Pain Signaling and Gangliosides

疼痛におけるガングリオシドの機能

Watanabe, Shun¹; and Higashi, Hideyoshi²

¹Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Kitasato University, Minato-ku, Tokyo 108–8641, Japan

E-mail: watanabes@pharm.kitasato-u.ac.jp

²Division of Glyco-Signal Research, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Miyagi, 981–8558, Japan

FAX: +81–22–727–0077, E-mail: hhigashi@tohoku-pharm.ac.jp

(Received on July 3, 2014, accepted on August 25, 2014)

Key Words: pain, nociception, hyperalgesia, gangliosides, afferent neuron

Abstract

Pain sensing is an important nervous system function to detect and avoid potentially harmful stimuli. In addition to direct noxious stimuli, inflammation and neuronal damage can also raise sensory nerve activation which is then transmitted to a higher brain region through particular neural pathways. In addition, pain sensing is increased under various physiological or pathological conditions such as viral infection, diabetes, cancer, chronic inflammation, or damage to neuronal fibers. It is possible that pain sensitivity persists long after tissue injury or inflammation has been resolved. In this chronic case, pain is a disease rather than a sign of tissue damage because pain sensitivity without tissue damage is not beneficial in avoidance of further tissue damage. Although the nervous system has abundant gangliosides, which play important roles in neural functions, little is known how gangliosides regulate pain sensing. In this review, we introduce several works that reveal gangliosides modulate pain sensing. These studies involve using naïve animals or pathological animal models. Moreover, we discuss the possibility that peripheral ganglioside GT1b produces nociception and hyperalgesia by regulation of peripheral glutamate signaling.

要約

痛みの感受性は潜在的に有害な刺激を発見し、回避する重要な神経系の機能の一つである。直接的な侵害刺激に加えて、炎症や神経組織への損傷も感覚神経の活性化を引き起こし、その信号は特定の神経経路を介して脳の高次領域へと伝達される。さらに、様々な生理的な条件下や、病的な状態（例えばウイルス感染、糖尿病、がん、慢性的な炎症、神経繊維への障害など）でも痛みの感受性は増加する。組織への障害や炎症が完治した後も、痛みの過敏化が持続する可能性がある。このような慢性的な疼痛の場合、組織障害が伴わない疼痛はもはやさらなる組織障害を回避するためには役に立たず、痛みは組織の障害のサインというよりは、病気と言って良い状態となる。ガングリオシドは神経細胞に多量に含まれ、神経系において重要な機能を果たしているが、ガングリオシドがどのように疼痛を制御しているのかについてはほとんど知られていない。このレビューでは、ガングリオシドが痛みを調節しうることを述べたいいくつかの研究を紹介する。これらの研究では、無処置動物や、病的な疼痛モデル動物を使用している。さらに、最近我々のグループの研究が明らかにした末梢のガングリオシドGT1bが疼痛や痛覚過敏を末梢のグルタミン酸シグナルを介して引き起こすことについて述べる。

A. The Pain Pathway

Peripheral nerve fibers innervate skin and sense various extrinsic stimuli such as temperature, touch, itch, and pain. These innervated fibers are connected to receptor cells, form encapsulated nerve endings, or unmyelinated free nerve endings from both unmyelinated and myelinated nerve fibers. Noxious stimuli leads to depolarization in free nerve endings and then nociceptive signals are driven towards central nervous systems. Sensory fibers are divided into A β -, A δ -, and C-fibers according to their diameters and conduction velocity. Nociceptors include part C-fibers and part A δ -fiber. A δ -fibers which are myelinated, are separated into a high-threshold mechanoreceptive fiber and a mechano-heat sensitive fiber. A δ -fiber activation leads to sharp pricking pain. On the other

A. 痛みの伝導路

末梢の神経繊維は皮膚内に侵入し、温度、触覚、痒み、痛みなど多様な外部の刺激を感知する。これらの皮膚に侵入した神経繊維は受容器細胞に接続するか、被包性の神経終末、もしくは無髄化した自由神経終末を形成する。この自由神経終末は無髄であるが、無髄、有髄繊維の両者から生じる。侵害性の刺激は自由神経終末において脱分極を生じさせ、この侵害性の信号は中枢神経系へと伝わる。これら感覚性の繊維は直径と神経伝達速度によりA β -, A δ -, C-繊維などと分類される。痛みを受容する繊維はA δ -, C-繊維の一部が担う。A δ -繊維は有髄繊維であり、高閾値で機械刺激を受容するものの、温度と機械刺激両者を受容するものに分けられる。A δ -繊維の刺激は“鋭く”“刺すような”痛みとして感じられる。

hand, most C-fiber nociceptors can respond to noxious thermal, mechanical, and chemical stimuli. Thus, these nociceptors are called polymodal nociceptors. These peripheral neural fibers are from primary afferent neurons which have cell bodies in the dorsal root ganglion (DRG, which is located close to the spinal cord and is a swelling along the dorsal root. Afferent nerve fibers enter the spinal cord through dorsal root). Primary afferent neurons also elongate axons into the spinal dorsal horn and synapse to dorsal horn neurons. The axons of dorsal horn neurons in the pain pathway are projected to a higher brain center through the contralateral spinal cord. At synapses between the primary afferent neurons and the dorsal horn neurons, substance P and glutamate is used as an excitatory neurotransmitter. In addition, neural fiber projected from higher brain centers to the spinal cord can reduce nociceptive signaling from peripheral to central. For example, periaqueductal grey (PAG) neurons can inhibit spinal nociceptive neuron *via* rostroventromedial medulla (RVM). Locus coeruleus (LC) neurons are also important in the endogenous anti-nociceptive system. LC neurons inhibit the transmission between primary afferent neurons and spinal dorsal horn neurons (Fig. 1). Moreover, spinal GABAergic and glycinergic interneurons also control pain signaling.

