

学位論文内容要旨

氏名：森田 元樹 印

題目：スフィンゴ糖脂質による疼痛調節に関する研究

【背景・目的】

痛みは危険を察知し回避するために必要であるが、慢性的な痛みや強い痛みは日常生活に支障をきたすため治療対象となる。痛み刺激は、末梢の自由神経終末により感知され、脊髄で神経を乗り換えた後、上位中枢へ伝達されて痛みとして認識される。また、炎症性疼痛が生じた際には脊髄においてアストロサイトやミクログリアが活性化し、炎症性サイトカインや一酸化窒素（NO）を放出し、痛みの感受性を調節することが知られている。

病態時における脊髄の疼痛伝達を理解することは重要であり、グリア細胞の活性化機構などについても、さらなる研究が求められている。

スフィンゴ糖脂質は生体膜に存在し親水部に多様な糖鎖を有する脂質であり、細胞間接着分子や受容体などの膜タンパク質の機能調節を介して、様々な細胞機能に関与している。スフィンゴ糖脂質の基本骨格であるセラミドに対し、糖転移酵素が糖を付加していくことでガングリオシドやスルファチドなど、多くの分子種が生合成される

(Fig. 1)。我々は、これまでの研究でb-シリーズガングリオシドに属する

GT1bをマウスの足底へ皮下投与することにより、痛覚刺激をより強く感じる痛覚過敏や触刺激を痛覚として認識する機械的アロディニアを引き起こすことを明らかにしており、皮膚においては、b-シリーズガングリオシドが疼痛に関与している可能性が示された。以上のように、投与した糖脂質が疼痛を調節しうる可能性が示されているが、内在性の糖脂質自体が疼痛時にどのような調節を受け、痛みを制御しているかはほとんど明らかとなっていない。そこで、本研究では、炎症性疼痛において脊髄内の糖脂質合成が変化することが痛みの原因になるか明らかにすることを目的に、(1) complete Freund's adjuvant

(CFA) を用いた炎症性疼痛モデルマウスにおいて脊髄でスフィンゴ糖脂質合成酵素の遺伝子発現量に変化があるかを解析した。(1)の結果に基づき、(2) 変動することが予想さ

