

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

脳卒中後疼痛における上行性痛覚伝導路
および下行性疼痛制御系の機能変容

2020 年 2 月

松 浦 渉

目 次

略語一覧

序 論	1
-----------	---

本 論

第一章 CPSP 発症における脊髄 DDAH1/NOS シグナルの関与

1-1. 緒 言	3
----------------	---

1-2. 実験材料および方法	4
----------------------	---

- 1-2-1. 実験動物
- 1-2-2. CPSP モデルの作製
- 1-2-3. 使用試薬
- 1-2-4. 試薬の投与方法
- 1-2-5. von Frey 試験
- 1-2-6. 脊髄組織抽出液の western blot 用サンプル調製
- 1-2-7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および western blot 法
- 1-2-8. 脊髄組織抽出液の NOS 活性用サンプル調製
- 1-2-9. NOS 活性
- 1-2-10. 統計学的処理

1-3. 結 果	8
----------------	---

- 1-3-1. BCAO 処置が機械的刺激に及ぼす影響
- 1-3-2. BCAO 誘発機械的アロディニアに対する L-NAME (i.t.) 投与の効果
- 1-3-3. BCAO 処置が脊髄における DDAH1 発現に及ぼす影響
- 1-3-4. BCAO 誘発機械的アロディニアに対する PD404182 (i.t.) 投与の効果
- 1-3-5. BCAO 誘発脊髄における NOS 活性の上昇に対する PD404182 (i.t.) 投与の影響

1-4. 考 察	14
----------------	----

第二章 CPSP 発症における脊髄 HMGB1 の役割

2-1. 緒 言	16
2-2. 実験材料および方法	17
2-2-1. 使用試薬	
2-2-2. 試薬の投与方法	
2-2-3. 脊髄組織切片の作製	
2-2-4. 蛍光免疫組織染色法	
2-2-5. 統計学的処理	
2-3. 結 果	19
2-3-1. BCAO モデルマウスの脊髄におけるグリア細胞活性化および HMGB1 局在	
2-3-2. BCAO 誘発機械的アロディニアに対する LPS-RS および LMWH (i.t.) 投与の影響	
2-3-3. BCAO 誘発機械的アロディニアに対する L-NAME (i.t.) 投与の影響および BCAO 後の脊髄 NOS 活性に対する抗 HMGB1 抗体、LPS-RS および LMWH (i.t.) 投与の効果	
2-3-4. BCAO 誘発脊髄グリア細胞活性化に対する抗 HMGB1 抗体 (i.t.) 投与の影響	
2-3-5. BCAO 誘発脊髄グリア細胞の活性化に対する LPS-RS および LMWH (i.t.) 投与の影響	
2-4. 考 察	29

第三章 脳内 orexin-A を介した CPSP 抑制機構の解明

3-1. 緒 言	31
3-2. 実験材料および方法	32
3-2-1. 使用試薬	
3-2-2. 試薬の投与方法	
3-2-3. 脳組織切片の作製	
3-2-4. 蛍光免疫組織染色法	

3-2-5.	脳組織抽出液の調製および real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法用サンプルの調製	
3-2-6.	Real-time PCR 法	
3-2-7.	統計学的処理	
3-3.	結 果	35
3-3-1.	BCAO 3 日後の視床下部における prepro-orexin 発現変化	
3-3-2.	BCAO 誘発機械的アロディニアに対する orexin-A (i.c.v.) 投与の効果	
3-3-3.	青斑核における TH および OX1R 共局在および orexin-A (i.c.v.) 投与によるノルアドレナリン作動性神経活性化	
3-3-4.	大縫線核における TPH および OX1R 共局在および orexin-A (i.c.v.) 投与によるセロトニン作動性神経活性化	
3-3-5.	BCAO モデルマウスにおける orexin-A (i.c.v.) 抗侵害作用に対する yohimbine および WAY100635 (i.t.) 投与の効果	
3-4.	考 察	43
	総 括	45
	謝 辞	47
	引用文献	48

略語一覽

ADMA	asymmetric dimethylarginine
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
BCAO	bilateral carotid artery occlusion
BSA	bovine serum albumin
CCA	common carotid artery
CPSP	central post-stroke pain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDAH1	N ^(G) ,N ^(G) -dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPR40/FFAR1	G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1
HAT	histone acetyl transferase
HDAC	histone deacetylase
HMGB1	high mobility group box-1
HRP	horseradish peroxidase
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
i.c.v.	intracerebroventricular
IL-1 β	interleukin-1 β
iNOS	inducible NOS
i.t.	intrathecal
LMWH	low-molecular weight heparin
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LPS-RS	lipopolysaccharide from the photosynthetic bacterium <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
mAb	monoclonal antibody
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NeuN	neuronal nuclei
NF- κ B	nuclear factor-kappa B

NMDA	N-methyl-D-aspartate
NOS	nitric oxide synthetase
nNOS	neuronal NOS
OX1R	orexin 1 receptor
OX2R	orexin 2 receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
RAGE	receptor for advanced glycation end products
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
S.E.M.	standard error of the mean
sham	sham surgery
TBS	tris buffered saline
TH	tyrosine hydroxylase
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPH	tryptophan hydroxylase

序 論

厚生労働省の人口動態統計によると、平成 23 年度まで、脳血管疾患はわが国における三大死因の一つ（第 3 位）であった。しかしながら、平成 24 年度以降は、肺炎に次いで第 4 位となっていたものの、平成 29 年度に再び第 3 位になった（厚生労働省、平成 29 年人口動態統計月報年計（概数）の概況）。脳血管疾患は高齢者に多発することから、本邦では高齢社会を迎え、今後本疾患罹患者のさらなる増加が予想される。

脳血管疾患の中で脳卒中は、一度発症すると、遺伝子組み換え型プラスミノーゲンアクチベーターやフリーラジカル消去薬などを用いた急性期治療を施しても、その障害部位や程度に依存して、麻痺、疼痛、感染症、うつ、不安など種々の後遺症を発症する¹⁻⁴⁾。特に疼痛は患者の生活の質の低下を引き起こす重要な要因の一つになる。疼痛には、元来外的刺激から危険を察知し身体を守る防御反応や、身体に異常があることを知らせる重要な役割がある⁵⁾。一方、原因不明の持続性疼痛によって、患者は、多大なるストレス状態に陥ること、不眠やうつ病などの疾患を誘発する要因となる⁶⁾。原因不明の持続性疼痛の一つとして神経障害性疼痛が知られている。神経障害性疼痛は、損傷された神経の支配領域の感覚低下やしびれ症状に加え、正常状態では痛みと感じない弱い触刺激を痛みと認識するアロディニアや痛覚閾値の低下に起因する痛覚過敏などが出現する⁷⁾。

脳卒中後の難治性の後遺症の一つとして知られている脳卒中後疼痛（central post-stroke pain: CPSP）は、中枢性神経障害性疼痛として分類されており、アロディニアや痛覚過敏などの発現が認められる²⁾。現在、CPSP に対して神経障害疼痛治療法ガイドラインに準じた薬物投与や外科的療法が施されているものの、その成果は乏しい状況にある^{8,9)}。したがって、その根本治療の開発が急がれている。しかしながら、CPSP の詳細な疼痛発症機序が解明されていないことから、その開発は困難を極めていく。近年、痛みの制御機構として、脊髄部位における上行性痛覚伝導路や下行性疼痛制御系の関与が注目されている¹⁰⁾。そこで、本研究では、CPSP の発症機序における上行性痛覚伝導路および下行性疼痛制御系の関与について検討を加えた。

まず、興奮性の痛みを脊髄上位（脳部位）へと伝達する上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄と CPSP 発症との関連に注目した。脳虚血後の脊髄部位において、神経系の二次的損傷や機能的障害が生じるが¹¹⁾、nitric oxide synthetase (NOS) は、神経系の損傷による神経障害性疼痛モデルの疼痛増悪および脊髄での神経系の可塑的变化において重要な役割を担っていることが報告されている¹²⁾。さらに、NOS を制御する因子として $N^{(G)}, N^{(G)}$ -dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) および high mobility group box-1 (HMGB1) が知られ^{13,14)}、上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄において、疼痛制御に関与する可能性が示唆されていることから^{15,16)}、CPSP における上行性痛覚伝導路における DDAH1/NOS および HMGB1/NOS 機構の変容による脳内への痛み刺激の過剰伝達に関与する可能性について検討を加えた。

次に、下行性疼痛制御系と CPSP 発症との関連を検討するために、覚醒や摂食を調節する神経ペプチドの一つである orexin に着目した。近年、神経障害性疼痛モデルにおける orexin-A の脊髄腔内 (intrathecal: i.t.) 投与は、疼痛を抑制したが、orexin-B の i.t. 投与は疼痛を抑制しないことが報告されている¹⁷⁾。また、視床下部外側野の orexin 神経が、下行性疼痛制御系において、それぞれノルアドレナリン作動性神経やセロトニン作動性神経の起始核である青斑核や大縫線核に投射し、その受容体である orexin 1 receptor (OX1R) および orexin 2 receptor (OX2R) に作用することで疼痛制御に寄与する可能性が示唆されている¹⁸⁻²⁰⁾。さらに、脳卒中患者の脳脊髄液中で orexin の含量が変動するとの報告もある²¹⁾。そこで、CPSP の発症における orexin-A を介した下行性疼痛制御系の関与について検討を加えた。

本 論

第一章 CPSP 発症における脊髄 DDAH1/NOS シグナルの関与

1-1. 緒 言

近年、上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄において、興奮性または抑制性の神経が脳から直接投射され、疼痛の制御に重要な役割を果たしていることが報告されている^{22,23)}。また、脳虚血後の脊髄において、神経系の二次的損傷および機能的障害が生じることも報告された^{24,25)}。その他、種々の神経障害性疼痛モデルを用いた国内外の多くの研究において、上行性痛覚伝導路の過剰伝達にグルタミン酸、adenosine triphosphate (ATP) および nitric oxide synthetase (NOS) などが関与することが示唆されている²⁶⁻²⁸⁾。さらに、他の CPSP モデルマウスを用いた例では、上行性痛覚伝導路の破綻もしくは変容にグルタミン酸および ATP の関与が提唱されている²⁹⁾。一方、脊髄における NOS がある種の神経障害性疼痛の発症において関与する可能性が報告されているものの³⁰⁾、CPSP の発症機序における関与は不明である。そこで、本章では、CPSP の発症と上行性痛覚伝導路との関連を検討するため、脊髄における NOS に着目した。NOS 活性は、中大脳動脈閉塞モデルにおける虚血領域で上昇し、神経細胞死が増悪することが知られている³¹⁾。さらに、脊髄における NOS 活性の上昇は、がん誘発機械的アロディニアを増悪させる一方で、NOS ノックアウトマウスではホルマリンおよび神経損傷誘発の疼痛を抑制するとの報告がある^{12,32,33)}。これらのことから、脳虚血ストレス負荷後の脊髄における NOS 活性の変動が上行性痛覚伝導路の機能を変容させ、CPSP を増悪させるのではないかと仮説のもとに研究を遂行した。

N^(G), N^(G)-Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) は、メチル化アルギニン分解酵素として知られており、中枢および末梢領域に存在している³⁴⁾。DDAH1 は、内因性 NOS 阻害因子である asymmetric dimethylarginine (ADMA) を代謝することから^{13,35)}、NOS 活性の調節に関与すると考えられる。

そこで、第一章では CPSP モデルマウスの上行性痛覚伝導路の起始部における脊髄 NOS の関与とその制御機構としての DDAH1 の役割について検討した。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

Matsuura W., Nakamoto K., Tokuyama S., The involvement of DDAH1 in the activation of spinal NOS signaling in early stage of mechanical allodynia induced by exposure to ischemic stress in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1569-1574 (2019)

1-2. 実験材料および方法

1-2-1. 実験動物

5 週齢 (体重 25-30 g) の ddY 系雄性マウス (日本 SLC、静岡、日本) を購入した。温度 24°C、湿度 55±5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間 (AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯) の室内にてプラスチックケージで飼育した。また、固形飼料 (オリエンタル酵母、東京、日本) と水は自由に摂取させた。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号: A16-10、17-09、18-01)。

1-2-2. CPSP モデルの作製

一過性全脳虚血 (bilateral carotid artery occlusion: BCAO) モデルマウスの作成は、民谷らの方法に従って行った³⁶⁾。具体的には、pentobarbital (64.8 mg/kg; 共立製薬株式会社、東京、日本) を生理食塩水 (大塚、大阪、日本) で使用直前に 60 mg/kg に希釈し、腹腔内投与による全身麻酔下にて行った。Pentobarbital によって麻酔したマウスの前歯に固定板の糸をかけ、仰臥位に固定した。頸部を正中線で切開し、組織を丁寧に剥離し両側側頸部の筋肉を外に引き出し、動脈クレンメで固定した。次に、両側の総頸動脈 (common carotid artery: CCA) を迷走神経と剥離し、杉田式動脈瘤クリップ (保持圧 140-150 g) を用いて閉塞した (虚血)。虚血 30 分後、杉田式動脈瘤クリップを取り外し総頸動脈に血流を回復させ (再灌流)、これを脳虚血ストレス負荷とした。頸部の切開部を縫合し、マウスをホームケージに戻した。偽手術 (sham surgery: sham) は杉田式動脈瘤クリップを用いて両側の CCA を閉塞しないものとし、その他は BCAO と同様に行った。

1-2-3. 使用試薬

試薬は、PD404182 (DDAH1 阻害剤、Tocris Bioscience Inc., Bristol, U.K.)、N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME、非選択的 NOS 阻害剤、Sigma-Aldrich、MO、U.S.A.) を実験に用いた。

1-2-4. 試薬の投与方法

PD404182 (50, 100 µg/mouse) は、生理食塩水を含む 0.1 % dimethyl sulfoxide、L-NAME (100, 300 µg/mouse) は、生理食塩水に溶解し、脊髄腔内 (intrathecal: i.t.) 投与した。I.t. 投与は、Hylden と Wilcox の方法に準じて、薬液を充填した 50 µl 用マイクロシリンジ (Hamilton、NV、U.S.A.) に取り付け、30 G 1/5 皮下針を、腰椎 5 番と 6 番の間の脊髄クモ膜下腔内へ挿入し、10 µl の薬液を投与した³⁷⁾。

1-2-5. von Frey 試験

機械的刺激に対する逃避行動回数の測定は、中本らの方法に従った³⁸⁾。マウスを金属メ

ッシュの上に置き、透明プラスチックケースをかぶせた状態で 60 分間アダプテーションさせた。自発運動の消失を確認後、touch test filament (Semmes-Weinstein von Frey Anesthesiomete、室町機械株式会社、東京、日本) のうち、0.4 g の filament を用いた。マウスの後肢腹側中心部に、filament を少し曲がるまで垂直に押し当て、6 秒間の刺激に対する、後肢を上げるまたは舐めるなどの逃避反応を観察した。具体的には、filament で刺激を与える操作を 10 回繰り返し、逃避反応を記録した。各薬物投与 10、20、30 および 60 分後に機械的刺激に対する疼痛評価を行った。

1-2-6. 脊髄組織抽出液の western blot 用サンプル調製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、後脊柱を摘出し、氷冷下で腰椎 4 番-6 番領域の脊髄を採取した。分取した脊髄は homogenize buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、4% tween 20、2 mM β -mercaptoethanol、1 mM Na_3VO_4 、5 mM benzamidine、20 mM NaF、1 mM *p*-nitrophenyl phosphate、5 mM imidazole] に 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin inhibitor、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptine、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin、5 mg/mL pepstatin、1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride を添加した溶液中で均質化し (超音波発生機、1 分)、遠心分離 (15,000 g、4°C、5 分) によって得られた上清を回収した。上清から 2 μL を分取し、それに対して滅菌水 18 μL を加えて 10 倍希釈し、Lowry 法 (DC protein Assay kit 2、BIO-RAD、CA、U.S.A.) によりタンパク質量を測定した。また、上清を等量の 2 \times sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [0.1 M Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、12% β -mercaptoethanol、20% glycerol、0.004% bromophenol blue] と混合した。さらに、タンパク質定量で得られた結果をもとに、その混合したものが 20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (2 mg/mL) となるように 1 \times SDS sample buffer で調製し、これを 97°C、3 分間加温し、速やかに氷冷したものを western blot 用サンプルとした。

