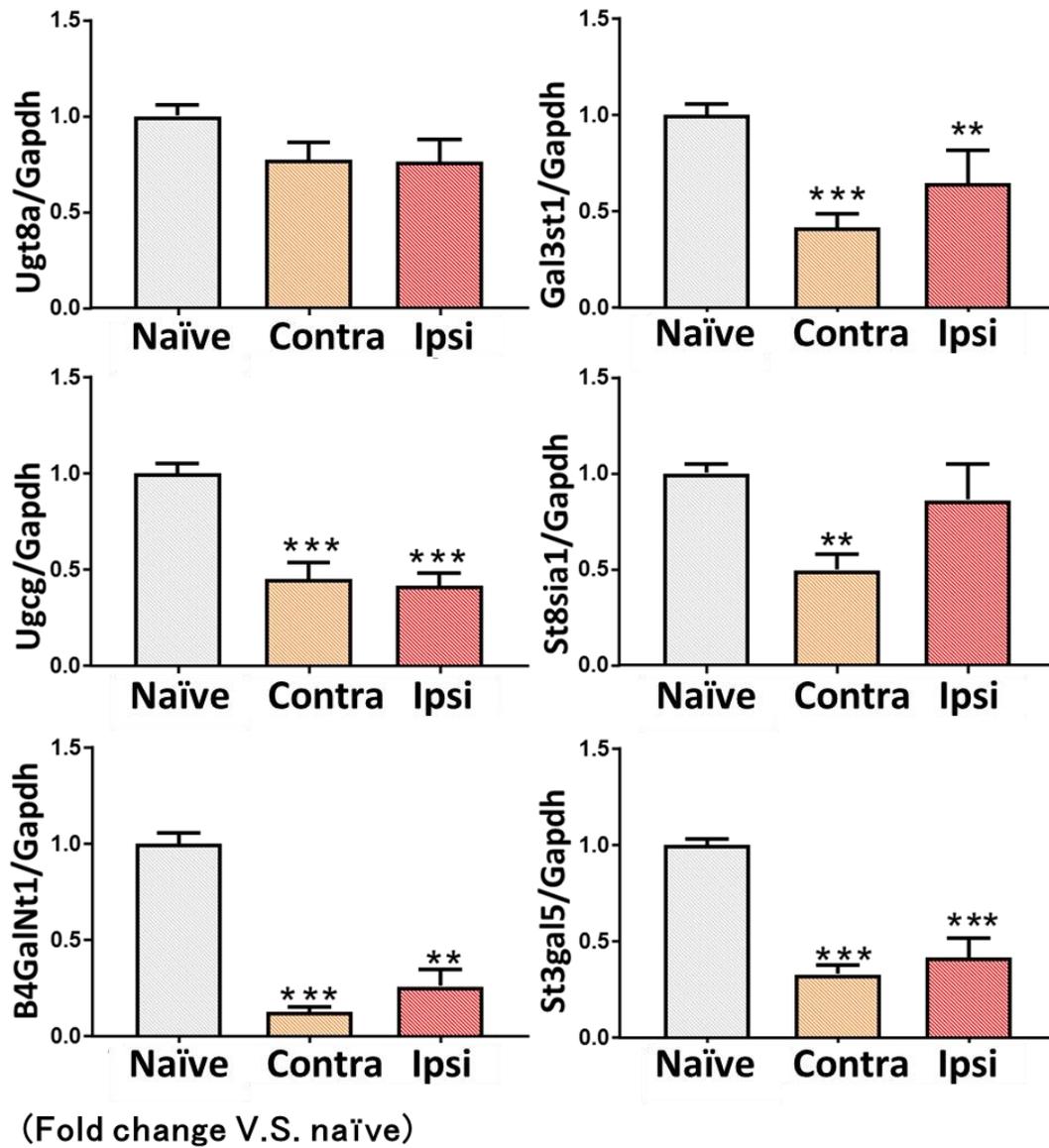
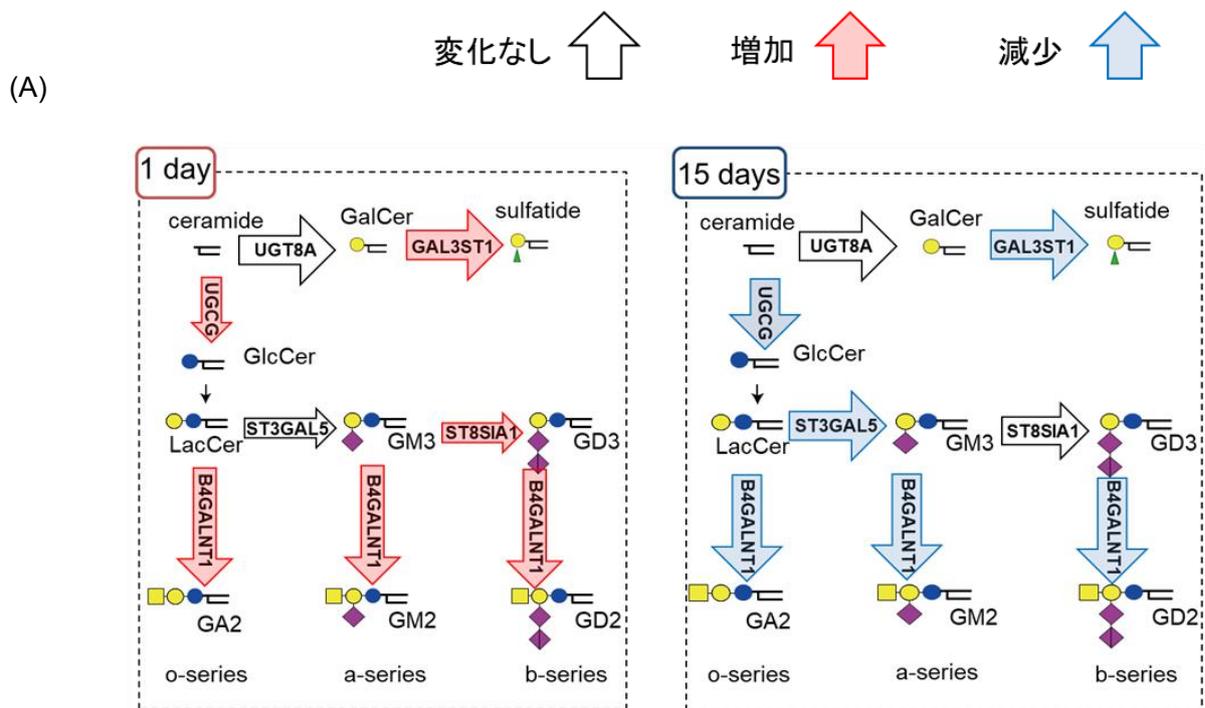


Fig. 5 CFA投与15日後の脊髄における糖転移酵素の遺伝子発現

各グラフは遺伝子発現量を、週齢を対応させたnaïveマウスの発現量に対して標準化したものである。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. naïve, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, $n=9-10$ hemi-spinal cords.



(B)

	脊髄	ガングリオシド系	スルファチド
1 day	早期炎症性疼痛		
15 days	慢性炎症性疼痛		

Fig. 6 CFA投与後の脊髄における糖転移酵素の遺伝子発現および増減が予想される糖脂質

(A) は同側の遺伝子発現の増減をまとめた図。(B) はその結果から同側において増減していると考えられる糖脂質。炎症早期にはガングリオシド、スルファチドが増加し、慢性期には減少している可能性が考えられる。

1.3.3 炎症性疼痛時における DRG の糖転移酵素の発現

次に、CFA投与1日後のDRGにおけるいくつかの糖転移酵素の発現パターンを測定したところ、naïveマウスに比較して、両側のDRGで、*Ugcg*、*St8sia1*、*St3gal5*遺伝子の発現量が減少していた (Fig. 7)。これらの結果は、GlcCer由来のスフィンゴ糖脂質 (すなわち、a-シリーズとb-シリーズの両方のガングリオシド) の量が両側で減少していることを示唆している。

慢性炎症性疼痛条件下では、*Ugcg*、*St3gal5*、*B4galnt1*、*Ugt8a*の発現はnaïveマウスと比較して変化していなかった。同側DRGでは*St8sia1*の発現が増加したが、対側DRGでは*Gal3st1*の発現が減少した (Fig. 8)。これらの結果は同側および対側の機械的アロディニアが、スルファチドとb-シリーズガングリオシドという異なるクラスの糖脂質合成の変化と関連していることを示している。以上の結果は、Fig. 9に生合成経路の図とともにまとめた。

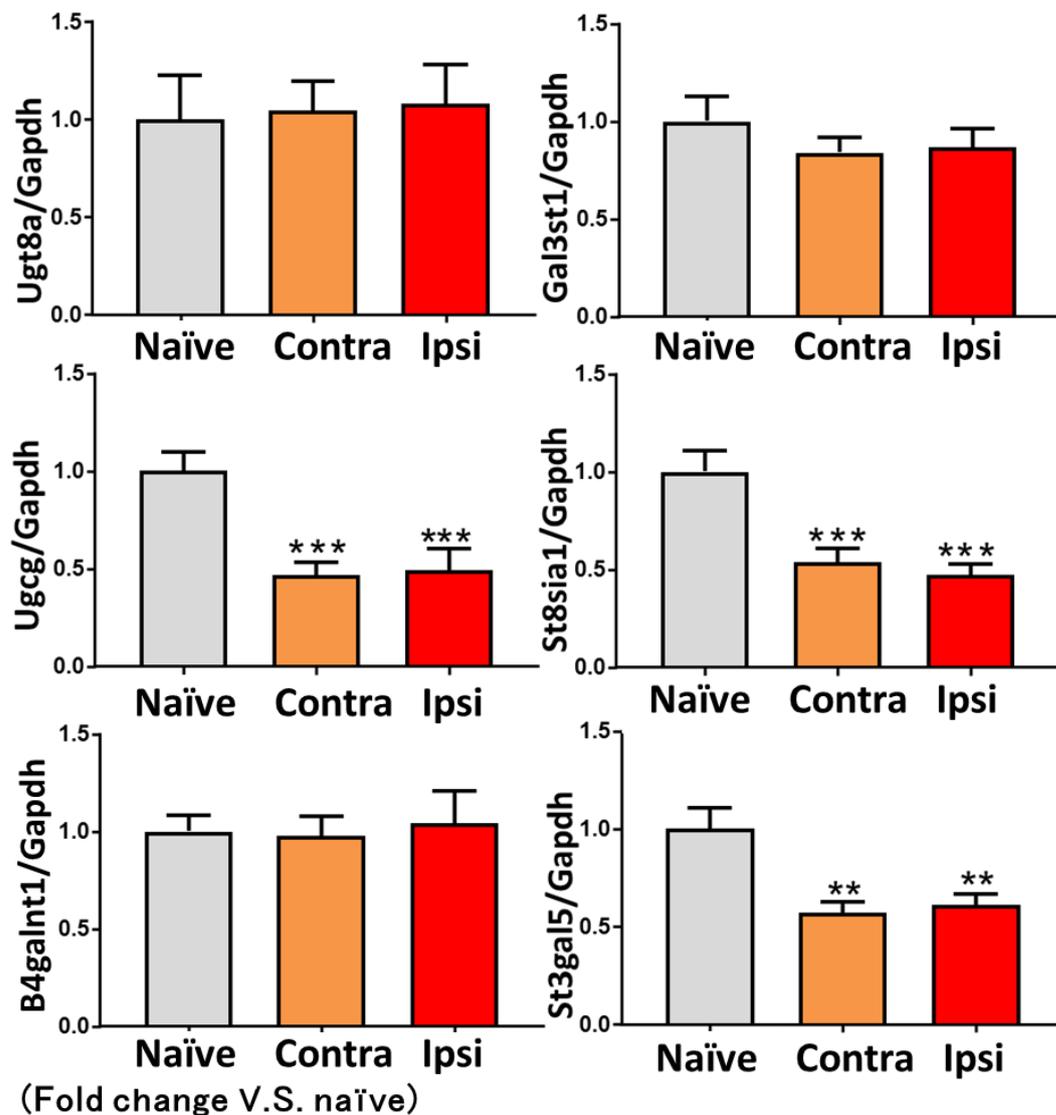


Fig. 7 CFA投与1日後のDRGにおける糖転移酵素の遺伝子発現

各グラフは遺伝子発現量を、週齢を対応させたnaïveマウスの発現量に対して標準化したものである。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. naïve, Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test, $n=19-26$ DRGs.

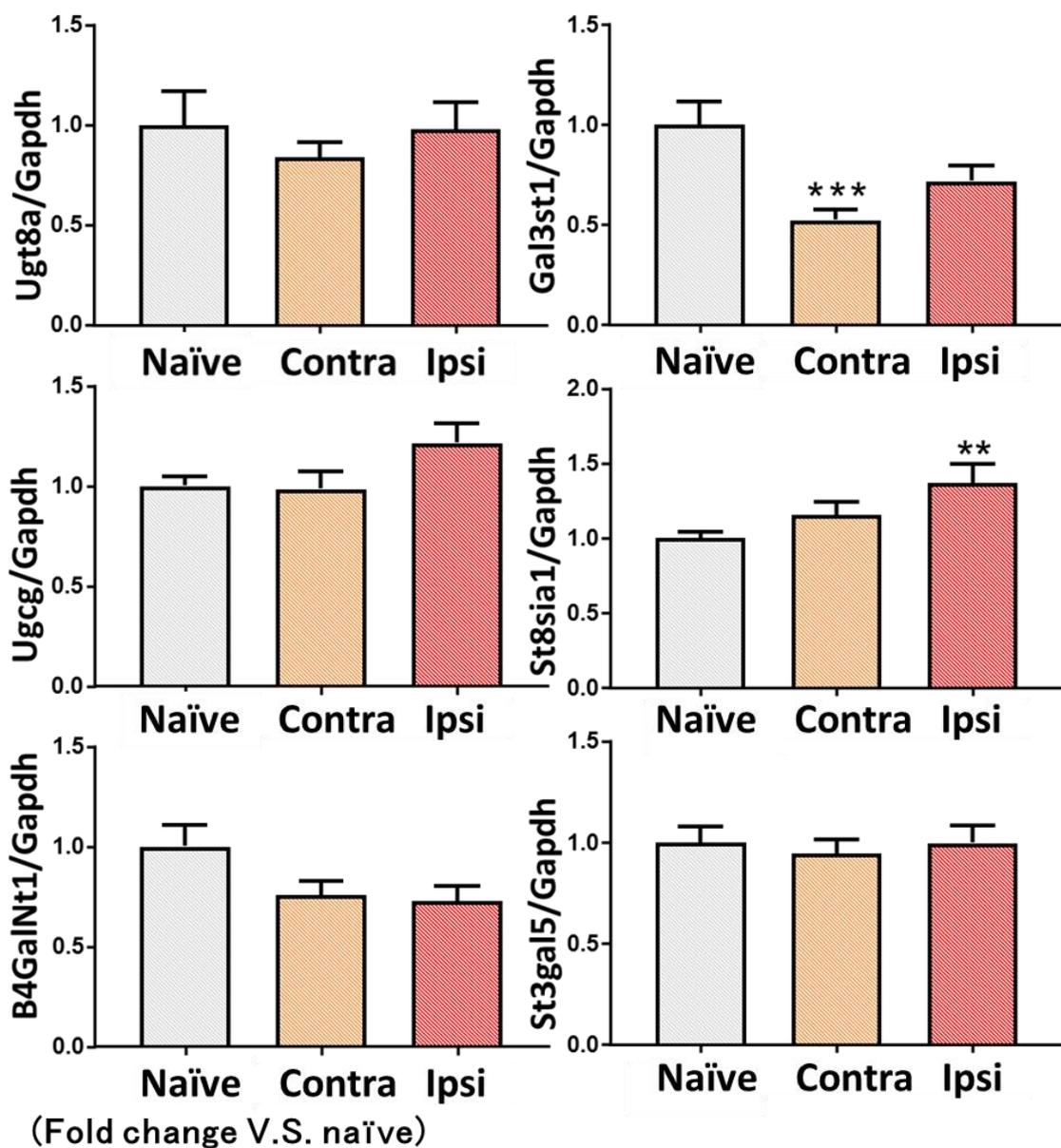
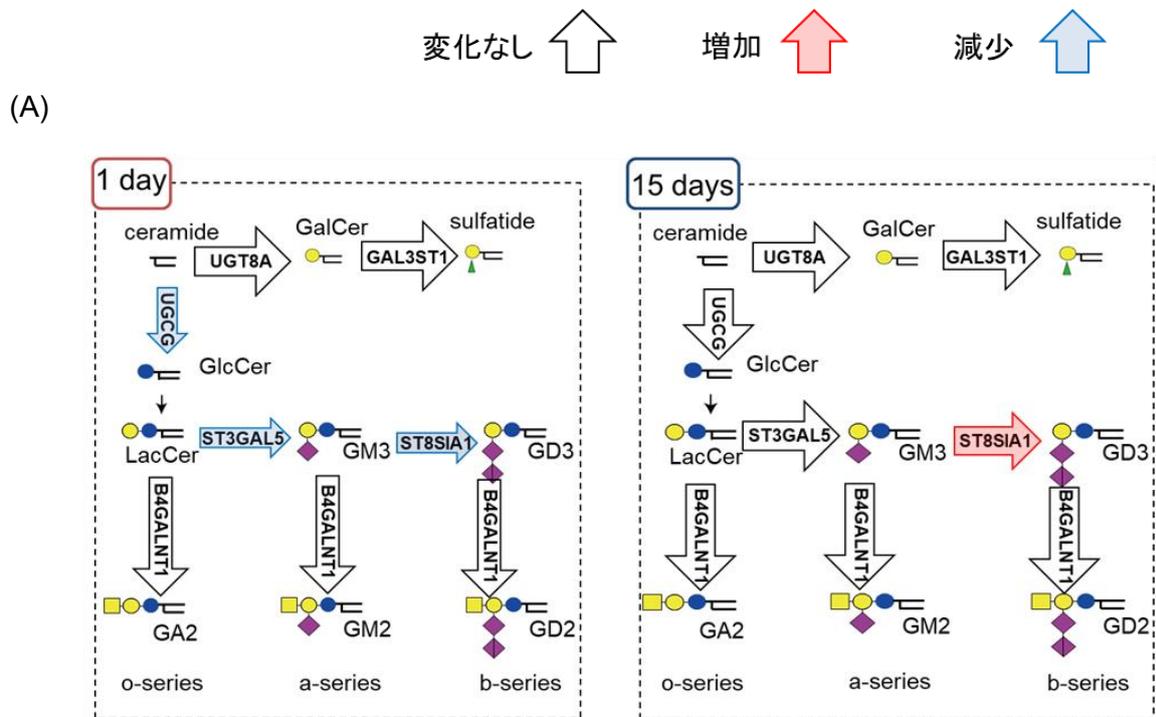


Fig. 8 CFA 投与 15 日後の DRG における糖転移酵素の遺伝子発現

各グラフは遺伝子発現量を、週齢を対応させた naïve マウスの発現量に対して標準化したものである。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. naïve, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, $n=12-24$ DRGs.