Free nerve endings of primary afferent neurons have many receptors for various endogenous nociceptive agents or nocicep-

一方で、ほとんどのC-繊維は侵害的な熱、機械、化学刺激など多様な刺激に反応することができる。そのため、これらの繊維はポリモーダル受容器とも呼ばれている。以上の末梢神経繊維は Dorsal root ganglion (DRG、後根神経節、脊髄近傍に位置し、後根の膨らんだ部分である。感覚神経繊維は後根を通過して脊髄へ入る) に細胞体を持つ一次感覚神経由来である。一次感覚神経は軸索を脊髄後角にも伸ばし、後角神経とシナプスを形成する。後角神経の軸索の中で、疼痛を伝達する軸索は対側の脊髄を通過し、より高次の脳へと投射される。この後角神経細胞と一次感覚神経との間のシナプスにおいては、グルタミン酸やサブスタンス P が主要な伝達物質として機能している。さらに、高次脳から脊髄へ投射されている神経繊維が末梢から中枢への痛みの伝導を減少させる。例えば、中脳中心灰白質 (periaqueductal grey、PAG) ニューロンは吻側延髄腹内側部 (rostromedial medulla、RVM) を介して脊髄の疼痛の伝導を抑制できる。青斑核 (Locus coeruleus、LC) ニューロンも内在性の疼痛抑制経路として重要である。青斑核ニューロンは脊髄後角に投射し、一次感覚神経と後角神経間のシナプス伝達などを抑制する (Fig. 1)。さらに、脊髄の GABA 性とグリシン性の介在神経も痛みのシグナルを調節できる。

Fig. 1. Pain pathway. Ascending pathway: Pain signaling from peripheral nociceptors to thalamus *via* spinal dorsal horn. Descending pathway: Antinociceptive pathways from the brain to spinal cord. These pathways from PAG or LC inhibit dorsal horn neuron. PAG: periaqueductal grey, RVM: Rostral Ventromedial medulla, LC: locus coeruleus.

tive stimuli such as heat, cold or acidic pH. In fact, intraplantar injection of endogenous nociceptive agents such as bradykinin (1), prostaglandin E2 (2), glutamate (3), ATP (4), LPA (5), or other ligands produced nociceptive behavior against the injected region. The sources of these endogenous nociceptive agents are various cells such as injured tissues, immune cells, or free nerve endings. Furthermore, nociceptive heat or cold stimuli are able to induce pain *via* the TRP channel receptor families that are non-selective cation channels. For example, TRPV1 channels are activated by H⁺ or temperature higher than 43°C; TRPV2 channels, higher than 52°C; TRPM8 channels, lower than 26°C. Receptor activation causes electric activity in free nerve endings.

B. Hyperalgesia and Allodynia

Pain sensitivity is increased under various physiological or pathological conditions. In case of injury, nociceptive sensitivity is increased to prevent further tissue damage. Lower nociceptive threshold leads to recognition of tissue vulnerability and promotes protective behavior. On the other hand, it is possible that hyperalgesia or allodynia (allodynia is pain in response to a non-nociceptive stimulus such as tactile stimulus, while hyperalgesia is increased pain sensitivity) persists for long periods after tissue injury or inflammation has been resolved. In this chronic stage, pain is a disease rather than a sign of tissue damage because hyperalgesia or allodynia without tissue damage is not beneficial to prevent further tissue damage. Allodynia or hyperalgesia are produced by various mechanisms such as nociceptor sensitization, synaptic plasticity, inhibition of the descending pathway, increased spontaneous neuronal activation, and ectopic discharge. These changes are caused by pathological cases such as chronic inflammation, cancer, diabetes, and neuropathic pain. Recent studies have focused on neuropathic pain, caused by impairment of the nervous system, due to serious pain and the difficulty of therapy. Animals used in Neuropathic pain models are prepared by nerve transection or ligation. Recent studies used several ligation models: In the chronic constriction injury (CCI) model, the sciatic nerve is constricted by chromic gut; In partial sciatic nerve ligation (PSNL or Seltzer model), 1/3–1/2 of the sciatic nerves are tightly ligated by sutures; In the spinal nerve ligation (SNL) model, lumbar spinal nerve 5 (and 4/6) is ligated by sutures. Differences in these models are attributed to sensitivity against the type of nociceptive stimuli or the type of sympathetic neuron relativity.