1-2-7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および western blot 法

DDAH1 タンパク質は 10 $\mu\text{L}/\text{lane}$ を 12% ポリアクリルアミドゲルを用いて、SDS-PAGE により分離した。泳動条件として DDAH1 は 195 V、60 分、マーカーとして Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (BIO-RAD) を用いた。電気泳動後、タンパク質は semi-dry transfer 法によって nitrocellulose 膜に転写した。転写条件は、15 V、50 分間で行った。DDAH1 (31 kDa) および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 37 kDa) の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [Tris buffered saline (TBS)-T {20 mM Tris-HCl (pH7.6)、150 mM NaCl、0.1% tween 20} + 5% non-fat dry milk (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)] 中で 1 時間室温において振盪させた。その後、rabbit anti-DDAH1 monoclonal antibody (1:1,000; abcam、東京、日本)、および mouse anti-GAPDH monoclonal antibody (1:20,000、Chemicon、CA、U.S.A.) を 4°Cで一晩反応させた。Nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。続いて二次抗体として、DDAH1 には horseradish peroxidase (HRP)-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG+IgM (H+L) (1:1,000、Kirkegaard and Perry

Laboratories, Guildford, UK)、GAPDH には HRP-labeled affinity purified antibody to mouse IgG+IgM (H+L) (1:10,000, Kirkegaard and Perry Laboratories) を室温で 1 時間反応させた。その後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。二次抗体の洗浄後、二次抗体に結合した HRP と反応する化学発光増強基質 ECLTM (Thermo Fisher Scientific K.K., 神奈川、日本) の No.1 と No.2 液を等量混和した溶液を 1 分間反応させた。免疫活性バンド検出は、Light-Capture (AE-6981; ATTO、東京、日本) で撮影した。バンドの強度は、CS-Analyzer ver. 3.0 (ATTO) を用いて解析し、GAPDH のバンドにて補正した。

1-2-8. 脊髄組織抽出液の NOS 活性用サンプル調製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、後脊柱を摘出し、氷冷下で腰椎 4 番-6 番領域の脊髄を採取した。分取した脊髄は homogenization buffer (1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 25.5 mM leupeptin, 1 μ M pepstatin A, 150 μ M aprotinin) に 1 mL homogenize buffer (0.1 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6.4 mL Tween 20, 22.4 μ L β -mercaptoethanol, sterile water, 60 mg p-nitrophenyl phosphate, 29.6 mg Na₃VO₄, 125.2 mg benzamide, 134.4 mg NaF, 54.4 mg imidazole) を添加し、その溶液中を均質化し (超音波発生機、1 分)、遠心分離 (15,000 g, 4°C, 5 分) によって得られた上清を回収した。上清から 2 μ L を分取し、それに対して滅菌水 18 μ L を加えて 10 倍希釈し、プレートリーダー (absorption wavelength 540 nm, SH-1200, CORONA, 茨城、日本) によりタンパク質量を測定した。

1-2-9. NOS 活性

NOS 活性の測定は、名和らの方法を参考にプロトコールを作製し、従法に従い行った³⁹⁾。1-2-8. で得られた上清を 30 μ L 分取し、それに対して 200 μ L reaction buffer (50 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-2-ethanesulfonic acid, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid)、10 μ L reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) part A (NADP⁺, glucose 6-phosphate, L-arginine)、10 μ L NADPH part B (glucose 6-phosphate dehydrogenase) を加えて混合し、37°C、3 時間反応させた。3 時間後、5 分間氷冷し、10 μ L nitrate reductase を加え反応させた。その後、20 分間インキュベートし、遠心分離 (15,200 g, 4°C, 5 分) した。96 ウェルプレートに nitrite standard および サンプルを 100 μ L 添加し、各ウェルに 50 μ L color reagent #1 (sulfanilamide in 3N HCl) を加え、室温で 5 分間反応させた。次に、各ウェルに 50 μ L color reagent #2 (N-(1-(Naphthyl) ethylenediamide dihydrochloride) を添加し、再び 5 分間室温で反応させ、プレートリーダー (absorption wavelength 540 nm, SH-1200) で測定した。NOS 活性は、各サンプルのタンパク量にて補正した。

1-2-10. 統計学的処理

機械的刺激に対する逃避行動回数の反応性および脊髄における NOS 活性の評価には、One-way analysis of variance (One-way ANOVA), Tukey-test を用いて統計学的解析を行った。

脊髄の western blot 法によるタンパク質発現量の評価には、Student's t-test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 \pm 標準誤差 (standard error of the mean: S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

1-3. 結 果

1-3-1. BCAO 処置が機械的刺激に及ぼす影響

Sham 群の後肢における機械的刺激に対する逃避行動回数は、偽手術の前後で変化が認められなかった。一方で、BCAO 1 および 3 日後の後肢において、機械的刺激に対する逃避行動回数が sham 群と比較して有意に増加した (Fig. 1A, B) (Fig. 1A: $F(4, 8) = 1.100$; Fig. 1B: $F(3, 7) = 1.656$)。

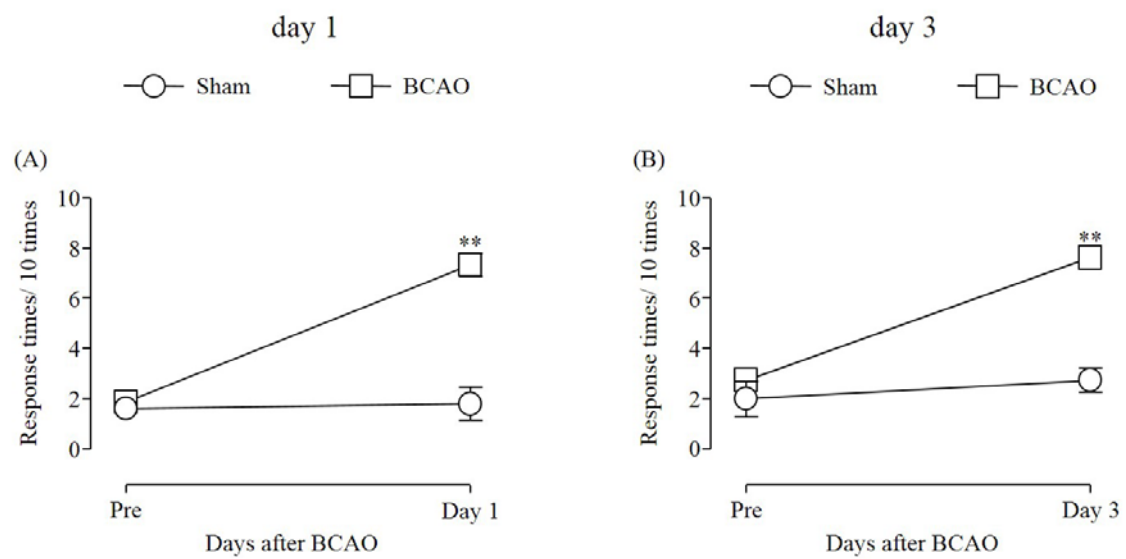


Fig. 1 Development of mechanical allodynia on days 1 and 3 after BCAA

(A) Sham: $n = 5$, BCAA: $n = 9$. (B) Sham: $n = 4$, BCAA: $n = 8$. Results are presented as mean \pm S.E.M.

** $p < 0.01$ compared with the Sham group.

1-3-2. BCAA 誘発機械的アロディニアに対する L-NAME (i.t.) 投与の効果

Sham 群の後肢における機械的刺激に対する逃避行動回数は、偽手術の前後で変化が認められなかった。BCAO 1 および 3 日後の後肢において認められた機械的刺激に対する逃避行動回数の増加は、L-NAME (300 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) の前処置によって、30 分間有意に抑制したが、60 分後には消失した。また、L-NAME (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) 前処置では改善は認められなかった (Fig. 2A, B) (Fig. 2A, $F(3, 20) = 9.1789$; Fig. 2B, $F(3, 20) = 7.7103$)。

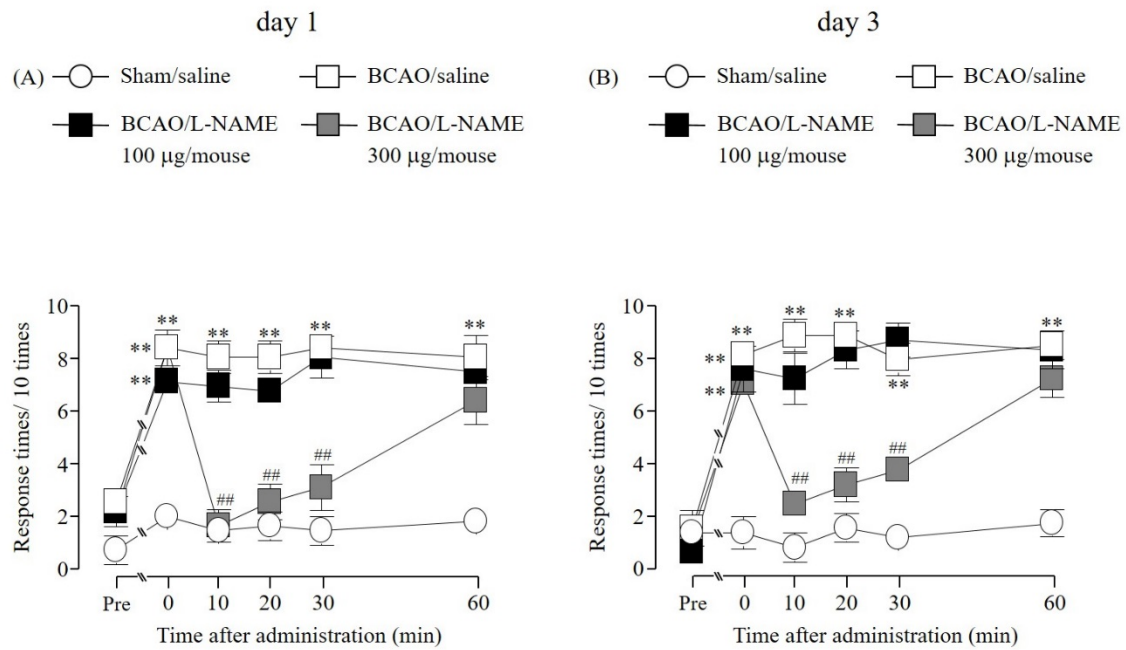


Fig. 2 Effect of (i.t.) administration of L-NAME on the development of mechanical allodynia after BCAA

(A) Sham/saline: $n = 6$, BCAA/saline: $n = 6$, BCAA/L-NAME 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$, BCAA/L-NAME 300 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$. (B) Sham/saline: $n = 6$, BCAA/saline: $n = 6$, BCAA/L-NAME 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$, BCAA/L-NAME 300 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$. Results are presented as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ compared with the Sham/saline group. ## $p < 0.01$ compared with the BCAA/saline group.

1-3-3. BCAA 処置が脊髄における DDAH1 発現に及ぼす影響

BCAO 1 日後の脊髄における DDAH1 タンパク質発現は、sham 群と比較して有意に増加したが、3 日後において変化は認められなかった (Fig. 3A, B) (Fig. 3A: $F(11, 11) = 5.891$; Fig. 3B: $F(14, 13) = 2.069$)。

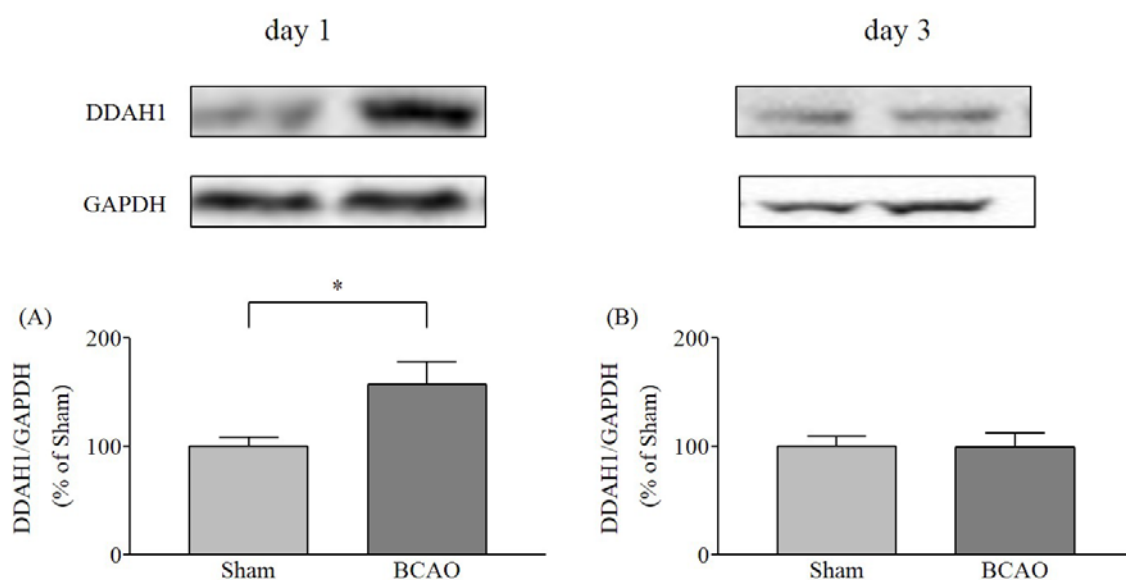


Fig. 3 Expression of DDAH1 in the spinal cord after BCAA

The band and column show DDAH1 and GAPDH in the spinal cord at day 1 (A) and day 3 (B) after BCAA. (A) Sham: $n = 12$; BCAA: $n = 12$, (B) Sham: $n = 14$; BCAA: $n = 15$. Results are presented as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ compared with the Sham group.

1-3-4. BCAA 誘発機械的アロディニアに対する PD404182 (i.t.) 投与の効果

PD404182 の i.t. 投与は、BCAO 1 日後において認められた機械的刺激に対する逃避行動回数の増加を有意に抑制し、その効果は 60 分後に消失した (Fig. 4A)。しかしながら、BCAO 3 日後における有意な逃避行動回数の増加は、PD404182 の i.t. 投与によって、改善しなかった (Fig. 4B) (Fig. 4A, $F(4, 25) = 9.8515$; Fig. 4B, $F(2, 15) = 15.398$)。

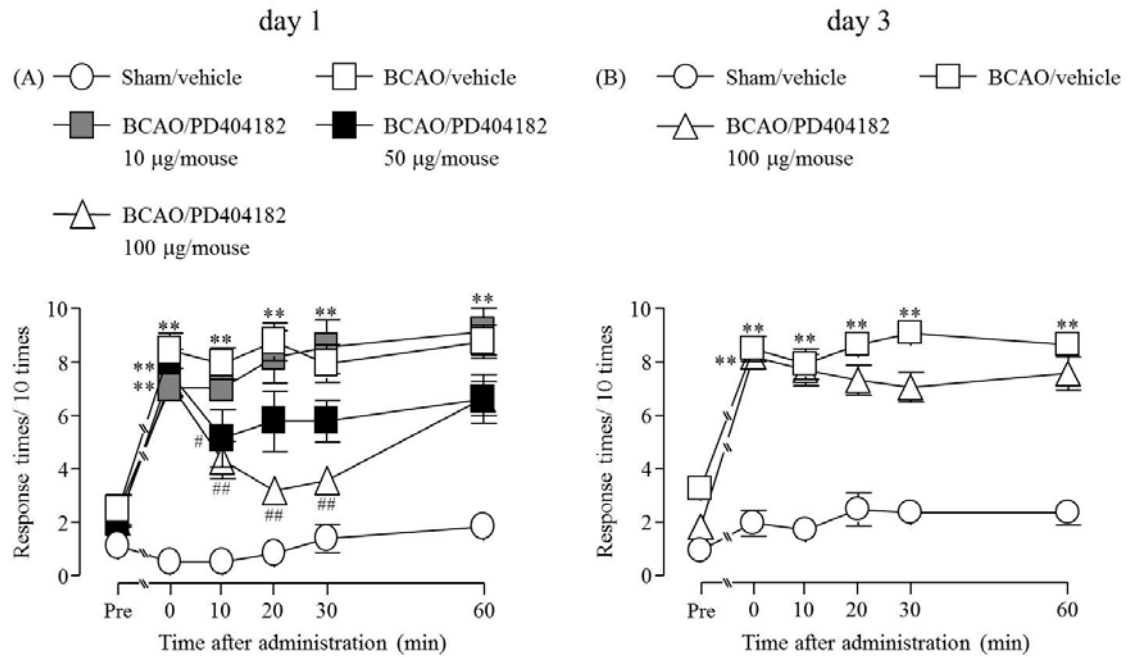


Fig. 4 Effect of (i.t.) administration of PD404182 on the development of mechanical allodynia after BCAA

(A) Sham/vehicle: $n = 8$, BCAA/vehicle: $n = 6$, BCAA/PD404182 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$, BCAA/PD404182 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 7$, BCAA/PD404182 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$. (B) Sham/vehicle: $n = 8$, BCAA/vehicle: $n = 6$, BCAA/PD404182 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 6$. Results are presented as mean \pm S.E.M. $**p < 0.01$ compared with the Sham/vehicle group. $\#p < 0.05$, $\##p < 0.01$ compared with the BCAA/vehicle group.