(B)

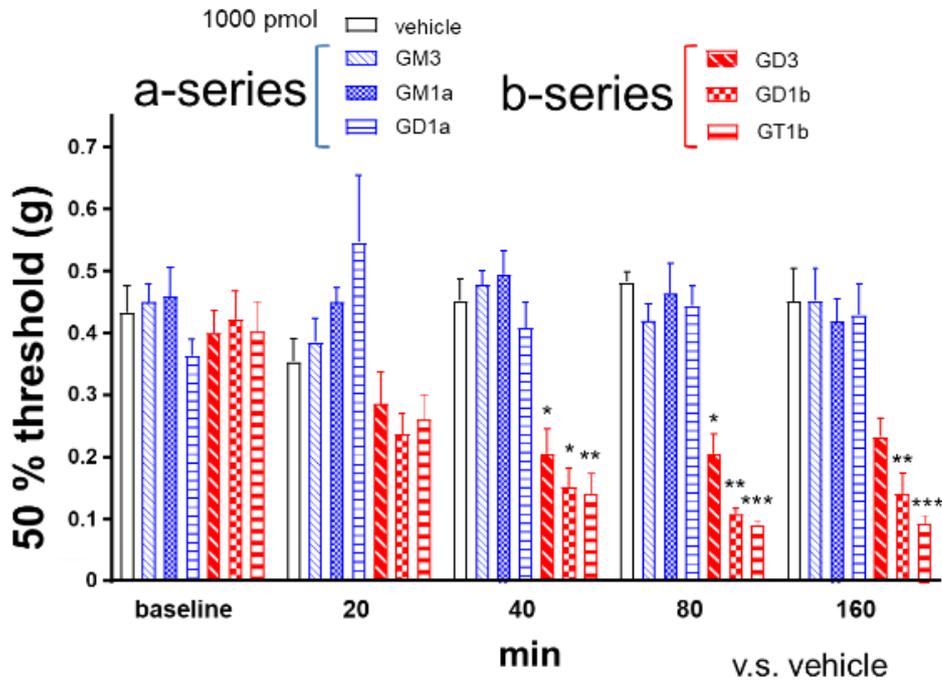
	DRG	ガングリオシド系	スルファチド
1 day	早期炎症性疼痛		
15 days	慢性炎症性疼痛		

Fig. 9 CFA投与後のDRGにおける糖転移酵素の遺伝子発現および増減が予想される糖脂質
 (A) は同側の遺伝子発現の増減をまとめた図。(B) はその結果から同側において実際に増減していると考えられる糖脂質。炎症早期にガングリオシドは減少し、慢性期には増えている可能性が考えられる。

1.3.4 ガングリオシド脊髄髄腔内投与後の機械的アロディニアの評価

炎症性疼痛初期の痛みにa-シリーズまたはb-シリーズのどのようなガングリオシドが影響を及ぼすかどうかを調べるため、様々なガングリオシドの脊髄髄腔内投与 (i.t.) 後にvon Frey testを実施した。b-シリーズガングリオシド (GD3、GD1b、GT1b) は、a-シリーズガングリオシド (GM3、GM1a、GD1a) とは異なり、機械的アロディニアを誘導した (Fig. 10A)。GD3の効果は、長い糖鎖を有するb-シリーズガングリオシド (GD1b、GT1bなど) の効果に比べ、弱い傾向を示した。このことから、CFAを投与した足底の同側の脊髄で*Ugcg*、*St8sia1*、*B4galnt1*の発現量が増加することにより、長い糖鎖を持つタイプのb-シリーズガングリオシドが蓄積され、機械的アロディニアが引き起こされると考えられた。さらに投与後機械的アロディニアが強く認められたGT1bを用いて濃度検討を行ったところ、用量依存的に機械的アロディニアを惹起した (Fig. 10B)。

(A)



(B)

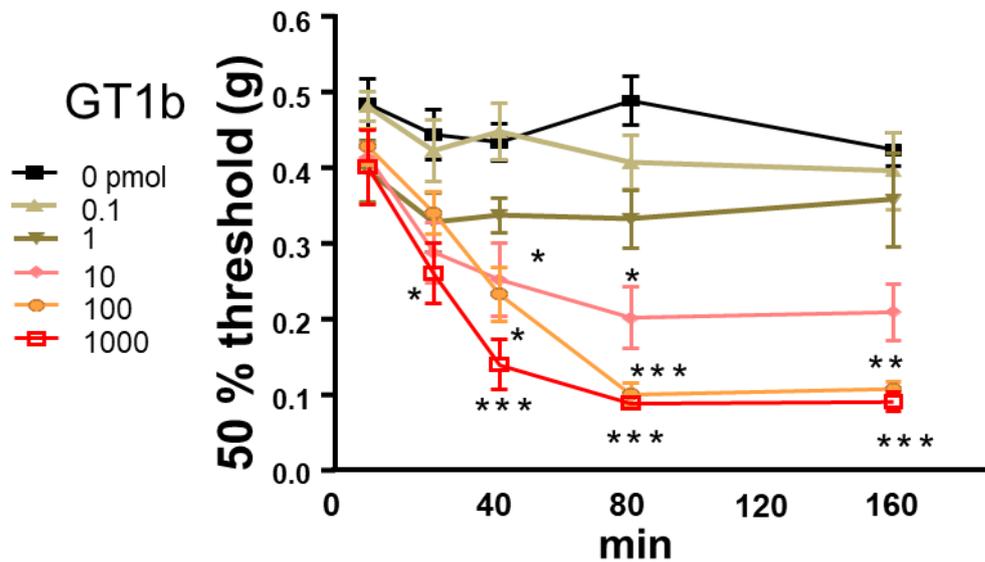


Fig. 10 ガングリオシド脊髄髄腔内投与後の機械的アロディニア
(A) a、b-シリーズガングリオシド投与後のvon Frey testの結果。b-シリーズガングリオシドのみ機械的アロディニアを惹起した。(B) GT1bは濃度依存的に機械的アロディニアを惹起した。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 0 pmol (vehicle), Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, $n=5-8$ mice.

1.3.5 スルファチド脊髄髄腔内投与後の機械的アロディニアと

熱痛覚過敏の評価

Fig. 4 の結果から、CFA 投与 1 日後には脊髄においてスルファチド合成酵素の遺伝子発現が上昇することが明らかになった。そこで、スルファチドが痛覚に関与しているかどうかを調べるため、マウスにスルファチドまたは溶媒を脊髄髄腔内投与し、機械的アロディニアが発現するか調べた (Fig. 11A)。スルファチド投与後 20 分、40 分、80 分、160 分、そして 1 日と 3 日後に、von Frey test を行った。機械的アロディニアはスルファチド投与後 40 分で対照群と比較し有意に生じ、閾値は 160 分以上にわたって低いままであった。さらに、スルファチド投与は用量依存的に機械的閾値を減少させた。10 pmol スルファチドを投与したマウスでは、機械的アロディニアは投与後 1 日以上持続し、最後の測定日 (3 日目) まで持続した。一方、スルファチドの前駆体である GalCer は、閾値に影響を与えなかった (Fig. 11B)。以上、スルファチドを脊髄髄腔内投与すると機械的アロディニアが生じたため、脊髄において痛みへの関与が示唆された。また、熱刺激に対する感受性に影響を与えるかも検討した。10 pmol のスルファチドを脊髄髄腔内投与すると、160 分まで熱痛覚過敏を示したが、1 日後に反応時間は baseline レベルに戻った (Fig. 11C)。

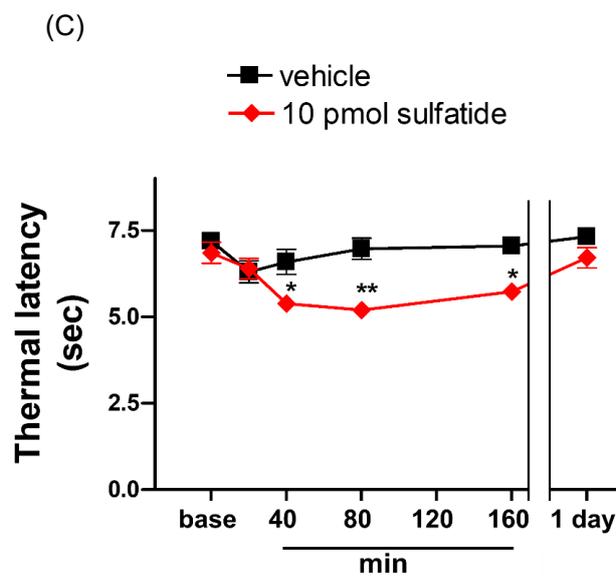
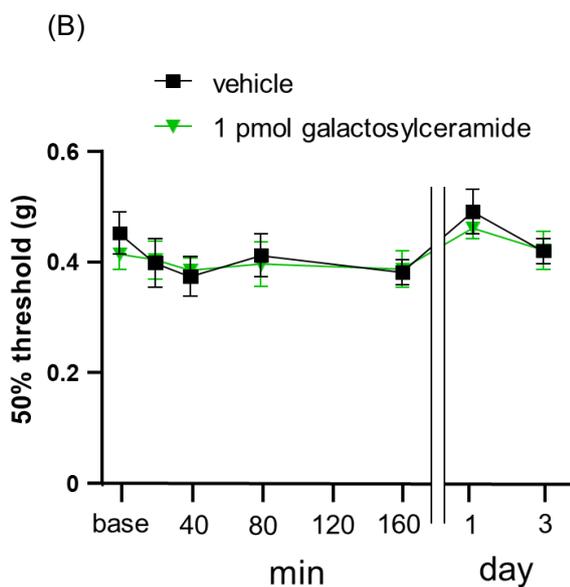
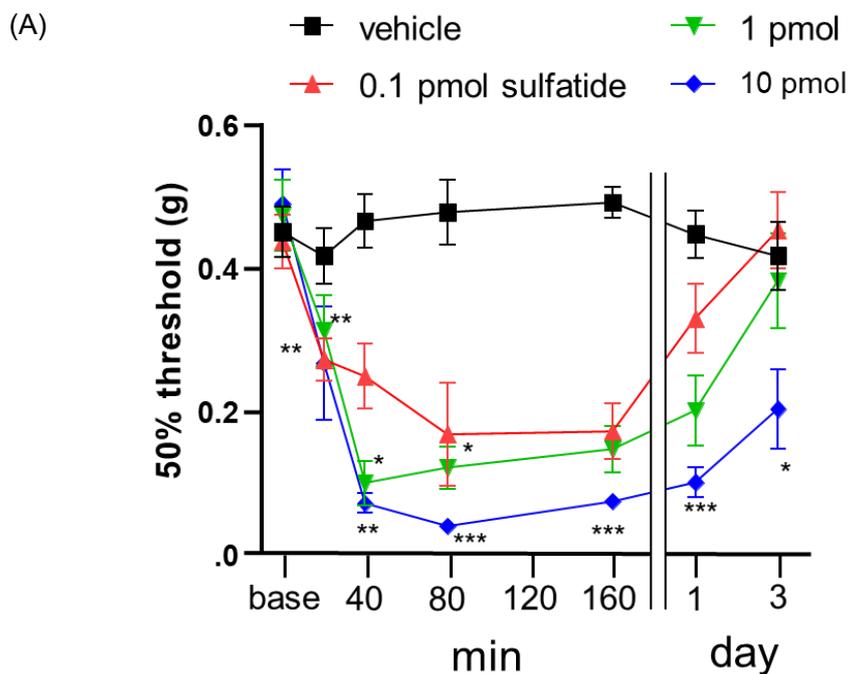


Fig. 11 スルファチド投与後の機械的アロディニアと熱痛覚過敏

(A) スルファチド投与後の von Frey test の結果。スルファチドは濃度依存的に機械的アロディニアを惹起した。(B) ガラクトシルセラミド投与後の von Frey test の結果。機械的アロディニアを惹起しなかった。(C) スルファチド投与後の Hargreaves test の結果。10 pmol スルファチドは熱痛覚過敏を誘発した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (A), Mann-Whitney U-test (B), unpaired Student's t test (C), $n=6$ (A, B), $n=9$ mice (C).

1.3.6 慢性炎症マウスに対するガングリオシド脊髄髄腔内投与後の

機械的アロディニアの評価

1.3.2. (Fig. 5) においてCFA投与15日後の脊髄でガングリオシド合成酵素の遺伝子発現は減少していたことから慢性炎症にもガングリオシドが関与している可能性がある。そこで慢性炎症期におけるガングリオシドの役割を調べるために、10 nmol GM1a またはvehicleをCFA投与21日後から毎日Fig. 12のタイムコースに従ってマウスに脊髄髄腔内投与し、von Frey testを行った。GM1aを繰り返し投与すると、両側の機械的アロディニアは有意に減少した (Fig. 12A)。また、連続投与を中止して8日後には対照群と同程度の閾値まで低下した。CFA投与21日後のGM1aの脊髄髄腔内投与40分後からCFA投与26日後のGM1a脊髄髄腔内投与80分後までの50% thresholdを積算すると、vehicle群に比べGM1a投与群では両側ともに有意な増加を示した(Fig. 12B)。

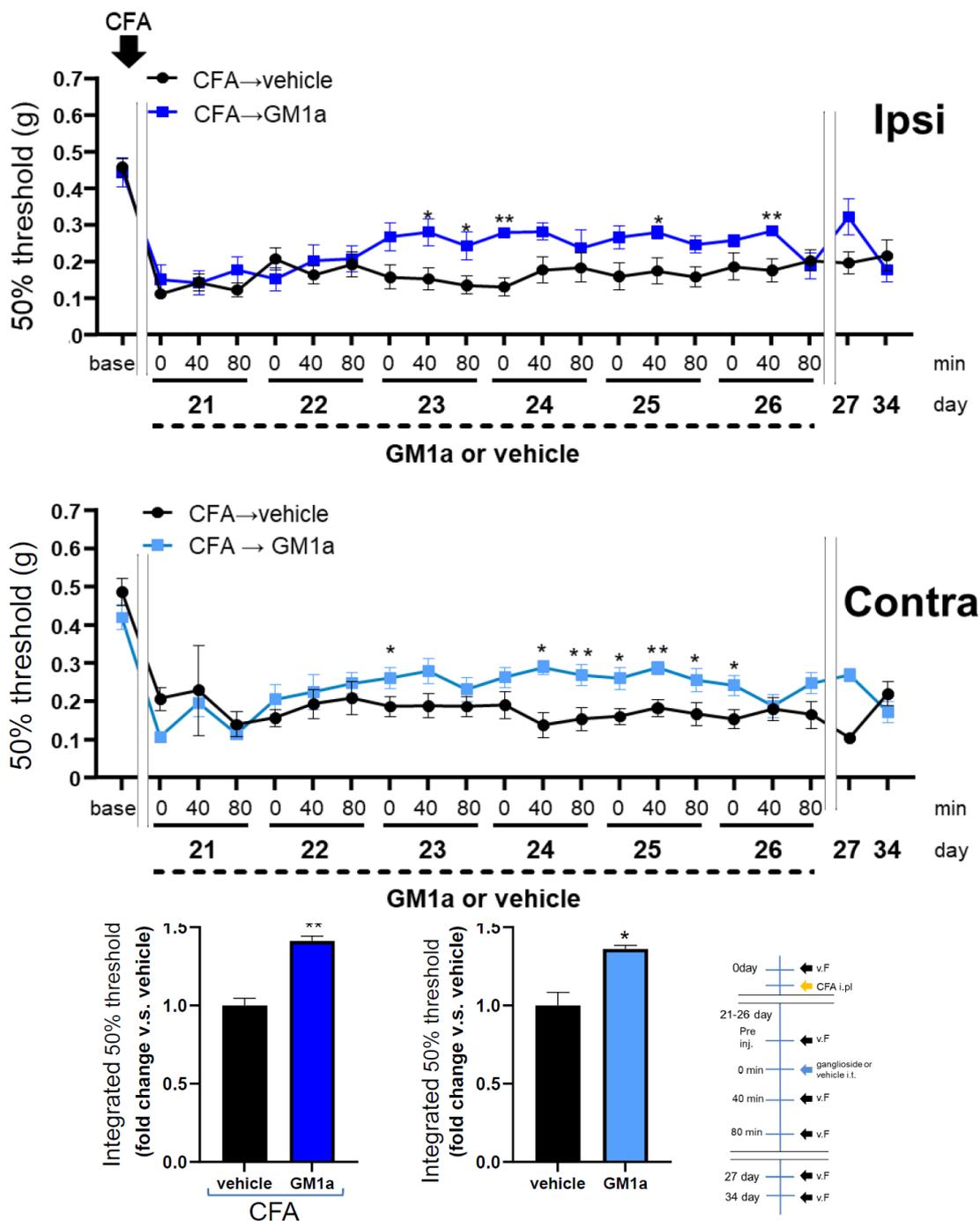


Fig. 12 慢性炎症マウスへのガングリオシド脊髄髄腔内投与後のアロディニアの回復
 (A) CFA投与後21日目から10 nmol GM1aの脊髄髄腔内への反復投与により慢性炎症期に認められる機械的アロディニアが同側、対側ともに回復した。CFA投与26日目を最後に投与を中止し、翌日(CFA投与27日目)とその一週間後(CFA投与34日目)に再度アロディニアを測定した。(B) は (A) のCFA21日の脊髄髄腔内投与40分後からCFA26日の脊髄髄腔内投与80分後までのthresholdの値の積算値。(C) にはCFA投与後の日数と、ガングリオシド投与、von Frey testのスケジュールを示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test, $n = 6$ mice per group.

1.3.7 慢性炎症マウスに対するスルファチド脊髄髄腔内投与後の

機械的アロディニアの評価

1.3.2. (Fig. 5) においてCFA投与15日後の脊髄でスルファチド合成酵素の遺伝子発現が減少していたことから慢性炎症にもガングリオシドと同様にスルファチドが関与している可能性がある。そこで慢性炎症期におけるスルファチドの役割を調べるために、慢性炎症性疼痛マウスに10 pmol スルファチドまたはvehicleをCFA投与21日後から毎日Fig. 13のタイムコースに従って脊髄髄腔内投与し、von Frey testを行った。スルファチドを繰り返し投与すると、両側の機械的アロディニアは有意に減少した (Fig. 13A)。また、連続投与を中止して8日後には対照群と同程度の閾値まで低下した。CFA投与21日後のスルファチドの脊髄髄腔内投与40分後からCFA投与26日後のスルファチド脊髄髄腔内投与80分後までの50% thresholdを積算すると、vehicle群に比べスルファチド投与群では同側において有意な増加を示し、対側においても増加する傾向が認められた (Fig. 13B)。

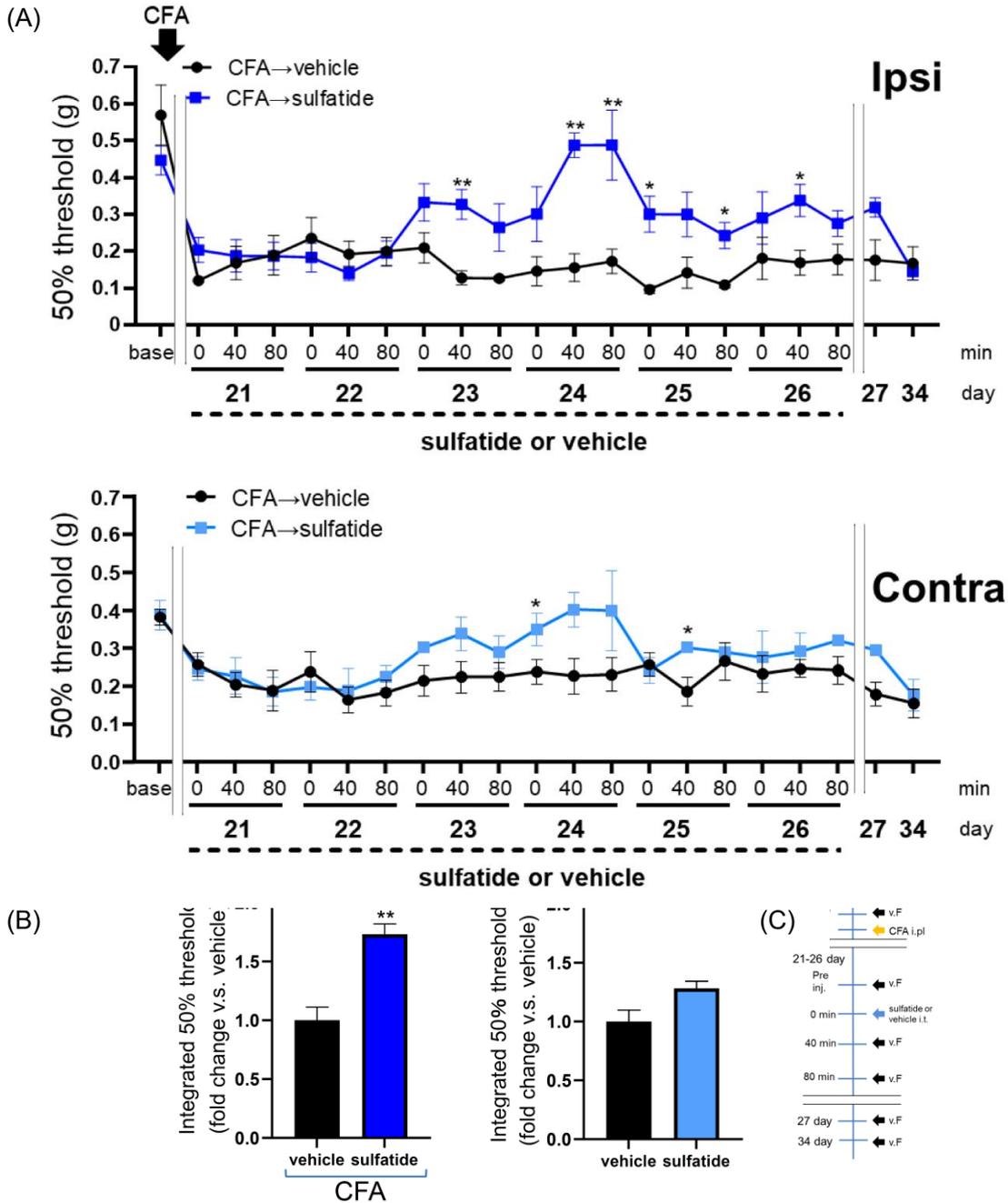


Fig. 13 慢性炎症マウスへのスルファチド脊髄髄腔内投与後の機械的アロディニアの回復

(A) CFA投与後21日目から10 pmol スルファチドの脊髄髄腔内への反復投与により同側の機械的アロディニアが回復した。また、CFA投与26日目を最後に投与を中止し、翌日 (CFA投与27日目) とその一週間後 (CFA投与34日目) に再度機械的アロディニアを測定した。(B) は (A) のCFA21日の脊髄髄腔内投与40分後からCFA26日の脊髄髄腔内投与80分後までのthresholdの値の積算値。(C) にはCFA投与後の日数と、スルファチド投与、von Frey testのスケジュールを示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test, $n = 6$ mice.