C. Methods of Measurement for Nociception

Tissue injury is caused by various environmental stimuli and pain sensing is associated with diverse molecular mechanisms and neural circuits. Thus, several nociceptive stimuli are used for

一次感覚神経の自由神経終末は内在性の発痛物質や熱、低温、酸などの侵害刺激に対する多くの受容体が存在する。事実、内在性の発痛物質であるブラジキニン(1)、プロスタグランジンE2(2)、グルタミン酸(3)、ATP(4)、lysophosphatidic acid(5)などは、足底皮下に投与すると、投与した部位に対する疼痛行動を惹起する。これらの発痛物質の供給源は障害を受けた組織をはじめ、血球系細胞や自由神経終末などである。さらに、侵害性の熱や冷刺激は非選択的なカチオンチャネルであるTRPチャネルファミリー受容体を介して疼痛を引き起こす。例えば、TRPV1は酸や43°C以上の温度で、TRPV2は52°C以上、TRPM8は26°C以下でそれぞれ活性化される。受容体の活性化は自由神経終末において電気的な活動を引き起こす。

B. 痛覚過敏およびアロディニア

痛みの感受性は様々な生理的、あるいは病的な条件下で増強される。負傷などのケースでは、疼痛の感受性はさらなる組織の障害を回避させるために増強する。低下した疼痛閾値は脆弱になった組織を感知し、さらなる防御行動をとらせる。一方で、このような痛覚過敏、あるいはアロディニア（アロディニアは触覚のような非侵害性の刺激に対しても痛みとして反応する現象である。一方で、痛覚過敏は痛み自体がより強く感じられる現象である）は炎症や障害が完治した後も長期間持続してしまうことがある。このような慢性的な状態では、組織障害がない痛覚過敏やアロディニアはさらなる障害を回避するという利点がないため、痛みは障害のサインというよりは病態と考えたほうがふさわしい。アロディニアや痛覚過敏は、侵害受容体の過敏化、疼痛伝達経路のシナプスの可塑的变化、下行性疼痛抑制経路の抑制、神経繊維の自発的あるいは異所性の発火などの多様な要因により引き起こされる。これらの変化は慢性的な炎症や、がん、糖尿病、神経因性疼痛などの病態時にも観察される。最近の研究では、深刻な痛みと治療の難しさから神経系の異常により引き起こされる神経因性疼痛が特に注目されている。神経因性疼痛モデル動物は、神経切断や神経結紮により作製される。このような神経因性疼痛モデルは、いくつかの種類が作製されている。坐骨神経絞扼（chronic constriction injury; CCI）モデルはクロムでコートした縫合糸を用いて、坐骨神経を結紮する。坐骨神経部分結紮モデル（PNSLもしくはSeltzerモデル）では、1/3～1/2周坐骨神経を縫合糸できつく結紮する。脊髄神経結紮（SNL）モデルでは第5（および4/6）腰椎神経を結紮する。これらのモデルでは各種の侵害刺激に対する感受性や交感神経からの影響が異なることが考えられている。

C. 痛みの測定法

上記のように組織障害は様々な外部の刺激により引き起こされ、痛みの感知は多様な分子メカニズムや神経回路に関連している。そのため、いくつかの侵害刺激が痛みの強さの

measurement of pain intensity: the pressure of a nylon filament (von Frey filament) to the plantar surface of animals for mechanical stimulus; the placing of animals on hot plate or applying radiant heat from lamps to the plantar surface of animals which are used for measurement of thermal nociception; a cold plate for cold stimulus; and the intraplantar injection of formalin, which is used for chemical agent induced nociception. Pain intensity is measured as duration until animals show nociceptive behavior, threshold of stimulus, length of time or number of nociceptive behavior.

D. Gangliosides Modulate Nociceptive Behaviors

Table 1 shows several studies reporting the effects of gangliosides on nociceptive behavior including pathological pain models. As shown here, however, effects of gangliosides are different in each pain model.

D-1. Gangliosides Reduced Phenylquinone-Induced Writhing

Early studies reported systemic treatment of ganglioside mixtures (GM1+GD1a+GD1b+GT1b) reduced phenylquinone induced writhing (6, 7). Writhing tests are performed by measurement of time length of writhing behavior after intraperitoneal injection of harmful agents such as phenylquinone or acetic acid. Individual injection of GM1 or GT1b is more effective than GD1a or GD1b. Acetic acid writhing is used as a viscera pain model, however, mechanisms of analgesic effects of gangliosides remain unclear.

D-2. Neuropathic Pain and GM1

Intraperitoneal injection of GM1 gangliosides is reported to be reduced in thermal hyperalgesia, spontaneous nociceptive behavior observed in neuropathic pain model (CCI model) rats (8), and increased neuronal metabolic activity that is monitored by uptake of 2-deoxyglucose in spinal cord of CCI model rats (9). In addition, intrathecal GM1 injection also reduces hyperalgesia of CCI model rats (10). However, GM1 injection has no effect on thermal nociception of naive rats. These findings suggest that GM1 gangliosides are involved in nociceptive pathways in spinal cord. GM1 seems to be reduced enhanced spinal neuronal activity involved in nociceptive pathway by neuropathic pain.

D-3. The Effects of GM1 on Altered Nociception in Aged Rats

In other reports using GM1 to reduce nociception, long term treatments (daily i.p. injection for 30 days) reduce altered nociceptive behaviors of aged rats. Nociceptive behavior is changed in response to aging in rats as well as human. In the report of Goettl *et al.* (11), aged rats (22–24 months) showed thermal hypoalgesia and mechanical hyperalgesia compared to young rats (3–5 month). Longterm treatment of intraperitoneal GM1 administration ame-

測定に使用されている。例えば、ナイロン製のフィラメント (von Frey filament) を足底に押し当てる方法は機械的刺激に、ホットプレート上に動物を置く、あるいはランプなどからの放射熱を足底にあてる方法は熱刺激に、冷却されたプレートに動物を置く方法は冷刺激に、足底部皮下へのホルマリンの注入は化学物質により引き起こされる痛みを測定するために用いられている。痛みの強度はこれらの刺激を加えた後に疼痛行動を引き起こすまでの時間や、刺激の強度閾値、疼痛行動を起こす時間や回数により測定される。