1-3-5. BCAO 誘発脊髄における NOS 活性の上昇に対する PD404182 (i.t.) 投与の影響

BCAO 1 および 3 日後の脊髄において、sham 群と比較して有意な NOS 活性の上昇を示した (Fig. 5A, B)。その NOS 活性の上昇は、PD404182 i.t. 投与によって、1 日後は有意に低下させたが、3 日後は変化しなかった (Fig. 5A, B) (Fig. 5A, $F(2, 14) = 8.0679$; Fig. 5B, $F(2, 9) = 8.1971$)。

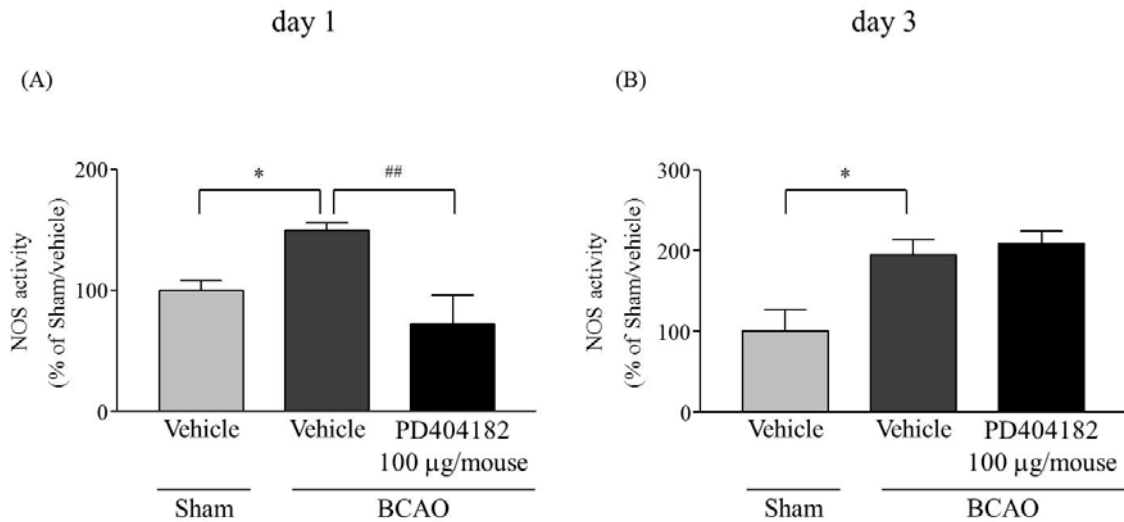


Fig. 5 Effect of (i.t.) administration of PD404182 on the increase of BCAA-induced NOS activity in the spinal cord

(A) Sham/vehicle: $n = 6$, BCAA/vehicle: $n = 6$, BCAA/PD404182 100 µg/mouse: $n = 6$. (B) Sham/vehicle: $n = 6$, BCAA/vehicle: $n = 6$, BCAA/PD404182 100 µg/mouse: $n = 6$. Results are presented as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ compared with the Sham/vehicle group. ## $p < 0.01$ compared with the BCAA/vehicle group.

Early phase of ischemic stress-induced mechanical allodynia

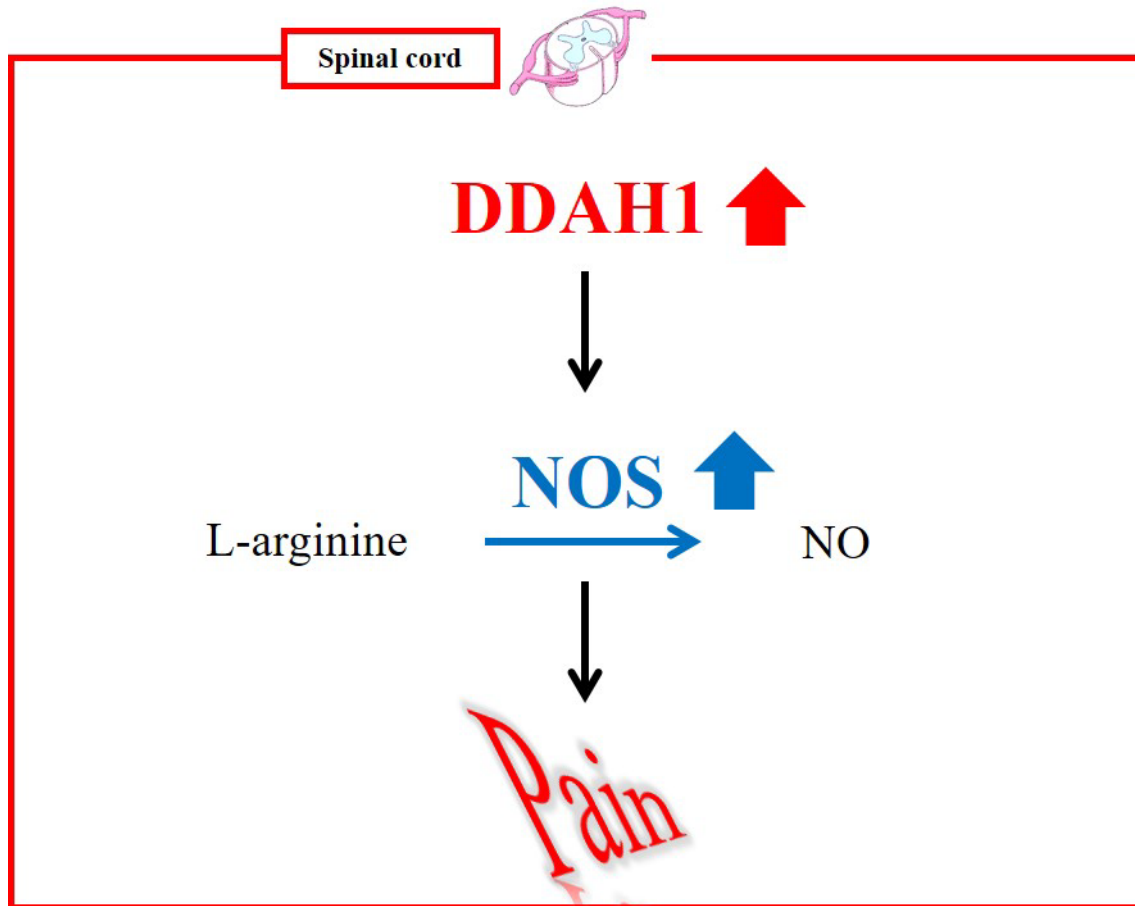


Fig. 6 The involvement of DDAH1 in the activation of spinal NOS signaling in early stage of mechanical allodynia induced by exposure to ischemic stress in mice

1-4. 考 察

第一章では、神経障害性疼痛の一つである CPSP の発症機序解明を目的に上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄における NOS の関与に着目した。本研究で用いた *in vivo* の CPSP モデルは、BCAO 1 日後から機械的・熱的刺激に対する痛覚閾値が低下し、28 日後までその低下の持続が認められた⁴⁰⁾。BCAO 1 および 3 日後における L-NAME の *i.t.* 投与は、機械的刺激によって生じた CPSP を有意に抑制した。すなわち、脊髄における NOS が、CPSP の発現の一部に関与している可能性が示唆される。以前の報告からも、オキシリプラチン投与によって誘発される機械的刺激に対する痛覚閾値の低下は、L-NAME の *i.t.* 投与によって抑制すること、さらには、坐骨神経損傷誘発機械的および熱的刺激に対する痛覚閾値の低下は、inducible NOS (iNOS) および neuronal NOS (nNOS) 欠損マウスにおいて改善することが明らかとなっている^{32,41)}。これらの結果は、本研究結果を強く支持するものである。

次に、BCAO 1 および 3 日後の脊髄における DDAH1 の発現変化を検討した。Western Blot 法において、BCAO 1 日後の脊髄では sham 群と比較して、有意に DDAH1 のタンパク質発現上昇を示した。なお、以前の報告において、DDAH1 は、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α) および interleukin-1 β (IL-1 β) によって発現が上昇することが示されている⁴²⁾。さらに、脳虚血および神経障害性疼痛モデルにおいて、グリア細胞の一つであるミクログリアから炎症性サイトカインが放出されることが明らかとなっており^{28,43,44)}、BCAO 1 日後の脊髄においてミクログリアが発現増加していることを確認している。すなわち、BCAO 処置によって、脊髄のミクログリアが活性化し、炎症性サイトカインが放出された結果、DDAH1 の発現上昇に一部関与しているのではないかと考えられる。また、我々は、BCAO 1 日後における PD404182 (DDAH1 阻害剤) の *i.t.* 投与は、CPSP を有意に抑制する知見を得た。過去の基礎研究において、ホルマリン誘発炎症性疼痛は、DDAH1 阻害剤の *i.t.* 投与によって、抑制されることが明らかにされている¹⁶⁾。DDAH1 は、内因性 NOS 阻害因子である ADMA を代謝することで NO 機構を調節することが報告されており、DDAH1 阻害は、細胞内の ADMA を増加させ、NO 産生を減少することも知られている^{45,46)}。さらに、*in vitro* 実験において、DDAH1 過剰発現は、nNOS および iNOS 発現を上昇させることや、DDAH1 ノックダウンは、iNOS 発現を低下させることが報告されている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。すなわち、脊髄における DDAH1 の発現上昇を介した NOS 機構の変動が、BCAO 1 日後における CPSP の発症に一部関与している可能性が示唆される。一方、BCAO 3 日後の脊髄においては、sham 群と比較して DDAH1 のタンパク質発現に変化は示さなかった。さらに、BCAO 3 日後に示された機械的アロディニアも、PD404182 の *i.t.* 投与によって改善しなかったことから、BCAO 3 日後における CPSP の発症機序には、DDAH1 以外の他の因子が、NOS 活性を制御していると示唆される。

本章では、脊髄における DDAH1 の発現上昇を介した NOS 活性の変動が、上行性痛覚伝導路の機能変容を引き起こし、BCAO 1 日後における CPSP の発症機序の一部に関与し

ている可能性を示した。

第二章 CPSP 発症における脊髄 HMGB1 の役割

2-1. 緒 言

第一章では、BCAO 1 日後の脊髄における DDAH1/NOS 機構の変動が上行性痛覚伝導路の機能変容を引き起こし、CPSP を引き起こす可能性が示唆された。したがって、第二章では、BCAO 3 日後における CPSP 発症および脊髄 NOS 活性上昇に関与する因子の探索を行った。

High mobility group box-1 (HMGB1) は、クロマチン結合性の非ヒストンタンパク質として同定され、クロマチン構造の維持機能や転写活性調節、DNA 修復等の役割を担っていると考えられていた⁵⁰⁾。しかしながら、米国の研究グループによって HMGB1 は、敗血症などの炎症性疾患に関わる重要な因子としても作用することが見出された⁵¹⁾。近年、HMGB1 は、脳虚血および神経障害性疼痛の増悪に関与することも提唱されている。これらは、ラットの中大脳動脈 2 時間閉塞-再灌流後の脳梗塞形成に対し、抗 HMGB1 中和抗体の投与によって顕著に抑制されることや、坐骨神経部分結紮モデルで誘発される神経障害性疼痛の発現が、抗 HMGB1 中和抗体の投与によって改善されることを基礎としたものである^{15,52)}。また、HMGB1 はその受容体である receptor for advanced glycation end products (RAGE) および toll-like receptor 4 (TLR4) に結合することによって、脳虚血や神経障害性疼痛を増悪することが示されている⁵³⁻⁵⁵⁾。さらに、脊髄損傷および糖尿病性末梢神経障害誘発機械的アロディニアの発現は、抗 HMGB1 抗体投与によって脊髄後角における疼痛に関与するグリア細胞の活性化や NOS を抑制することによって改善されるとの興味ある知見もある^{14,56,57)}。

したがって、第二章では CPSP における脊髄 HMGB1 機構およびグリア細胞/NOS の関与について検討した。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

Matsuura W., Harada S., Liu K., Nishibori M., Tokuyama S., Evidence of a role for spinal HMGB1 in ischemic stress-induced mechanical allodynia in mice. *Brain Res.*, **1687**, 1-10 (2018)

2-2. 実験材料および方法

第一章 1-2 と同様の実験材料および方法に従った。

2-2-1. 使用試薬

試薬は、抗 HMGB1 モノクローナル抗体 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬理学分野 西堀 正洋 教授より御供与頂いた)、lipopolysaccharide from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS、TLR4 アンタゴニスト、InvivoGen、San Diego、CA、U.S.A.)、low-molecular weight heparin (LMWH、RAGE アンタゴニスト、キッセイ薬品工業株式会社、長野、日本)、N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME、非選択的 NOS 阻害剤、Sigma-Aldrich) を実験に用いた。

2-2-2. 試薬の投与方法

抗 HMGB1 抗体 (20 µg/mouse)、LPS-RS (5, 10 µg/mouse)、LMWH (20, 40, 70 µg/mouse)、L-NAME (100, 300 µg/mouse) を i.t. 投与した。I.t. 投与は、1-2-4. にて記述した方法と同様のものを用いた。

2-2-3. 脊髄組織切片の作製

マウスを diethyl ether 麻酔下にて開腹し、ペリスタポンプ AC-2110 (アトー株式会社、東京、日本) を用い、左心室より生理食塩水を灌流して駆血を行った。その後、4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich) で灌流固定を行った。駆血した脊髄を摘出し、4% PFA (Sigma-Aldrich) により 4℃ で 2 時間、10% スクロース (ナカライテスク株式会社、京都、日本) で 3 時間、20% スクロース (ナカライテスク株式会社) で一晩浸漬固定を行った。固定した脊髄切片を Tissue-Tek OCT Compound (サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) を用いて凍結包埋を行った。凍結包埋後、クリオスタット (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて、-20℃ で厚さ 20 µm の脊髄組織切片を作製した。作製した脊髄組織切片を MAS-coated ガラススライド (松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) に乗せ 30 分間風乾させた後、-80℃ にて保存した。

2-2-4. 蛍光免疫組織染色法

蛍光組織免疫染色は、中本らの蛍光免疫染色法を参考にプロトコールを作製し、従法に従い行った³⁸⁾。凍結保存した脊髄組織切片を室温にて 20 分間風乾した後、4% ホルマリン溶液 (和光純薬工業株式会社) にて 15 分間の後固定を行った。後固定後、PBS-T [(PBS; phosphate buffered saline、pH 7.2)+0.1% Tween20] を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った。続いて組織の周りを撥水ペン (Dako pen、ダコ・ジャパン株式会社、東京、日本) で囲い、3% BSA (bovine serum albumin、Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキン

グ後、一次抗体である HMGB1 抗体 (anti-rat HMGB1 monoclonal、1:200、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬理学分野 西堀 正洋 教授より御供与頂いた; anti-mouse monoclonal、1:50、R&D Systems Inc.、Minneapolis、MN) を添加し、4℃で一晩反応させた。1 時間室温で反応させた後、PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行った。二次抗体 (donkey anti-rat polyclonal、goat anti-mouse polyclonal IgG、1:200、Alexa fluor 594、Life Technologies、CA、U.S.A.) を添加し、遮光下で室温にて 2 時間のインキュベートを行った。続いて、遮光下にて PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行い、再度 3% BSA (Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、神経細胞マーカーである neuronal nuclei (NeuN) (anti-mouse NeuN monoclonal、1:1,000、EMD Millipore Corporation、Billerica、MA、U.S.A.)、アストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) (anti-mouse GFAP monoclonal、1:1,000、EMD Millipore Corporation) および ミクログリアマーカーである ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) (anti-rabbit Iba1 polyclonal、1:1,000、和光純薬工業株式会社) を添加し、4℃で一晩反応させた。1 時間室温で反応させた後、PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行った。二次抗体 (donkey anti-rabbit polyclonal IgG、goat anti-mouse polyclonal IgG、1:200、Alexa fluor 488、Life Technologies) を添加し、遮光下にて 2 時間のインキュベートを行った。それぞれの一次および二次抗体は、1% BSA (Sigma-Aldrich) を含む PBS 溶液中にてそれぞれ希釈した。続いて、遮光下にて PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄後、遮光下 10 分間室温にて 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、Boster Immunoleader、Pleasanton、CA、U.S.A.) を処置することによって核を染色し、Fluoromount/Plus (Dianostic Biosystems、Pleasanton、Canada) と MAS-coated glass slide (S9115、松浪硝子工業株式会社) を用いて封入を行った。その後、4℃で 1 日風乾させた後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、OLYMPUS、東京、日本) を用いて観察を行った。