1.4 考察

糖脂質は神経系に豊富に含まれ、神経機能の調節に関与することが知られている。神経系の重要な機能のひとつである感覚系においても、我々のこれまでの研究も含め、糖脂質は痛みの調節に関与していることが報告されている (Mao *et al.*, 1992a-c; Goettl *et al.*, 2000; Handa *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2011)。しかし、内因性糖脂質がどのように関与しているかは不明であり、炎症性疼痛の各段階において、どのように糖脂質合成が変化するのも明らかではない。本研究では、マウスの脊髄およびDRGにおいて、片側足底へのCFA投与により誘発された炎症性疼痛時の、糖脂質合成に関わる様々な糖転移酵素の遺伝子発現量を比較した。糖転移酵素遺伝子の発現パターンは、組織の種類 (脊髄対DRG)、炎症が発症した後の期間 (初期対慢性)、CFAを投与した足に対する側 (同側対同側) により異なることが明らかとなった。

1.4.1 脊髄およびDRGにおける糖転移酵素の発現量とパターンの炎症性疼痛の

各段階においての変動

炎症初期 (CFA投与後1日)、DRGではGlcCerを構造内に持つ糖脂質合成に関わる遺伝子 (すなわち、*Ugcg*、*St3gal5*、*St8sia*) の発現が低下し、GalCer由来の糖脂質合成に関わる遺伝子の発現には変化がなかった (Fig. 7, 9)。CFA投与15日後、同側DRGでは*St8sia1*のみ発現が上昇し、対側DRGでは*Gal3st1*の発現が低下した (Fig. 8, 9)。すなわち、皮膚の炎症はスフィンゴ糖脂質合成経路に関与する遺伝子発現に影響を与え、痛みの感度に影響を与える可能性が考えられる。b-シリーズガングリオシドの発現増加は同側足の機械的アロディニアに寄与し、スルファチドの発現減少は対側足の機械的アロディニアに寄与していることが示唆された。

炎症性疼痛の初期には、5つの糖転移酵素が脊髄で有意に増加していた (Fig. 4, 6)。

*Ugcg*と*Gal3st1*はCFA投与部位に対して同側と反対側で、*St8sia1*と*B4galnt1*は同側

で、*St3gal5*は対側で、それぞれ発現が増加していた。これらの結果は、セラミドからUGCGによりGlcCerの合成が増加し、さらにST8SIA1によるGD3合成を経て、B4GALNT1を介し長い糖鎖を持つb-シリーズガングリオシド (GD1bとGT1b等) が合成され、機械的アロディニアが誘発されることを示している。そこで、機械的アロディニアを起こしていない、naïveマウスの脊髄髄腔内へa-シリーズとb-シリーズの各種ガングリオシドを脊髄髄腔内投与した。その結果、a-シリーズガングリオシドはいずれも機械的アロディニアを引き起こさず、b-シリーズガングリオシドによってのみ機械的アロディニアが示された (Fig. 10)。さらに、b-シリーズガングリオシドのなかでも、糖鎖が短いGD3は他のb-シリーズガングリオシドよりも痛みを引き起こす効果が弱かった。また、*Gal3st1*の発現上昇から、その産生物であるスルファチドが痛みを引き起こすことが予想される。そこで、スルファチドを同様に脊髄髄腔内へ投与すると、濃度依存的に機械的アロディニアを引き起こした。一方で、GAL3ST1の基質であるGalCerは脊髄髄腔内投与により痛みを引き起こすことはなく、酵素発現量の増大から予想される結果と一致した (Fig. 11)。以上、行動実験からも糖転移酵素の発現パターンから増加すると考えられる糖脂質が痛みを直接惹起することが強く示唆された。

一方、慢性炎症時には、6つの糖転移酵素のうち、4つの糖転移酵素が脊髄で有意に減少していた (Fig. 5, 6)。Ugt8a1は、有意な発現量の変化は認められなかったため、セラミドから生合成されるGalCerとGlcCer合成の二つの経路の内、GalCer合成に傾くことが示唆され、ガングリオシド量は減少することが予測された。特に、同側脊髄ではGM3からGD3を合成する*St8sia1*の発現量は変化が認められないため、a-シリーズガングリオシドの基質であるGM3はb-シリーズガングリオシドよりも、より大きく減少していると考えられる。本研究では、GM1aガングリオシドを繰り返し髄腔内に投与すると、慢性炎症性疼痛における機械的アロディニアが改善されることを見出した (Fig. 12)。GM1aの脊髄髄腔内投与や腹腔内投与により、神経障害性疼痛モデルにおいて鎮

痛作用が生じることが報告されている (Hayes *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 1992a-c)。これらの慢性疼痛モデルやCFAによる慢性炎症性疼痛においてGM1aガングリオシドが減少しているとすれば、GM1a脊髄髄腔投与によって内因性a-シリーズガングリオシドの減少を補うことで鎮痛作用が生じるという仮説は妥当である。また、ヒトを含め、脊髄においてはa-シリーズガングリオシドGM1aがb-シリーズガングリオシドGT1bに比べ、多量に存在している (Ueno *et al.*, 1978)。健常時にはaシリーズのガングリオシドがb-シリーズガングリオシドの発痛作用を上回り痛みは生じないが、炎症時にはb-シリーズガングリオシドが増加してa-シリーズの抑制的な作用を打ち消し、発痛作用を示す可能性が考えられる。しかし、a-シリーズの鎮痛作用とb-シリーズの発痛作用が拮抗するかは明らかでないため、a-、b-シリーズガングリオシドを同時に投与し、疼痛行動を評価する必要がある。さらに、Gal3st1の発現も減少していたため、その生成物であるスルファチドの減少が予想される。そこで、GM1aと同様なタイムスケジュールで脊髄髄腔内へ投与したところ、慢性炎症期の機械的アロディニアは緩和された (Fig. 13)。以上のように、炎症性疼痛過程の異なる時期に、異なる糖脂質が痛みの調節に関与していると考えられる (Fig. 14に脊髄に対する糖脂質投与の結果をまとめた)。今後は、遺伝子発現だけでなく糖脂質自体を定量することで、遺伝子発現量から推測された糖脂質の組成変化を確認することが必要である。特に、酵素反応の生成物である各糖脂質が合成酵素の遺伝子発現を阻害する、ネガティブフィードバック機構が存在する場合、炎症早期に蓄積した糖脂質が酵素遺伝子発現を抑制する。この場合、遺伝子発現抑制から十分な時間が経過しないと糖脂質は減少しない可能性が考えられるため、CFA投与後のどの時点で実際に糖脂質含量が変動するか、TLCやLC-MS/MSなどを用いて測定することは重要である。

本研究から慢性炎症性疼痛では、脊髄のいくつかの糖転移酵素遺伝子の発現が両側で低下することが明らかとなり、炎症を起こした末梢皮膚組織が対側の脊髄の遺伝子

発現に影響を与えることが示唆された。我々が用いたモデルでは、CFA投与後15日経過すると炎症を起こしていない、対側の足底でも機械的アロディニアが引き起こされる。このような痛みは、**mirror image pain** と呼ばれている (Huang and Yu, 2010)。Choiらはこのメカニズムについて次のように報告している。炎症を惹起し疼痛を引き起こすcarrageenanをマウスの片側の足底に投与すると、5日後にはcarrageenan投与側と非投与側の両方の脊髄においてアストロサイトの活性化 (glial fibrillary acidic protein (GFAP)の増加) とconnexin 43 (CX43、中枢神経系において主にアストロサイトに発現するタンパク質。dimerを形成して細胞間のGap結合の形成に関与し、monomerではイオン、セカンドメッセンジャーなどを透過するチャネルとしての機能を有する) の発現が増加し、**mirror image pain**が生じる。CX43のdimer形成を抑制する薬物を投与することでGFAPの発現および**mirror image pain**が抑制されることから (Choi *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2017)、**mirror image pain**の発症にはCX43を介したアストロサイトの活性化が重要である。

いくつかの研究で、糖脂質がグリア細胞の活性化を調節することが報告されている。例えば、GD1aやGM1aではなくGT1bを投与すると、アストロサイトは一酸化窒素 (nitric oxide, NO) を放出し (Huang and Yu, 2010)、ミクログリアは腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor, TNF- α) を放出する (Pyo *et al.*, 1999)。スルファチド処理により、ミクログリアからのサイトカインの放出が誘導される (Jeon *et al.*, 2008)。Interleukin (IL) -13とGT1bの共処理はミクログリア細胞死を誘発する (Yang *et al.*, 2002) が、GM1aは誘発しない。さらに、GT1bではなくGM1aでミクログリアを処理すると、リポポリサッカライドで処理したミクログリアに見られる形態学的変化とは異なるミクログリアの肥厚化が増加する (Park *et al.*, 2008)。これらの研究において、グリア細胞からのサイトカインやNOの放出、細胞死、ミクログリアの肥厚といった炎症過程の各段階には、それぞれ異なる糖鎖構造を持つ糖脂質が必要であることが報告

されている。従って、炎症性疼痛時に生じた糖脂質合成の変化は同側だけでなく対側におけるグリア細胞の活性化調節にも関与し、**mirror image pain**の発症に関与していることが示唆される。また、近年においては脊髄ミクログリア細胞に発現する**P2X4**受容体の阻害薬**NC-2600**が神経障害性疼痛の新規鎮痛薬として期待されている。第I相臨床試験をクリアしており、鎮痛薬のターゲットとしてもグリア細胞は有望である。そこで、第二章では、これまでに疼痛への関与が知られていないスルファチドに着目し、グリア細胞活性化や**NO**およびサイトカイン産生への関与など、より詳細に糖脂質により痛みを引き起こす分子機構について検討を行うこととした。

本章の研究を通じて、各糖転移酵素発現量は炎症の初期に変動するが、その変動が持続するのではなく、対側の機械的アロディニアが生じる時期に達すると異なる変動パターンを示すことが明らかとなった。そのため、このパターンの変化が、慢性疼痛へ移行する時期の分子機構に関与しているかもしれない。本研究から、炎症性疼痛において、糖転移酵素とその産物が痛みの感知に重要な役割を果たすという新規なメカニズムの存在が示唆された。

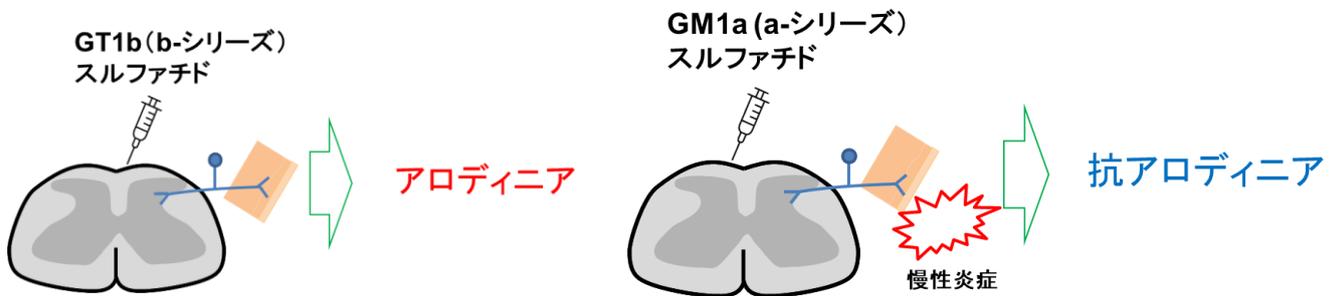
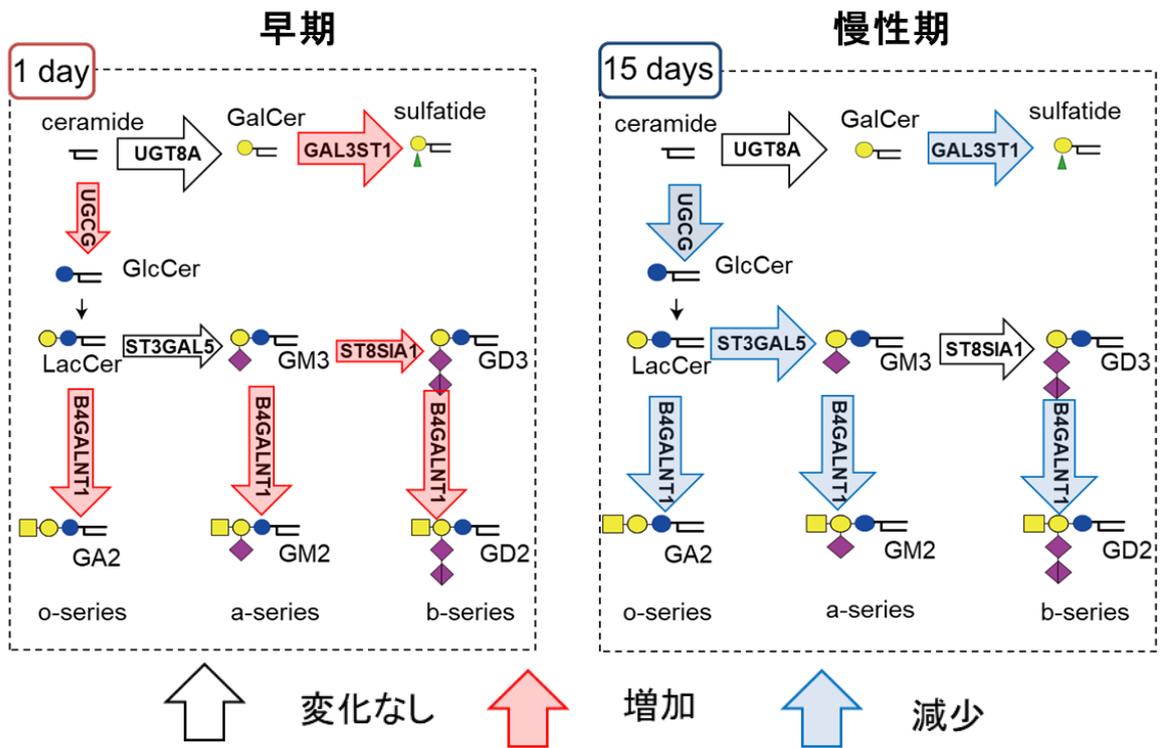


Fig. 14 第一章のまとめ

炎症早期には ganglioside、スルファチドの合成酵素の遺伝子発現は増加した。また、疼痛時に増加すると予想される sphingolipid をマウスに投与した結果、スルファチド、b-シリーズ ganglioside が機械的アロディニアを惹起したことから、これらの糖脂質が機械的アロディニアの惹起に関与している可能性が考えられる。一方、慢性期には ganglioside、スルファチドの合成酵素の遺伝子発現は減少した。慢性期に減少が予想される a-シリーズ ganglioside、スルファチドを投与することにより機械的アロディニアが減弱したことから糖脂質の減少が疼痛に関与していることが示唆された。

第二章

糖脂質スルファチドの脊髄髄腔内投与により生じる

機械的アロディニアのメカニズム

2.1 背景

第一章においては、炎症早期にスルファチド合成酵素 *Gal3st1* の遺伝子発現が炎症性疼痛モデルマウスの脊髄において増加していることを明らかにし、さらに *naive* マウスにおいて脊髄髄腔内投与したスルファチドが機械的アロディニアを引き起こすことを示した。スルファチドが疼痛に関与するかについてはこれまでに報告がなく、疼痛を引き起こすメカニズムは不明である。そこで、本章ではスルファチドが疼痛に関わるどのような分子機構を作動させるか、検討を行った。スルファチドはミエリン鞘に豊富に含まれる硫酸化糖脂質である。神経系では、スルファチドの大部分はオリゴデンドロサイトやシュワン細胞などのミエリン形成細胞で合成されるが、ニューロンやアストロサイトにおいても少量のスルファチドが検出される (Pernber *et al.*, 2002)。スルファチドはミエリンの構成成分であり、ミエリンの形成と維持の調節因子である (Hoshi *et al.*, 2007; Honke, 2018)。スルファチドは、CD1 アイソフォーム (Jahng *et al.*, 2004; Zajonc *et al.*, 2005) やセレクチン (Imai *et al.*, 1990) などの特定の膜タンパク質にリガンドとして結合することや、脂質ラフトを形成することによって細胞機能を調節する (Honke, 2018)。スルファチドの生合成酵素や分解酵素を遺伝子改変することにより代謝異常を引き起こすと、神経系に様々な機能障害が生じることが知られている。例えば、*Gal3st1* ノックアウトマウスでは、ミエリンの空胞化、脳のいくつかの領域での軸索の膨張 (Honke, 2018) を引き起こす。スルファチド分解酵素であるアシルスルファターゼ A (脱硫酸化酵素) をコードする遺伝子のノックアウトマウスにおいてミエリン形成細胞で *Gal3st1* を過剰発現させると、スルファチドが著し

く増加し、ミエリンの機能不全が見られる (Ramakrishnan *et al.*, 2007)。

今回着目した疼痛におけるグリア細胞の機能について述べる。慢性炎症や神経に損傷が生じた際にはグリア細胞が疼痛伝達に関与することが知られている。中枢神経系のグリア細胞はアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに分類され、中でもアストロサイト、ミクログリアは炎症性疼痛や神経障害性疼痛に関与していることが知られている (Wang and Xu, 2022)。ミクログリア、アストロサイトは活性化することで炎症性サイトカインである TNF- α 、interleukin や NO を放出し、痛みの感受性を変化させる (Schmidtko *et al.*, 2009; Üçeyler *et al.*, 2009; Wang and Xu, 2022)。また、アストロサイトが活性化されると、TNF- α の産生をもたらす、他の炎症性サイトカインの産生も促進する (Dvorianchikova and Ivanov, 2014; Sanz and Garcia-Gimeno, 2020)。さらに、TNF- α は神経細胞に発現する TNFR1 受容体を介し、p38 MAP キナーゼを活性化することでナトリウムチャンネルをリン酸化し、神経細胞におけるナトリウムイオンの流入を増加させる (Jin *et al.*, 2006)。さらに、TNF- α はグルタミン酸受容体である NMDA 受容体や AMPA 受容体の細胞表面への輸送を促し、神経細胞の興奮性を上昇させること (Olmos and Lladó, 2014) によって疼痛を増悪させる。一方、活性化されたグリア細胞から放出される NO は、cGMP 産生、窒素酸化物、タンパク質のニトロ化を介して神経細胞の機能に関与している (Bian *et al.*, 2006)。NO 合成酵素 (NO synthase、NOS) は、nNOS、eNOS、iNOS の 3 つのアイソザイムに分類されるが、各アイソザイムに対する NOS 阻害薬は、炎症性 (Luo *et al.*, 2000; Da *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007) および神経障害性疼痛 (Hao and Xu, 1996; Tanabe *et al.*, 2009) を改善させる。放出された NO はグリア細胞を活性化し、脊髄のニューロンからの伝達物質放出を調節する (Milligan and Watkins, 2009)。炎症性疼痛において、NOS は痛覚過敏と機械的アロディニアに関与していることも知られている。nNOS の発現は CFA による後肢の炎症時に脊髄で上昇し、nNOS 遺伝子ノック

クアウトは CFA による機械的痛覚過敏を抑制する (Chu *et al.*, 2005)。NO の産生は cGMP 経路の活性化による機械的アロディニアを引き起こし (Ferreira *et al.*, 1999)、炎症性疼痛時には脊髄 cGMP 依存性プロテインキナーゼの発現が増加する (Tao *et al.*, 2000)。また、NO は抑制性神経を抑制することで神経細胞の興奮性を上昇させることや神経の感作を引き起こす (Schmidtko *et al.*, 2009)。以上のように、グリア細胞活性化とその際に、放出されるメディエーターは疼痛において重要な機能を担うことから、第二章では、スルファチドが疼痛を引き起こすメカニズムにグリア細胞の活性化やサイトカイン、NO が関与する可能性を検討した。