D. ガングリオシドによる疼痛行動の調節

Table 1 に病的な疼痛モデル動物を含む疼痛行動へのガングリオシドの効果を検討した報告を示す。なお、ここで示すようにガングリオシドの効果はそれぞれの痛みのモデルで異なる。

D-1. ガングリオシド投与によるフェニルキノンWrithingの軽減

初期の研究では、ガングリオシド混合物 (GM1+GD1a+GD1b+GT1b) を全身投与することで、フェニルキノン writhing や酢酸 writhing (フェニルキノンや酢酸を腹腔内投与すると、痛みのため身もだえするような症状を起こす) を抑制できるという報告がある(6, 7)。Writhing testは腹腔内にフェニルキノンや酢酸などの障害性の薬剤を投与し、writhing behavior (身もだえするような動き) を測定する。それぞれのガングリオシドを個別に投与すると、GM1 やGT1bではGD1aやGD1bよりも鎮痛効果が高い。酢酸 writhing testは内臓痛のモデルともなりうるが、ガングリオシドがどのように痛みを抑制するか不明であった。

D-2. 神経因性疼痛とGM1

GM1 ガングリオシドを腹腔内に投与することにより、神経因性疼痛モデルであるCCIモデルラットで引き起こされる熱刺激に対する疼痛過敏と自発的疼痛行動を抑制でき(8)、CCIにより増加した脊髄の神経代謝活動 (2-デオキシグルコース取り込み能) も抑制できる(9) という報告がある。さらに、脊髄内にGM1を投与することでCCIモデルラットの疼痛過敏を抑制する(10)。しかし、GM1投与は無処置動物の熱による疼痛に対して効果を持たない。これらの結果から、GM1は神経因性疼痛により引き起こされた疼痛伝達系に関わる脊髄内の神経活動の亢進を抑えることで鎮痛効果を持つと考えられる。

D-3. 老化による疼痛異常におけるGM1 ガングリオシドの効果

ほかに、GM1を鎮痛のために投与した報告としては、ラットにおいてGM1を長期間処理 (30日間連日腹腔内投与) したところ、老齢ラットの疼痛異常を減少させたという報告がある。ラットの痛みの反応はヒトと同様に、老化に伴い変化していく。Goettlらの報告では(11)、若いラット (3~5カ月齢) に比べて高齢ラット (22~24カ月齢) では熱に対する感受性が低下する一方で、機械的刺激に対しては敏感になる。長期間GM1を腹腔内投与することにより、高齢ラット

Table 1. The effects of ganglioside and ganglioside related agents on pain.

		Animal model	Nociceptive stimuli		Sensitivity
KO mouse					
	GD3 synthase KO mice		von Frey filament	↑	Handa, Y. <i>et al.</i> (20)
			hot plate	↑	
			late phase of high conc. formalin	↓	
Ganglioside treatment					
GT1b i.pl.	ICR mice		low-conc. formalin	↑	Watanabe, S. <i>et al.</i> (22)
GT1b i.pl.	ICR mice		spontaneous nociception	↑	
Neuraminidase i.pl.	ICR mice		late phase of high conc. formalin	↓	
GM1 i.p. (30 days)	SD rats		hot plate	↑ *	Goettl, V. M. <i>et al.</i> (11)
	22–24 months		von Frey	↓ *	
			tail-flick test	=	
	SD rats		hot plate	=	
	3–5 months		von frey	=	
			tail-flick test	=	
Ganglioside mixture s.c./i.p./i.v.	Swiss mice		phenylquinone writhing	↓	Amico-Roxas, M. <i>et al.</i> (6, 7)
Ganglioside mixture i.p.	Swiss mice		hot plate	=	
GM1 i.p.	SD rats	Neuropathic pain (CCI)	radiant heat (hind paw)	↓	Hayes, R. L. <i>et al.</i> (8)
Brain ganglioside mixture **** i.p.	SD rats	Neuropathic pain (CCI)	radiant heat (hind paw)	↓	Mao, J. <i>et al.</i> (9)
Brain ganglioside mixture **** i.p.	SD rats	Neuropathic pain (CCI)	spontaneous nociception	↓	
GM1 i.t.	SD rats	Neuropathic pain (CCI)	radiant heat (hind paw)	↓	Mao, J. <i>et al.</i> (10)
GM1 i.t.	SD rats	Neuropathic pain (CCI)	spontaneous nociception	↓	
GM1 i.p.	129/SvEv mice	s.c. morphin (analgesic)	tail-flick test	↑ **	Crain, S. M. <i>et al.</i> (14)
GM1 i.t.	SD rats	Morphine torelance i.t.	tail-flick test	↓ ***	Mao, J. <i>et al.</i> (15)
		Opioid-induced hyperalgesia	radiant heat (hind paw)	↓	
Ganglioside binding protein					
cholera toxin B s.c.	SW mice	Opioid-induced hyperalgesia	tail-flick test	↓	Shen, K. F. <i>et al.</i> (12)
		s.c. morphin (analgesic)	tail-flick test	↓ ****	
		Morphine torelance s.c.	tail-flick test	↓ ***	
Neuraminidase inhibitor					
oseltamivir s.c.	SW mice	Opioid-induced hyperalgesia	tail-flick test	↓	Crain, M. <i>et al.</i> (13)
		s.c. morphin (analgesic)	tail-flick test	↓ ****	
		Morphine torelance s.c.	tail-flick test	↓ ***	

i.p., intraperitoneal; i.pl., intraplantar; i.t., intrathecal; i.v., intravenous; s.c., subcutaneous

↑ indicate increased nociceptive sensitivity; ↓ indicate decreased nociceptive sensitivity; = indicate gangliosides have no significant effect on nociceptive stimuli.

