Role of MAP kinases in sensory neurons on pain transmission

Koichi Noguchi

Department of Anatomy and Neuroscience, Hyogo College of Medicine

[Received 6 October 2005]

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are able to transduce extracellular stimuli into intracellular posttranslational and transcriptional responses in dorsal root ganglion (DRG). We have examined the phosphorylation of MAPKs, such as extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38, and found two kinds of responses of ERK and p38, in primary afferent neurons. One response involves rapid alteration of MAPKs, which noxious stimulation of the peripheral tissue induces in the DRG. We found that noxious stimulation of the peripheral tissue very rapidly induced phosphorylation of ERK and p38 in DRG neurons. Phosphorylation of MAPKs might be very useful as markers of primary afferent activation after noxious stimulation. Another response is the long-term changes in the DRG after a variety of types of neuropathic injury to the peripheral nerves. We found that chronic constriction injury (CCI) induced phosphorylation in ERK and p38 MAPK in different subpopulations of DRG neurons and also in satellite glial cells. L5 spinal nerve ligation (SNL) induced phosphorylation in p38 MAPK in neighboring L4 DRG neurons. We have also found that p38 inhibitors attenuated BDNF and TRPV1 expression increased in the L4 DRG and thermal hyperalgesia after L5 SNL. These data indicate that dynamic changes occur in uninjured primary afferent neurons, as well as injured neurons in neuropathic pain models, and might be important for the transmission of exaggerated pain (peripheral sensitization) in neuropathic pain conditions.

Key words: DRG; MAPK; ERK; p38; Neuropathic pain; Nociception; Gene expression

一次感覚ニューロンにおける MAP キナーゼと疼痛伝達

野口 光一

兵庫医科大学解剖学第2講座

緒 言

MAP キナーゼをはじめとする細胞内情報伝達系の活性化が、一次知覚ニューロンや脊髄後角ニューロンにおいて生じ、痛みの発生やそれに伴う可塑的な変化に重要な役割を担っていることがわかってき

た。これは蛋白質のリン酸化といった早期における神経系の可塑的变化だけではなく、遺伝子発現レベルでの制御といった long term な可塑的变化にも関与している。本稿では、痛覚伝達における細胞内情報伝達系の一つである MAP キナーゼの一次知覚ニューロンにおける動態、その疼痛伝達における役

Fig. 1 Stimulus-evoked ERK phosphorylation in rat DRG neurons.

A. L4 DRG section (30 μ m) immunostained for pERK in the naive rat. **B.** pERK labeling in many small L4 DRG neurons 2 min after intraplantar injection of capsaicin (10 mM, 200 μ l). Western blot of capsaicin-stimulated DRG tissue with pERK antibody (inset). **C.** Time course of capsaicin-evoked pERK expression in L4/5 DRG neurons (n=5 each time point, *: $p<0.01$, **: $p<0.001$ compared to naive). Scale bars, 100 μ m. (From Dai et al., JN 2002)

Fig. 2 Thermal stimulus intensity-dependent pERK expression.

A. pERK labeling in L4 DRG neurons 2 min after thermal stimulation at 42°C. **B.** pERK labeling in L4 DRG neurons 2 min after thermal stimulation at 60°C. **C.** Size distribution of pERK-labeled neurons in the L4/5 DRGs 2 min after thermal stimulation at 42, 46, 50, 54, and 60°C. **D.** The percentage of pERK-labeled neurons in L4/5 DRG neurons (n=5 each temperature, *: $p<0.01$, **: $p<0.001$ compared to 38°C). Scale bars, 100 μ m. (From Dai et al., JN 2002)

割について、我々の知見を概説する。

刺激様式に対応する DRG における ERK のリン酸化¹⁾

カプサイシンを用いて、ラット末梢組織に存在する無髄線維である c-fiber を選択的に刺激すると、後根神経節 DRG において c-fiber を持つ小型

ニューロンにおいてのみ ERK のリン酸化が、刺激後 2 分をピークとする非常に早い時間経過で誘導される (Fig. 1A-C). しかもこれらの pERK 陽性ニューロンはカプサイシンの受容体である TRPV1 を含有していた。また A-fiber を選択的に刺激すると、有髄線維を持つ中型から大型の DRG ニューロンでの ERK リン酸化が観察された。カプサイシン

Fig. 3

A. Colocalization of pERK (green) and VR-1 (red) in L4 DRG neurons after thermal stimulation (54°C) of the plantar surface of the hind paw. Double staining appears yellow. **B.** Percentages of VR-1-labeled neurons also labeled for pERK after different thermal stimuli (**: $p < 0.001$ compared to 38°C). **C.** Percentages of pERK-labeled neurons also labeled for VR-1 after different thermal stimuli. **D–F.** Percentages of VR-1-labeled neurons in L4/5 DRG neurons following capsazepine treatment combined with capsaicin injection (D), thermal stimulation (54°C) (E) or mechanical stimulation of the plantar surface of the hind paw (F) (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ compared to vehicle). Scale bars, 100 μm . (From Dai et al., JN 2002)