2.2 方法

2.2.1 使用動物

実験には、雄の Jcl:ICR マウス (5~7 週齢 ; CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用した。マウスは、12 時間サイクルで明暗が変わる環境下で飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。実験は明期中に行った。すべての動物実験は、北里大学薬学部動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 : 17-5、17-7、20-8)。また、CFA 以外の薬物の投与はすべてブラインドで行った。麻酔が痛みの感作に及ぼす影響を避けるため、無麻酔で薬物の投与および von Frey test、Hargreaves test を行った。CFA 以外の薬物および溶媒は、マイクロシリンジ (Hamilton company, NV, USA) に取り付けた 30 G 針を用いて、L4-5 椎間関節腔に髄腔内投与 (5 μ L) した。

2.2.2 von Frey test

機械的刺激への感受性は、第一章と同様に von Frey test を用いて評価した。機械的刺激に対する 50%疼痛閾値を、8 つのフィラメントを用い (2.36-4.17g)、up-down 法 (Dixon *et al.*, 1980)を用い、Chaplan らの方法に従って疼痛閾値 (50% thresholds) を算出した (Chaplan *et al.*, 1994)。マウスは透明なチャンバー (直径 10cm) 内の金網に乗せ、試験の前に少なくとも 1 時間チャンバー内で順化させた。詳細については、第一章の 1.2.2 von Frey test の欄に記載した。baseline の閾値を測定した後、薬物を脊髄腔内に投与した。

2.2.3 Hargreaves test

熱痛覚は、第一章と同様 Hargreaves test (Hargreaves *et al.*, 1988) を用いて評価した。マウスは、IITC Plantar Analgesia Meter (IITC Life Science Inc., CA, USA) を用いた行動学的試験の 60 分前に、個別にチャンバーに入れ、試験中、放射熱光源をチャン

バーの下に置き、後肢の足底面に焦点を当て、マウスが逃避行動をとるまでの時間を記録した。組織損傷を避けるため、ランプは 20 秒後に消灯するように設定し、薬物の投与はすべてブラインドで行った。各時間 3 回の値の平均値を用いた。

2.2.4 免疫染色

マウスはペントバルビタールナトリウム(70- 80 mg/kg、i.p.) 麻酔下、0.1M リン酸緩衝液中 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。灌流後すぐに各マウスから脊髄を採取し、L4-5 脊髄を 0.1M リン酸緩衝液中の 4%パラホルムアルデヒドで 12 時間以上固定後、Phosphate Buffered Saline (PBS) 0 中の 15%スクロース中に置換し、さらにその後、PBS 中の 30%スクロース中に、4°C24 時間以上で保存した。組織は OCT コンパウンド (SAKURA Finetechnical Co, Tokyo, Japan) で凍結し、クリオスタット (HM-550, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を使用して 10 μ m で切片を作製した。切片を 10% normal donkey serum、0.1% Triton X-100 in PBS により 30 分間室温でインキュベーションした後、GFAP に対する抗体 (マウスモノクローナル IgG、1:5000、Sigma Aldrich, MO, USA) で 4°C一晩インキュベーションした。切片を二次抗体 (AlexaFluor 488 標識抗マウス IgG 抗体、1:2000、Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で室温、1 時間インキュベーションし、封入後共焦点顕微鏡で観察した。

2.2.5 mRNA の抽出と RT-PCR

一章と同様に検討を行った。マウスは頸椎脱臼後直ちに脊髄の腰部膨大を採取した。採取した脊髄をRNA 安定化保存薬 RNAlater solution (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に浸し、Sepasol - RNA Super G solution (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いて Total RNA を精製後、prime script RT reagent kit (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) でcDNAに逆転写した。PCRは、CFX96 Touch Real-Time PCR

Detection System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で実施した。PCRは、50°C 2分に続いて95°C 2分処理し、95°C 15秒、60°C 1分を45サイクル行った。各遺伝子の発現量は、*Gapdh*の発現量を用いて標準化した。データはnaïveマウスの発現量と比較し、fold changeで表した。プライマーは以下のものを使用した。

gene	forward	reverse
<i>Gapdh</i>	CTTTGGCATTGTGGAAGGGC	TCAGCTCTGGGATGACCTTG
<i>Tnf</i>	AGCAAACCACCAAGTGGAGGA	GCTGGCACCAGTGTGGTTGT
<i>I1b</i>	TTGGCTGTGGAGAAGCTGT	AACGTCACACACCAGCAGGTT

2.2.6 NOx 測定

マウスを頸椎脱臼後、脊髄の腰部膨大部を直ちに採取した。窒素酸化物 (NOx) を測定するために、組織を 3 mM Tris- HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA、1/100 protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 中で氷上でホモジナイズし、ホモジネートを 12000 g で 60 分間遠心分離した。上清を回収し、-80°C で保存し、後に NOx 測定に使用した。脊髄における NOx の測定は標準曲線として亜硝酸塩で作成し (0.03 ~ 3 nmol/L) 2,3-diaminonaphthalene (DAN) (DOJINDO, Kumamoto, Japan) reagent (Fernández-Cancio *et al.*, 2001) を用いて測定した。また、試料に *Aspergillus* 属由来の硝酸塩還元酵素 (Roche Diagnostics, niederlenz, Schweiz) を加え、NADPH の存在下で 37°C、60 分間反応させた。次に、10 µL の DAN 溶液 (0.05N HCl 30 µg/mL) を 100 µL の硝酸還元酵素処理したサンプルまたは亜硝酸標準液に加え、室温で 15 分間インキュベーションした。反応は 5 µL の 2.8 M NaOH の添加により終了させた。蛍光強度は FlexStation 3 (Molecular devices, CA, USA) を用いて励起波長 365 nm、発光波長 450 nm で測定した。得られた硝酸塩濃度は、タンパク質含量で標準化した。脊髄ホモジネートの上清中のタンパク質含量は、タンパク質測定用 BCA protein キット

(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて測定した。

2.2.7 脊髄におけるスルファチドの定量

右後肢足底への CFA 投与 7 日後にマウスを頸椎脱臼後、脊髄腰部膨大部を採取し、左右に分け、直ちに -80°C に保存した。保存した脊髄を、内部標準として合成 GM3 ガングリオシド (脊髄の湿重量 1 mg あたり合成 GM3 ガングリオシド 1~3 μg) を加えた 19 倍の容量の冷水中でホモジナイズした。次に、0.2 mL のホモジネートを 6 mL のクロロホルム/3 mL のメタノールと混合し、 37°C で 1 時間インキュベーションした。遠心分離後、ペレットを 2 mL のクロロホルム/メタノール (v/v, 1/1) 中で 37°C 、1 時間インキュベーションした。再度遠心分離し、得られたペレットを 2 mL のクロロホルム/メタノール/水 (v/v/v, 1/2/0.8) 中で 37°C 、1 時間インキュベーションし、遠心分離した。3 つの上清を混合し、窒素吹付により乾固させた。スルファチドを含む酸性脂質画分を精製するために、DEAE Sephadex A-25 (Sigma Aldrich, MI, USA) を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。得られた脂質をカラムにかけ、クロロホルム/メタノール/1.6M 酢酸アンモニウム (v/v/v, 30/60/8) で溶出した (Ledeen *et al.*, 1973)。グリセロ脂質を除去するために、酸性脂質画分をアルカリ加水分解し、Sep-Pak C18 (Waters Corp., MA, USA) を用いて脱塩を行った。脱塩した酸性スフィンゴ糖脂質は、クロロホルム/メタノール/0.1% CaCl_2 in water (v/v/v, 5/4/1) 下の薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) (silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) で分離した。糖脂質は、オルシノール-硫酸染色を用いて可視化した。各試料中のスルファチドおよび合成 GM3 ガングリオシドは、ブタ脳由来のスルファチドおよび合成 GM3 ガングリオシドを標準物質とした標準曲線から定量を行った。脊髄ホモジネート中のスルファチド量は、GM3 ガングリオシド (内部標準) の回収率から算出し、ホモジネートのタンパク質含量で標準化した。3 つの片側脊髄を合わせて 1 つの試料とした。

2.2.8 ウェスタンブロット

マウスを頸椎脱臼後、腰椎の脊髄をホモジナイズバッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 0.17 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail (1:100, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)) 中で超音波処理によりホモジナイズした。ホモジネートを SDS-PAGE サンプルバッファーで溶解し、SDS-PAGE を行った後、PVDF メンブレン (Millipore, MA, USA) 上に転写した。スキムミルクを溶解した TBS-T (0.05% Tween20) でブロッキングした後、メンブレンを抗 GFAP (1:5000, マウスモノクローナル、Sigma Aldrich, MO, USA) または抗 Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) (1:1000、ウサギ IgG, Wako Chemicals, Osaka, Japan) で反応させた。TBS-T で洗浄後、メンブレンを抗マウス IgG CF640 (1:5000, Biotium Inc., CA, USA) または抗ウサギ IgG HRP (1:10000, 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) を用いて反応させた。Iba-1 については、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いてバンドを観察した。各サンプルは、 β -actin を用いて標準化した。 β -actin は抗 actin hFAB rhodamine (Biorad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて 4°C でインキュベーション後定量化した。メンブレンは Chemidoc (Biorad Laboratories, CA, USA) により観察した。プロットイングにおけるバンドは、Image J ソフトウェア (Schneider *et al.*, 2012) を用いて定量化した。

2.2.9 薬物

スルファチドは豚の脳由来のものを用いた (Avanti Polar Lipids, Inc., AL, USA)。内部標準として合成ガングリオシド GM3 (d18:1/C16:0) およびアストロサイト活性化阻害薬として L- α -amino adipate (L-AA) を用いた (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)。N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) は Nacalai Tesque

(Kyoto, Japan)、GalCer、minocycline、SPD-304、N ω -propyl-L-arginine (NPA)、7-nitroimidazole (7-NI),1400W、1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)、および bimosiamose (BIMO) は Cayman Chemical Company (MI, USA) より購入した。ODQ と 7-NI は、10% DMSO を用いて指示濃度に希釈した。その他はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解し、DMSO の最終濃度は 1%を超えないようにした。

2.2.10 統計処理

すべてのデータは、平均値 \pm SEM で表した。2 群間の差は、Student's *t* test、Mann-Whitney U-test を用いた。3 群以上の場合は、Kruskal-Wallis test または two way ANOVA を行うことにより評価し、post-hoc test として Dunn's multiple comparison を用いた。統計的評価はすべて GraphPad Prism ver.7 (GraphPad Software, CA, USA) を用いて行い、*P* 値が 0.05 未満を有意とした。

2.3 結果

2.3.1 スルファチドは脊髄のアストロサイトを活性化するか

スルファチドがどのような細胞メカニズムで機械的アロディニアを誘発するのかを明らかにするため、疼痛伝達に関与することが知られているグリア細胞に注目した。脊髄のグリア細胞は炎症性疼痛時の疼痛調節に重要な役割を果たすことから (Raghavendra *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2013)、グリア細胞の活性化がスルファチドによる機械的アロディニアに関与するかを検討した。まず、マウスに L-AA (アストロサイト活性化阻害薬) または minocycline (ミクログリア活性化阻害薬) を前処理し、10 pmol のスルファチドをマウス脊髄髄腔内に投与した (Fig. 15)。

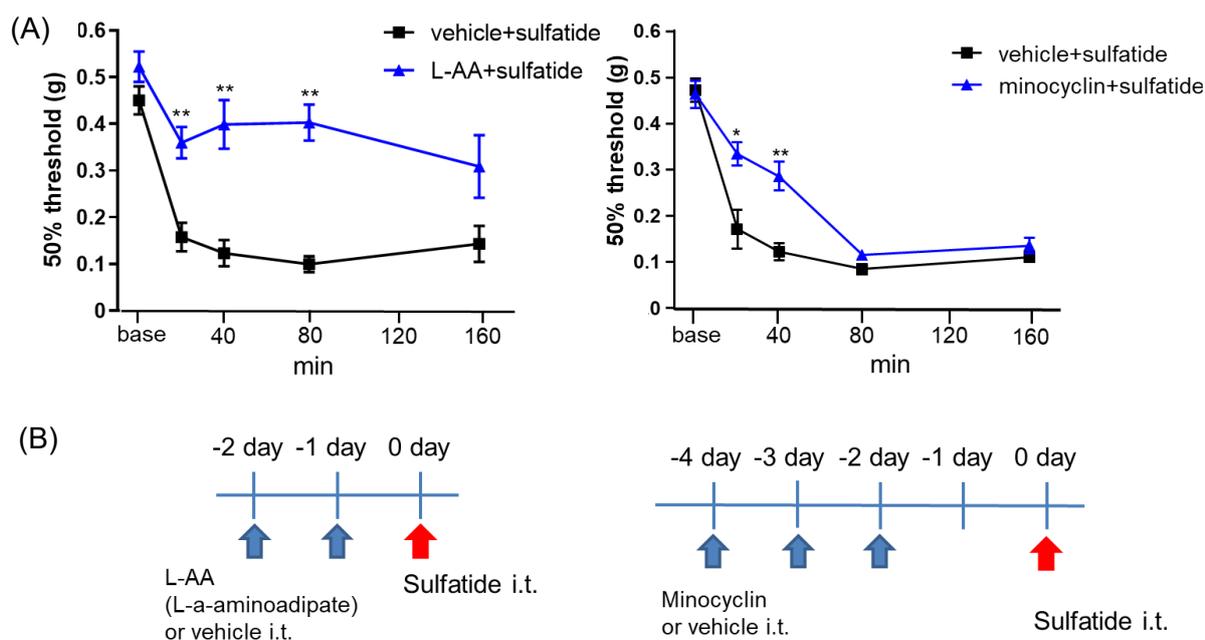


Fig. 15 グリア細胞活性化阻害薬のスルファチドによる機械的アロディニアに対する効果

(A) アストロサイト活性化阻害薬L- α -amino adipate (L-AA, 30 nmol) をスルファチド投与の1日前と2日前に投与した後、10 pmolスルファチドを脊髄髄腔内投与すると機械的アロディニアが抑制された。ミクログリア活性化阻害薬minocycline (50 nmol) をスルファチド投与の2、3、4日前投与した (Schreiber *et al.*, 2008のプロトコルを参考にした)。Minocycline の前処理はスルファチドによる機械的アロディニアを減弱させた。(B) に投与スケジュールを示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test, $n = 6$ mice per group.

L-AA と minocycline は共に、スルファチド投与後 20 分におけるスルファチドによる機械的アロディニアを緩和した。しかし、L-AA の機械的アロディニア抑制効果は 160 分以上持続するのに対し、minocycline の抑制効果は短時間であった。スルファチド投与後 80 分で、minocycline による機械的アロディニア抑制効果は急激に低下し、160 分までに minocycline 前処置マウスの機械的アロディニアは対照群マウスの閾値と変わらなくなった (Fig. 15)。これらのことからスルファチドは脊髄のミクログリアとアストロサイトの両方を活性化することが示されたが、ミクログリア活性化の寄与は部分的かもしれない。次に、スルファチド投与 40 分後にアストロサイトマーカーである GFAP と、ミクログリアマーカーである Iba-1 の発現をウェスタンブロッティングで評価した。定量的解析の結果、GFAP の発現は増加していた。一方、Iba-1 は対照群と比較し差はなかった (Fig. 16)。さらに共焦点顕微鏡で脊髄を抗 GFAP 抗体で染色して観察したところ、スルファチド投与 40 分後 GFAP の発現は増加していた (Fig. 17)。これらの結果からスルファチドが脊髄においてアストロサイトを活性化することが示された。GFAP が増加している理由の 1 つとして、GFAP の分解が抑制されていることが考えられる。

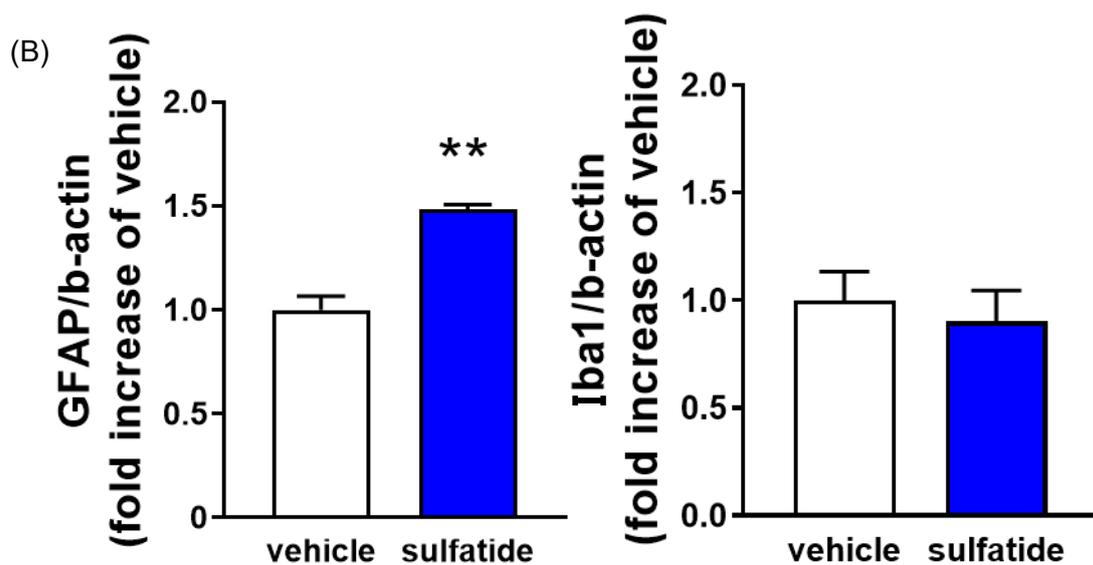
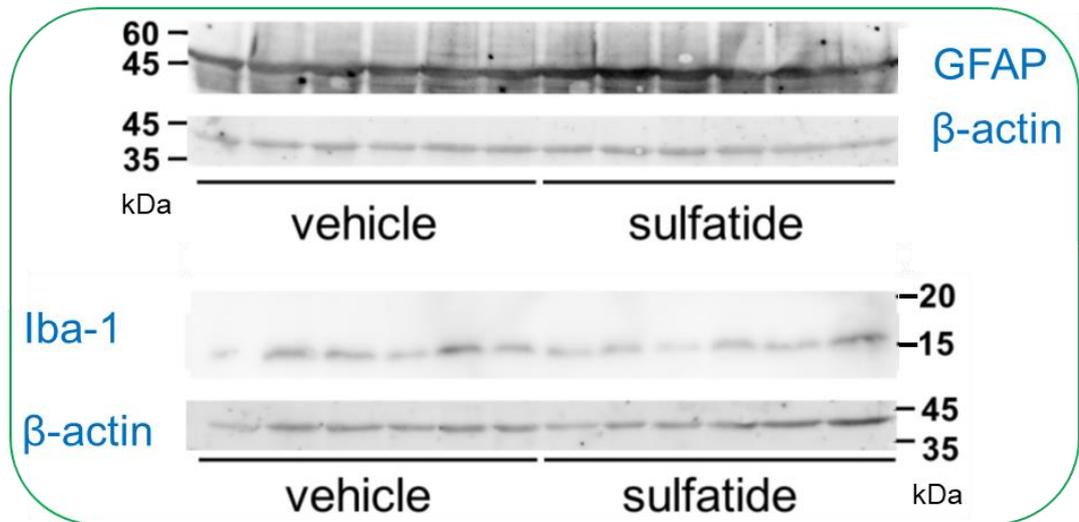


Fig. 16 スルファチド投与後の脊髄におけるGFAPおよびIba1発現のウェスタンブロット解析

10 pmol スルファチドの脊髄髄腔内投与40分後、脊髄腰部膨大部を採取し、ウェスタンブロットに供し、抗GFAP抗体と抗Iba-1抗体により各タンパク質の発現量を解析した。(A)はウェスタンブロット像。(B)グラフはウェスタンブロットからのGFAPとIba-1の定量を示す。各バンドはβ-Actinの発現量に対して標準化した。スルファチドはGFAPの発現を増加させたが、Iba-1の発現は増加させなかった。 ** $P < 0.01$ vs. vehicle, unpaired Student's t test, $n = 6$ mice.