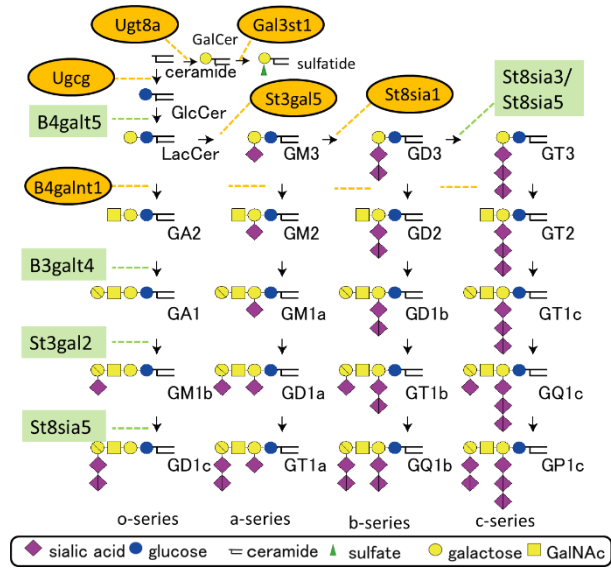


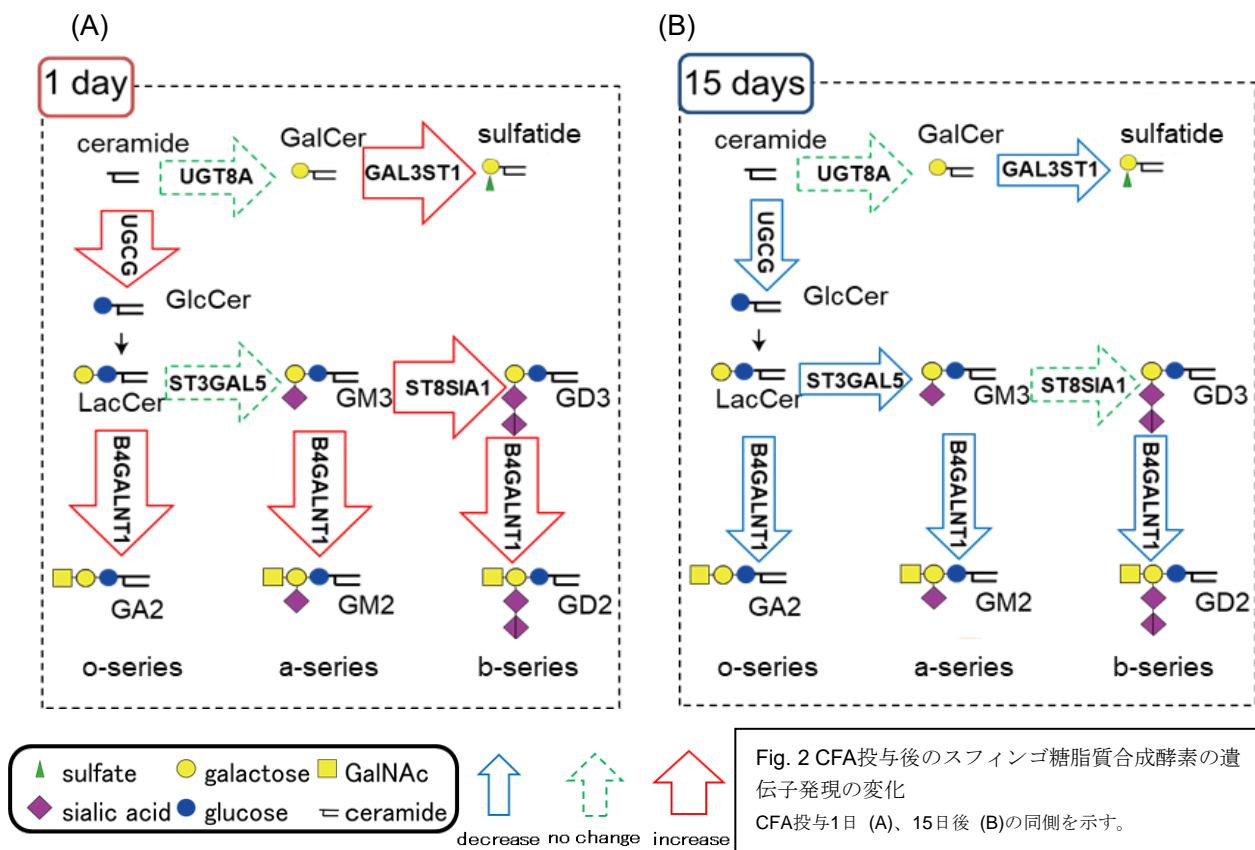
Fig. 1 スフィンゴ糖脂質の生合成経路
各糖脂質の模式図の右下に名称を表記した。また、丸で囲った酵素の遺伝子発現量を測定した。

れる糖脂質の内、疼痛における機能が知られていないスルファチドに着目し、どのような分子メカニズムを介して疼痛伝達に関与しているかを検討した。

【方法】

(1) 起炎物質である CFA をマウス (ICR 雄性 5 週令) 後肢片側足底皮下に投与し、その 1 日後を早期、15 日後を慢性期として、各時期に機械的刺激に対する逃避閾値を測定する von Frey test を行い、疼痛閾値 (50% threshold) を算出し機械的アロディニアを評価した。CFA を投与した後肢に対して、同側と反対側の脊髄に分け mRNA を抽出し、糖脂質合成に関わる 6 つの酵素の遺伝子発現量 (Fig. 1、丸で囲んだ遺伝子) をリアルタイム PCR により解析した。さらに、この結果から脊髄で変化していると思われる糖脂質をそれぞれマウスに脊髄髄腔内投与した後、von Frey test を行った。

(2) 脊髄髄腔内投与したスルファチドにより引き起こされる疼痛のメカニズムを、グリア細胞の活性化阻害薬や各種の細胞内シグナル伝達系阻害剤等により検討した。薬物はいずれも脊髄髄腔内投与した。さらに、western blot (グリア細胞マーカー発現)、リアルタイム PCR (サイトカインの遺伝子発現)、DAN 法 (窒素酸化物の測定) を用いてスルファチドが痛みに関与する分子を調節するか解析を行った。



