Role of spinal microglial cells in pain signaling

Makoto Tsuda and Kazuhide Inoue

Department of Molecular and System Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

[Received 2 December 2005, Accepted 6 January 2006]

Abstract

Neuropathic pain is often a consequence of nerve injury or of diseases such as diabetes, HIV AIDS or cancer, that damage peripheral nerves. Neuropathic pain can be agonizing, persistent over long periods, and, unfortunately, is often resistant to known pain-killers. Recent advances in our understanding of the mechanisms producing neuropathic pain have been made by defining causal roles of spinal microglia in the pathogenesis of neuropathic pain. Within spinal dorsal horn, peripheral nerve injury leads to a progressive series of changes in microglia including morphological hypertrophy of cell body and proliferation taken as indicative of activation. Furthermore, several molecules including P2X₄ receptors, which are present in activated microglia, have been found to be required molecular mediators. We expect that understanding the key roles of these molecules in spinal microglia may lead to new strategies for the management of neuropathic pain, strategies not previously anticipated by a neuron-centric view of pain plasticity in the dorsal horn.

Key words: P2X₄ receptor; p38; Microglia; Spinal cord; Neuropathic pain

脊髄ミクログリア細胞の痛みへの役割

津田 誠／井上 和秀

九州大学大学院薬学研究院医療薬科学専攻薬効解析学分野

はじめに

末期癌や糖尿病、あるいは脳卒中や事故、手術などの後遺症に見られる慢性化した堪え難い痛みの中で、神経系の圧迫、変性あるいは損傷に起因しているものは神経因性疼痛と呼ばれる。その典型的症状として、自発痛、痛覚過敏反応およびアロディニアがある。アロディニアとは、通常であれば痛みを起こさない軽度な機械刺激や触刺激によって激しい痛みを誘発するという症状である。このような病的な

痛みに対しては、適切なペインコントロールが必要であるが、今現在その発症機序が解明されておらず、ゆえに有効な治療法もない。

神経因性疼痛における基礎研究は、おもに末梢神経を損傷させたモデル動物を用いて行われている。しかし、その研究の殆どが痛覚伝導路における神経細胞に焦点をあてたものである。中枢神経系は、神経細胞の他に、数の上では数倍になるグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびミクログリア）で構成されている。グリア細胞は、神

経細胞に対する形態維持や栄養補給といった補助的役割がメインであろうと考えられてきたが、最近の *in vitro* 研究から、神経活動の調節にも積極的に関わっていることが示され、生体内でも様々な生理的役割あるいは疾患に対する関与が注目されている。その役割に関して、最近、特にクローズアップされている病態の1つが神経因性疼痛である。そこで本稿では、脊髄グリア細胞、特にミクログリアに発現する様々な分子が神経因性疼痛に深く関与しているという最近の知見を概説する。

神経因性疼痛における 脊髄内ミクログリアの活性化

ミクログリアは、骨髄由来単核細胞の前駆細胞が血液脳関門の不完全な時期に脳内に移行して、そこで成熟を遂げたものと想定されており、哺乳類の中核グリア細胞の5～20%を占める¹⁾。正常状態におけるミクログリアは、分岐の多い突起を長く伸ばしたラミファイド (ramified) 型で存在している。従来まで、ラミファイド型ミクログリアは“静止型”とされてきたが、最近の研究から、*in vivo* におけるミクログリアは、静止しているのではなく、周囲の環境を監視するかのようにその突起をダイナミックに常に動かしていることが示されている^{2,3)}。そこへ外界から刺激が加わると、ミクログリアは即座に応答し、活性化状態へ移行する。神経因性疼痛モデルの脊髄後角の場合、末梢神経の損傷24時間後で細胞体の肥大化や突起の退縮などの活性化型ミクログリアの形態学特徴が観察できる。さらに、2～3日後には細胞分裂を起こし、ミクログリアの細胞数が2倍以上に増加する⁴⁾。L5脊髄神経を損傷した場合、L5脊髄後角内におけるミクログリアの活性化領域は、表層部(第I層や第II層外側)にはあまり見られず、プロテインキナーゼC γ を発現する第II層内側から深層部(第III層や第IV層)で著明である(論文準備中)。このことから、脊髄後角におけるミクログリアの活性化は一樣ではなく、時空的に非常に制御された反応であることが示唆される。ミクログリアを活性化させる因子として、様々な分子が提唱されているが、詳細なメカニズムは依然不明である⁴⁾。しかし最近、toll-like receptor 4 (TLR4)の欠損により、末梢神経損傷によるミクログリアの活性化が著明に減弱していることが報告され⁵⁾、そ