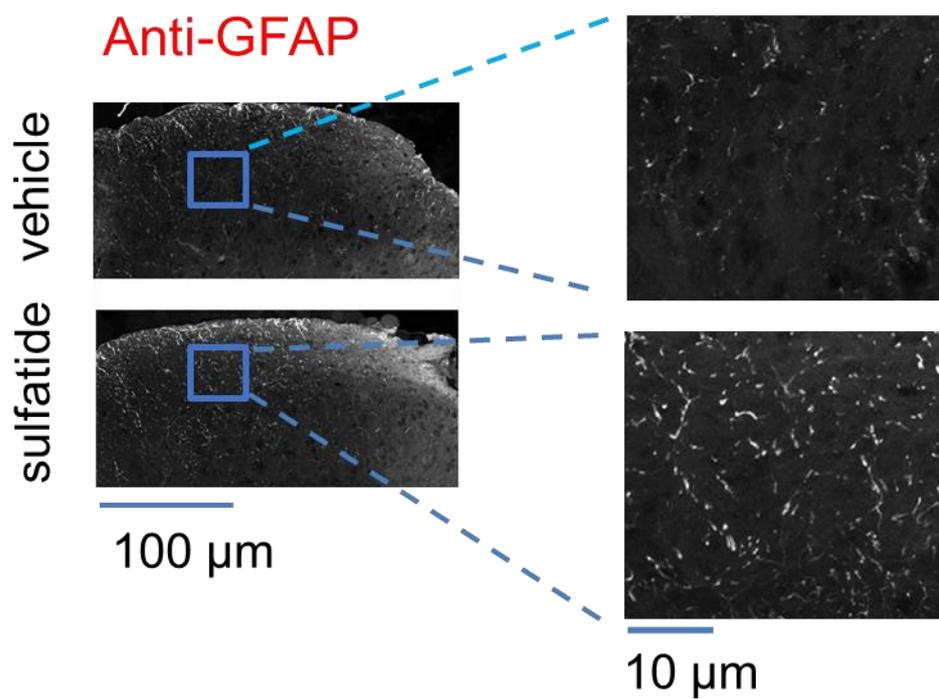


Fig. 17 スルファチド投与による脊髄におけるGFAPの発現

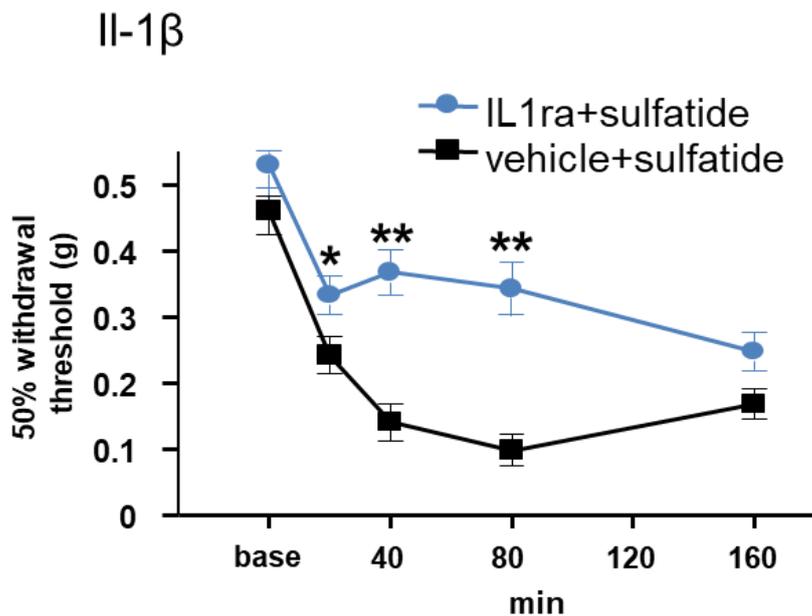
脊髄髄腔内への10 pmolスルファチド投与40分後の、脊髄1, 2層におけるGFAPの形態を抗GFAP抗体を用いた染色により観察した。スルファチド投与によりvehicleと比べ抗GFAP抗体の染色性が増加した。

2.3.2 スルファチドが炎症性サイトカイン IL-1 β および TNF- α の

mRNA 発現に関与するか

脊髄の活性化されたグリア細胞は、炎症性サイトカインや NO などの様々な炎症性メディエーターを放出することが知られている。炎症性疼痛時には、脊髄の TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの mRNA が上昇する (Raghavendra *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014)。これらの炎症性サイトカインは慢性疼痛時の中枢神経系における痛みの感受性を制御している (Samad *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2007)。そこで、TNF- α 阻害薬の SPD-304 (TNF- α が三量体となることを抑制することで TNF- α と受容体との相互作用を阻害する、He *et al.*, 2005) と IL-1 β の受容体に対する阻害タンパク質の interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) をマウスに脊髄髄腔内投与し、炎症性サイトカインがスルファチドによる機械的アロディニアに関与する可能性を検討した。SPD-304 と IL-1ra はスルファチドによって誘発された機械的アロディニアを減少させた (Fig. 18)。また、RT-PCR により、スルファチド投与後 80 分以降に脊髄における TNF- α および IL-1 β の発現が増加する傾向が認められ、160 分後には有意に上昇することが明らかとなった (Fig. 19A)。さらに、炎症性サイトカインの遺伝子発現の増加が疼痛に関与するかを検討するため、スルファチド投与 160 分後に SPD-304 を投与すると、スルファチドが誘発する機械的アロディニアが抑制された (Fig. 19B)。従って、炎症性サイトカインの遺伝子発現の増加により産生されたサイトカインは、スルファチドが誘発する機械的アロディニアに関与することが示唆された。

(A)



(B)

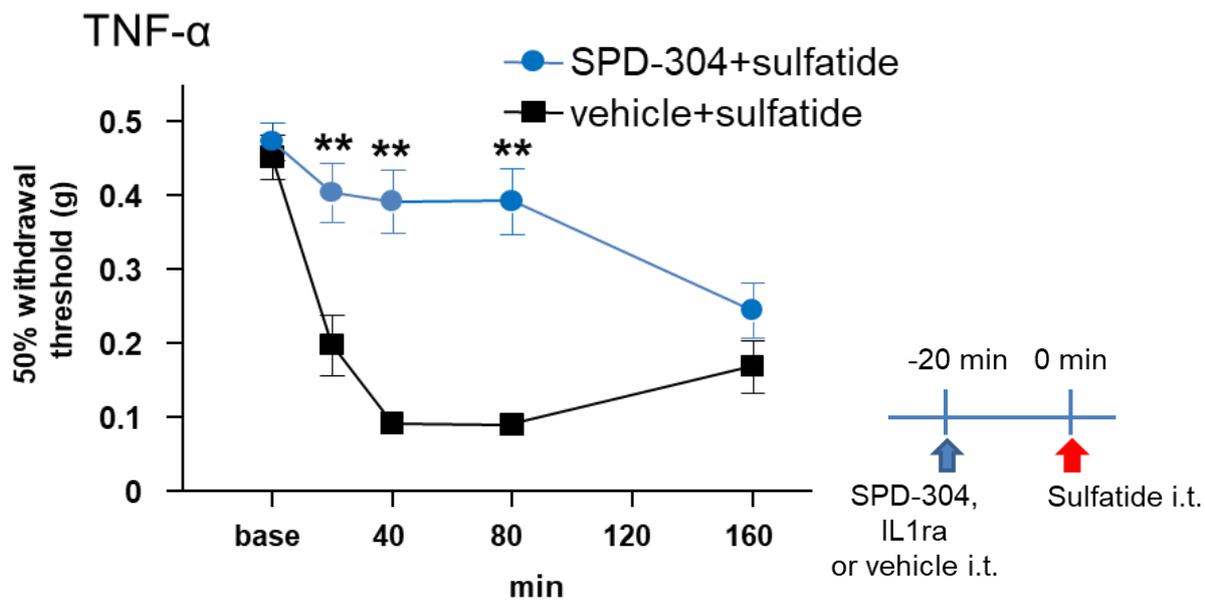


Fig. 18 サイトカイン阻害薬のスルファチドによる機械的アロディニアに対する効果
(A) TNF- α 阻害薬 SPD-304 (500 pmol) または IL1 β 阻害薬 IL1ra (1 ng)、vehicleを脊髄髄腔内投与し、20分後に10 pmolのスルファチドを投与し、von Frey testを行った。SPD-304とIL1raは、それぞれスルファチド投与後の機械的アロディニアを減弱させた。また、(B) のスケジュールに従って薬物を投与した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test, $n = 6$ mice.

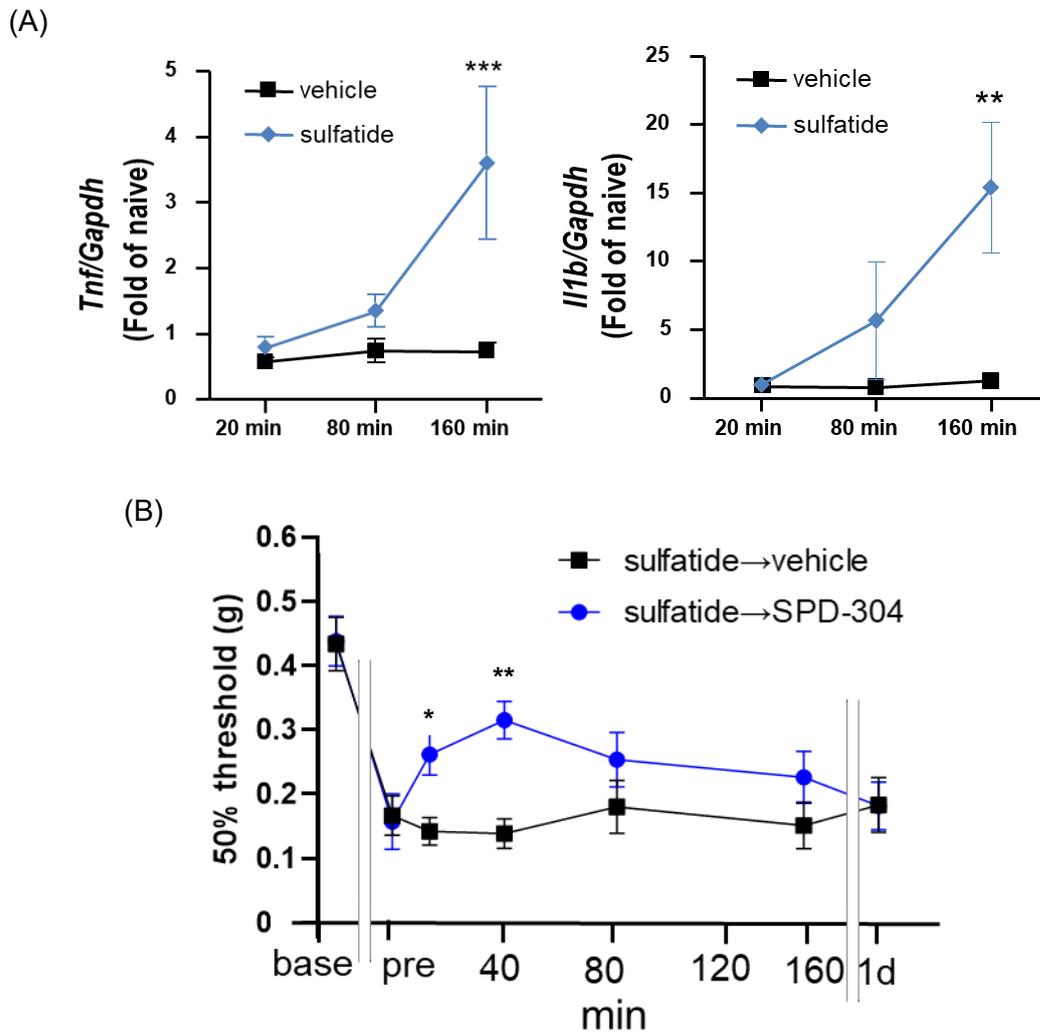


Fig. 19 スルファチド投与後のサイトカイン遺伝子の発現上昇

(A) 10 pmolスルファチドの脊髄髄腔内投与後のIL-1 β およびTNF- α mRNA発現のRT-PCRによる定量化。発現量は、*Gapdh*で標準化した。*Tnf- α* と*Il1b*の発現はスルファチド投与の80分後には増加傾向を示し、160分後に有意に増加した。(B) 10 pmolスルファチド投与160分後のSPD-304 (500 pmol) 脊髄髄腔内投与の効果。図中のpreは、10 pmolスルファチド投与後120分の値である。SPD-304はスルファチド投与後160分に投与し、SPD-304投与後の時間をグラフに示した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle, two-way ANOVA, followed by Dunn's multiple comparison test. $n = 8$ mice per group (A). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test, $n = 6$ mice per group (B).

2.3.3 スルファチドによる機械的アロディニアはNOの産生を必要とするか

次に、スルファチドが NO の産生を誘発するかを調べた。まず非選択的 NOS 阻害薬である L-NAME を前投与し、次にスルファチドを投与した。L-NAME 存在下では、スルファチドは機械的アロディニアを誘発しなかった (Fig. 20A)。一方、NO 依存的に活性化する可溶性グアニル酸シクラーゼ (Soluble guanylyl cyclase, sGC) 阻害薬である ODQ も同様にスルファチドによる機械的アロディニアを抑制した (Fig. 20B)。更に NOS アイソザイム特異的阻害薬である nNOS 選択的阻害薬 NPA、eNOS/nNOS 阻害薬 7-NI、iNOS 選択的阻害薬 1400W もスルファチドが誘発する機械的アロディニアを抑制した (Fig. 21A)。これらの結果は、スルファチドが NO-cGMP 経路を活性化することを示唆している。さらに、スルファチド投与後の脊髄において NOx 濃度が増加した (Fig. 21B)。すなわち、スルファチドが NOS 活性化を介し NO 産生を増加させ、機械的アロディニアを誘発することを明らかにした。次に、NOS 阻害薬 L-NAME のサイトカイン遺伝子発現への影響を検討した。L-NAME はスルファチドによる TNF- α と IL1b の遺伝子発現の増加を抑制した (Fig. 22)。これらの結果から、スルファチドによるサイトカイン遺伝子発現には、NO の産生が重要であることが明らかになった。

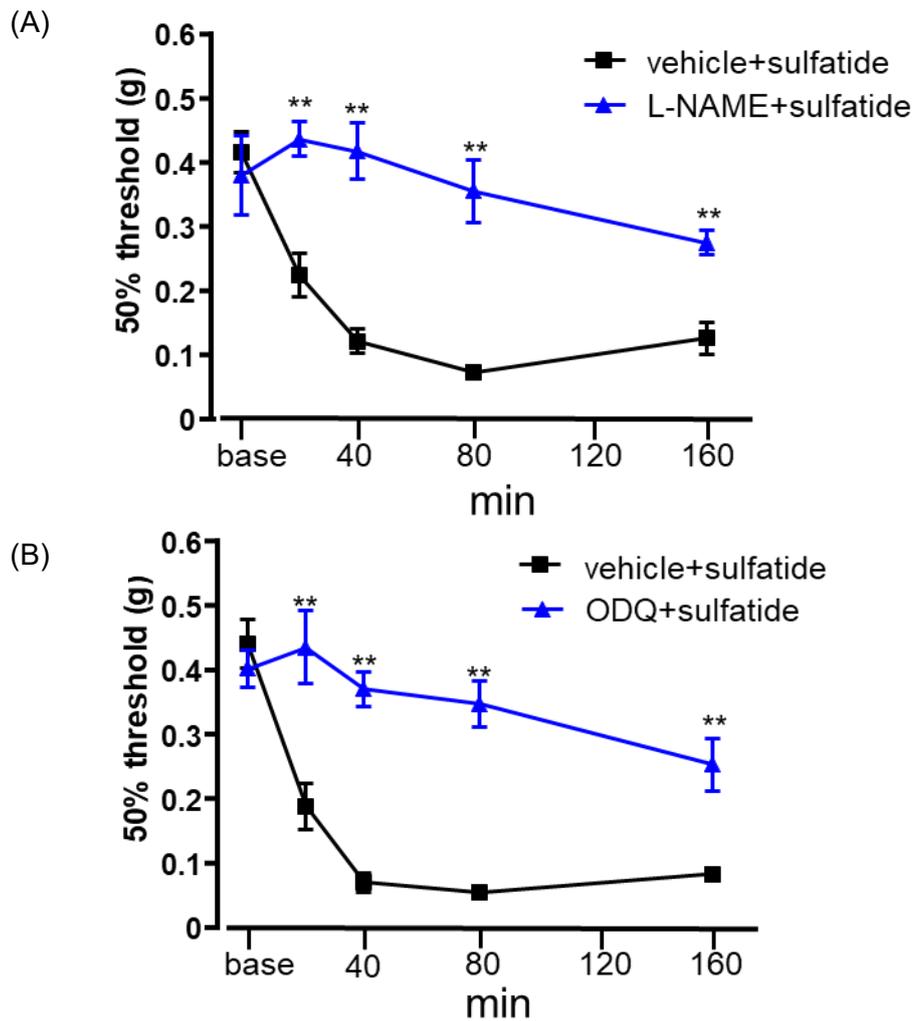


Fig. 20 スルファチド投与後の機械的アロディニアへのNOの関与

NOS阻害薬である 100 nmol L-NAME (A) または cGMP阻害薬50 nmol ODQ (B) を脊髄髄腔内への10 pmolスルファチド投与の20分前に投与したところ、スルファチドによる機械的アロディニアは抑制された。 ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test, $n = 6$ mice per group.

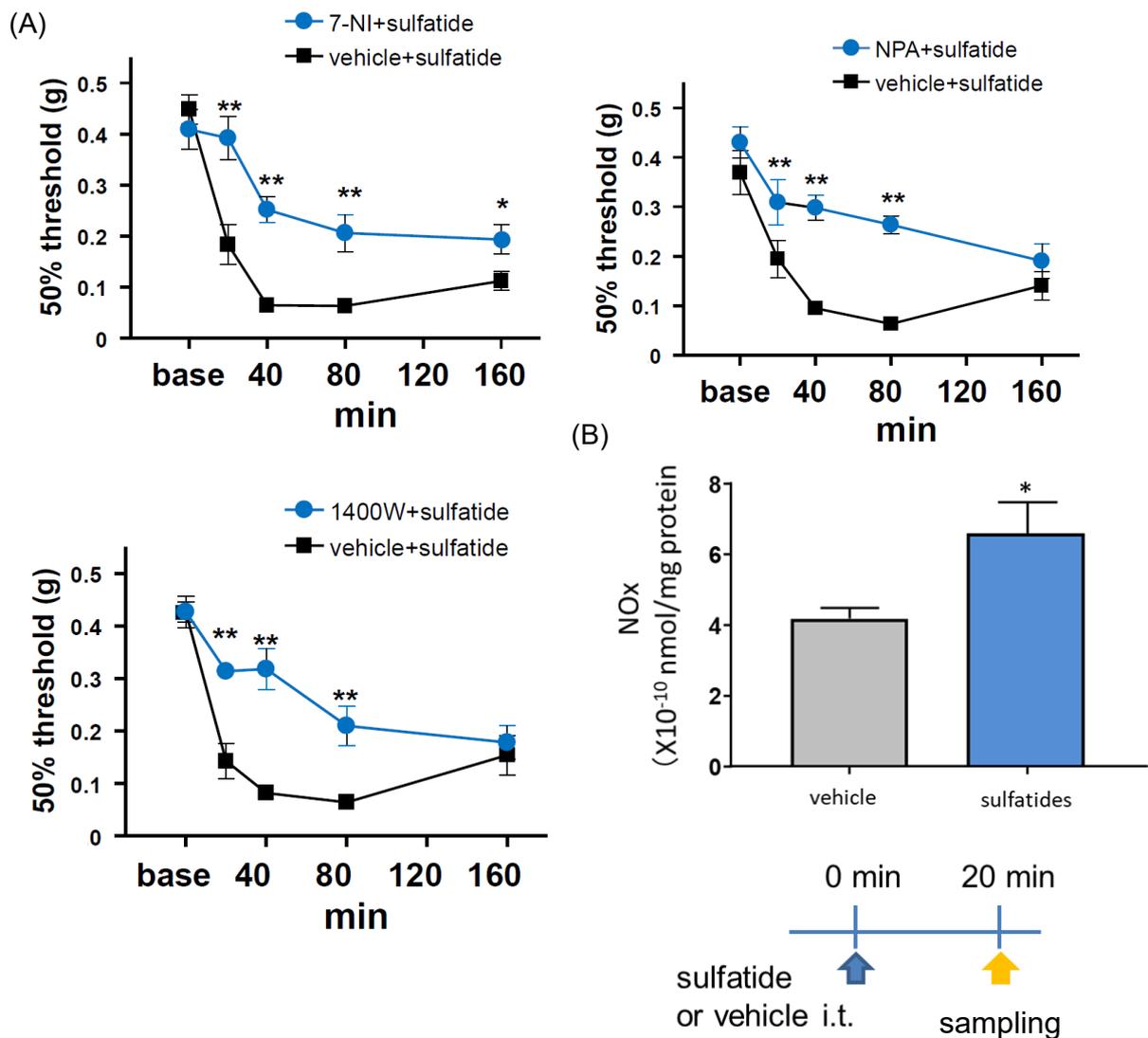


Fig. 21 スルファチド投与後の機械的アロディニアへのNOの関与

(A) アイソザイム特異的NOS阻害薬である50 nmol 7-NI、100 nmol Nw-Propyl-L-arginine (NPA)、100 nmol 1400Wを脊髄髄腔内への10 pmolスルファチド投与の20分前に投与したところ、スルファチドによる機械的アロディニアは抑制された。(B) スルファチド投与20分後に脊髄ホモジネート中の窒素酸化物量は増加した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test $n = 6$ mice per group (A), * $P < 0.05$ vs. vehicle, unpaired Student's t test, $n = 12$ mice (B).