Fig. 4

A, B: Co-localization of pERK (green) and P2X3 (red) in L5 DRG neurons of normal rats (A) or CFA rats (B) after mechanical noxious stimulation of the hind paw. Double staining appears yellow. **C:** Percentage of P2X3 immunoreactive neurons relative to pERK-labeled neurons in normal (Nor) rats and CFA-inflamed rats after mechanical stimulation. **D:** Percentage of pERK-labeled neurons relative to P2X3 immunoreactive neurons in normal (Nor) rats and CFA-inflamed rats after mechanical stimulation (*: $p < 0.01$, Student's t-test). Scale bars, 100 μm . (From Dai et al., Pain 2004)

注射によって誘導される ERK のリン酸化は, Na チャネルのプロローカーである lidocaine の事前局所投与によってブロックできることも明らかとなった. すなわち生体に侵害刺激が加わる際に, 活動電位の伝搬によって刺激様式特異的に, 一次知覚神経

細胞において ERK カスケードが活性化されることが明らかとなった.

刺激強度依存的な ERK 活性化¹⁾

次に末梢組織に自然刺激を与えて, DRG におい

Fig. 5 Thermal stimulus intensity-dependent p-p38 expression.

L4 DRG section (10 μm) immunostained for p-p38 2 min after thermal stimulation at 38°C (A) and 54°C (B). C. Quantification of the percentage of p-p38-IR neurons of L4/5 DRG neurons after thermal stimulation (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ compared to naive). D. Size distribution of p-p38-labeled neurons in the L4/5 DRG 2 min after thermal stimulation at 54°C (black bars) and in the L4/5 DRG of naive rats (white bars). Scale bars, 100 μm. (From Mizushima et al., Pain 2005)

る ERK のリン酸化を検索した。ERK の刺激強度を変えると、強度依存的に応答する (ERK リン酸化) 一次感覚細胞の population が変化することが明らかとなった (Fig. 2A–D)。つまり、段階的に温度刺激を与えると、より高い温度刺激で、ERK リン酸化が起こる DRG ニューロンの数が増加するだけでなく、そのサイズが増大することがわかった。また電気刺激や機械刺激においても同様の現象が観察された。この結果は、比較的サイズの大きい (A δ線維を持つ) ニューロンが、より強い刺激に応答する可能性を示している。

リン酸化 ERK は痛み関連受容体を同定する 有用なマーカー¹⁾

侵害性熱刺激によって誘導される ERK のリン酸化が、TRPV1 (VR1) の antagonist などの事前局所投与によってブロックできるかどうかを検討した。まず、TRPV1 陽性ニューロン内での pERK 陽性ニューロン (TRPV1 と pERK の二重標識細胞, Fig. 3A) の割合は、温度に依存して増加すること

が明らかとなった (Fig. 3A–C)。さらに、熱刺激に誘導されたリン酸化 ERK と TRPV1 の二重染色の割合は、TRPV1 の antagonist の局所投与により抑制でき、一方機械刺激によって誘導されたリン酸化 ERK には何の影響も持たないことがわかった (Fig. 3D–F)。この結果は、カプサイシン刺激による一次知覚ニューロンにおける ERK のリン酸化が、その受容体を介していることを示している。さらにこの結果は、拮抗剤を用いた、各種痛み関連受容体とリン酸化 ERK の二重免疫染色法により、疼痛刺激様式と受容体の関連の分子組織化学的解析が可能となったことを示唆している。

末梢組織炎症モデルにおいては、一次知覚ニューロンの神経終末が末梢性感作を受け、外部からの刺激に対して明らかな過敏状態であることが知られている。炎症状態の神経終末の疼痛伝達に ATP が重要な役割を持っていることは既に多くの論文により示唆されているが、今回我々はリン酸化 ERK を用いてそれを検証した²⁾。機械刺激による誘導されるリン酸化 ERK と ATP 受容体 P2X3 との二重標識

Fig. 6

A, B: Photomicrographs showing the p-ERK-IR in the ipsilateral (A) and contralateral (B) L4/5 DRG at 7 days after CCI surgery. The CCI increased p-ERK expression in both neurons and surrounding satellite cells (arrowheads) or only in satellite cells surrounding large neurons (open arrows) in the ipsilateral DRG; the inset shows that both neurons and satellite cells expressed p-ERK-IR. **C:** Time course of the mean percentages of p-ERK-IR neurons relative to the total number of neurons in the DRG. *: $p < 0.05$ compared to the naive control. **D:** Size-distribution histogram of p-ERK-IR neuron profiles in the ipsilateral DRG at 7 days after CCI surgery. Scale bar: (in B) A, B, 100 μm . (From Obata et al., EJN 2004)