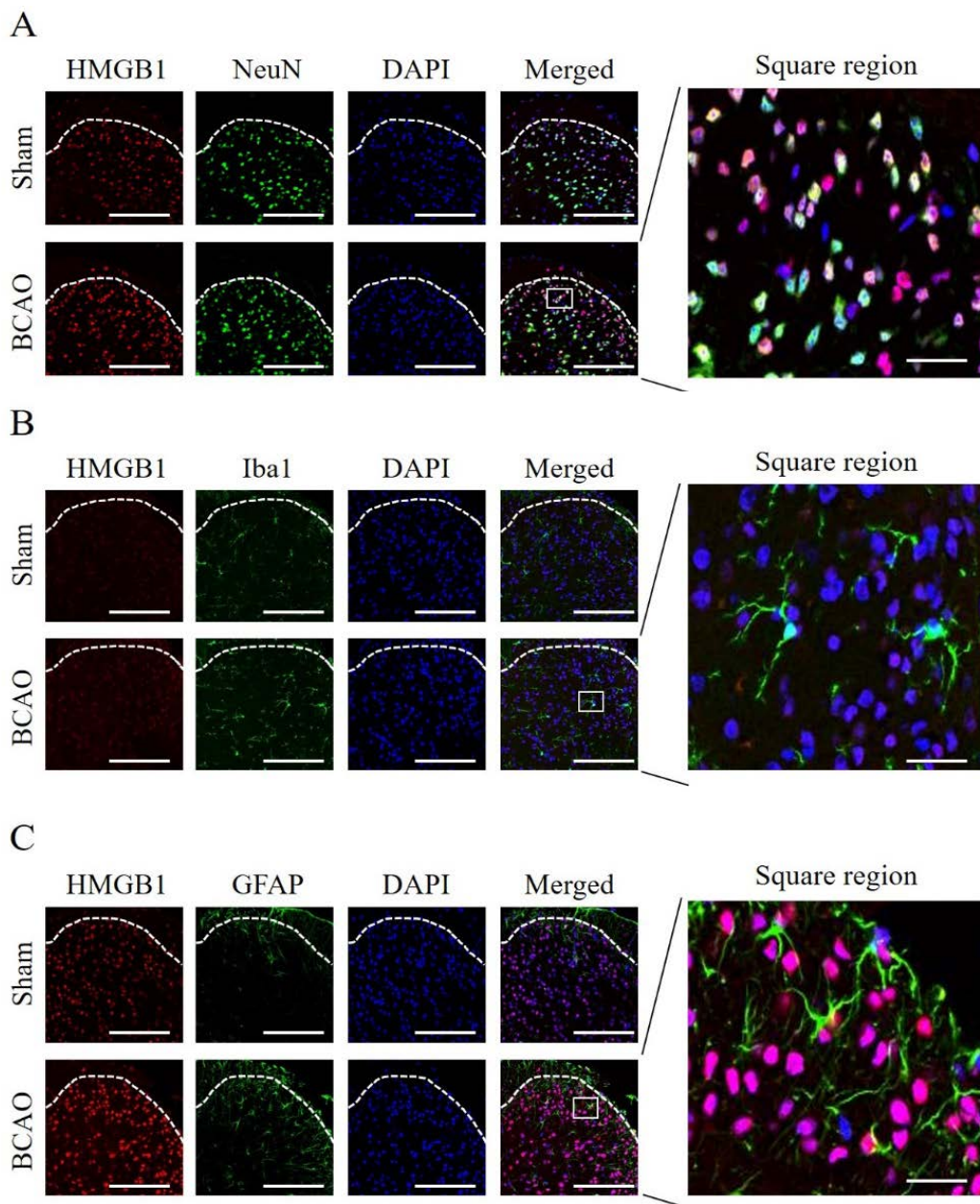
2-2-5. 統計学的処理

機械的刺激に対する逃避行動回数の反応性および脊髄における NOS 活性の評価には、One-way ANOVA, Tukey-test を用いて統計学的解析を行った。脊髄におけるグリア細胞蛍光強度の評価には、Student's t-test または One-way ANOVA, Tukey-test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 ± 標準誤差 (S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

2-3. 結 果

2-3-1. BCAO モデルマウスの脊髄におけるグリア細胞活性化および HMGB1 局在

BCAO 3 日後の脊髄において、sham 群と比較し、HMGB1 陽性細胞の有意な増加が示された (Fig. 7A-C, D-(a), E-(a), F-(a))。さらに、ミクログリアのマーカーである Iba1 (Fig. 7B) およびアストロサイトのマーカーである GFAP (Fig. 7C) 陽性細胞の有意な増加が BCAO 群の脊髄において認められた (Fig. 7E-(b), F-(b))。一方で、神経細胞のマーカーである NeuN (Fig. 7A) 陽性細胞に変化は認められなかった (Fig. 7D-(b))。HMGB1 は、脊髄において NeuN 陽性細胞と共局在を示したが、Iba1 および GFAP 陽性細胞との共局在は示さなかった (Fig. 7A-C)。



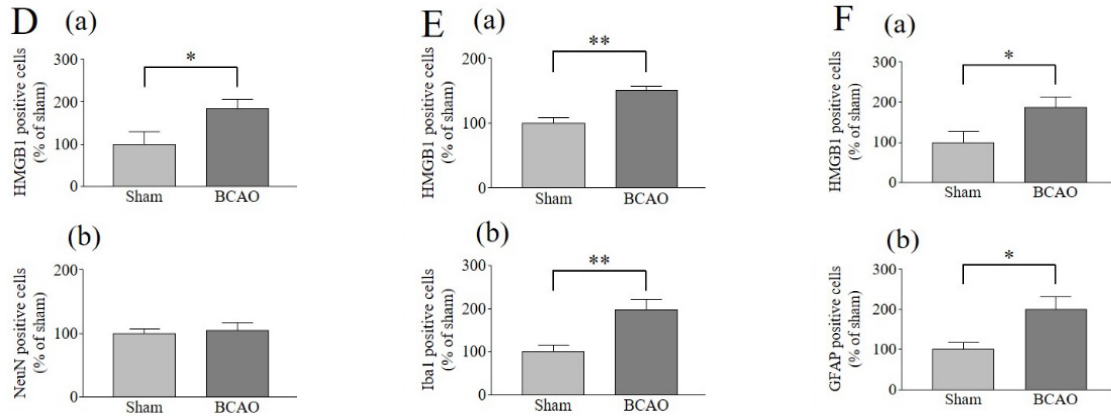


Fig. 7 Analysis of activated spinal glial cells after BCAA and HMGB1 expression in spinal neurons and glial cells.

Double-labeling immunohistochemistry for HMGB1 (red) and (A) NeuN (a marker for neurons, green); (B) Iba1 (a marker for microglia, green) or (C) GFAP (a marker for astrocytes, green) in the spinal cord of sham operation and BCAA mice 3 days after surgery. DAPI (blue) shows nuclear localization (n = 6). Quantitatively the immunofluorescent (D-b) NeuN positive cells (E-b) Iba1 positive cells (F-b) GFAP positive cells and (D, E, F-a) HMGB1 positive cells were analyzed using Image J. Original magnification 40x, HMGB1, NeuN, Iba1, GFAP, merged panel, scale bar = 50 μ m; original magnification 100x, square panel, scale bar = 125 μ m. Results are presented as mean \pm S.E.M. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the Sham group. n = 6.

2-3-2. BCAA 誘発機械的アロディニアに対する LPS-RS および LMWH (i.t.) 投与の影響

Sham 群の後肢における機械的刺激に対する逃避行動回数は、偽手術の前後で変化が認められなかった。BCAO 3 日後において認められた機械的刺激に対する逃避行動回数の増加は、LPS-RS および LMWH i.t. 投与によって用量依存的に抑制された (Fig. 8A-B)。

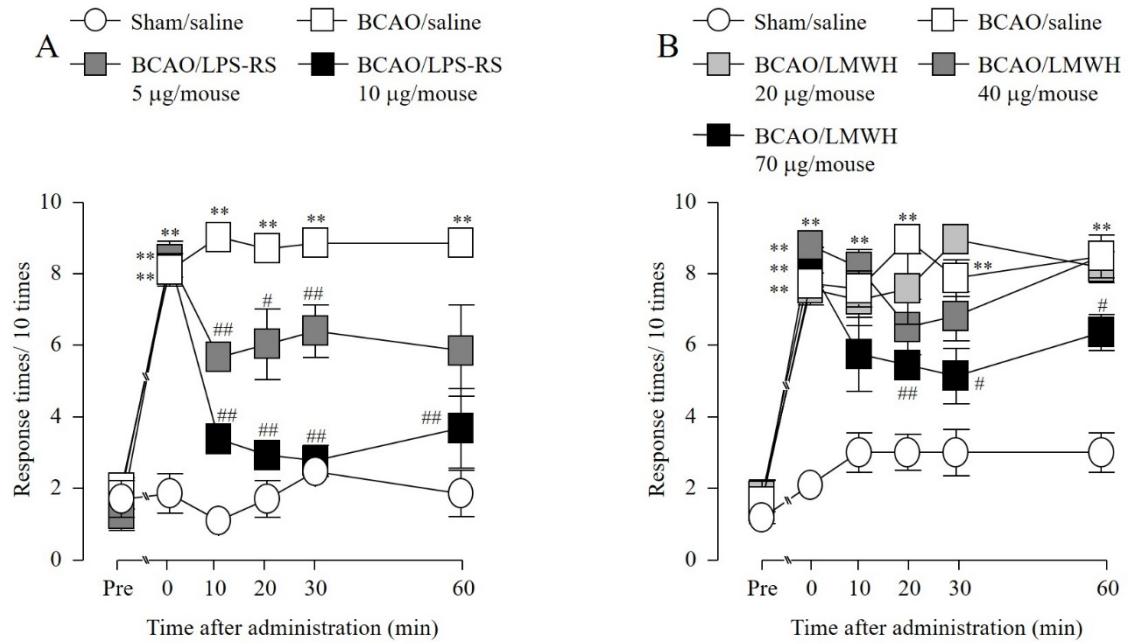


Fig. 8 Effect of (i.t.) LPS-RS and LMWH on the development of mechanical allodynia after BCAA.

(A) Sham/saline: $n = 6$, BCAA/saline: $n = 6$, BCAA/LPS-RS 5 µg/mouse: $n = 6$, BCAA/LPS-RS 10 µg/mouse: $n = 6$. (B) Sham/saline: $n = 6$, BCAA/saline: $n = 6$, BCAA/LMWH 20 µg/mouse: $n = 6$, BCAA/LMWH 40 µg/mouse: $n = 6$, BCAA/LMWH 70 µg/mouse: $n = 6$. Results are presented as mean \pm S.E.M. $**p < 0.01$ compared with the Sham/saline group. $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$ compared with the BCAA/saline group.

2-3-3. BCAO 誘発機械的アロディニアに対する L-NAME (i.t.) 投与の影響および BCAO 後の脊髄 NOS 活性に対する 抗 HMGB1 抗体、LPS-RS および LMWH (i.t.) 投与の効果

Sham 群の後肢における機械的刺激に対する逃避行動回数は、偽手術の前後で変化が認められなかった。BCAO 3 日後において認められた機械的刺激に対する逃避行動回数の増加は、L-NAME i.t. 投与によって用量依存的に抑制された (Fig. 9A)。BCAO 3 日後の脊髄において、sham 群と比較して有意な NOS 活性の上昇を示した (Fig. 9B-D)。その NOS 活性の上昇は、抗 HMGB1 抗体、LPS-RS および LMWH i.t. 投与によって、有意に低下させた (Fig. 9B-D)

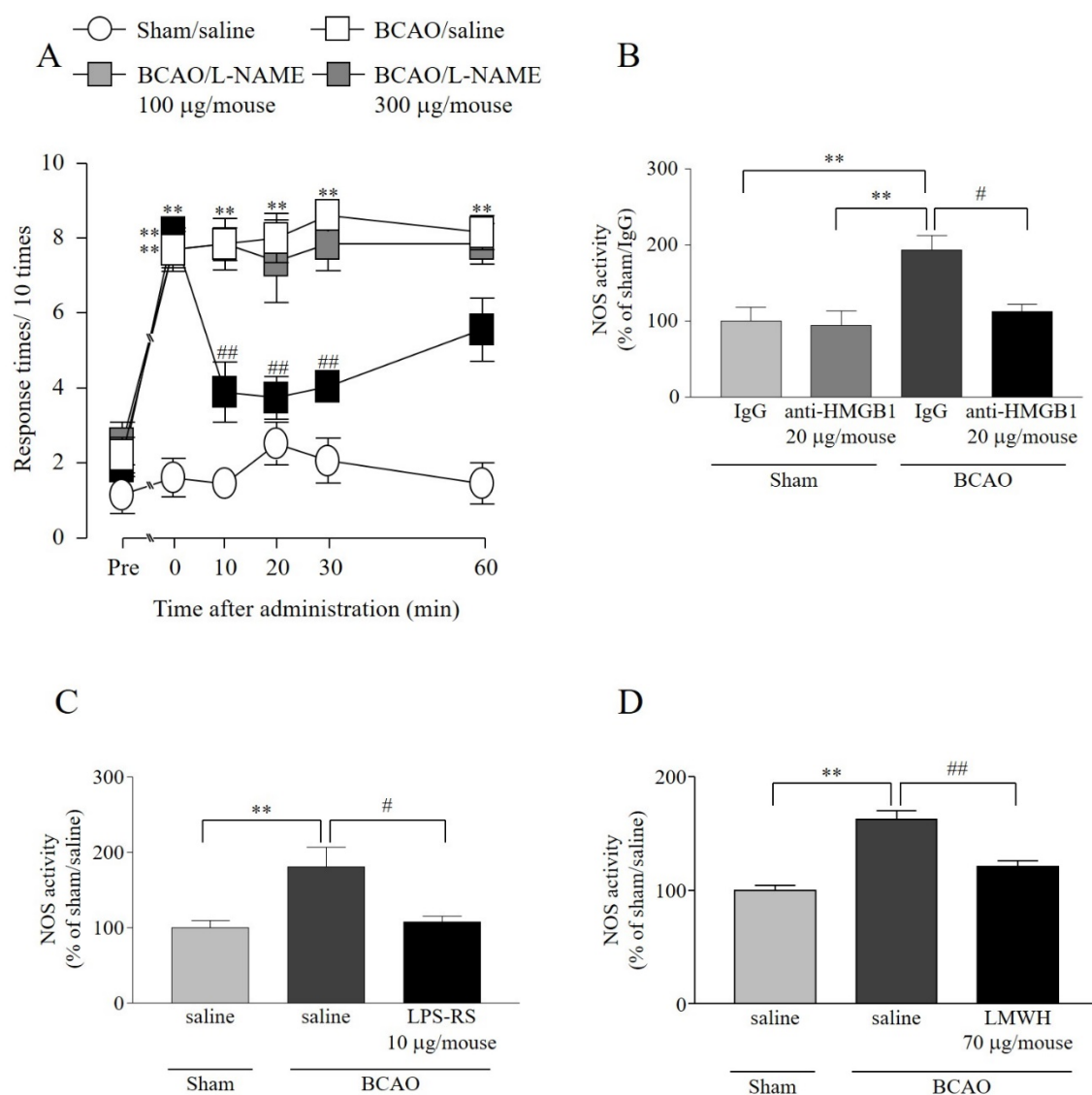
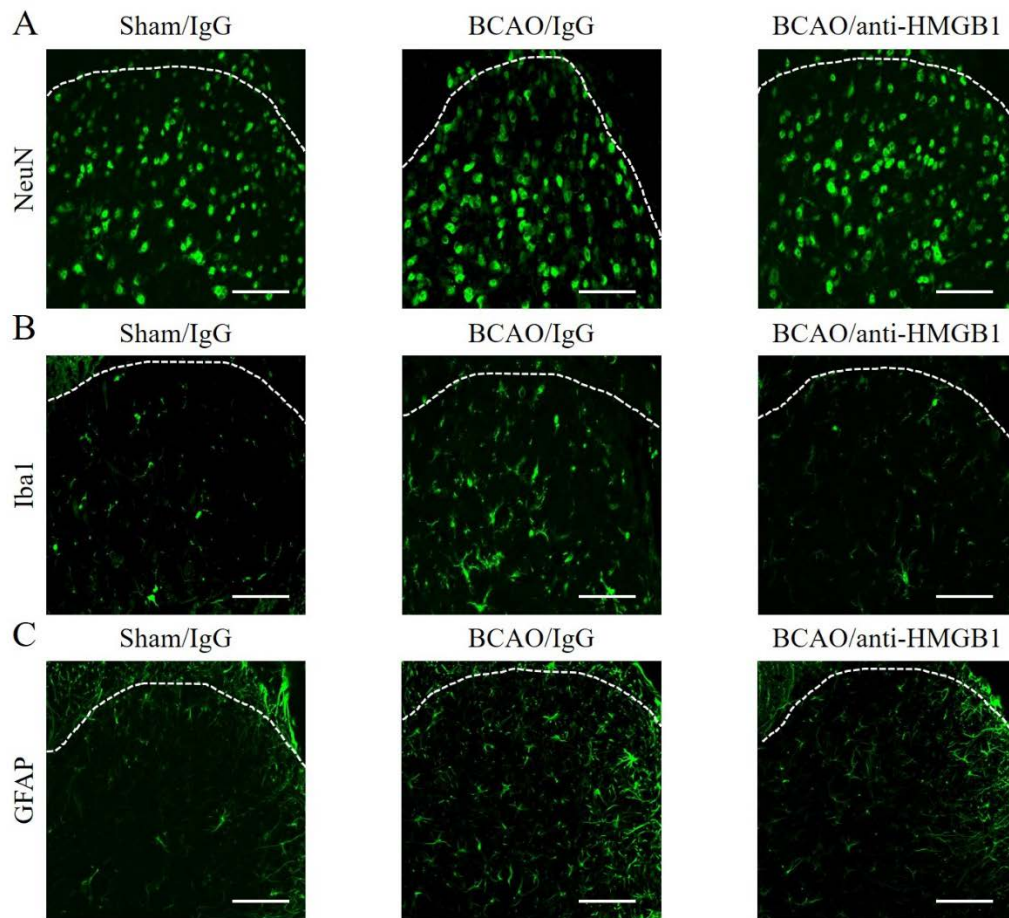


Fig. 9 Effect of (i.t.) L-NAME on the development of mechanical allodynia and the effect of (i.t.) anti-HMGB1 monoclonal antibody (mAb), LPS-RS, and LMWH on the increase of BCAA-induced NOS activity in the spinal cord.