【結果・考察】

(1) スフィンゴ糖脂質合成に関わる遺伝子について検討した結果、炎症後に脊髄において糖脂質合成酵素の遺伝子発現量の変動が認められ、炎症の持続期間に応じて糖脂質が増減している可能性が考えられた (Fig. 2)。CFA投与1日後はCFAを投与した後肢と同側の脊髄においてUGCG、B4GALNT1、ST8SIA1、GAL3ST1の各糖転移酵素の遺伝子発現量が増加し、CFA投与15日後にはUGCG、B4GALNT1、ST3GAL5、GAL3ST1が減少していた。各酵素の生合成経路上の位置を考慮すると、炎症早期にはガングリオシド (特に他のガングリオシドと比較し相対的にb-シリーズガングリオシド)、スルファチドが増加し、慢性期にはガングリオシドおよびスルファチドが全般的に減少している可能性が考えられる。この結果から炎症早期に増加することが予想されるb-シリーズガングリオシド、スルファチドを未処置マウスの脊髄に投与したところアロディニアを誘発した。一方、a-シリーズガングリオシドはアロディニアを誘発しなかった (Fig. 3A, B)。

これらのことから早期の炎症性疼痛時にはb-シリーズガングリオシド、スルファチドが疼痛伝達に関与していることが示された。一方、慢性期に減少すると予想されるa-シリーズガングリオシドGM1aやスルファチドを慢性炎症マウスの脊髄に反復投与することでアロディニアが減弱した。慢性炎症期には、ガングリオシドやスルファチドの減少が炎症性疼痛を促進している可能性が示され、炎症性疼痛の時期により痛みに関与する糖脂質の種類が異なることが明らかになった。

(2) スルファチドはミエリン鞘に多量に存在するスフィンゴ糖脂質であるが、疼痛においてどのような機能を果たしているかこれまで知られていなかった。(1) で、炎症性疼痛早期にはスルファチドの増加が痛みを引き起こし、慢性期には逆にスルファチドの減少が痛みを引き起こすことが示唆されたことから、炎症早期に着目し、スルファチドがどのよ

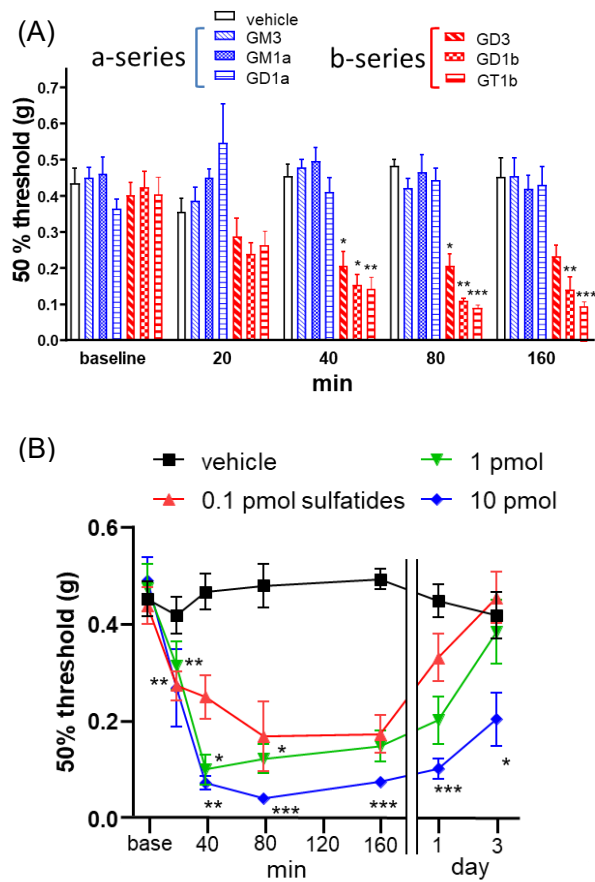


Fig. 3 脊髄髄腔内へのスフィンゴ糖脂質投与による機械的アロディニア
(A) 未処置マウスにa-, b-シリーズガングリオシド (1 nmol)、vehicleを髄腔内投与した後の各時間における機械的刺激に対する疼痛閾値 (50% threshold)。(B)スルファチド投与後の濃度依存的な疼痛閾値の変化を示す。

うなメカニズムでアロディニアを引き起こすか検討を行なった。皮膚で炎症が生じると、脊髄においてミクログリア、アストロサイトが活性化しTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインやNOを放出し、痛みを引き起こすことが知られている。そこで、スルファチドがこれらの分子を活性化するか検討した。まず、アストロサイト、ミクログリアの活性化をそれぞれ阻害するL-aminoadipic acid (L-AA) やミノサイクリンを前投与した後、スルファチドを投与してvon Frey testを行った。その結果、特にL-AAによりスルファチドの疼痛惹起効果は阻害された。さらに、アストロサイトマーカーであるGFAPタンパク質の発現量がスルファチドにより上昇したことから、スルファチドがアストロサイトの活性化を介してアロディニアを惹起させることが示唆された。一方、TNF- α 、IL-1 β の阻害剤