ニューロンは、正常状態では非常に少ないのに対して、CFAによる炎症組織では多くの二重標識細胞が観察された (Fig. 4A-D)。この結果は、正常組織の機械的侵害受容に P2X3 受容体はほとんど関与しないが、炎症状態による疼痛過敏では大きな関与を持っていることを示している。

侵害熱刺激による p38MAPK のリン酸化

ERK 以外の代表的 MAPK として、p38MAPK が知られている。この p38 に対するリン酸化抗体を用いて、侵害熱刺激をラット足底に与え、L4,5 DRG における p38 のリン酸化を免疫組織化学法にて検出した³⁾。その結果、リン酸化 p38 は、正常状態においても 15% ほどの DRG ニューロンにおいて存在し、刺激温度が高くなるほど、特に侵害領域に入ると、有意に多数のニューロンにおいて陽性細胞が観察された (Fig. 5A-D)。その変化の時間経過は、ERK の場合と同様に、刺激後 2 分をピークとする、

非常に早い時間経過を示した。さらに ERK の場合と同じく、侵害領域の高い温度により誘発されるリン酸化 p38 陽性ニューロン群は、サイズ分布が右方向へ、つまりより大きなニューロン群で陽性反応が観察されることが明らかとなった。また、この p38 のリン酸化反応を拮抗剤で抑制すると、カプサイシン誘発熱性痛覚過敏が抑制できることが明らかとなった。つまり、p38 のシグナル伝達機構の活性化は、一次知覚ニューロンの感作を通じて、痛覚過敏に直接関与していることがわかった。

神経傷害モデル (CCI model) の DRG における MAPKs の活性化⁴⁾

疼痛行動の亢進が観察される末梢神経傷害モデルが複数発表され、ニューロパシックペインモデルとしてその行動薬理学的検索が広く行われている。さらにその病態を精査することで、ニューロパシックペインの病態に迫ろうとする多くの研究成果が報告

Fig. 7

A, B: Photomicrographs showing the p-p38-IR in the ipsilateral (A) and contralateral (B) L4/5 DRG at 7 days after CCI surgery. There was an increase in the number of p-p38-IR neurons (arrows) in the ipsilateral DRG. The number of p-p38-IR satellite cells was also greatly increased (open arrows); the inset shows that both neuron and satellite cell expressed p-p38-IR. **C:** Time course of the mean percentages of p-p38-IR neurons relative to the total number of neurons in the DRG. *: $p < 0.05$ compared to the naive control. **D:** Size-distribution histogram of p-p38-IR neuron profiles in the ipsilateral DRG at 7 days after CCI surgery. Scale bar: (in B) A, B, 100 μm . (From Obata et al., EJM 2004)

されてきた。我々も CCI モデルや後述の Chung モデルなど、部分神経損傷モデルの病態を検索してきたが、今回はモデルの DRG における MAPK のリン酸化について検討した。その結果、CCI モデル作成後 1 週間後の DRG においては、中型から大型のニューロンにおいて ERK のリン酸化反応の増強が観察された (Fig. 6A-D) 次に我々が以前発表した神経傷害マーカーとして有用な ATF3 との二重染色を施行すると、多くのリン酸化 ERK 陽性ニューロン (82.6%) が ATF3 を発現しており、多くの傷害ニューロンにおいて ERK のリン酸化が亢進していることがわかった。一方、p38MAPK についても検討した (Fig. 7A-D)。CCI モデルの DRG において、劇的に増加したリン酸化 p38 が観察された。ERK の場合と違って、小型から中型のニューロンでその免疫反応の増加が観察された。また、ATF3 との二重染色ではごく一部のニューロン (10.7%) のみ共存が観察された。この結果は、ERK の場合

とは異なって、CCI モデルのような部分神経損傷において、p38 のリン酸化が生じるのは損傷から免れた非損傷ニューロンであることが明らかとなった。

神経傷害モデル (Chung model) における遺伝子発現に対する MAPKs の役割⁵⁾

もう一つの代表的ニューロパシックペインモデルである Chung モデルは、L5 脊髄神経の結紮することで、疼痛過敏行動が生じるものである。非損傷神経である L4 脊髄神経を通じて、末梢組織からの侵害情報は脊髄ニューロンに伝達されるが、我々はこれまでこの非損傷ニューロンの集合体である L4 DRG において、多彩な遺伝子発現の変化が生じていることを明らかにしてきた⁶⁻¹⁰⁾。今回は、この L5 脊髄神経絞扼後の L4 DRG における MAPK の変化を検討した。すぐ近傍の脊髄神経の切断を受けた L5 DRG においては、ERK および p38 のリン酸化反応は明らかに増加し、ニューロンおよび周囲の