*GM1 restores abnormal nociceptive responses in aged rats.

**Blocking of opioid analgesia

***Blocking of morphine tolerance

****Increased duration of opioid analgesia

*****21% GM1, 40% GD1a, 16% GD1b, 2% GD3, 2% GQ1b

litorates altered nociception of aged rats. In this injection method, GM1 has no effects on young rats. Concomitant with GM1 effects on neuropathic pain, GM1 treatment seems to restore altered pain intensity in animals to the level of naïve rats. However, the change

で変化した疼痛感受性が若年ラットに近づくようである。なお、この投与方法では若年ラットには効果を持たない。神経因性疼痛における GM1 の効果とともに、GM1 は変化した痛みの強度を無処理のラットのレベルまで回復させる効果がある

of endogenous ganglioside composition in the pain pathway is unclear.

D-4. The Role of GM1 on Side Effects of Morphine

Chronic opioid receptor agonist treatment causes tolerance and hyperalgesia. Cholera toxin B (CtxB) subunit (12) that binds to GM1, and influenza drug oseltamivir, sialidase inhibitor (13) that is expected to decreased GM1 production from higher complex gangliosides, reduced opioid induced hyperalgesia and morphine tolerance in Swiss-Webster mice. Both CtxB and oseltamivir sustain acute analgesic effects of opioids, suggesting that blocking of GM1 inhibits opioid tolerance and hyperalgesia by reducing of opioid receptor desensitization. On the other hand, analgesic effects of opioid are inhibited by GM1 treatment in 129SvEv mice that are resistant strain to opioid tolerance (14). It may be possible that nociceptive pathways in 129SvEv mice have low GM1 content. However, daily intrathecal injection of GM1 ganglioside could inhibit morphine tolerance and opioid induced hyperalgesia in the rat model (15). These differences may be dependent on injection methods, injected tissues and/or animal species.

Various mechanisms are involved in opioid induced hyperalgesia (16). Crain *et al.* suggested that G protein class coupled to the opioid receptor is changed by chronic treatment of opioids (17). Opioid receptor coupled to Gi G protein reduce cAMP levels and neuronal activity under a normal state. Chronic opioid treatment may induce switching from Gi to Gs which induced cAMP production and neuronal activation. Indeed, chronic treatment of F11 cells (neuroblastoma×DRG neuron hybrid cells) with [D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin (DADLE), a δ opioid receptor agonist, increased cAMP levels although δ opioid receptors are coupled to a Gi G protein under normal state. Acute DADLE treatment does not cause cAMP production, however, pretreatment of GM1 cause cAMP production by acute DADLE treatment in F11 cells. In addition, GM1 pretreatment abolish inhibitory effects of DADLE on forskolin induced cAMP production (18). Furthermore, using NG108-15 cells, co-treatment with DADLE, GM1 and pertussis toxin that inhibit Gi activation, lead to enhanced cAMP production (19), indicating that GM1 enhanced opioid receptor coupling to Gs protein under inhibition of Gi activation.

D-5. Ganglioside Biosynthesis Enzyme Knockout Mice and Nociception

GD3 synthase deficient mice showed significant nociceptive defects (20) without visible histological defects in the nervous system (21), significant differences in the conduction velocity and the size of the cross-sectional area of the myelinated axons in the sciatic nerve (20). Nociceptive behavior of these KO mice is conflicting; KO mice showed mechanical allodynia (using von Frey filament), thermal hyperalgesia (hot plate) and reduced nociceptive

ようである。しかし、疼痛伝達系における内在性のガングリオシドの組成変化は不明である。

D-4. モルヒネの副作用におけるGM1の役割

オピオイドは慢性的に作用させることで耐性が生じ、同時に痛覚過敏を引き起こす。GM1に結合するコレラトキシンB (CtxB) サブユニット(12) や、インフルエンザ治療薬 oseltamivir(13) (シアリダーゼ阻害薬であり、高級ガングリオシドからのシアル酸分解によるGM1産生を抑制することが期待される) はSwiss-Websterマウスにおいて、オピオイドによる耐性と痛覚過敏を抑制することが報告されている。さらに、CtxB、oseltamivirともに急性的なオピオイドによる鎮痛効果を持続させるため、GM1をブロックすることでオピオイド受容体の脱感作を抑制し、オピオイド耐性や痛覚過敏を抑制するということが示唆される。一方で、オピオイド耐性が生じにくい系統である129SvEvマウスにGM1を投与すると、オピオイドの鎮痛効果を抑制する(14)。129SvEvマウスの疼痛伝達経路においてはGM1量が少ない可能性がある。しかし、連日の脊髄へのGM1ガングリオシド投与によりラットモデルにおいてモルヒネ耐性や痛覚過敏が抑制される(15)。これらの効果の違いは投与方法や投与組織、動物種などの違いに起因するかもしれない。