(A) Sham/saline: n = 6, BCAA/saline: n = 6, BCAA/L-NAME 100 µg/mouse: n = 6, BCAA/L-NAME 300 µg/mouse: n = 6. Results are presented as mean ± S.E.M. $^{**}p < 0.01$ compared with the Sham/saline group. $^{##}p < 0.01$ compared with the BCAA/saline group. (B) Sham/IgG: n = 6, Sham/anti-HMGB1 mAb 20 µg/mouse: n = 6, BCAA/IgG: n = 6, BCAA/anti-HMGB1 mAb 20 µg/mouse: n = 6. (C) Sham/saline: n = 6, BCAA/saline: n = 6, BCAA/LPS-RS 10 µg/mouse: n = 6. (D) Sham/saline: n = 6, BCAA/saline: n = 6, BCAA/LMWH 70 µg/mouse: n = 8. Results are presented as mean ± S.E.M. $^{**}p < 0.01$ compared with the Sham/IgG or Sham/saline group. $^{#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$ compared with the BCAA/IgG or BCAA/saline group.

2-3-4. BCAA 誘発脊髄グリア細胞活性化に対する抗 HMGB1 抗体 (i.t.) 投与の影響

BCAO 3 日後の脊髄において、NeuN 陽性細胞は sham 群と比較して変化を示さず、抗 HMGB1 抗体 i.t. 投与によっても、影響を示さなかった (Fig. 10A, D)。対照的に、BCAO 3 日後の脊髄において Iba1 および GFAP 陽性細胞は、sham 群と比較して有意な増加を示した (Fig. 10B, C, E, F)。その増加は、抗 HMGB1 抗体 i.t. 投与によって、有意に抑制された (Fig. 10B, C, E, F)。



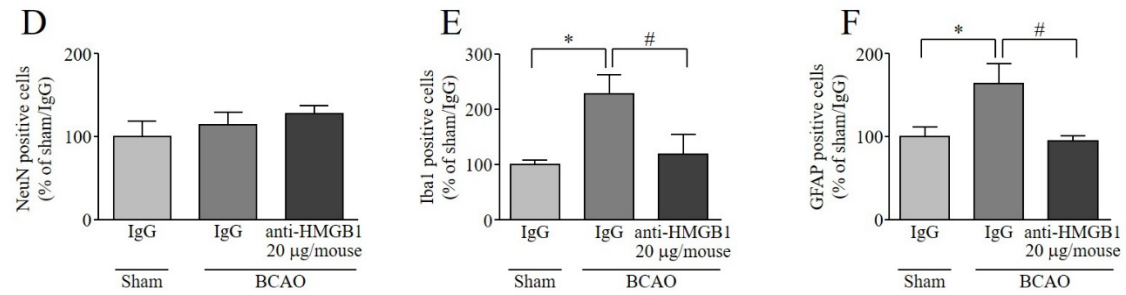


Fig. 10 Effect of (i.t.) anti-HMGB1 mAb on BCAA-induced activation of spinal glial cells.

Confocal images of spinal (A) neurons (NeuN, green), (B) microglia (Iba1, green), and (C) astrocytes (GFAP, green) from mice 20 min after treatment with either anti-HMGB1 mAb (20 µg/mouse) or control IgG. Sham operation and BCAA mice were treated with antibody 3 days after surgery. Quantitatively the immunofluorescent (D) NeuN positive cells (E) Iba1 positive cells (F) GFAP positive cells were analyzed using Image J. Original magnification 40x, NeuN, Iba1, GFAP, scale bar = 100 µm. Results are presented as mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ compared with the Sham/IgG group. # $p < 0.05$ compared with the BCAA/IgG group. $n = 6$.

2-3-5. BCAA 誘発脊髄グリア細胞の活性化に対する LPS-RS および LMWH (i.t.) 投与の影響

BCAO 3 日後の脊髄において Iba1 および GFAP 陽性細胞は、sham 群と比較して有意な増加を示した (Fig. 11A-H)。その増加は、LPS-RS i.t. 投与によって、有意に抑制された (Fig. 11A, E, C, G)。一方で、BCAO 3 日後に示された脊髄における Iba1 および GFAP 陽性細胞の増加は、LMWH i.t. 投与によって、変化を示さなかった (Fig. 11B, F, D, H)。

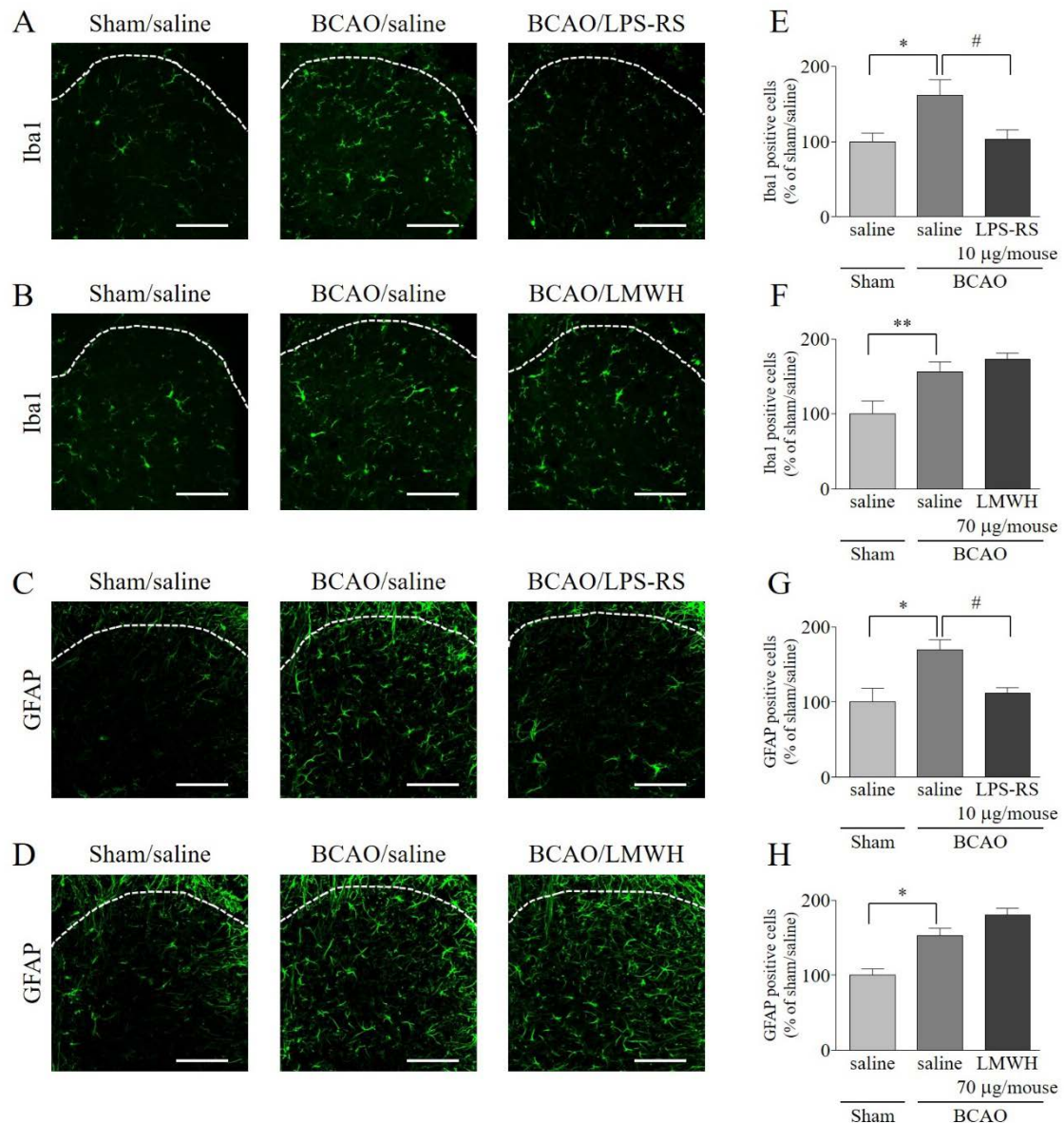


Fig. 11 Effect of (i.t.) LPS-RS and LMWH on BCAA-induced activation of spinal microglia and astrocytes.

Confocal microscopic images of spinal (A, B) microglia (Iba1, green) and (C, D) astrocytes (GFAP, green) from mice 20 min after treatment with (A, C) LPS-RS (10 μ g/mouse) and (B, D) LMWH (70 μ g/mouse). Sham and BCAA mice were treated with (A, C) LPS-RS and (B, D) LMWH on day 3 after surgery. Quantitatively the immunofluorescent (E, F) Iba1 positive cells (G, H) GFAP positive cells were analyzed using Image J. Original magnification 100x, scale bar = 80 μ m. Results are presented as mean \pm S.E.M. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the Sham/saline group. # p < 0.05 compared with the BCAA/saline group. n = 6.

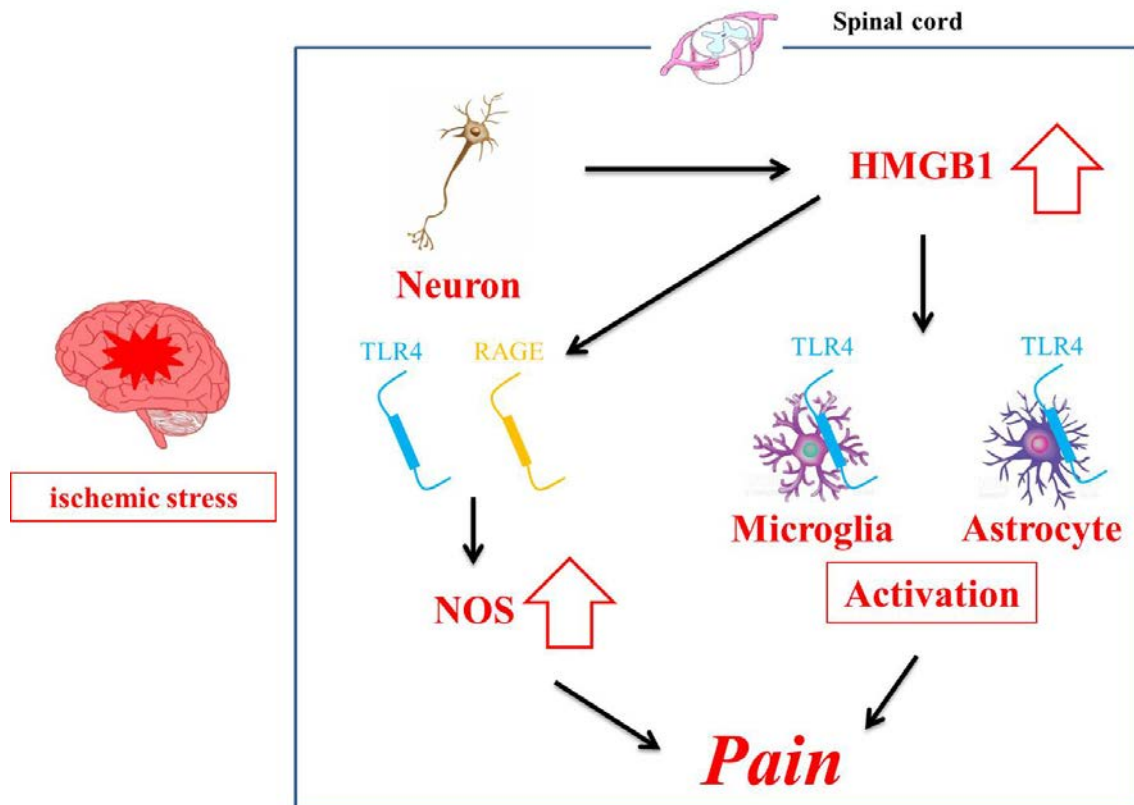


Fig. 12 Spinal HMGB1 in ischemic stress-induced mechanical allodynia in mice

2-4. 考 察

第一章の検討結果から、BCAO 1 日後の脊髄における DDAH1 の発現上昇を介した NOS 機構の変動が上行性痛覚伝導路の機能変容を引き起こし、痛み刺激の脳内への過剰伝達に関与する可能性を明らかにした。しかしながら、BCAO 3 日後における疼痛発症および脊髄 NOS 活性の変動に関与する因子が不明なままであった。そこで、脳虚血や神経障害性疼痛モデルおよび NOS との関連が報告されている HMGB1 に着目し検討を行った。

我々は、これまでに BCAO 3 日後に誘発される機械的アロディニアは、抗 HMGB1 抗体の i.t. 投与によって抑制されることを明らかにしている。本研究において、BCAO 3 日後の脊髄において、HMGB1 の発現上昇が示された。さらに、HMGB1 はグリア細胞と共局在せず、神経細胞と共局在を示した。これまでに、HMGB1 は、壊死細胞やクロマチン構造における構成因子である histone deacetylase (HDAC) および histone acetyl transferase (HAT) 機能の変化によって、細胞外に放出されることが報告されている^{58,59)}。また、神経細胞死や HAT 機能の変容に、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介したシグナル系が一部関与することが知られている^{60,61)}。さらに、神経障害性疼痛モデルにおいて、脳の帯状回-脊髄神経回路の後シナプスに発現している NMDA 受容体を介した長期増強による疼痛が増悪することも報告されている²³⁾。加えて、HDAC や HAT 機能の変化が疼痛制御に関与することも示されている⁶²⁾。すなわち、CPSP 発症機序の一部に、帯状回-脊髄神経回路が活性化し、脊髄におけるグルタミン酸濃度が上昇することで HAT 機能が亢進し、アセチル化された HMGB1 が細胞外に放出されることで上行性痛覚伝導路の機能を変容させている可能性が示唆される。

本研究において、BCAO 3 日後における LPS-RS および LMWH の i.t. 投与は、機械的刺激によって生じたアロディニアを有意に抑制する知見を得た。すなわち、脊髄において HMGB1 の受容体である TLR4 および RAGE が、CPSP 発症の一部に関与している可能性が考えられる。事実、パクリタキセルおよび脛骨神経損傷による痛覚閾値の低下は、TLR4 および RAGE アンタゴニストの i.t. 投与によって有意に抑制されるとの知見もあり^{63,64)}、本研究の結果を支持していると思われる。