の役割に注目が集まっている。

ミクログリア発現分子と神経因性疼痛

上述のように、神経因性疼痛モデルの脊髄においてミクログリアの活性化が起こるという組織学的な数多くの知見が報告されている一方で、神経因性疼痛自体に対するその役割は不明であった。しかし最近、神経因性疼痛の発現に重要な役割を有している幾つかの分子が、脊髄でミクログリア細胞特異的に発現していることが報告され、脊髄ミクログリアが神経因性疼痛に対して因果性を有していることが示されている。

筆者らは、イオンチャネル型ATP受容体サブタイプ1つであるP2X₄受容体の発現が、末梢神経損傷によって脊髄ミクログリア細胞特異的に著しく増加することを見出している⁶⁾。P2X₄受容体の薬理的遮断や発現レベルの低下により、アロディニアが著明に抑制され、さらにP2X₄受容体を刺激したミクログリアを正常ラットの脊髄腔内へ投与することによりアロディニアが発症する。したがって、活性化型ミクログリアにおけるP2X₄受容体の活性化が神経因性疼痛に必須であるとともに、十分なシグナルであることを示している⁶⁾。

Gタンパク質共役型受容体もミクログリアに発現して神経因性疼痛に関与しているという報告がある。Abbadieら(2003年)は、chemotactic cytokine receptor 2 (CCR2)の欠損マウスが末梢神経損傷によるアロディニアを発症しないことを報告している⁷⁾。CCR2の発現は、神経損傷により、脊髄ミクログリアだけでなく、末梢神経や足の皮膚でも著明に増加するが、MCP-1 (CCR2の内因性リガンド)を脊髄腔内へ投与することでアロディニアを誘発できることから、脊髄ミクログリアに発現するCCR2の重要性を示唆している。Fractalkine受容体であるCX₃C chemokine receptorはミクログリアに発現し、神経損傷により増加し、fractalkineの中和抗体によりアロディニアの発現が抑制される⁸⁾。以上のように、ケモカインとその受容体がミクログリアを介して神経因性疼痛に関与していることが示唆される。

ミクログリアは、免疫関連分子を発現しており、中枢免疫担当細胞とも呼ばれている。生体の自然免疫を司っているTLR4もその中の1つであるが、神経因性疼痛モデルの脊髄後角においてその発現が著

Fig. 1 脊髄ミクログリアに発現する分子と想定される神経因性疼痛発現メカニズム。

末梢神経の損傷によって脊髄内で活性化したミクログリアにおいて、イオンチャネル型受容体 (P2X₄)、Gタンパク質共役型受容体 (CCR2, CX₃CR1)、免疫関連分子 (TLR4) および細胞内シグナル分子 (p38, ERK) の発現増加および活性化が起こり、サイトカイン等の液性因子の放出を介して、近接する神経細胞へ伝えられる。その結果、シナプス伝達の変調を引き起こし、最終的に神経因性疼痛を発現するものと考えられる。

明に増加することが報告されている。さらに最近、TLR4の遺伝子欠損と機能不全、さらに脊髄に局限したTLR4発現レベルの減少によって、神経損傷後のアロディニアが減弱することも示され、脊髄ミクログリアに発現するTLR4の重要性も示唆されている⁵⁾。

ミクログリアにおける細胞内情報伝達分子としてmitogen-activated protein kinaseファミリーのp38とextracellular signal-regulated kinase (ERK)が報告されている。p38は、神経因性疼痛モデルの脊髄ミクログリアで活性化する^{9,10)}。さらに、その阻害剤であるSB203580により、アロディニアの形成および発現が抑制される^{9,10)}。p38の活性化は、一次求心性神経細胞でも観察されるが、Jinら(2003年)