オピオイドによる痛覚過敏は多様な要因により引き起こされる(16)。Crainらはオピオイド受容体に共役するGタンパク質のクラスがオピオイドの慢性投与により変化する可能性を示している(17)。オピオイド受容体は通常Giタンパク質と共役することにより、cAMPを抑制し神経の活動を抑制する。慢性的なオピオイド投与により、GiからGsへの共役が進みcAMPを産生するようになることで疼痛伝達経路の神経細胞がオピオイドにより興奮性を生じるというメカニズムである。実際、F11細胞(neuroblastomaとDRGニューロンのハイブリッド細胞)に δ オピオイド受容体のアゴニスト [D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin (DADLE) を長期に投与すると、通常状態ではGiと共役しているにもかかわらずcAMPの上昇が観察される。一過性にDADLE処理をしてもcAMPは生産されないが、GM1をあらかじめ投与しておくで一過性のDADLE処理によりcAMPが産生される。加えて、GM1はDADLEによるホルスコリン誘導cAMP産生の抑制を解除する(18)。さらに、神経芽細胞NG108-15を用いて、GM1と百日咳毒素存在下(Giの活性化を阻害する)で、低濃度のDADLEを処理するとcAMPを産生する(19)。これらの結果は、GM1はGiが阻害される条件下ではオピオイド受容とGsの共役を増強することを示唆している。

D-5. ガングリオシド生合成酵素ノックアウトマウスと疼痛

GD3合成酵素ノックアウトマウスは、疼痛異常を示す(20)。このマウスは目に見える組織学的な神経系の異常を示さず(21)、坐骨神経の伝導速度や有髄軸索の横断面の面積も異常を示さない(20)。しかしながら、疼痛異常の解釈は複雑であるかもしれない。つまり、このノックアウトマウスは機械刺激(von Frey filament) および熱(ホットプレート)に対する痛覚過敏を示すが、ホルマリンによる疼痛の第二相に

behavior in the late phase of formalin test. These conflicting results may be due to several causes: GD3 synthase KO mice have the depletion of b- and c-series gangliosides and accumulation of a-series gangliosides. Thus, it is unclear whether depleted gangliosides or accumulated gangliosides affect altered nociceptive behavior: each ganglioside species may relate a particular nociceptive stimulus and/or each tissue in pain pathway.

D-6. b-Series Ganglioside and Nociception

We reported that intraplantar injection of GT1b induced nociceptive behavior and hyperalgesia of low-dose formalin induced nociception (22). Hyperalgesic effects of ganglioside such as GQ1b, GT1b, or GD1b were observed, although a-series gangliosides such as GD1a, GM1, GM2 or GM3 had no significant effects in nociception induced by intraplantar injection of low-dose formalin. In addition, intraplantar injection of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase that cleaves $\alpha 2 \rightarrow 3$, $\alpha 2 \rightarrow 6$ and $\alpha 2 \rightarrow 8$ linked sialic acids reduced the late phase of high-dose formalin induced nociception as observed in GD3 KO mice. These data supported the possibility that endogenous gangliosides in subcutaneous tissues contribute to nociceptive behavior. Next, we tried to identify the receptors against nociceptive agents involved in GT1b-induced hyperalgesia by using several receptor antagonists. Among the tested antagonists, antagonists against NMDA receptor and mGluR1, but not other antagonists against pain-related receptors such as 5-HT2A, 5-HT3, histamine H1, purine P2, prostaglandin EP4, and bradykinin B2, blocked GT1b-induced hyperalgesia. Moreover, intraplantar injection of GT1b caused glutamate accumulation in subcutaneous

oite疼痛行動は減少する。これらの相反した結果はいくつかの原因によるのかもしれない。GD3合成酵素ノックアウトマウスではb-およびc-シリーズガングリオシドが欠損し、a-シリーズガングリオシドは蓄積している。そのため、蓄積したガングリオシドと欠損したガングリオシドのどちらが疼痛異常をもたらしているのか明らかでない。それぞれのガングリオシド種と、特定の侵害刺激や疼痛伝達経路の各組織が関連しているのかもしれない。

D-6. b-シリーズガングリオシドと痛み

筆者らはマウス足底皮下にガングリオシドGT1bを投与すると疼痛行動を引き起こし、低濃度のホルマリンにより引き起こされる痛みに対して痛覚過敏効果が認められることを見いだした(22)。低濃度ホルマリンに対する痛覚過敏作用はb-シリーズのガングリオシドであるGQ1b、GT1b、GD1bにおいては有意に認められたが、a-シリーズガングリオシドGD1a、GM1、GM2、GM3では認められなかった。さらに、*Arthrobacter ureafaciens* シアリダーゼ ($\alpha 2 \rightarrow 3$ 、 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 、 $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合をいずれも切断する)をホルマリンの投与部位(足底皮下)に前投与することにより、GD3ノックアウトマウスで観察されたようにホルマリンによる第二相の疼痛が減弱する現象が認められた。これらのデータは、皮下組織において内在性ガングリオシドが疼痛に寄与している可能性をサポートしている。次に、GT1bによる痛覚過敏に関与している皮下における発痛物質に対する受容体を、そのアンタゴニストにより決定することを試みた。検討した受容体アンタゴニストの中で、NMDA受容体やmGluR1のアンタゴニストのみがGT1bによる痛覚過敏効果をブロックし、ほかのアンタゴニスト(5-HT2A、5-HT3、histamine H1、purine P2、prostaglandin EP4、bradykinin B2受容体アンタゴニスト)では有