また、第一章で示した BCAO 3 日後の脊髄 NOS 活性の上昇に HMGB1、TLR4 および RAGE が関与するか検討を加えた。抗 HMGB1 抗体、LPS-RS および LMWH を i.t. 投与することによって、BCAO 3 日後に誘発される脊髄の NOS 活性の上昇は有意に抑制した。第一章で述べたように、脊髄における NOS 活性の上昇は、様々な疼痛モデルの疼痛増悪に関与することが報告されている^{33,41)}。さらに、in vitro 実験において、HMGB1、TLR および RAGE リガンドは、転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を活性化し、iNOS 発現を誘導することが報告されている¹⁴⁾。したがって、BCAO 3 日後の脊髄における HMGB1 は、TLR4 および RAGE に作用し、下流因子である NF- κ B を介し、NOS 活性を増加させることで、疼痛制御の一部に関与しているのではないかと示唆される。

次に、BCAO 3 日後の脊髄における HMGB1 機構と疼痛への関与が報告されているグリア細胞の一種であるミクログリアおよびアストロサイトとの関連を検討した。神経障害性疼痛モデルの脊髄におけるミクログリアおよびアストロサイトの活性化は、NOS および炎症性サイトカインなどを放出し疼痛を増悪させることが明らかにされている⁶⁵⁻⁶⁷⁾。BCAO 3 日後の脊髄において、ミクログリアおよびアストロサイトの活性化を示し、その活性化は、抗 HMGB1 抗体および LPS-RS i.t. 投与によって有意に抑制された。抗 HMGB1 抗体投与によって、坐骨神経損傷によって誘発される脊髄グリア細胞の活性化を抑制することや HMGB1 が活性化グリア細胞から放出される炎症性サイトカインを調節することが報告されている^{15,68)}。さらには、TLR4 ノックアウトマウスにおいて、関節炎誘発の脊髄グリア細胞の活性化を抑制したことが示されている⁶⁹⁾。すなわち、脊髄における HMGB1 が TLR4 を介し、グリア細胞を活性化することで NOS および炎症性サイトカインなどを放出し、CPSP の制御に一部関与していることが推察される。

一方、BCAO 3 日後における脊髄のグリア細胞の活性化は、LMWH i.t. 投与によって抑制されなかった。RAGE は、マウスおよびヒトの脳においてグリア細胞に局在が認められないうが、神経細胞に局在することが知られている^{70,71)}。また、in vitro 実験において、HMGB1 による過剰な神経発火は、RAGE アンタゴニストによって抑制されることが明らかにされている⁶⁴⁾。以上の結果から、脊髄における HMGB1 が RAGE に作用し、神経を過剰興奮させることで CPSP の制御に一部関与していることが考えられる。

本章では、BCAO 3 日後における疼痛発症および脊髄における NOS 活性の変動に HMGB1 が関与するか検討を行った。その結果、脊髄における HMGB1/TLR4/グリア細胞活性化/NOS および HMGB1/RAGE/NOS 機構の変動が、上行性痛覚伝導路の機能変容を引き起こし、CPSP の発症機序の一部に関与している可能性が示唆された。

第三章 脳内 orexin-A を介した CPSP 抑制機構の解明

3-1. 緒 言

第一章および第二章では、上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄において、DDAH1 および HMGB1 機構を介した NOS 活性の変動が CPSP の発症機序の一部に関与している可能性を示した。一方、疼痛制御機構には上行性痛覚伝導路に加えて、脳から脊髄に向けて下行性に投射している神経が疼痛を調節する機構も知られ、脊髄における過剰な疼痛伝達を抑制することが示唆されている⁷²⁾。下行性疼痛制御系の一部として、それぞれ脳部位である青斑核および大縫線核から脊髄に投射しているノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経が知られているが、慢性疼痛においてそれらの神経系の機能低下が疼痛の増悪に関与することが報告されている⁷³⁻⁷⁵⁾。また、CPSP 患者は、下行性疼痛制御系が障害される結果、過剰な疼痛を生じること¹⁰⁾や、種々の疼痛モデルにおいて、下行性疼痛制御系に関する因子としてオピオイド受容体、G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 (GPR40/FFAR1) またはニコチン性アセチルコリン受容体などが提唱されているが^{38,76,77)}、確立した見解は得られていない。したがって、本研究においては、不眠症治療薬の標的である orexin に着目した。

Orexin は、神経ペプチドの一つとして知られており、視床下部外側野の神経に発現している⁷⁸⁾。Orexin の生理学的機能としては、覚醒、睡眠、グルコース代謝および摂食行動に関与することが知られ⁷⁹⁻⁸¹⁾、前駆体である prepro-orexin から orexin-A および orexin-B が産生され、それらの受容体として G タンパク質共役型受容体である orexin 1 receptor (OX1R) および orexin 2 receptor (OX2R) が明らかにされている²⁰⁾。さらに、近年、orexin 機構と疼痛および脳虚血との関連が注目されている。疼痛においては、下行性疼痛制御系の起始核である青斑核や大縫線核領域に OX1R および OX2R が発現していることや、これらの領域に orexin-A を局所投与することでホルマリン誘発炎症性疼痛を抑制するなどの検討がなされ^{18,19,82)}、視床下部オレキシン神経欠損は、機械的および熱的刺激に対する痛覚閾値の低下を示すことが見出されている²²⁾。さらに、脳虚血においては、orexin-A を intracerebroventricular (i.c.v.) 投与することで、中大脳動脈閉塞モデルラットにおける梗塞巣が減少するとの知見もある⁸³⁾。

したがって、第三章では CPSP における orexin を介した下行性疼痛制御系の関与について検討を加えた。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

Matsuura W., Nakamoto K., Tokuyama S., Involvement of descending pain control system regulated by orexin receptor signaling in the induction of central post-stroke pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, in press

3-2. 実験材料および方法

第一章 1-2 および第二章 2-2 と同様の実験材料および方法に従った。

3-2-1. 使用試薬

試薬は、orexin-A (Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, U.S.A.), SB334867 (選択的 OX1R アンタゴニスト、Tocris Bioscience)、TCS OX2 29 (選択的 OX2R アンタゴニスト、Tocris Bioscience)、yohimbine (選択的ノルアドレナリン α_2 受容体アンタゴニスト、ナカライテスク株式会社) および WAY100635 (選択的セロトニン 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト、Sigma-Aldrich) を実験に用いた。

3-2-2. 試薬の投与方法

Orexin-A (50, 150 pmol/mouse)、SB334867 (15 nmol/mouse) および TCS OX2 29 (300 nmol/mouse) を脳室内 (intracerebroventricular: i.c.v.) 投与した。I.c.v. 投与は、Haley and McCormick の方法に従い行った⁸⁴⁾。27 ゲージの注射針の先端が 2.5-3.0 mm になるよう加工し、脳地図に従いながら、bregma から尾側に 1 mm、外側に 1 mm の深さにある i.c.v. に投与した。I.c.v. 投与量は 10 μ l として、5 秒かけて投与を行った。SB334867 または TCS OX2 29 は、orexin-A を i.c.v. 投与する 30 分前に i.c.v. 投与した。また、yohimbine (16 μ g/mouse) および WAY100635 (40 μ g/mouse) を i.t. 投与した。I.t. 投与は、1-2-4. にて記述した方法と同様のものを用いた。Yohimbine および WAY100635 は、orexin-A を i.c.v. 投与する 15 分前に i.t. 投与した。

3-2-3. 脳組織切片の作製

マウスを diethyl ether 麻酔下にて開腹し、ペリスタポンプ AC-2110 (アトー株式会社) を用い、左心室より生理食塩水を灌流して駆血を行った。その後、4% PFA (Sigma-Aldrich) で灌流固定を行った。駆血した脳組織を摘出し、4% PFA (Sigma-Aldrich) により 4°C で 2 時間、10% スクロース (ナカライテスク株式会社) で 3 時間、20% スクロース (ナカライテスク株式会社) で一晩浸漬固定を行った。固定した脳組織切片を Tissue-Tek OCT Compound (サクラファインテックジャパン株式会社) を用いて凍結包埋を行った。凍結包埋後、クリオスタット (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて、-20°C で厚さ 20 μ m の脳組織切片を作製した。作製した脳組織切片を MAS-coated ガラススライド (松浪硝子工業株式会社) に乗せ 30 分間風乾させた後、-80°C にて保存した。

3-2-4. 蛍光免疫組織染色法

蛍光組織免疫染色は、中本らの蛍光免疫染色法を参考にプロトコールを作製し、従法に従い行った³⁸⁾。凍結保存した脳組織切片を室温にて 20 分間風乾した後、4% ホルマリン溶液

(和光純薬工業株式会社) にて 15 分間の後固定を行った。後固定後、PBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った。続いて組織の周りを撥水ペン (Dako pen、ダコ・ジャパン株式会社) で囲い、3% BSA (Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、青斑核サンプルにノルアドレナリンのマーカである一次抗体 tyrosine hydroxylase (TH、anti-chicken TH monoclonal、1:200、abcam) および大縫線核サンプルにセロトニンのマーカである一次抗体 tryptophan hydroxylase (TPH、anti-sheep TPH polyclonal、1:300、EMD Millipore Corporation) を添加し、4℃で一晩反応させた。1 時間室温で反応させた後、PBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体 (goat anti-chicken polyclonal IgG、donkey anti-sheep polyclonal IgG、1:200、Alexa fluor 594、Life Technologies) を添加し、遮光下で室温にて 2 時間のインキュベートを行った。続いて、遮光下にて、PBS-T で 5 分間ごとの洗浄を 3 回行い、再度 3% BSA (Sigma-Aldrich) にて 1 時間のブロッキングを行った。ブロッキング後、神経活性化マーカーである c-Fos (anti-rabbit c-Fos polyclonal、1:2,000、Santa Cruz、CA、U.S.A.) を添加し、4℃で一晩反応させた。1 時間室温での反応後、PBS-T で 5 分間ごとの洗浄を 3 回行った。二次抗体 (donkey anti-rabbit polyclonal IgG、1:200、Alexa fluor 488、Life Technologies) を添加し、遮光下で室温にて 2 時間のインキュベートを行った。それぞれの一次および二次抗体は 1% BSA (Sigma-Aldrich) を含む PBS 溶液中にてそれぞれ希釈した。続いて、遮光下にて PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄後、Fluoromount/Plus (Dianostic Biosystems) と MAS-coated glass slide (S9115、松浪硝子工業株式会社) を用いて封入を行った。その後、4℃で 1 日風乾させた後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、OLYMPUS) を用いて観察を行った。

3-2-5. 脳組織抽出液の調製および real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法用サンプルの調製

RNeasy Mini kit (QIAGEN、LI、NL) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を用いて cDNA を調製した。マウスより視床下部を摘出し、350 μ L の buffer RLT 中でバイオマッシャー (株式会社ニッピ、東京、日本) を用いて均質化したものをサンプルとした。遠心分離 (15,000 rpm、室温、5 分間) によって得られた各サンプルの上清 200 μ L を 1.5 mL チューブに単離し、同量の 70% エタノールと混和した。このサンプルを RNeasy スピンカラムに 400 μ L 加え、遠心分離 (10,000 rpm、室温、20 秒間) アスピレーターを用いてろ液を除去した。次に、Buffer RW1 700 μ L を加え、同条件下にて遠心操作を行った。さらに Buffer RPE 500 μ L を加え、同条件下にて遠心操作を行った後、Buffer RPE 500 μ L を加え、遠心分離 (10,000 rpm、室温、2 分間) した。スピンカラムを新しい 2 mL チューブに移し、遠心分離 (15,000 rpm、室温、1 分間)を行った。その後スピンカラムに RNase Free H₂O を 30 μ L 加え、遠心分離 (10,000 rpm、室温、1 分間) し、得られた抽出液の RNA 濃度を nanodrop lite (Thermo Fisher Scientific Inc.、MA、U.S.A.) を用いて測定した。抽出した RNA に PrimScript RT reagent Kit with gDNA

eraser (タカラバイオ株式会社) のゲノム DNA 除去反応液を加え、15 分間室温で反応させた。逆転写反応液を加え、PCR Thermal Cycler (タカラバイオ株式会社) において 37°C、15 分間の反応の後に 85°C、5 秒間の逆転写反応を行い complementary DNA (cDNA) を調製した。本 cDNA を real-time PCR のサンプルとして用いた。

3-2-6. Real-time PCR 法

Real-time PCR 法は、FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics, Basel, Swiss Confederation) を用いて SYBERGREEN 法にて行った。ホワイトチューブに cDNA 溶液、FastStart Essential DNA Green Master、PCR-grade water および prepro-orexin または GAPDH のプライマー (Life Technologies, Inc.) を加え、反応溶液を調製した。Master Diagnostics にて PCR を行った。PCR は pre-incubation の後、3 step Amplification (95°C 10 秒、65°C 20 秒、72°C 20 秒) を 40 サイクル行い、melting (95°C 10 秒、65°C 60 秒、97°C 1 秒)、cooling (37°C 30 秒) の順で行った。解析には、comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta CT$ 法) を用いた。また、プライマーの配列は下記のものを使用した。

prepro-orexin	Forward	5'-GGC ACC ATG AAC TTT CCT TC-3'
	Reverse	5'-GAC AGC AGT CGG GCA GAG-3'
GAPDH	Forward	5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3'
	Reverse	5'-GGA TGC AGG GAT GTT CT-3'

Table 1: Primer sequence.

3-2-7. 統計学的処理

機械的刺激に対する逃避行動回数の反応性の評価には、two-way ANOVA, Tukey-test を用いて統計学的解析を行った。異なる二群間の mRNA 量および蛍光強度の評価には、Student's t-test を用い、orexin-A i.c.v. 投与後の青斑核および大縫線核における TH および TPH 陽性細胞と c-Fos 陽性細胞との共局在は one-way ANOVA, Tukey-test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 \pm 標準誤差 (S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

3-3. 結 果

3-3-1. BCAO 3 日後の視床下部における prepro-orexin 発現変化

BCAO 3 日後の視床下部における prepro-orexin mRNA 量は、sham 群と比較して有意に減少した (Fig. 13)。

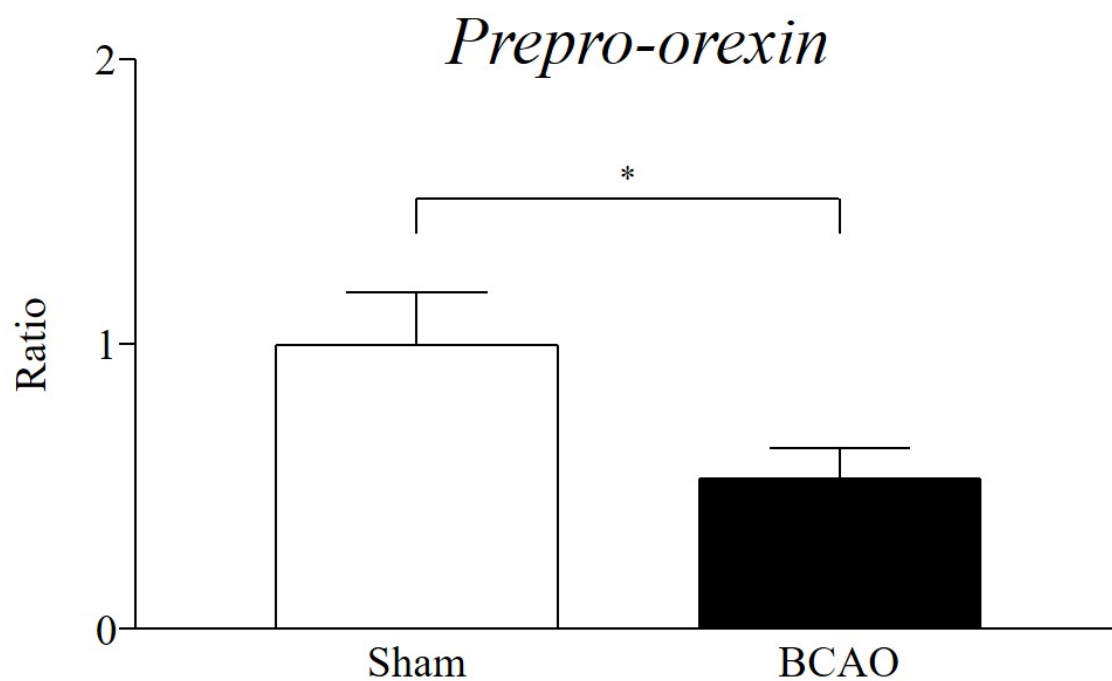


Fig. 13 Expression of prepro-orexin in the hypothalamus after BCAA

Sham: n = 9; BCAA: n = 11. Results are presented as mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ compared with the Sham group.