(それぞれSPD-304、IL-1ra)、NO合成酵素を阻害するL-NAME、NOの下流シグナルであるグアニル酸シクラーゼを阻害する

ODQを投与したところいずれもスルファチドによるアロディニアを抑制した。また、スルファチド投与後のNO量やサイトカイン (TNF- α およびIL-1 β) 発現量が増加していることを確認した。以上から、炎症性サイトカイン、NOがスルファチドによるアロディニアに関与することが明らかになった。次に、スルファチドが直接結合することが報告されているセレクトインについて痛みに関与しているか検討した。スルファチド投与前にセレクトイン阻害剤であるbimosiamose (BIMO) を処置したところ、アロディニアを抑制したことから、セレクトインとスルファチドが結合することによりアロディニアが発症することが示唆された。さらに、BIMOはCFA足底皮下投与後7日のマウスにおいても鎮痛効果を示したことから、炎症性疼痛時にもセレクトインが関与している可能性が示された (Fig. 4)。

【総括】

本研究により炎症性疼痛において、脊髄における糖脂質合成酵素群の発現量が変動し、痛みにおいて種々の糖脂質が関与していることが示唆された。慢性的に持続した炎症における糖転移酵素遺伝子の発現パターンは、炎症早期とは異なっているため、炎症の時

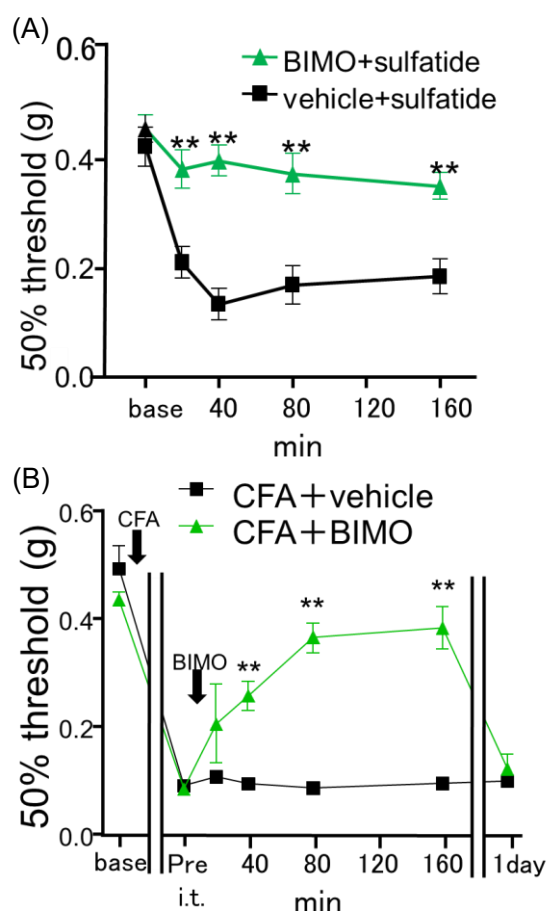


Fig. 4 セレクトイン阻害剤のアロディニアに対する効果
BIMOは10 pmol sulfatide (A) やCFA (B、投与後7日) によって誘発された機械的アロディニアを減少させた。

期に応じて、疼痛に関与する糖鎖の種類が異なることが考えられる。以上の結果は、炎症における痛み、糖転移酵素とその産物が重要な役割を果たすという新しい知見を示すものである。また、硫酸化糖脂質スルファチドは、炎症早期には生合成量が上昇することが示唆されたが、実際に健常マウスの脊髄に投与したスルファチドはセレクトインと結合し、グリア細胞の活性化や炎症性サイトカインの発現亢進を介し、痛みを引き起こすことが示された。これらのことから、スルファチドの合成やセレクトインの阻害剤が新規疼痛治療薬となる可能性がある。

【論文目録】

・ [Motoki Morita](#), Shun Watanabe, Misa Oyama, Takashi Iwai, Mitsuo Tanabe

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** (2020) 217–227

・ [Motoki Morita](#), Shun Watanabe, Natsumi Nomura, Kanako Takano-Matsuzaki, Misa Oyama, Takashi Iwai, Mitsuo Tanabe

Sulfatide-selectin signaling in the spinal cord induces mechanical allodynia.
Journal of neurochemistry **164** (2023) 658-670