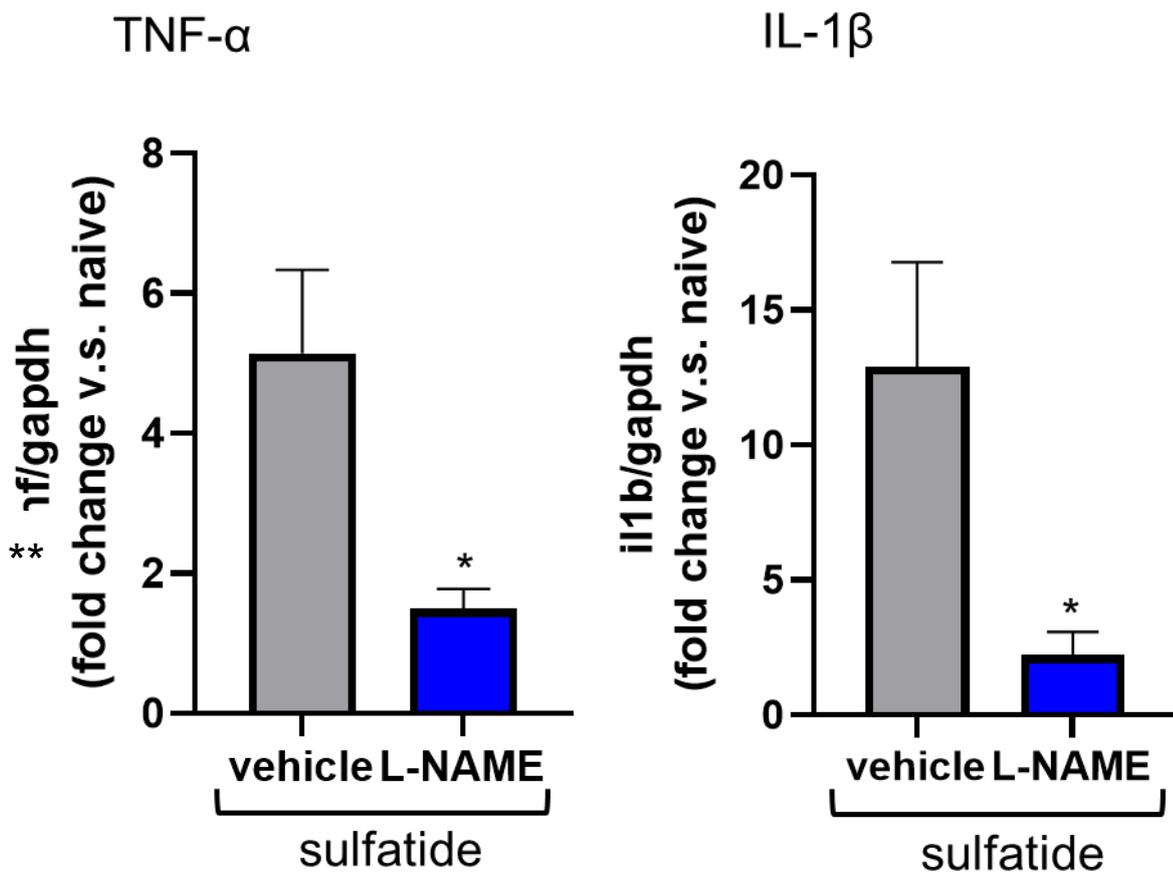


Fig. 22 スルファチドによる炎症性サイトカイン遺伝子発現増加におけるNOS阻害薬による抑制

10 pmol スルファチド投与20分前に100 nmol L-NAMEを投与した(両者ともに脊髄髄腔内投与)。スルファチド投与160分後に脊髄を採取して定量的PCRを行った。L-NAMEにより炎症性サイトカインTNF- α 、IL-1 β の遺伝子発現の上昇は抑制された。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs. vehicle, unpaired Student's *t* test, $n = 8$ mice.

2.3.4 炎症性疼痛における脊髄スルファチドの定量

次に、CFAによる炎症性疼痛時の脊髄のスルファチド量を測定した。まず脊髄のホモジネートから中性脂質を DEAE カラムによって除去した。なお、脊髄より調整した中性脂質画分にはスルファチドと GM3 は検出されず、両者は酸性画分に回収される。また、脊髄の糖脂質組成から、豊富なスルファチドに比べると内在性の GM3 ガングリオシドは微量であるため、外部から脊髄サンプルへと添加した GM3 の測定にほとんど影響を与えない。そこで、GM3 ガングリオシドを内部標準として脊髄ホモジネート中に添加した。GM3 ガングリオシドから回収率を算出したところ、それぞれ、CFA 投与マウスの右側 (投与した後肢と同側) 脊髄は $73.7 \pm 2.8\%$ 、naïve マウスの右側は $74.1 \pm 4.9\%$ 、CFA 投与マウスの左側は $75.2 \pm 6.7\%$ 、naïve の左側は $79.4 \pm 7.3\%$ ($n=5$) であった。マウスの脳では、胎生後期以降に *Gal3st1* mRNA の発現が増加するが、生後まもなくから顕著なスルファチドの蓄積が観察される (Ngamukote *et al.*, 2007) ため、*Gal3st1* mRNA の発現上昇がスルファチドの蓄積に数日先行して起こると考えられる。そこで、CFA 投与 1 日後の *Gal3st1* 発現増加の数日後にスルファチド測定を行った。CFA 投与 7 日後の脊髄より酸性脂質画分を調整後、脱塩を行い、薄層クロマトグラフィーで展開した。展開された脂質をオルシノール硫酸 (糖を呈色させる) により染色し、スルファチドと内部標準として用いた GM3 を定量した。その結果、CFA を投与した足と同側のスルファチドが有意に増加していることが明らかとなった。対側の脊髄でもスルファチドの量は増加する傾向を示したが、有意な差は認められなかった (Fig. 23)。

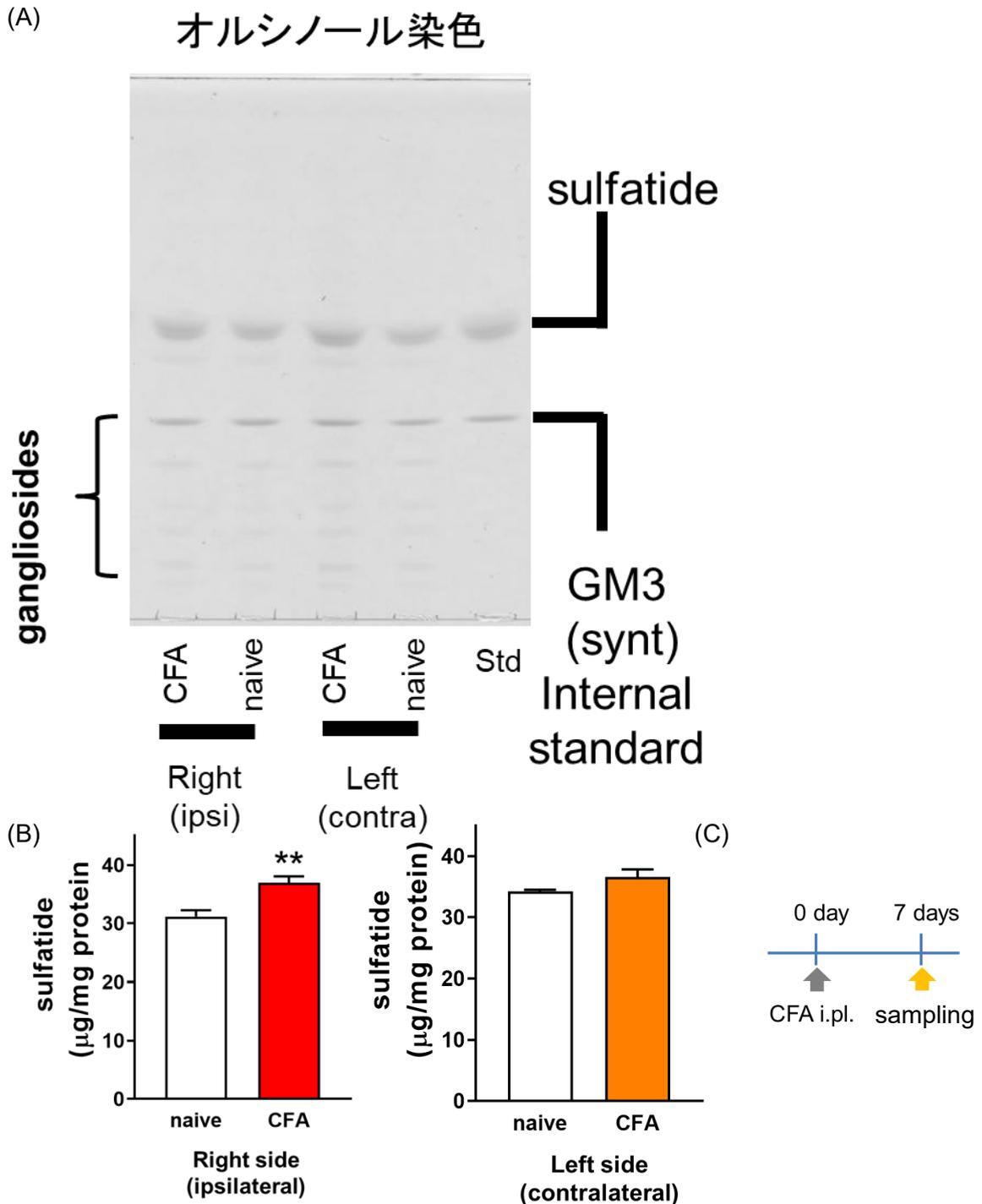


Fig. 23 炎症性疼痛時の脊髄のスルファチド

(A) CFA投与7日後の脊髄におけるスルファチド含量を示す薄層クロマトグラム代表例。展開後、TLCプレートはオルシノールで糖染色した。Stdは、1.2 µg 脳由来スルファチドと1.5 µg 合成GM3ガングリオシドである。各サンプルは内部標準として合成GM3ガングリオシドを含む。(B) CFA投与7日後の脊髄のスルファチドの定量化。スルファチド含量はタンパク質含量で標準化した。(C) のタイムコースで脊髄を採取した。** $P < 0.01$ vs. naive, unpaired Student's t -test, $n=5$ experiments.

2.3.5 スルファチド結合タンパク質セレクチンは機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏に関与するか

スルファチドが機械的アロディニアと熱痛覚過敏を惹起するメカニズムを調べるために、セレクチン阻害薬 **bimosiamose (BIMO)** (Kogan *et al.*, 1998) を用いた。セレクチンはスルファチドの生体内結合タンパク質として知られる分子である (Varki, 1994)。BIMO をスルファチド投与の 30 分前に投与すると、スルファチドによる機械的アロディニアと熱痛覚過敏は抑制された (Fig. 24)。更に、セレクチンが炎症性疼痛に関与しているかどうかを調べるために、CFA 投与 7 日後のマウスに BIMO を投与した。その結果、BIMO は炎症性疼痛時の機械的アロディニアを抑制したことから、セレクチンが炎症性疼痛に関与していることが示唆された (Fig. 25A)。一方、BIMO 単体では naïve マウスの疼痛行動に影響を与えないことが明らかになった (Fig. 25B)。

次に、スルファチドによる炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇にセレクチンが関与しているか検討した。その結果、スルファチド脊髄腔内投与による IL-1 β の遺伝子発現の増加は BIMO によって抑制され、TNF- α も減少傾向を示した (Fig. 26)。

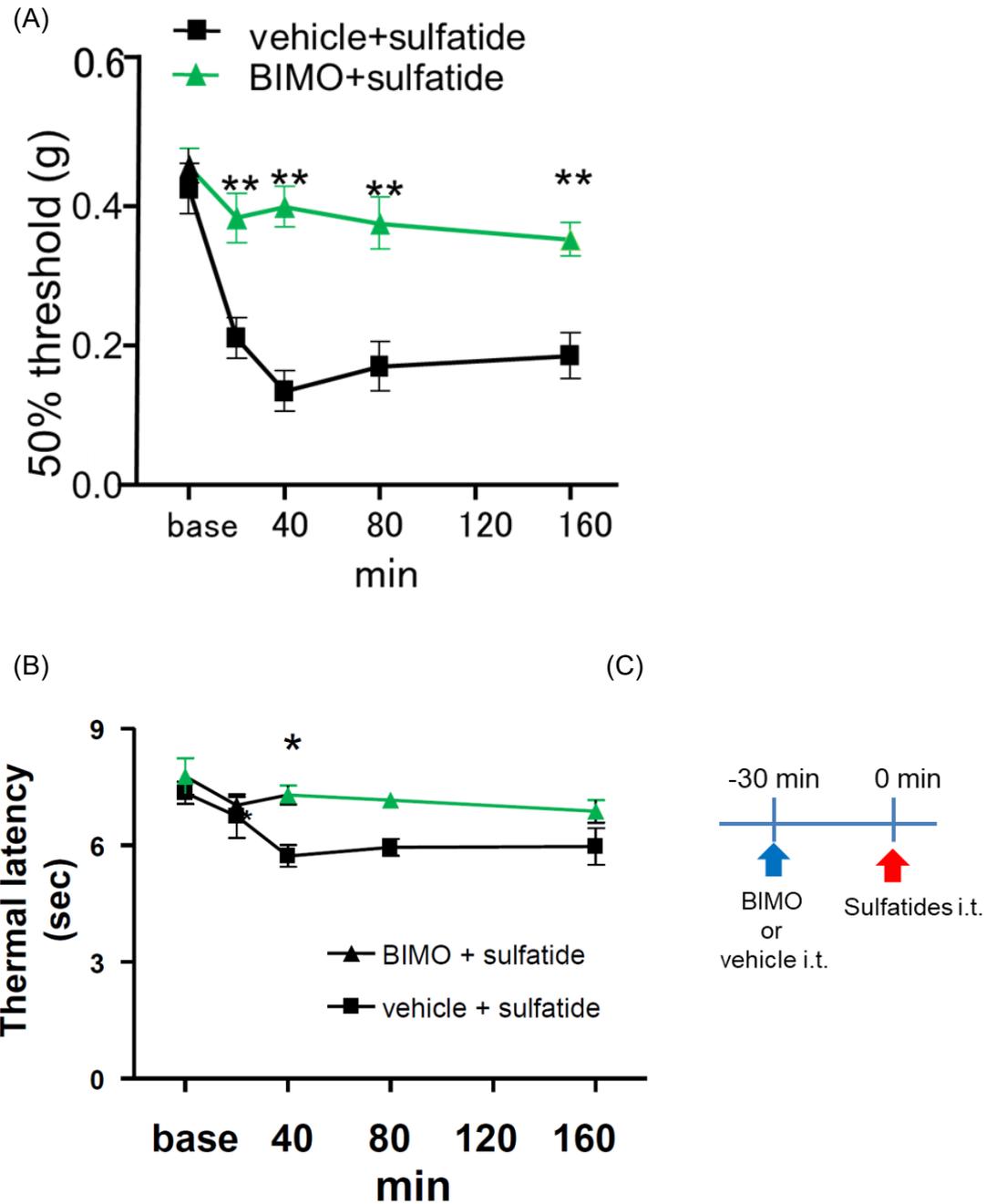


Fig. 24 セレクション阻害薬のスルファチドより惹起される機械的アロディニアに対する効果

BIMOはスルファチドの機械的アロディニアをブロックし、炎症性疼痛を減少させた。脊髄髄腔内へ500 pmol BIMOを投与した30分後、同じく脊髄髄腔内へ10 pmolスルファチドを投与した。BIMOは機械的アロディニア (A) および熱痛覚過敏 (B)を抑制した。(C) 投与スケジュールを示した。 ** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U-test; $n = 6$ mice per group (A), unpaired t -test; $n = 6$ mice per group (B).

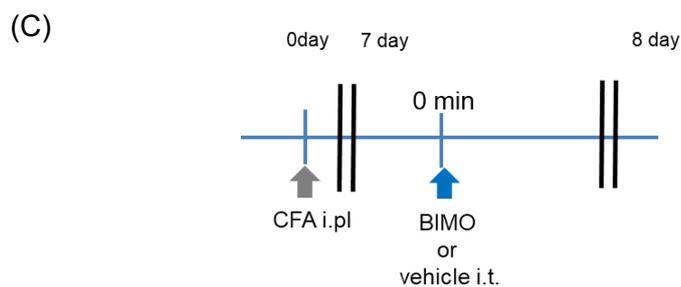
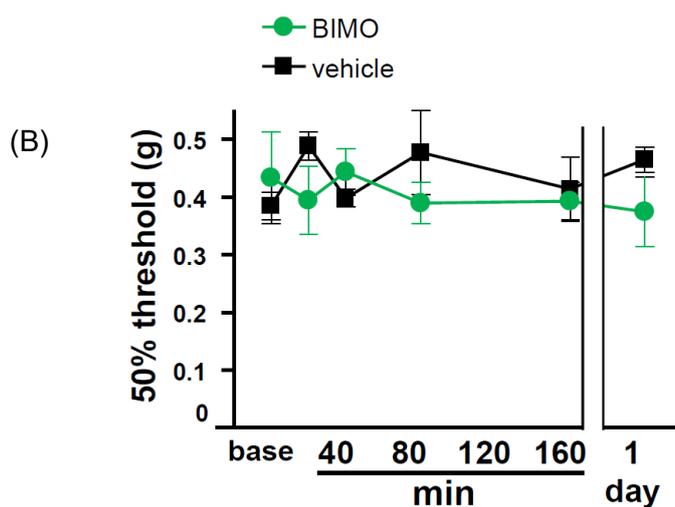
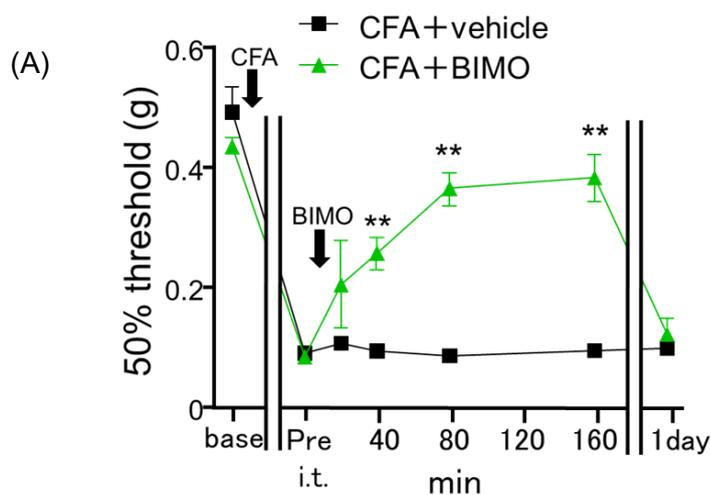
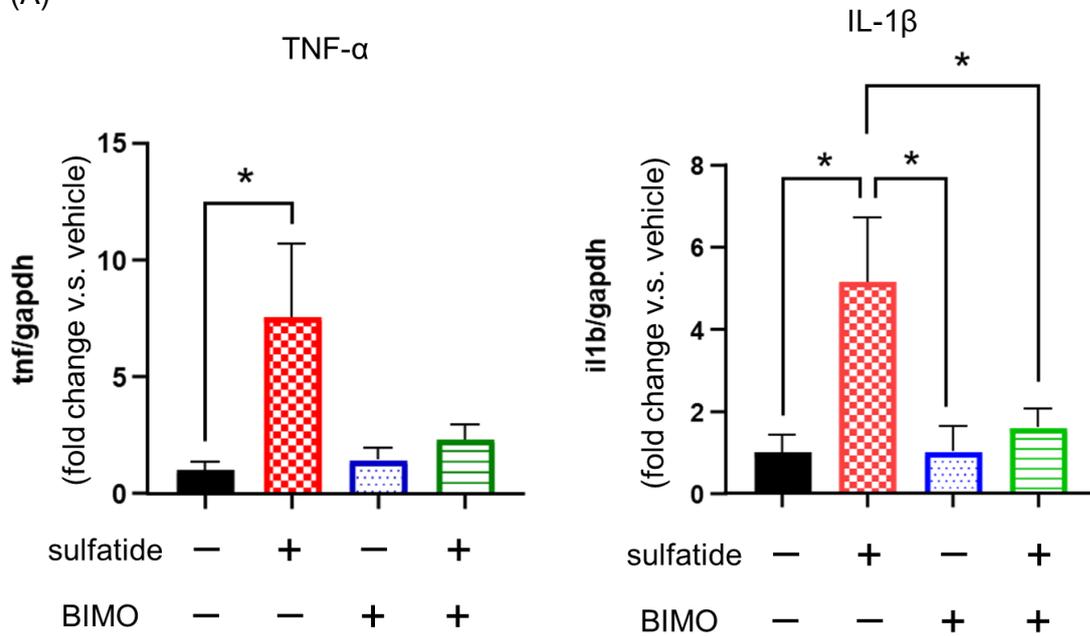


Fig. 25 セレクチン阻害薬のCFAにより惹起される炎症性疼痛に対する効果

(A) 右後肢に完全フロイントアジュバント(CFA)を投与してから7日後に500 pmol BIMOを投与した際の機械的アロディニア。BIMOはCFAによって誘発された機械的アロディニアを緩和した。(B) BIMOはnaïveマウスのvon Frey フィラメントによる疼痛閾値に影響を与えなかった。(C) に投与スケジュールを示した。** $P < 0.01$ vs. vehicle, Mann-Whitney U -test, $n = 6-7$ (A), $n = 6$ (B) mice per group.