Fig. 2. Glutamate is released by GT1b treatment in subdermal tissues. Intraplantar injection of GT1b caused hyperalgesia, nociception, and glutamate accumulation in subcutaneous tissue. Co-injection of glutamate degrading enzyme or glutamate receptor antagonists with GT1b blocked GT1b-induced hyperalgesia. These findings suggested that GT1b increased extracellular glutamate levels in subdermal tissues, thereafter activating glutamate receptors, which in turn, resulted in hyperalgesia and nociception.

ous tissue and glutamate dehydrogenase (GLDH), which degrades glutamate, blocked GT1b-induced hyperalgesia. These results indicate that GT1b is involved in regulation of extracellular glutamate concentrations in subcutaneous tissue, which leads to glutamate receptor activation and then induces hyperalgesia (Fig. 2).

Previous reports revealed glutamate in subcutaneous tissues is involved in nociceptive behavior. Nociceptive stimuli such as heat, capsaicin (23), and formalin (24) leads to glutamate accumulation in subcutaneous tissues. In fact, intraplantar injection of glutamate or glutamate receptor agonists induce nociceptive behavior (3, 25–27). This glutamate in subcutaneous tissue is released from A- or C-fiber by electrical stimulation of peripheral nerve fibers (28). Moreover, recent immunohistochemical studies revealed that vesicular glutamate transporters (vGluTs) are localized in free nerve endings (29). These studies suggest a glutamate source in subcutaneous tissue may be free nerve endings. Thus, it is possible that GT1b are involved in glutamate releasing systems of free nerve endings (Fig. 2).

Recently, we reported that gangliosides are involved in pain-related receptors. Pretreatment of cells with gangliosides and/or chondroitin sulfate potentiate bradykinin B2 receptor desensitization and internalization (30). Bradykinin is a potent endogenous nociceptive agent, and future studies are needed to reveal the effects of gangliosides in bradykinin-induced nociception using animal models.

E. Conclusion

As mentioned above, gangliosides can regulate various nociception such as neuropathic pain, altered pain in aging animals, opioid-induced hyperalgesia, morphine tolerance, and formalin induced nociception. These studies present a novel ganglioside-dependent mechanism of pain. However, its molecular mechanisms have not been clarified and the effects of gangliosides on nociceptive behavior may be dependent on various conditions such as nociceptive models, injected site, or carbohydrate structures. In fact, GD3 synthase knockout mice show both thermal hyperalgesia and hypoalgesia on formalin induced nociception. However, there are few examples that compare the differences in effect of ganglioside using the same nociceptive stimulus in the same nociceptive model.

Future studies are needed to reveal these problems, especially, the relationship between molecular structures of gangliosides and nociceptive responses under each pathological state.

意な効果が認められなかった。さらに、皮下においてGT1bの投与によりグルタミン酸の蓄積が生じることや、glutamate dehydrogenase (GLDH、グルタミン酸を分解する)の共投与によりGT1bの疼痛増強効果を抑制した。以上の結果から、GT1bが皮下における細胞外グルタミン酸濃度の制御に関与し、これによりグルタミン酸受容体を活性化することで痛覚過敏を引き起こすことが示唆される (Fig. 2)。

以前の研究から、皮下における細胞外グルタミン酸は疼痛に関与していることが明らかになっている。皮下におけるグルタミン酸の濃度は熱やカプサイシン(23)、あるいはホルマリン(24)といった疼痛刺激により増加する。実際に、グルタミン酸やグルタミン酸受容体アゴニストをマウスの足底皮下に投与すると、疼痛行動を引き起こす(3, 25–27)。皮下におけるグルタミン酸は末梢のA-繊維やC-繊維を電気的に刺激することで分泌される(28)。さらに、組織学的に vesicular glutamate transporters (vGluTs) が自由神経終末付近に存在していることが明らかにされている(29)。以上の報告から、皮下におけるグルタミン酸源の一つは自由神経終末であるかもしれない。そのため、GT1bは自由神経終末におけるグルタミン酸放出経路に関与している可能性が考えられる (Fig. 2)。

最近、我々は疼痛受容体とガングリオシドの関連性を示唆する研究結果を得た。ブラジキニンB2受容体を発現させた培養細胞にガングリオシドやコンドロイチン硫酸を投与すると、受容体の不応化と内在化が促進されたのである(30)。ブラジキニンは強力な内在性の発痛物質であり、今後、動物モデルを利用してブラジキニンにより引き起こされる疼痛におけるガングリオシドの効果を明らかにする必要がある。

E. 結語

以上のように、神経障害性疼痛や、老齢により変化した疼痛感受性、オピオイドによる痛覚過敏、モルヒネ耐性、ホルマリンによる疼痛など様々な痛みをガングリオシドは制御できる。これらの報告はガングリオシド依存的な何らかの新規なメカニズムが疼痛に関与していることを示唆する。しかし、その分子メカニズムはいまだ明らかではなく、疼痛行動におけるガングリオシドの効果は疼痛モデルや投与部位、あるいはガングリオシドの糖鎖構造に依存しているかもしれない。事実、GD3合成酵素ノックアウトマウスは熱による痛覚過敏とホルマリンに対する痛覚鈍麻の両者を示す。しかしながら、ガングリオシドの効果の違いを同一の疼痛刺激や疼痛モデルで比較した例はほとんど知られていない。