3-3-2. BCAA 誘発機械的アロディニアに対する orexin-A (i.c.v.) 投与の効果

Sham 群の後肢における機械的刺激に対する逃避行動回数は、偽手術の前後で変化が認められなかった。BCAO 3 日後の後肢において認められた機械的刺激に対する逃避行動回数の増加は、orexin-A i.c.v. 投与によって、用量依存的に抑制され、その効果は 60 分間持続した (Fig. 14A)。Orexin-A i.c.v. 投与によって認められた抗侵害作用は、SB334867 i.c.v. 投与によって拮抗されたが (Fig. 14B)、TCS OX2 29 i.c.v. 投与では拮抗されなかった (Fig. 14C)。

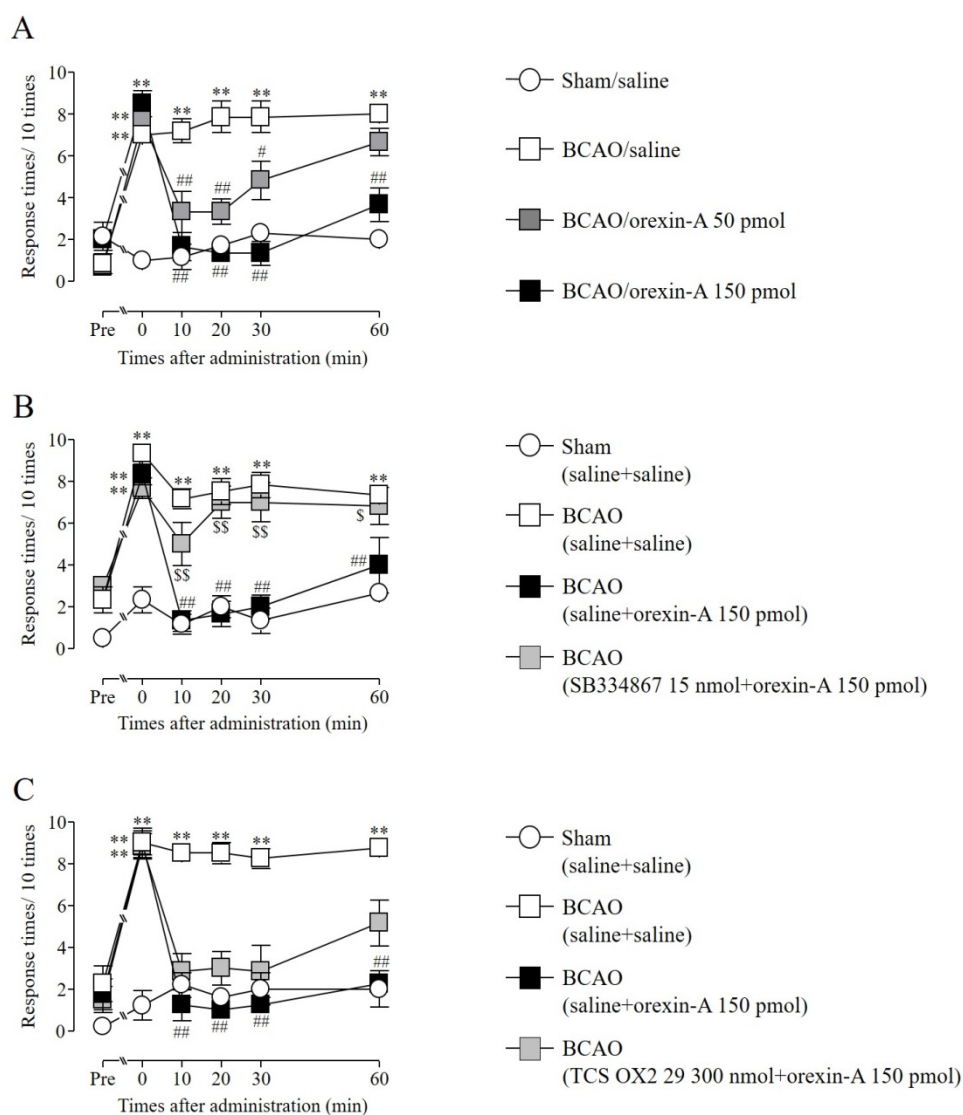


Fig. 14 Effect of (i.c.v.) administration of orexin-A on mechanical allodynia in BCAA model mice

(A) Sham/saline: n = 7, BCAA/saline: n = 6, BCAA/orexin-A 50 pmol/mouse: n = 6, BCAA/orexin-A 150 pmol/mouse: n = 6. (B) Sham (saline+saline): n = 6, BCAA (saline+saline): n = 6, BCAA (saline+orexin-A 150 pmol/mouse): n = 6, BCAA (SB334867 15 nmol/mouse+orexin-A 150 pmol/mouse): n = 6. (C) Sham (saline+saline): n = 6, BCAA (saline+saline): n = 6, BCAA (saline+orexin-A 150 pmol/mouse): n = 6, BCAA (TCS OX2 29 300 nmol/mouse+orexin-A 150 pmol/mouse): n = 6. Results are presented as mean \pm S.E.M. ^{**} $p < 0.01$ compared with the Sham/saline, Sham (saline+saline) group. ^{##} $p < 0.01$ compared with the BCAA/saline, BCAA (saline+saline) group. ^{\$} $p < 0.05$, ^{\$\$} $p < 0.01$ compared with the BCAA (saline+orexin-A 150 pmol/mouse) group.

3-3-3. 青斑核における TH および OX1R 共局在および orexin-A (i.c.v.) 投与によるノルアドレナリン作動性神経活性化

BCAO 3 日後の青斑核において、TH および OX1R が共局在を示した (Fig. 15A)。BCAO 3 日後の青斑核における TH 陽性細胞は、sham 群と比較して変化は認められなかった (Fig. 15B, C)。Orexin-A の前処置は、saline 投与群と比較して青斑核における c-Fos および TH/c-Fos 陽性細胞数を増大させた (Fig. 15D, E, F)。

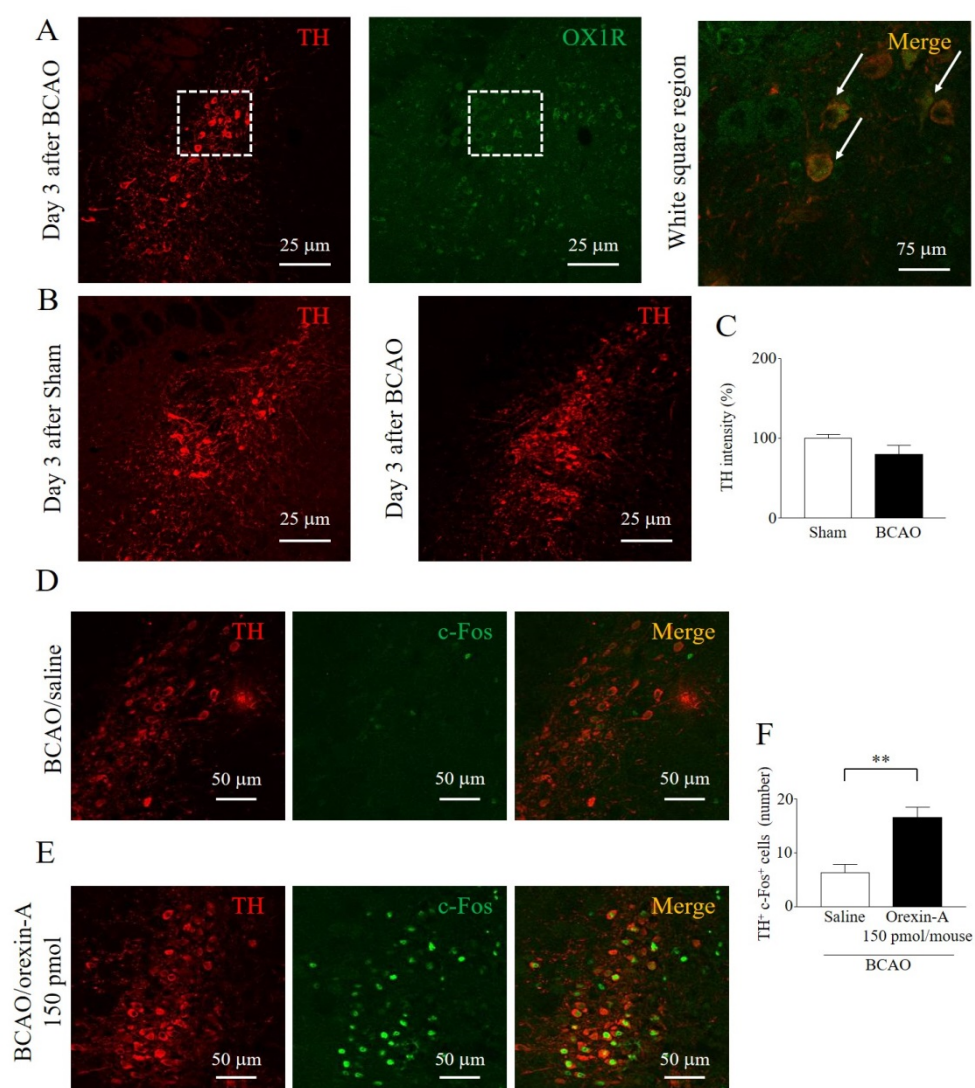


Fig. 15 Colocalization of TH with OX1R or c-Fos in the LC

(A) On day 3 after BCAO, colocalization in the LC was evaluated with double immunofluorescence staining (red: TH; green: OX1R receptors). White arrows indicate colocalization in TH and OX1R of the LC. Original magnification 20x, scale bar = 25 μm . White square panel: original magnification 60x, scale bar = 75 μm . (B) TH (a marker of noradrenergic neuron) positive cells in the LC region of sham operation and BCAO mice 3 days after surgery. Original magnification 20x, scale bar = 25 μm . (C) TH intensity were analyzed using Image J. (D, E) Colocalization of c-Fos (a marker of neuronal activation marker) with TH in the LC after i.c.v. administration of orexin-A (150 pmol/mouse) or saline was evaluated with double immunofluorescence staining (red: TH; green: c-Fos) on day 3 after BCAO. Original magnification 40x, scale bar = 50 μm . (F) The number of merged cells (TH⁺/c-Fos⁺ cells) in the LC after i.c.v. administration of orexin-A (150 pmol/mouse) or saline on day 3 after BCAO. Results are presented as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ compared with the BCAO/saline group.

3-3-4. 大縫線核における TPH および OX1R 共局在および orexin-A (i.c.v.) 投与によるセロトニン作動性神経活性化

BCAO 3 日後の大縫線核において、TPH および OX1R が共局在を示した (Fig. 16A)。BCAO 3 日後の青斑核における TPH 陽性細胞は、sham 群と比較して変化は認められなかった (Fig. 16B, C)。Orexin-A の前処置は、saline 投与群と比較して大縫線核における c-Fos および TPH/c-Fos 陽性細胞数を増大させた (Fig. 16D, E, F)。

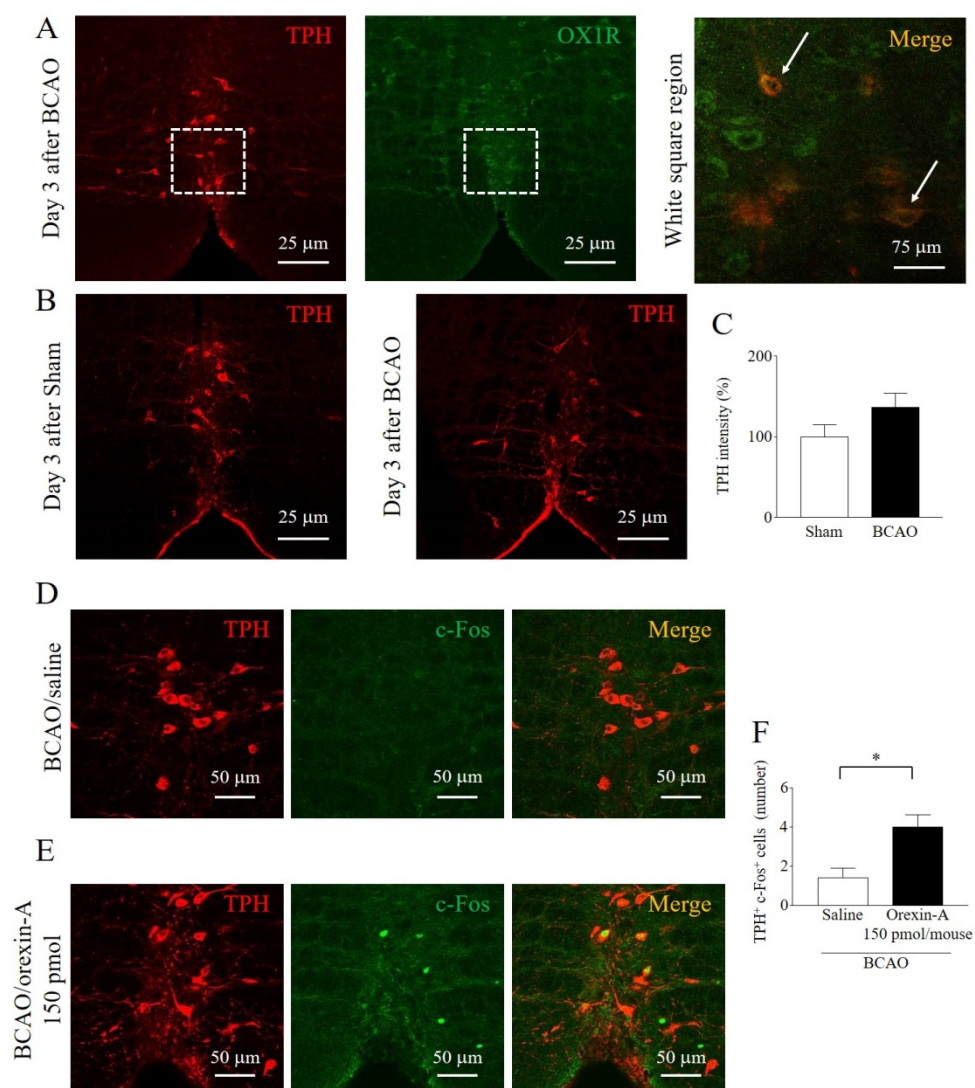


Fig. 16 Colocalization of TPH with OX1R or c-Fos in the RVM

(A) On day 3 after BCAA, colocalization in the RVM was evaluated with double immunofluorescence staining (red: TPH; green: OX1R receptors). White arrows indicate colocalization in TPH and OX1R of the RVM. Original magnification 20x, scale bar = 25 μ m. White square panel: original magnification 60x, scale bar = 75 μ m. (B) TPH (a marker of serotonergic neuron) positive cells in the RVM region of sham operation and BCAA mice 3 days after surgery. Original magnification 20x, scale bar = 25 μ m. (C) TPH positive cells were analyzed using Image J. (D, E) Colocalization of c-Fos (a marker of neuronal activation) with TPH in the RVM after i.c.v. administration of orexin-A (150 pmol/mouse) or saline was evaluated with double immunofluorescence staining (red: TPH; green: c-Fos) on day 3 after BCAA. Original magnification 40x, scale bar = 50 μ m. (F) The number of merged cells (TPH⁺/c-Fos⁺ cells) in the RVM after i.c.v. administration of orexin-A (150 pmol/mouse) or saline on day 3 after BCAA. Results are presented as mean \pm SEM. * p < 0.05 compared with the BCAA/saline group.