(A)



(B)

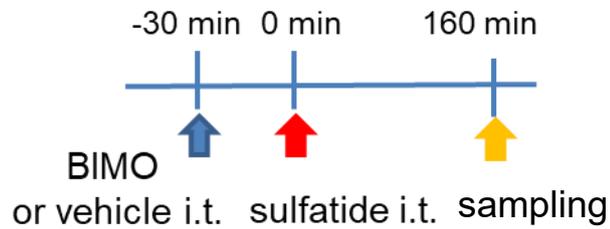


Fig. 26 セレクチン阻害薬によるスルファチド投与後の炎症性サイトカイン遺伝子発現上昇の抑制

500 pmol BIMOを脊髄髄腔内投与後、30分で10 pmol スルファチドを脊髄髄腔内投与し、その160分後に脊髄の炎症性サイトカインの遺伝子発現量を測定した。BIMOはサイトカインの遺伝子発現の上昇を抑制した。* $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Turkey multiple comparison test, $n = 8$ mice per group.

2.4 考察

2.4.1 スルファチドによるアロディニアにグリア細胞およびサイトカインが

関与する

第一章においては、スルファチド合成酵素遺伝子が、炎症による疼痛時に脊髄で発現上昇することを明らかにした。本章では、スルファチドによる機械的アロディニアが、脊髄におけるセレクトインの活性化、グリア細胞の活性化、NOの産生を介して起こることを明らかにした。皮膚の炎症は、動物モデルにおいて脊髄のグリア細胞活性化を引き起こし (Raghavendra *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2013)、グリア細胞の増殖、肥大、炎症性サイトカイン遺伝子発現、およびNOの放出を誘導することが知られている (Samad *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015; Ueda *et al.*, 2018)。これらの分子の放出や産生は、脊髄のシナプス伝達の変化と、さらなるグリア活性化につながる。 *In vitro*において、スルファチド処理は、培養ミクログリアおよびアストロサイトにおけるNO産生、炎症性サイトカイン放出、およびNF- κ B活性化の増加をもたらすことが示されている (Jeon *et al.*, 2008) ことから、アストロサイト活性化阻害薬であるL-AAがスルファチドによる機械的アロディニアを抑制した本研究結果は、スルファチドが脊髄のアストロサイトを活性化することを強く示唆する (Fig. 15)。炎症性疼痛において、活性化したグリアにより産生される炎症性サイトカインTNF- α とIL-1 β が関与していることが広く知られている (Raghavendra *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Weyerbacher *et al.*, 2010)。アストロサイトが活性化されると、TNF- α の産生をもたらし、TNF- α 自身を含む炎症性サイトカインのさらなる発現を誘導する (Dvorientchikova and Ivanov, 2014; Sanz and Garcia-Gimeno, 2020)。産生されたTNF- α は脊髄においてNMDA受容体やAMPA受容体の細胞表面への移行を促し (Olmos and Lladó, 2014)、神経細胞を興奮させることで疼痛を増強する。本研究では、TNF- α 阻害薬 SPD-304 (He *et al.*, 2005) やIL-1阻害薬IL-1raは、スルファチドによ

る機械的アロディニアを阻害することを示した (Fig. 18)。スルファチドを脊髄髄腔内投与すると、TNF- α mRNAの発現とIL-1 β mRNAの発現も増加した (Fig. 19A)。さらに、スルファチド投与により有意に遺伝子発現が上昇した後、SPD-304を脊髄髄腔内投与しても機械的アロディニア抑制効果を示したことから (Fig. 19B)、mRNAの転写を介したこれらのサイトカインの産生は、スルファチドによる機械的アロディニアの持続に重要である可能性が考えられる。しかしながら、サイトカインの阻害薬によりスルファチド投与20分後からアロディニアが抑制されたが、この時点ではmRNA量の増加は認められなかった。そのため、スルファチド投与20分後のサイトカインタンパク質の増加をELISA等により検討する必要がある。

一方で、minocycline はスルファチドによる機械的アロディニアを抑制したが、L-AA よりも作用持続期間が短く、80分後には vehicle 前投与と同程度の値を示した (Fig. 15)。今回用いた minocycline の投与量では、慢性疼痛モデルにおいて鎮痛作用を有することが報告されている (Schreiber *et al.*, 2008)。しかしながら、スルファチドによるミクログリアの活性化を抑制するのに十分な量であるか不明であるため、ミクログリアの関与を明確にするためには、さらなる検討が必要である。また、Fig.16 からスルファチド投与によって脊髄における Iba-1 発現量の変動は認められなかったため、Iba-1 以外の指標によりミクログリアの活性化を評価することが有効である。すなわち、サイトカインはミクログリアが活性化した際に放出される (Hanisch, 2002) ことから、スルファチド投与後、サイトカインが増加することを確認し、minocycline が抑制できるかを検討することで、minocycline の投与量が適切であるかを判断する。また、活性型ミクログリアは、炎症性の M1 と抗炎症性の M2 の活性型が存在する。minocycline は、M1 ミクログリアのマーカー (CD86、CD68) の発現を抑制し、IL-1 β 、TNF- α 、Interferon- γ の産生を抑制する (Kobayashi *et al.*, 2013) ことが知られて

いるため、M1 ミクログリアの抑制を介してスルファチドによる機械的アロディニアを抑制したと考えられる。

2.4.2 スルファチドによる機械的アロディニアにNOが関与する

本研究では、NOS阻害薬L-NAMEで前処理すると、スルファチドによる機械的アロディニアが抑制された (Fig. 20A)。また、sGC阻害薬のODQが、L-NAMEと同様に機械的アロディニアを抑制した (Fig. 20B)。さらに、選択的nNOS阻害薬、iNOS阻害薬、nNOS/eNOS阻害薬もスルファチドによる機械的アロディニアを抑制した (Fig. 21A)ことから、cGMP産生も3つのNOSアイソザイムを介して産生されるNOによって活性化される必要があることが示唆された。これらの結果は、スルファチドが脊髄のNOSを活性化することを示しており、実際に、スルファチド投与後の脊髄中のNOx濃度も増加していた (Fig. 21B)。このように、スルファチドはNOの産生を誘導し、脊髄のNO-cGMP 経路を活性化し、その結果、機械的アロディニアを引き起こすと思われる。また、sGCはラット脳においてミクログリア、アストロサイトに発現していることが報告されている (Ding *et al.*, 2004) ため、スルファチドによりグリア細胞のsGCが活性化されている可能性が考えられる。続いて、NOS活性化とサイトカイン遺伝子発現の関係についても検討した。L-NAMEはサイトカイン遺伝子発現を抑制したことから (Fig. 22)、スルファチドがNO産生を活性化し、それがサイトカイン遺伝子発現を誘導していることが明らかとなった。以上から、炎症性疼痛で発現が増加したGAL3ST1によりスルファチド生合成量が増加することがNO産生の一因となることが本研究で示唆された。しかし、スルファチドがNOSの活性や発現量に直接影響を与えるかは検討する必要がある。

2.4.3 スルファチドによる機械的アロディニアにセレクチンが関与する

スルファチドはセレクチンファミリーの内因性のリガンドである (Imai *et al.*, 1990)。その中の一つ、L-セレクチンと糖鎖の相互作用には、糖鎖のスルホン化が必要である。したがって、スルホン化されていない糖脂質であるGalCerはL-セレクチンに対し親和性が低い (Imai *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1993)。これらの研究や、GalCerが侵害受容行動に影響を及ぼさないという今回の結果から、スルファチドがセレクチンと相互作用することで痛みを引き起こした可能性が考えられる。そこで、セレクチン阻害薬BIMOの効果を検討した。その結果、BIMOはスルファチド誘発性の機械的アロディニアと熱痛覚過敏を抑制した (Fig. 24)。BIMOは熱的痛覚過敏をスルファチド投与後40分から80分で抑制し、機械的アロディニアでは抑制効果がスルファチド投与後少なくとも160分持続した。このように、スルファチド-セレクチンシグナルは熱痛覚過敏および機械的アロディニアの両方に関与していることが明らかとなった。Laudannaらは、スルファチドがL-セレクチン発現白血球の細胞内カルシウムの上昇と炎症性サイトカインのmRNAの増加を引き起こすことを報告している (Laudanna *et al.*, 1994)。また、スルファチドで処理したT細胞はAktを活性化するが、L-セレクチンノックアウト細胞ではこのAkt活性化は認められない (Duchesneau *et al.*, 2007)。これらの研究は、セレクチンが細胞接着分子としてだけでなく、細胞内シグナル伝達を媒介する受容体としても働いていることを示している。本研究においても (Fig. 26)、BIMOの脊髄髄腔内投与により、スルファチドによるサイトカイン遺伝子の発現上昇が抑制されることが示され、スルファチド-セレクチンの相互作用は脊髄においても細胞内シグナル伝達系を作動させる受容体としての働きを有していることが示唆された。L-セレクチンはアストロサイトにも発現していることが報告されており (Jeon *et al.*, 2008; Sergent-Tanguy *et al.*, 2006)、今回の検討から、脊髄のスルファチドがL-セレクチン依存性のメカニズムでアストロサイトを活性化した可能性が考えられる。スルファチ

ドが直接セレクチンを介して脊髄アストロサイトを活性化するかは、セレクチンノックアウトマウスを用いて、スルファチドのアストロサイト活性化能を検討することで明らかになると考えられる。また、スルファチドはCD1dやToll-like receptor 4に結合することが知られている (Capelluto, 2022) ため、セレクチン同様、スルファチドが疼痛を引き起こすメカニズムに関与している可能性がある。しかしながら、セレクチンの阻害剤であるBIMOの前投与により、スルファチド投与による機械的アロディニアはbaselineと同等な程度まで回復したことから、セレクチンが主な作用点であると考えられる。

本研究ではCFA投与後、脊髄においてスルファチドが増加することを明らかにした (Fig. 23)。更にCFA投与マウスの機械的アロディニアに対してもBIMOが著効することを明らかにした (Fig. 25A)。このことは皮膚炎症により脊髄で増加したスルファチドが、セレクチンを介して炎症性疼痛に関与していることを示唆している。Qiuらは、長期間 (少なくとも数ヶ月)のスルファチド欠乏がアストロサイトとミクログリア両方の活性化につながることを示した (Qiu et al., 2021)。しかし、スルファチドが数日以内に、あるいはそれ以前に炎症反応を活性化させるかどうかについては不明である。第一章において、Gal3st1の発現がCFA投与1日後に増加し、CFA投与15日後に減少することを見出した。これらの結果から、スルファチド量が一定の値から外れるとグリア細胞が炎症反応を示す可能性がある。

一方で、スルファチドはMLDにおける脳脊髄液において増加することが、脂質をTLC上で分離後スルファチドに対する抗体により検出することで明らかにされている。また、スルファチドは多発性硬化症患者の血中で上昇することがLC-MS/MSを用いた研究により報告されているため、バイオマーカーとして診断に有用であることが示唆されている (Dali et al., 2015; Moyano et al., 2013)。MLDは、スルファチド分解酵素であるアリルスルファターゼAの欠損により発症する、常染色体劣性遺伝形式を示

す遺伝病で、脳白質、末梢神経、腎臓などにスルファチドが蓄積し、中枢および末梢神経障害をきたす。また、多発性硬化症はスルファチドを豊富に含むミエリンが障害を受ける (Dali *et al.*, 2015; Moyano *et al.*, 2013)。MLDや多発性硬化症のように疼痛時にスルファチドが脊髄液、血液中に放出され、疼痛の進行度と体液中スルファチド濃度の相関をTLCやLC-MS/MSを用いることによって示すことができれば、体液中のスルファチドが多い場合はセレクトイン阻害薬を用い、少ない場合はスルファチドと同様の役割をするアゴニストを投与するなど痛みの時期に応じた適切な治療が可能になるかもしれない。しかし、がん患者やMLDの患者においては体内でスルファチドが増加しており (Takahashi and Suzuki, 2012)、これらの疾患を有する患者に対しては、疼痛の指標としてスルファチドを用いることはできないと考えられるため、患者の既往歴を確認し、適切に対処することが必要である。

本研究から、皮膚炎症時には脊髄にスルファチドの蓄積が認められ、スルファチド結合タンパク質であるセレクトインの活性化およびグリア細胞活性化、NOやサイトカイン産生を介して、機械的アロディニアや炎症性疼痛に関与していることが示された (Fig. 27 にまとめとして、模式図を示した)。よって、炎症が生じた後、比較的早い段階では脊髄において、スルファチドとセレクトインの相互作用を阻害する薬物で痛みを抑制できる可能性が示された。一方、炎症が慢性化すると、早期とは逆にスルファチドの枯渇が痛みを増悪させる可能性が示唆された。今後の検討において慢性炎症時におけるスルファチド量の定量が必要とされるものの、生成物であるスルファチドが遺伝子発現量と相関するとした場合、スルファチドを補うことで痛みを抑制できる可能性がある。そのため、慢性期におけるスルファチドのターゲット分子の解析は今後の重要な課題であり、そのような分子を活性化させる薬物は慢性炎症性疼痛における鎮痛薬として利用できると考えられる。

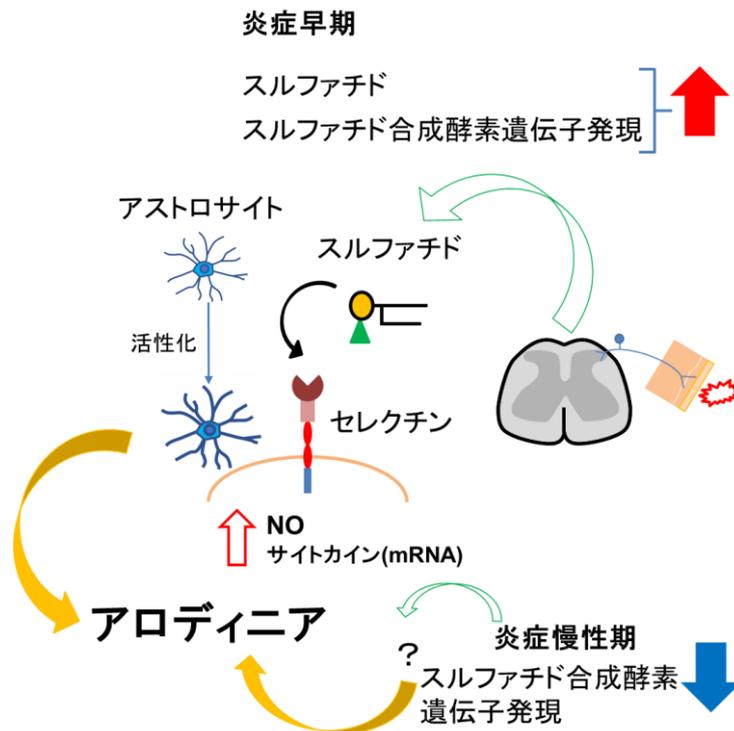


Fig. 27 まとめ

炎症早期の脊髄においてガングリオシド、スルファチド合成酵素の遺伝子発現は増加し、b-シリーズガングリオシド、スルファチドをnaïveマウスに投与することで機械的アロディニアが生じた。さらにスルファチドはセレクチンと結合し、グリア細胞の活性化、炎症性サイトカイン、NOの放出を誘発する。一方、炎症慢性期の脊髄においてガングリオシド、スルファチド合成酵素の遺伝子発現は減少した。減少することが予測される糖脂質を投与することで鎮痛効果が得られた。これらのことからスルファチド-セレクチン間の相互作用の阻害が、新規疼痛治療のターゲットとなる可能性がある。

総括

現在、痛み治療は薬物治療による対症療法が中心であるが、慢性疼痛を抱えている患者の多数は満足な治療効果を得ていない。このことから、慢性疼痛のメカニズムを解明し、新たな治療薬を開発していく必要があると考えられる。痛みの感受性の変化には、受容体やトランスポーターなどの膜タンパク質の制御を介することが必要である。膜タンパク質は、周囲の脂質二重層を構成している脂質から活性や局在に影響を受ける。その機構の一つとして、脂質ラフトを介した膜タンパク質の調節機構が知られている。脂質ラフトはスフィンゴ糖脂質やコレステロールを豊富に含む微小な領域であり、脂質ラフトに親和性の高い膜タンパク質は集積することでタンパク質間相互作用が促進され、細胞間における情報伝達や接着、分化などに関与する (Simons and Ehehalt, 2002)。そこで、本研究では脂質ラフトを構成する脂質の一種であるスフィンゴ糖脂質に着目した。スフィンゴ糖脂質は多様な糖鎖を有し、多くの種類が存在する。その中でも、シアル酸を有するガングリオシドや、ミエリンに豊富なGalCerやスルファチドは神経系に豊富なことから、神経機能に関する研究が行われてきた。実際、我々の以前の研究を含め、いくつかの研究でガングリオシドは痛みにも関与していることが明らかになっている。一例を挙げると、ガングリオシドGT1bの足底内投与は、マウスの痛み刺激に対する感受性を上昇させる (Watanabe *et al.*, 2011)。そこで、ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質が疼痛伝達に関与している可能性を考え、炎症性疼痛モデルマウスにおいて、疼痛伝達経路であるDRGと脊髄における糖脂質生合成酵素の発現量解析を行った。その結果から、増減することが予測された糖脂質が疼痛の感受性に影響を及ぼすかを明らかにするため、naïveマウスおよび炎症性疼痛モデルマウスに対して糖脂質を脊髄髄腔内投与し、痛みがどのように変化するか解析した (第一章)。次に、発痛作用を有することが明らかとなった糖脂質の中で、痛みに関与することが知られていなかったスルファチドについて、炎症早期にどのような

分子機構を介して痛みを引き起こすか検討を行った (第二章)。

第一章では、炎症の早期にはガングリオシド、およびスルファチド合成酵素の遺伝子発現は上昇し、慢性期には減少することが明らかになった。この合成酵素遺伝子発現の増加が疼痛に関与しているかを検討するためいくつかのスフィンゴ糖脂質をnaïveマウスの脊髄へ投与したところ、b-シリーズガングリオシドであるGD3、GD1b、GT1b、および硫酸化糖脂質スルファチドが機械的アロディニアを惹起した。一方、慢性炎症マウスに対してはa-シリーズガングリオシドであるGM1aが鎮痛作用を示した。さらに、naïveマウスでは痛みを惹起したスルファチドが慢性期では逆に機械的アロディニア減弱効果を示した。この結果から、炎症早期の疼痛時には糖脂質が増加することで疼痛に関与しており、慢性期には減少することが痛みを引き起こしている可能性が考えられた。以上から、脊髄における遺伝子発現の増減は、行動試験でマウスに糖脂質を投与する実験結果と矛盾しなかったため、糖脂質合成酵素遺伝子発現の増減から疼痛に関与している糖脂質を予想することが可能であると考えられる。