今後の研究は特に、それぞれの病的な状態におけるガングリオシドの分子構造の違いと疼痛反応の関連性を検討することが必要である。

References

1. Ferreira, J., Triches, K. M., Medeiros, R., and Calixto, J. B. (2005) *Pain* **117**, 171–181.
2. Kassuya, C. A., Ferreira, J., Claudino, R. F., and Calixto, J. B. (2007) *Br. J. Pharmacol.* **150**, 727–737.
3. Beirith, A., Santos, A. R., and Calixto, J. B. (2002) *Brain Res.* **924**, 219–228.
4. Bland-Ward, P. A., and Humphrey, P. P. (1997) *Br. J. Pharmacol.* **122**, 365–371.
5. Renback, K., Inoue, M., Yoshida, A., Nyberg, F., and Ueda, H. (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **75**, 350–354.
6. Amico-Roxas, M., Caruso, A., Cioni, M., Scifo, R., Leone, M. G., and Scapagnini, U. (1988) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **291**, 238–252.
7. Amico-Roxas, M., Caruso, A., Trombadore, S., Scifo, R., and Scapagnini, U. (1984) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **272**, 103–117.
8. Hayes, R. L., Mao, J., Price, D. D., Germano, A., d'Avella, D., Fiori, M., and Mayer, D. J. (1992) *Pain* **48**, 391–396.
9. Mao, J., Hayes, R. L., Price, D. D., Coghill, R. C., Lu, J., and Mayer, D. J. (1992) *Brain Res.* **584**, 18–27.
10. Mao, J., Price, D. D., Hayes, R. L., Lu, J., and Mayer, D. J. (1992) *Brain Res.* **584**, 28–53.
11. Goettl, V. M., Lindsey, A. E., Neff, N. H., and Hadjiconstantinou, M. (2000) *Brain Res.* **858**, 380–385.
12. Shen, K. F., and Crain, S. M. (2001) *Brain Res.* **919**, 20–30.
13. Crain, S. M., and Shen, K. F. (2004) *Brain Res.* **995**, 260–266.
14. Crain, S. M., and Shen, K. (2000) *Brain Res.* **856**, 227–235.
15. Mao, J., Price, D. D., and Mayer, D. J. (1994) *J. Neurosci.* **14**, 2301–2312.
16. Koppert, W., and Schmelz, M. (2007) *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **21**, 65–83.
17. Crain, S. M., and Shen, K. F. (1998) *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 358–365.
18. Wu, G., Fan, S. F., Lu, Z. H., Ledeen, R. W., and Crain, S. M. (1995) *J. Neurosci. Res.* **42**, 493–503.
19. Wu, G., Lu, Z. H., Alfinito, P., and Ledeen, R. W. (1997) *Neurochem. Res.* **22**, 1281–1289.
20. Handa, Y., Ozaki, N., Honda, T., Furukawa, K., Tomita, Y., Inoue, M., Furukawa, K., Okada, M., and Sugiura, Y. (2005) *Pain* **117**, 271–279.
21. Okada, M., Itoh, M.-i., Haraguchi, M., Okajima, T., Inoue, M., Oishi, H., Matsuda, Y., Iwamoto, T., Kawano, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Furukawa, K., Aizawa, S., and Furukawa, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1633–1636.
22. Watanabe, S., Tan-No, K., Tadano, T., and Higashi, H. (2011) *Pain* **152**, 327–334.
23. Jin, Y. H., Nishioka, H., Wakabayashi, K., Fujita, T., and Yonehara, N. (2006) *Neuroscience* **138**, 1329–1339.
24. Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., and Namiki, A. (1998) *Brain Res.* **787**, 161–164.
25. Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Nakayama, Y., Hazama, K., and Namiki, A. (2000) *Anesthesiology* **93**, 173–178.
26. Bhavé, G., Karim, F., Carlton, S. M., and Gereau, R. W. 4th. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 417–423.
27. Zhou, S., Bonasera, L., and Carlton, S. M. (1996) *Neuroreport* **7**, 895–900.
28. deGroot, J., Zhou, S., and Carlton, S. M. (2000) *Neuroreport* **11**, 497–502.
29. Brumovsky, P., Watanabe, M., and Hokfelt, T. (2007) *Neuroscience* **147**, 469–490.
30. Shimazaki, A., Nakagawa, T., Mitoma, J., and Higashi, H. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 193–198.

Profile of the Authors

Shun Watanabe studied biology at the Tokyo University of Science. In 2005, he obtained a Ph.D. degree from the Tokyo University of Science and joined the group of Yoshio Hirabayashi as postdoctoral fellow at RIKEN Brain Science Institute. In 2008, he joined the group of Hideyoshi Higashi at Tohoku pharmaceutical university as a postdoctoral fellow and began his study of pain. After a third and fourth postdoc at Juntendo University and Tohoku pharmaceutical university, he became an assistant professor at Kitasato University in 2013. His research focus is neural function and sphingolipids.

Hideyoshi Higashi is a professor at the Division of Glyco-signal Research, Institute of Molecular Bio-membrane and Glycobiology, Tohoku Pharmaceutical University. He received his Ph.D. degree in 1985 from Hokkaido University. He was a research associate at the University of Notre Dame (1979–1981), a research associate at Osaka University (1981–1988), senior researcher at Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (1988–2004), researcher at RIKEN Brain Science Institute (2004–2006), and moved to the present institute. His research interests are signal transduction, related neural differentiation, pain and energy metabolism, and glycan-modulation of signals.