Fig. 8

A, B: Photomicrographs showing the p-p38-IR in the ipsilateral (A) and contralateral (B) L4 DRG at 7 days after L5 SNL surgery. There was an increase in the number of p-p38-IR neurons (arrows), but not satellite glial cells, in the ipsilateral L4 DRG. Scale bar: (in B) A, B, 100 μ m. (From Obata et al., JN 2004)

衛星細胞において、免疫反応の増大が観察された。非損傷 DRG である L4 DRG においても大きな変化が観察され、小型細胞から中型細胞のニューロンにおいて、多くのリン酸化 p38 陽性細胞が観察された (Fig. 8A, B)。興味深いことに、他の MAPK である ERK や JNK においては L4 DRG における増加は観察されなかった。これらのリン酸化 p38 陽性ニューロンは、TrkA と高い共存を示し、これらの変化が神経成長因子 (NGF) 依存性であることを示唆している。

さらに Chung モデルの L4 DRG において、BDNF (brain derived neurotrophic factor) や TRPV1 の発現が増加することも我々は報告している。リン酸化 p38 陽性ニューロンは、これらの BDNF や TRPV1 と高い共存率を示し、さらに p38 の拮抗剤を投与することで、L4 DRG における遺伝子発現の増加を抑制することにも成功した。これらの結果は、非損傷ニューロンである L4 DRG において、p38 の活性化が転写調節に関与し、標的遺伝子である BDNF や TRPV1 の発現調節に関わっていることを示している。さらに Chung モデルに対して、p38 の拮抗剤を投与すると侵害熱刺激に対する疼痛過敏反応が抑制できることより、上記の変化は疼痛行動に大きな役割を持っていることが明らかとなった。

最後に

我々の教室における一次感覚ニューロンにおける MAPK の役割に関する成果の一部を概説した。MAPK が痛みの発生やそれに伴う可塑的な変化に

重要な役割を担っていることは明らかである¹¹⁾。今後、慢性痛に対する効果的な治療法の開発に向けて、様々な動物モデルを用いた詳細な解析が必要となってくるであろう。特異的なリン酸化阻害薬を用いれば、リン酸化カスケードの任意のレベルで MAPK の活性化を阻害することが可能であり、痛覚伝達における MAPK の役割は加速度的に解明されていくものと思われる。

文 献

- 1) Dai, Y., Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tokunaga, A., Yamanaka, H., Tachibana, T., Liu, Y. and Noguchi, K., Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization, *J. Neurosci.*, 22 (2002) 7737-7745.
- 2) Dai, Y., Fukuoka, T., Wang, H., Yamanaka, H., Obata, K., Tokunaga, A. and Noguchi, K., Contribution of sensitized P2X receptors in inflamed tissue to the mechanical hypersensitivity revealed by phosphorylated ERK in DRG neurons, *Pain*, 108 (2004) 258-266.
- 3) Mizushima, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Mashimo, T. and Noguchi, K., Activation of p38 MAPK in primary afferent neurons by noxious stimulation and its involvement in the development of thermal hyperalgesia, *Pain*, 113 (2005) 51-60.
- 4) Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A. and Noguchi, K., Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats, *Eur. J. Neurosci.*, 20 (2004) 2881-2895.

- 5) Obata, K., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Mizushima, T., Katsura, H., Fukuoka, T., Tokunaga, A. and Noguchi, K., Role of the MAPK activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation, *J. Neurosci.*, 24 (2004) 10211-10222.
- 6) Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Hashimoto, N. and Noguchi, K., Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model, *J. Neurosci.*, 21 (2001) 4891-4900.
- 7) Tsuzuki, K., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tsujino, H., Sakagami, M. and Noguchi, K., Differential regulation of P2X3 mRNA expression by peripheral nerve injury in intact and injured neurons in the rat sensory ganglia, *Pain*, 91 (2001) 351-360.
- 8) Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tachibana, T., Dai, Y., Yamanaka, H. and Noguchi, K., VR1, but not P2X3, increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation, *Pain*, 99 (2002) 111-120.
- 9) Fukuoka, T. and Noguchi, K., Contribution of the spared primary afferent neurons to the pathomechanisms of neuropathic pain, *Molecular Neurobiology*, 26 (2002) 57-67.
- 10) Obata, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Hashimoto, N., Yoshikawa, H. and Noguchi, K., Contribution of injured and uninjured DRG neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats, *Pain*, 101 (2003) 65-77.
- 11) Obata, K. and Noguchi, K., MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity, *Life Sci.*, 74 (2004) 2643-2653.

Address for correspondence: Koichi Noguchi, M.D.

Department of Anatomy and Neuroscience, Hyogo College of Medicine

1-1 Mukogawa, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan

Tel: 0798-45-6415