は、ミクログリアのみでp38の活性化が見られる損傷1日後で、アロディニアの発現がSB203580で抑制されることを見出し、ミクログリアにおけるp38の活性化がアロディニアの発現に重要であることを示している⁹⁾。Zhuangら(2005年)は、神経損傷後2日をピークとして、21日まで活性化型ERKがミクログリアで観察され、その活性化に重要なMEKの阻害剤によりアロディニアの抑制が検出できることから、ERKは神経因性疼痛に重要な役割を示唆している¹¹⁾。

ミクログリアから神経細胞への機能的連関

ミクログリアが中枢神経系におけるサイトカインやケモカインの産生・遊離細胞である点から¹²⁾、そ

れら液性因子が神経細胞への連絡役である可能性が考えられる (Fig. 1). P2X₄ 受容体やその他の受容体の活性化は、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、そのカルシウムが細胞内キナーゼの活性化を誘発させ、サイトカイン、ケモカインまたは神経栄養因子等の液性因子の産生および放出を促すと予想される⁴⁾。放出された液性因子は、近接する神経細胞へ作用し、シナプス伝達を変化させ、神経因性疼痛を引き起こしていることが考えられる⁴⁾。

おわりに

P2X₄ 受容体およびその他のミクログリア発現分子が神経因性疼痛に重要な役割を有しているという基礎的知見は、神経因性疼痛に対して脊髄ミクログリア細胞が非常に重要な役割を担っていることを示し、その発現分子を標的にした薬剤が、将来的に有効な治療薬となり得る可能性を示唆している⁴⁾。今後、同定されているミクログリア発現分子が、神経損傷後にどのような時間経過に沿った発現変化を起こすのか、また、分子同士がどのように相互作用するのかなどを詳細に解析することで、脊髄ミクログリアが神経因性疼痛を形成する全体像を解明できるものと思われる。

文 献

- 1) Nakajima, K. and Kohsaka, S., Microglia: activation and their significance in the central nervous system, *J. Biochem.*, (Tokyo) 130 (2001) 169-175.
- 2) Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B., ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo, *Nat. Neurosci.*, 8 (2005) 752-758.
- 3) Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F., Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo, *Science*, 308 (2005) 1314-1318.
- 4) Tsuda, M., Inoue, K., and Salter, M.W., Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia, *Trends. Neurosci.*, 28 (2005) 101-107.
- 5) Tanga, F.Y., Natile-McMenemy, N., and DeLeo, J.A., The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuro-immunity and painful neuropathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 (2005) 5856-5861.
- 6) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K., P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury, *Nature*, 424 (2003) 778-783.
- 7) Abbadie, C., Lindia, J.A., Cumiskey, A.M., Peterson, L.B., Mudgett, J.S., Bayne, E.K., DeMartino, J.A., MacIntyre, D.E., and Forrest, M.J., Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (2003) 7947-7952.
- 8) Milligan, E.D., Zapata, V., Chacur, M., Schoeniger, D., Biedenkapp, J., O'Connor, K.A., Verge, G.M., Chapman, G., Green, P., Foster, A.C., Naeve, G.S., Maier, S.F., and Watkins, L.R., Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats, *Eur. J. Neurosci.*, 20 (2004) 2294-2302.
- 9) Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J., and Ji, R.R., p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain, *J. Neurosci.*, 23 (2003) 4017-4022.
- 10) Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., and Inoue, K., Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury, *Glia*, 45 (2004) 89-95.
- 11) Zhuang, Z.Y., Gerner, P., Woolf, C.J., and Ji, R.R., ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model, *Pain*, 114 (2005) 149-159.
- 12) Inoue, K., Microglial activation by purines and pyrimidines, *Glia*, 40 (2002) 156-163.

Address for correspondence: Kazuhide Inoue

Department of Molecular and System Pharmacology

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

II-410, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

TEL: 092-642-4729 / FAX: 092-642-4729 / E-mail: inoue@phar.kyushu-u.ac.jp