第二章においては第一章でこれまで痛みにおける機能が知られていなかった、スルファチドに着目し、その疼痛惹起作用のメカニズムの解析に絞って検討を行った。その結果、スルファチドは脊髄においてアストロサイトを活性化させ、炎症性サイトカイン、NOの放出を介して機械的アロディニアを引き起こしている可能性が示された。更にスルファチドの生体内結合分子であるセレクチンはスルファチドによる機械的アロディニアや炎症性サイトカイン遺伝子発現量の増加にも関与していることが明らかになった。これらの結果から比較的早い炎症時期には脊髄において、スルファチドとセレクチンの相互作用を阻害する薬物、もしくはスルファチド合成阻害薬が奏功する可能性が考えられる。一方、炎症が慢性化すると、スルファチドの減少が疼痛に関与している可能性が考えられ、スルファチド自体を補うことで、痛みを抑えることができるかもしれない。さらに、スルファチドはいくつかの病態のバイオマーカーとして

知られているため、生体内スルファチドの量的な変化が、疼痛の病巣の進行度を反映させていることが証明できれば、新たな疼痛の診断ツールとして利用できる可能性がある。一方、セレクチンは白血球のローリングに関与しているため、セレクチンを阻害することによって炎症部位に血球が十分に集積することが抑制され、殺菌作用や治癒に影響を及ぼす副作用が考えられる。白血球のローリングには**P-selectin glycoprotein ligand- 1**などの糖タンパク質上の**sialyl Lewis X**といったスルファチドとは異なる糖鎖構造を有する分子が関与している (Norman *et al.*, 1995; Brunk *et al.*, 1996)。そこで、スルファチドとセレクチンの結合を特異的に阻害する薬物を開発することで、副作用を防げる可能性がある。また、スルファチド分解酵素の欠損により生じる**MLD**の病態時には過剰に蓄積したスルファチドが神経や腎臓に蓄積し障害をきたすことが知られているため、過剰投与により有害反応が生じる可能性がある。よって、慢性疼痛時に鎮痛を目的としてスルファチドを投与する場合、スルファチドによる鎮痛作用の分子メカニズムを解析し、スルファチドの類縁体を投与することなどが有効であると考えられる。

以上、本研究からスフィンゴ糖脂質、中でもスルファチドが疼痛に関与し、それらが新たな疼痛治療、および診断のターゲットとなる可能性を示した。また、ガングリオシドについても、疼痛時の組成変化を測定するなどの解析が必要であるものの、スルファチド同様、脊髄において炎症早期にはいくつかの合成酵素の遺伝子発現は増加し、慢性期には減少していた。また、**b-シリーズガングリオシド**は**naïve**マウスに対して発痛、**a-シリーズガングリオシド**は慢性炎症マウスに対して鎮痛効果を示したことから、炎症早期には**b-シリーズガングリオシド**生合成酵素阻害薬、慢性炎症期には**a-シリーズガングリオシド**自体が鎮痛薬として使用できる可能性がある。さらに炎症の時期に応じて糖脂質の量の変動が予想されるため、**b-シリーズガングリオシド**が増加していれば早期、**a-シリーズガングリオシド**が減少していれば慢性期と、スルファチ

ドと併せて測定することで、糖脂質の発現パターンからより正確な炎症性疼痛の進行度を示すバイオマーカーとしての利用が期待できる。本研究から、糖脂質がどのように痛みを調節しているか、より詳細な機構が明らかとなり、その含量や細胞に影響を与えるシグナル伝達系などの解析を行うことが、鎮痛薬として新しいカテゴリーの薬物の開発につながるものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻、ご協力を賜りました、北里大学薬学部薬理学教室 田辺 光男 教授に厚く御礼申し上げます。

ご多忙の中主査を引き受けてくださいました、北里大学薬学部分子薬理学教室 中原 努 教授、副査を引き受けてくださいました、生薬学教室 小林 義典 教授、薬物治療学 I 尾鳥 勝也 教授、薬理学教室 田辺 光男 教授に謹んで熱く御礼申し上げます。

直接ご指導いただきました北里大学薬学部薬理学教室 渡辺 俊 助教に深く感謝いたします。また、本研究を遂行する上で、学生時代より数々のご指導、ご助言、励ましをいただきました、北里大学薬学部薬理学教室 内藤 康仁 講師、岩井 孝志 講師、尾山 実砂 助教に心より御礼申し上げます。さらに、研究生生活を楽しく有意義に過ごさせていただきました、北里大学薬学部薬理学教室 卒業生並びに在校生の皆さんに深く感謝致します。

最後に、長年にわたり、研究をする機会を頂き、陰ながら支えていただきました家族に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Bian, K., Ke, Y., Kamisaki, Y., Murad, F., 2006. Proteomic modification by nitric oxide. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 271–279.
- Brunk, D.K., Goetz, D.J., Hammer, D.A., 1996. Sialyl Lewis(x)/E-selectin-mediated rolling in a cell-free system. *Biophys. J.* 71, 2902–2907.
- Capelluto, D.G.S., 2002. The repertoire of protein-sulfatide interactions reveal distinct modes of sulfatide recognition. *Front. in Mol. Biosci.* 9, 1–13.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods.* 53, 55–63.
- Cheng, C.F., Cheng, J.K., Chen, C.Y., Lien, C.C., Chu, D., Wang, S.Y., Tsaur, M.L., 2014. Mirror-image pain is mediated by nerve growth factor produced from tumor necrosis factor alpha-activated satellite glia after peripheral nerve injury. *Pain.* 155, 906–920.
- Chiricozzi, E., Pomè, D.Y., Maggioni, M., Di Biase, E., Parravicini, C., Palazzolo, L., Loberto, N., Eberini, I., Sonnino, S., 2017. Role of the GM1 ganglioside oligosaccharide portion in the TrkA-dependent neurite sprouting in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 143, 645–659.
- Choi, H.S., Roh, D.H., Yoon, S.Y., Kwon, S.G., Choi, S.R., Kang, S.Y., Moon, J.Y., Han, H.J., Kim, H.W., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2017. The role of spinal interleukin-1 β and astrocyte connexin 43 in the development of mirror-image pain in an inflammatory pain model. *Exp. Neurol.* 287, 1–13.
- Choi, H.S., Roh, D.H., Yoon, S.Y., Moon, J.Y., Choi, S.R., Kwon, S.G., Kang, S.Y., Han, H.J., Kim, H.W., Beitz, A.J., Oh, S.B., Lee, J.H., 2015. Microglial interleukin-1 β in the ipsilateral dorsal horn inhibits the development of mirror-image contralateral mechanical allodynia through astrocyte activation in a rat model of inflammatory pain. *Pain.* 156, 1046–1059.
- Chu, Y.C., Guan, Y., Skinner, J., Raja, S.N., Johns, R.A., Tao, Y.X., 2005. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain.* 119, 113–123.
- Dali, C.Í., Barton, N.W., Farah, M.H., Moldovan, M., Månsson, J., Nair, N., Dunø, M., Risom, L., Cao, H., Pan, L., Moura, M.S., Corse, A.M., Krarup, C., 2015. Sulfatide levels correlate with severity of neuropathy in metachromatic leukodystrophy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 518–533.

- Ding, J.D., Burette, A., Nedvetsky, P. I., Schmidt, H.H.H.W., Weinberg, R.J., 2004. Distribution of Soluble Guanylyl Cyclase in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* 472, 437–448.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462.
- Dodge, J.C., Treleaven, C.M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., Cromwell, M., Sardi, S.P., Chuang, W.L., Sidman, R.L., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., 2015. Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112, 8100–8105.
- Dupree, J.L., Coetzee, T., Blight, A., Suzuki, K., Popko, B., 1998. Myelin Galactolipids Are Essential for Proper Node of Ranvier Formation in the CNS. *J. Neurosci.* 18, 1642–1649.
- Dvorianchikova, G., Ivanov, D., 2014. Tumor necrosis factor-alpha mediates activation of NF- κ B and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3171–3178.
- Eckhardt, M., Hedayati, K.K., Pitsch, J., Lüllmann-Rauch, R., Beck, H., Fewou, S.N., Gieselmann, V., 2007. Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci.* 27, 9009–9021.
- Ferreira, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology.* 38, 835–842.
- Gao, Y.J., Xu, Z.Z., Liu, Y.C., Wen, Y.R., Decosterd, I., Ji, R.R., 2010. The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition. *Pain.* 148, 309–319.
- Goettl, V.M., Lindsey, A. E., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2000. GM1 ganglioside restores abnormal responses to acute thermal and mechanical stimuli in aged rats. *Brain Res.* 858, 380–385.
- Guo, W., Wang, H., Watanabe, M., Shimizu, K., Zou, S., LaGraize, S.C., Wei, F., Dubner, R., Ren, K., 2007. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J. Neurosci.* 27, 6006–6018.
- Handa, Y., Ozaki, N., Honda, T., Furukawa, K., Tomita, Y., Inoue, M., Furukawa, K., Okada, M., Sugiura, Y., 2005. GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. *Pain.* 117, 271–279.

- Hanisch, U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 40,140–155.
- Hao, J.X., Xu, X.J., 1996. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered nitric oxide synthase inhibitors. *Pain*. 66, 313–319.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32,77–88.
- Hayes, R.L., Mao, J., Price, D.D., Germano, A., d'Avella, D., Fiori, M., Mayer, D.J. 1992. Pretreatment with gangliosides reduces abnormal nociceptive responses associated with a rodent peripheral mononeuropathy. *Pain*. 48, 391–396.
- He, M.M., Smith, A.S., Oslob, J.D., Flanagan, W.M., Braisted, A.C., Whitty, A., Cancilla, M. T., Wang, J., Lugovskoy, A.A., Yoburn, J.C., Fung, Y.D., Farrington, G., Eldredge, J.K., Day, E.S., Cruz, L.A., Cachero, T.G. Miller, S.K., Friedman, J E., Choong, I.C., Cunningham, B.C., 2005. Small-Molecule Inhibition of TNF- alpha. *Science*. 310, 1022–1025.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D.A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebecker, A., Hussain, M.G., Boursier-Neyret, C. Echaniz-Laguna, A., Ludolph, A.C., Platt, F.M., Walther, B., Spedding, M., Loeffler, J., Aguilar, J.L.D.G., 2015. Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet*. 24, 7390–7405.
- Honke, K., 2018. Biological functions of sulfoglycolipids and the EMARS method for identification of co-clustered molecules in the membrane microdomains. *J. Biochem*. 163, 253–263.
- Hoshi, T., Suzuki, A., Hayashi, S., Tohyama, K., Hayashi, A., Yamaguchi, Y., Takeuchi, K., Baba, H., 2007. Nodal protrusions, increased Schmidt-Lanterman incisures, and paranodal disorganization are characteristic features of sulfatide-deficient peripheral nerves. *Glia*. 55, 584–594.
- Huang, D., Yu, B., 2010. The mirror-image pain: An unclered phenomenon and its possible mechanism. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 34, 528–532.
- Imai, Y., True, D.D., Singer, M.S., Rosen, S.D., 1990. Direct Demonstration of the Lectin Activity of gp90 MEL, a Lymphocyte Homing Receptor. *J. Cell Biol*. 111, 1225–1332.
- Jahng, A., Maricic, I., Aguilera, C., Cardell, S., Halder, R.C., Kumar, V., 2004. Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide. *J. Exp. Med*. 199, 947–957.
- Jeon, S.B., Yoon, H.J., Park, S.H., Kim, I.H., Park, E.J., 2008. Sulfatide, A Major Lipid

- Component of Myelin Sheath, Activates Inflammatory Responses As an Endogenous Stimulator in Brain-Resident Immune Cells. *J. Immunol.* 181, 8077–8087.
- Ji, R.R., Berta, T., Nedergaard, M., 2013. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain.* 154, 10–28.
- Jin X., Gereau R.W., 2006. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.* 26, 246–255.
- Kawai, H., Allende, M.L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J.N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff, K., Proia, R.L., 2001. Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J. Biol. Chem.* 276, 6885–6888.
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., H, Takeuchi, A, Suzumura, N, Ishiguro, K, Kadomatsu., 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 4, 1–9.
- Laudanna, C., Constantid, G., Barons, P., Scarpinis, E., Scarlatoo, G., Cabrinin, G., Dehecchir, C., Rossis, F., Cassatellas, M.A., Bertonsll, G., 1994. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 269, 4021–4026.
- Ledeen, R.W., Wu, G., 1992. Ganglioside Function in the Neuron. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 4, 174–187.
- Lopez, P.H., Schnaar, R.L., 2009. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 549–557.
- Luo, Z.D., Cizkova, D., 2000. The Role of Nitric Oxide in Nociception. *Curr. Rev. Pain.* 4, 459–466.
- Mao, J, Hayes, R.L., Price, D.D., Coghill, R.C., Lu, J., Mayer, D.J., 1992a. Post-injury treatment with GM1 ganglioside reduces nociceptive behaviors and spinal cord metabolic activity in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 584:18–27.
- Mao, J., Price, D.D., Hayes, R.L., Lu, J., Mayer, D.J., 1992b. Intrathecal GM1 ganglioside and local nerve anesthesia reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 584, 28–53.
- Mao, J., Price, D.D., Mayer, D.J., Lu, J., Hayes, R.L. 1992c. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 576, 254–262.

- Miller, Y. I., Navia-Pelaez, J. M., Corr, M., Yaksh T. L., 2020. Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *J. Lipid Res.* 61,655–666.
- Milligan, E.D., Watkins, L.R., 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 23–36.
- Moyano, A.L., Pituch, K., Li, G., Breemen, R., Van, M.J.E., Givogri, M.I., 2013. Levels of plasma sulfatides C18: 0 and C24: 1 correlate with disease status in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurochem.* 127, 600–604.
- Mutoh, T., Tokuda, A., Inokuchi, J., Kuriyama, M., 1998. Glucosylceramide synthase inhibitor inhibits the action of nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 26001–26007.
- Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., Ando, S., Yu, R.K., 2007. Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *J. Neurochem.* 103, 2327–2341.
- Norman, K.G., Moore, K.L., McEver, R.P., Ley, K., 1995. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.* 86, 4417–4421.
- Olmos, G. and Lladó, J., 2014. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014, 861231.
- Pernber, Z., Molander-Melin, M., Berthold, C.H., Hansson, E., Fredman, P., 2002. Expression of the myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain. *J. Neurosci. Res.* 69, 86–93.
- Park, J.Y., Kim, H.Y., Jou, I., Park, S.M., 2008. GM1 induces p38 and microtubule dependent ramification of rat primary microglia in vitro. *Brain Res.* 1244, 13–23.
- Pyo, H., Joe, E., Jung, S., Lee, S.H., Jou, I., 1999. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J. Biol. Chem.* 274, 34584–34589.
- Qiu, S., Palavicini, J., Wang, J., Gonzalez, N.S., He, S., Dustin, E., Zou, C., Ding, L., Bhattacharjee, B., Skike, C.E.V., Galvan, V., Dupree, J.L, Han, X., 2021. Adult-onset CNS myelin sulfatide deficiency is sufficient to cause Alzheimer’s disease-like neuroinflammation and cognitive impairment. *Mol. Neurodegener.* 16, 1–24.
- Raghavendra, V., Tanga, F.Y., DeLeo, J.A., 2004. Complete Freund’s adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* 20, 467–473.
- Ramakrishnan, H., Hedayati, K.K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Fewou, S.N., Maier, H., Goebel, H.H., Gieselmann, V., Eckhardt, M., 2007. Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic

- leukodystrophy. *J. Neurosci.* 27, 9482–9490.
- Sanz, P., Garcia-Gimeno, M.A., 2020. Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–17.
- Sergent-Tanguy, S., Véziers, J., Bonnamain, V., Boudin, H., Neveu, I., Naveilhan, P., 2006. Cell surface antigens on rat neural progenitors and characterization of the CD3 (+)/CD3 (-) cell populations. *Differentiation.* 74, 530–541.
- Schmidtke, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., 2009, No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends. Neurosci.* 32, 339–346.
- Schneider, J.S., 2018. Altered expression of genes involved in ganglioside biosynthesis in substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *PLoS One.* 13, 1–14.
- Schreiber, K.L., Beitz, A.J., Wilcox, G.L., 2008. Activation of spinal microglia in a murine model of peripheral inflammation-induced, long-lasting contralateral allodynia. *Neurosci. Lett.* 440, 63–67.
- Seyfried, T.N., Choi, H., Chevalier, A., Hogan, D., Akgoc, Z., Schneider, J.S., 2018. Sex-Related Abnormalities in Substantia Nigra Lipids in Parkinson's Disease. *ASN. Neuro.* 10, 1–10.
- Simons, K., Eehalt, R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597–603.
- Suzuki, Y., Toda, Y., Tamatani, T., Watanabe, T., Suzuki, T., Nakao, T., Murase, K., Kiso, M., Hasegawa, A., Tadano-Aritomi, K., 1993. Sulfated glycolipids are ligands for a lymphocyte homing receptor, L-selectin (LECAM-1), binding epitope in sulfated sugar chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 426–434.
- Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K., Furukawa, K., Furukawa, K., Rasband, M.N., Yuki, N., 2007. Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia.* 55, 746–757.
- Takahashi, T., Suzuki, T., 2012. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J. Lipid Res.* 53, 1437–1450.
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Aizawa, S., 1996. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 10662–10667.
- Tanabe, M., Nagatani, Y., Saitoh, K., Takasu, K., Ono, H., 2009. Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after

- peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology*. 56, 702–708.
- Tang, Q., Svensson, C.I., Fitzsimmons, B., Webb, M., Yaksh, T.L., Hua, X.Y., 2007. Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation. *Eur. J. Neurosci*. 25, 2964–2972.
- Tao, Y.X., Hassan, A., Haddad, E., Johns, R.A., 2000. EXPRESSION AND ACTION OF CYCLIC GMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE Ia IN INFLAMMATORY HYPERALGESIA IN RAT SPINAL CORD. *Neuroscience* 95, 525–533.
- Üçeyler, N., Schäfers, M., Sommer, C., 2009. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp. Brain Res*. 196, 67–78.
- Ueda, H., Neyama, H., Nagai, J., Matsushita, Y., Tsukahara, T., Tsukahara, R., 2018. Involvement of lysophosphatidic acid-induced astrocyte activation underlying the maintenance of partial sciatic nerve injury-induced neuropathic pain. *Pain*. 159, 2170–2178.
- Ueno, K., Ando, S., Yu, R.K., 1978. Gangliosides of human, cat, and rabbit spinal cords and cord myelin. *J. Lipid Res*. 19, 863–871.
- Varki, A., 1994. Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 91, 7390–7397.
- Wang, H., Xu, C., 2022. A Novel Progress: Glial Cells and Inflammatory Pain. *ACS. Chem. Neurosci*. 13, 288–295.
- Watanabe, S., Iwai, T., Tanabe, M., 2017. Intraplantar injection of sialidase reduces mechanical allodynia during inflammatory pain. *J. Pharmacol. Sci*. 133, 49–52.
- Watanabe, S., Tan-No, K., Tadano, T., Higashi, H., 2011. Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia via a glutamate signaling mechanism. *Pain*. 152, 327–334.
- Weyerbacher, A.R., Xu, Q., Tamasdan, C., Shin, S.J., Inturrisi, C.E., 2010. N-Methyl-d-aspartate receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain. *Pain*. 148, 237–246.
- Xu, F., Li, Y., Li, S., Ma, Y., Zhao, N., Liu, Y., Qian, N., Zhao, H., Li, Y., 2014. Complete Freund's adjuvant-induced acute inflammatory pain could be attenuated by triptolide via inhibiting spinal glia activation in rats. *J. Surg. Res*. 188, 174–182.
- Yamashita, T., Wu, Y.P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., Proia, R.L., 2005. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 2725–2730.
- Yang, M.S., Park, E.J., Sohn, S., Kwon, H.J., Shin, W.H., Pyo, H.K., Jin, B., Choi, K.S., Jou, I., Joe, E.H., 2002. Interleukin-13 and -4 induce death of activated microglia.

Glia. 38, 273–280.

Zajonc, D.M., Maricic, I., Wu, D., Halder, R., Roy, K., Wong, C.H., Kumar, V., Wilson, I.A., 2005. Structural basis for CD1d presentation of a sulfatide derived from myelin and its implications for autoimmunity. *J. Exp. Med.* 202, 1517–1526.

Zhang, R.X., Li, A., Liu, B., Wang, L., Ren, K., Zhang, H., Berman, B.M., Lao, L., 2008. IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *Pain.* 135, 232–239.