3-3-5. BCAA モデルマウスにおける orexin-A (i.c.v.) 抗侵害作用に対する yohimbine および WAY100635 (i.t.) 投与の効果

Orexin-A i.c.v. 投与によって認められた BCAA 後に生じる逃避行動回数増加の抑制作用は、yohimbine および WAY100635 i.t. 投与によって、60 分間拮抗された (Fig. 17A, B)。

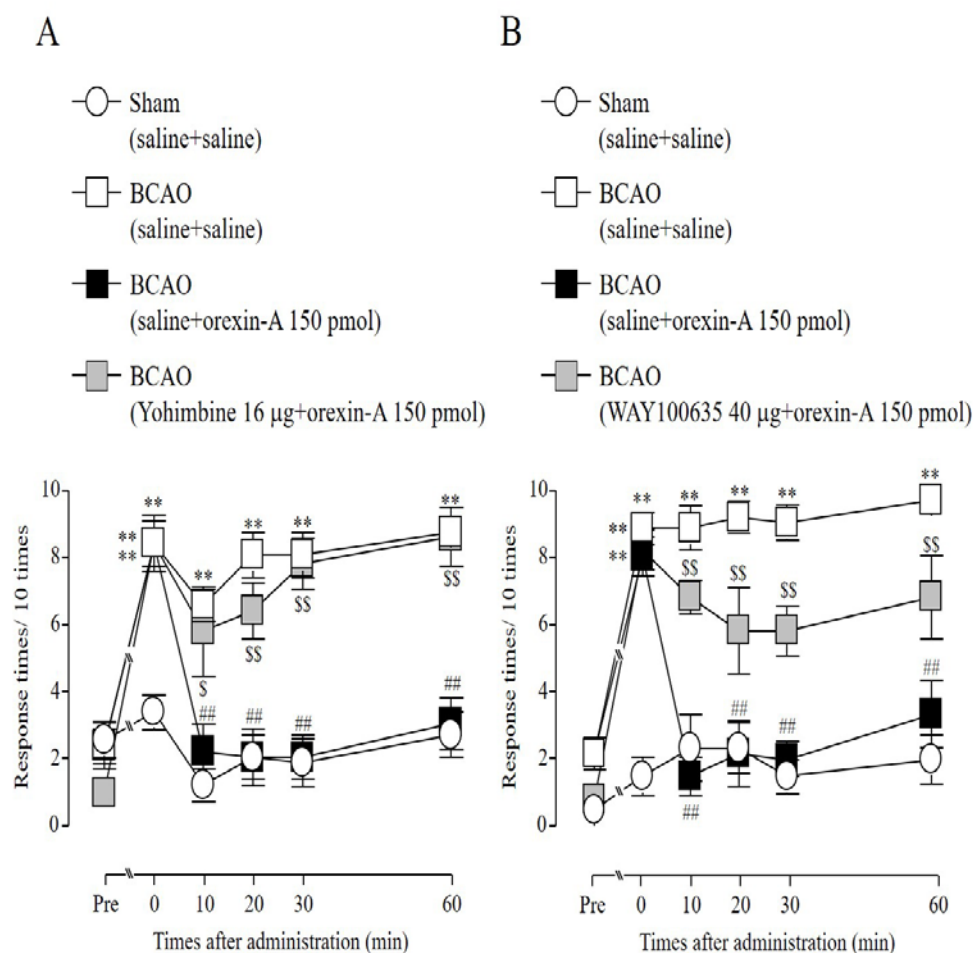


Fig. 17 Inhibitory effect of (i.t.) administration of yohimbine and WAY100635 on orexin-A induced antinociception in BCAA model mice

(A) Sham (saline+saline): $n = 6$, BCAA (saline+saline): $n = 6$, BCAA (saline+orexin-A 150 pmol/mouse): $n = 6$, BCAA (yohimbine 16 μ g/mouse+orexin-A 150 pmol/mouse): $n = 5$. (B) Sham (saline+saline): $n = 6$, BCAA (saline+saline): $n = 6$, BCAA (saline+orexin-A 150 pmol/mouse): $n = 6$, BCAA (WAY100635 40 μ g/mouse+orexin-A 150 pmol/mouse): $n = 6$. Results are presented as mean \pm S.E.M. $**p < 0.01$ compared with the Sham (saline+saline) group. $##p < 0.01$ compared with the BCAA (saline+saline) group. $$p < 0.05$, $$$p < 0.01$ compared with the BCAA (saline+orexin-A 150 pmol/mouse) group.

3-4. 考 察

第三章では、CPSP に対する orexin-A を介した下行性疼痛制御系の関与について検討を行った。本研究において、BCAO 3 日後の視床下部において、prepro-orexin mRNA の有意な低下が認められた。従来からオレキシン神経は、グリア細胞との関係が注目されている。実際、アストロサイトから放出される ATP や乳酸によって活性化すること⁸⁵⁾や、脳虚血モデルの海馬において、活性酸素種が増大し、アストロサイトの機能が低下することなどの報告が多くなされている⁸⁶⁾。我々の先行研究でも、BCAO 後の視床下部において、アストロサイトのマーカーである GFAP の発現低下を明らかにしている⁸⁷⁾。したがって、BCAO 処置によって、視床下部におけるアストロサイトの機能低下が、prepro-orexin mRNA の発現低下に関与していると考えられる。

本研究において、BCAO 3 日後に認められる機械的アロディニアの増強は、orexin-A を i.c.v. 投与することによって有意に抑制されることを確認した。さらに、orexin-A の i.c.v. 投与が、部分坐骨神経損傷によって誘発される機械的アロディニア⁸⁸⁾およびホルマリン誘発炎症性疼痛は、orexin-A の i.t. 投与によって抑制されることも報告されている⁸⁹⁾。これらの結果から、orexin-A の脳内や脊髄への局所投与は、種々の神経障害性疼痛において、一定の鎮痛効果を発揮することが期待される。しかしながら、orexin-A は神経ペプチドの一つであり、内服などの全身投与では代謝されてしまうため、使用が困難な状況にある。したがって、酵素で代謝されにくい orexin-A 関連化合物の開発は急務である。

Orexin-A 投与によって抑制される機械的アロディニアは、SB334867 (選択的 OX1R アンタゴニスト) 前処置によって拮抗されるが、TCS OX2 29 (選択的 OX2R アンタゴニスト) では拮抗されないとの興味ある知見を得た。この結果は、orexin-A 投与によって認められる CPSP 抑制機序において、OX1R が重要な役割を担っていることが示唆される。これまでオキサリプラチン投与によって誘発される機械的アロディニアは、orexin-A 投与によって抑制され、その抑制作用は SB334867 前処置によって拮抗されることが報告されている⁹⁰⁾。さらに、脳内腹内側中脳水道周囲灰白質内への orexin-A 投与は、熱的刺激による痛覚過敏を抑制し、その作用は、SB334867 を共処置することによって拮抗されたが、TCS OX2 29 では何らの影響もみられなかった⁹¹⁾。したがって、これらの報告は、CPSP を含む種々の神経障害性疼痛の発症に OX2R は介さずに OX1R を介する機構が重要であるとの我々の結果を支持する。

下行性疼痛制御系の起始核である青斑核および大縫線核において、TH/OX1R および TPH/OX1R 陽性細胞を示したことから、ノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経に OX1R が発現していることが認められた。また、視床下部外側野の orexin 神経が、青斑核および大縫線核に投射しているとの報告もある⁹²⁾。加えて、in vitro 実験において、orexin-A 処置によって、ノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経の発火を増大させることも知られている^{79,93)}。さらに、今回の検討によって、orexin-A の i.c.v. 投与は、saline 投与群と比較して TH/c-Fos および TPH/c-Fos 陽性細胞を増加させることが確認された。した

がって、orexin-A は、青斑核および大縫線核において OX1R を介して、ノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経を活性化していることが示唆された。

Orexin-A の CPSP に対する疼痛抑制作用は、yohimbine (選択的ノルアドレナリン α_2 受容体アンタゴニスト) および WAY100635 (選択的セロトニン 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト) を i.t. 投与することによって拮抗された。近年、これらの受容体と orexin-A が密接に関連していることを示唆する文献が散見される。それらの例として、orexin-A は、分界条床核においてノルアドレナリン α_2 受容体を介して gamma-aminobutyric acid (GABA) 作動性神経を活性化することが示されている⁹⁴⁾。また、orexin ノックアウトマウスにおけるセロトニン 5-HT_{1A} 受容体 mRNA 量は、前頭前皮質において有意に減少したが、視床下部や背側縫線核においては有意に増加していることが確認されている。一方、セロトニン 5-HT_{2A} または 5-HT_{2C} 受容体 mRNA 量は、orexin ノックアウトマウスにおいて変化は認められなかった⁹⁵⁾。前述した様に、青斑核および大縫線核は、ノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経の起始核であり、下行性疼痛制御系と密接な関係にあることが知られている^{74,75)}。事実、ノルアドレナリン α_2 受容体アゴニストの i.t. 投与は、熱または機械的痛覚過敏を抑制すること^{96,97)}や、セロトニン 5-HT_{1A} 受容体アゴニストの i.t. 投与は、ホルマリン誘発疼痛行動を抑制し、その抑制効果は、WAY100635 i.t. 投与によって拮抗を示すことなどが報告されている⁹⁸⁾。以上の知見から、CPSP における orexin-A 神経系の減弱は、下行性疼痛制御系の機能低下を引き起こす可能性が考えられる。

活性化したグリア細胞から放出される炎症性サイトカインが脳虚血や神経障害性疼痛の増悪に関与することは周知であり^{43,99)}、第二章で示したように、本研究においても BCAA 3 日後の脊髄において、グリア細胞が活性化していることを確認している。さらに、in vitro の実験において、orexin-A は、炎症性マーカーとして報告されている TNF- α や iNOS 発現を減少させること¹⁰⁰⁾や、ノルアドレナリン α_2 またはセロトニン 5-HT_{1A} 受容体の活性化は、グリア細胞の活性化および炎症性サイトカインの誘導を抑制することが明らかにされている¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾。したがって、orexin-A の減弱は、下行性疼痛制御系の機能低下を引き起こし、投射先の脊髄においてグリア細胞を活性化させることで、炎症性サイトカインを誘導し、CPSP が発症するものと推察される。

第三章では、orexin-A/OX1R 機構の減弱は、下行性疼痛制御系であるノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経の活性低下を引き起こし、CPSP を発症することを明らかにした。

総 括

本研究では、CPSP における脊髄 DDAH1/NOS および HMGB1/NOS 機構の変動が、上行性痛覚伝導路を介した痛み刺激の脳内へ過剰伝達する可能性について検討した。さらに、CPSP に対する orexin-A を介した下行性疼痛制御系の関与について注目し、以下の結果を得た。

1. CPSP モデルマウスの脊髄において、NOS 活性の上昇が認められたことから、CPSP の発症に上行性痛覚伝導路を介した痛み刺激の脳内への過剰伝達が関与することが示唆された。しかしながら、NOS 活性の制御において、BCAO の 1 日後は、DDAH1、3 日後には、HMGB1 が関与することが明らかとなった。
2. 脳内 orexin-A/OX1R 機構の変容は、下行性疼痛制御系であるノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経の活性低下を引き起こすことで、CPSP を発症する可能性を見出した。

現在、CPSP は治療を施しても、その根治は困難な状況にある。有効な治療薬がない現状において、新たな治療標的を提案する基盤研究は非常に重要であると考えられる。本研究において、CPSP モデルにおいて上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄での DDAH1 および HMGB1 機構の変動が疼痛の増悪に関与することや orexin を介した下行性疼痛制御系の変容が CPSP 発症に深く関与することを明らかにした。本研究の成果は、CPSP に対する治療戦略の開発研究において新たな概念を導入することとなり、本研究分野の発展に大いに寄与できると考えられる。

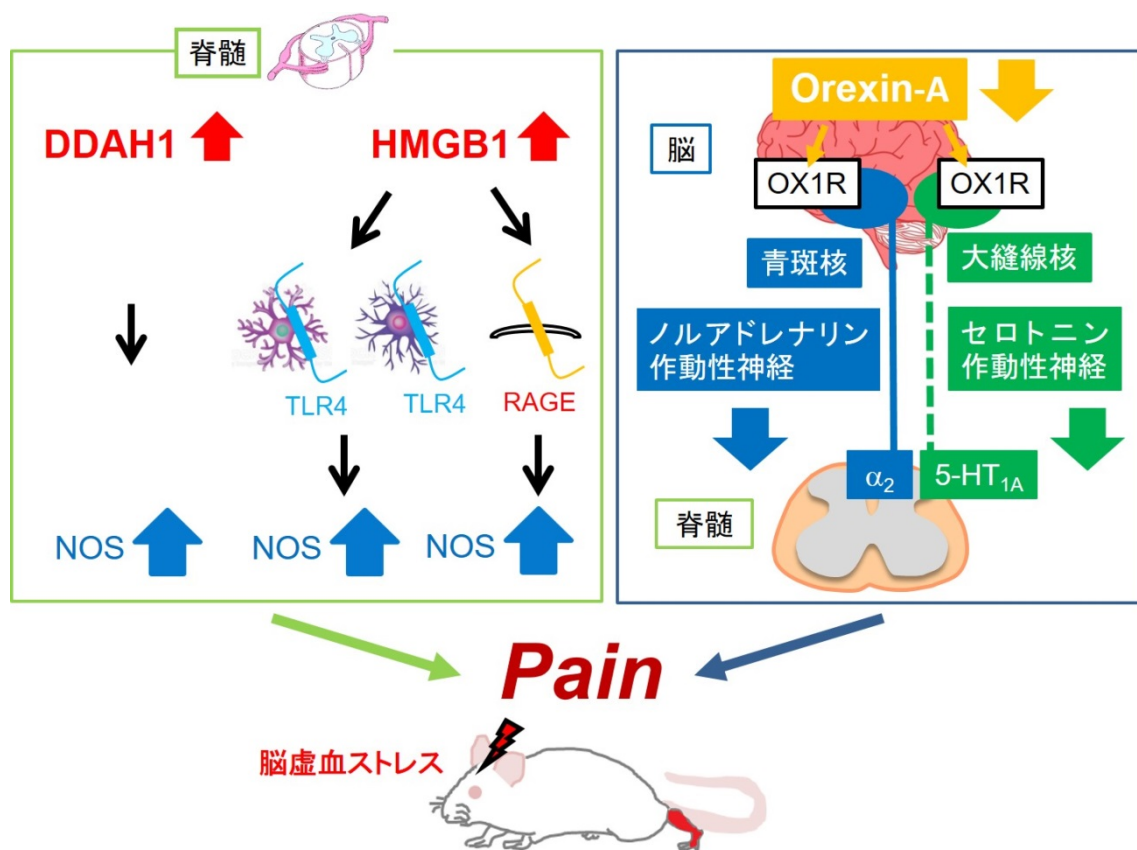


Fig. 18 Graphical abstract

謝 辞

本論文の作成ならびに本研究の遂行にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 徳山 尚吾 教授に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、御校閲ならびに御助言を賜りました神戸学院大学薬学部 岡本 正志 教授、糟谷 史代 教授に心から感謝致します。

HMGB1 の実験に際し、抗 HMGB1 抗体を御供与頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学分野 西堀 正洋 教授、劉 克約 非常勤研究員に深く感謝を申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文作成に際し、多大なる御指導、御助言を賜りました、神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 中本 賀寿夫 講師に心から御礼申し上げます。

また、温かい励ましと御協力を頂きました本研究室の皆様および卒業生の皆様に心から感謝致します。

末筆になりましたが、これまで大変な心配とご苦勞をおかけしたにも関わらず、温かく見守り、多大なるご支援を頂きました家族に心より感謝の意を表します。

引用文献

1. Hackett M. L., *et al.* Frequency of depression after stroke: a systematic review of observational studies. *Stroke* **36**, 1330–40 (2005).
2. Kumar B., *et al.* Central poststroke pain: a review of pathophysiology and treatment. *Anesth. Analg.* **108**, 1645–57 (2009).
3. Yamaguchi T., *et al.* Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT). *Stroke* **37**, 1810–5 (2006).
4. Watanabe T., *et al.* [Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant]. *Yakugaku Zasshi* **124**, 99–111 (2004).
5. Woolf C. J. What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.* **120**, 3742–4 (2010).
6. Spiegel D., *et al.* Pain and depression in patients with cancer. *Cancer* **74**, 2570–2578 (1994).
7. Gierthmühlen J., *et al.* Neuropathic Pain. *Semin. Neurol.* **36**, 462–468 (2016).
8. Khedr E. M., *et al.* Longlasting antalgic effects of daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation in central and peripheral neuropathic pain. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 833–8 (2005).
9. Lampl C., *et al.* Amitriptyline in the Prophylaxis of Central Poststroke Pain. *Stroke* **33**, 3030–3032 (2002).
10. Kim J. S. Post-stroke pain. *Expert Rev. Neurother.* **9**, 711–21 (2009).
11. Garbuzova-Davis S., *et al.* Blood-Spinal Cord Barrier Alterations in Subacute and Chronic Stages of a Rat Model of Focal Cerebral Ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **75**, 673–88 (2016).
12. Kuboyama K., *et al.* Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol. Pain* **7**, 50 (2011).
13. Cooke J. P., *et al.* DDAH says NO to ADMA. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1462–4 (2011).
14. Das N., *et al.* HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia. *Cell Rep.* **17**, 1128–1140 (2016).
15. Nakamura Y., *et al.* Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1. *PLoS One* **8**, e73640 (2013).
16. D’Mello R., *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 is involved in spinal nociceptive plasticity. *Pain* **156**, 2052–60 (2015).
17. Suyama H., *et al.* Analgesic effect of intrathecal administration of orexin on neuropathic pain in rats. *In Vivo* **18**, 119–23
18. Azhdari-Zarmehri H., *et al.* Orexin-A microinjection into the rostral ventromedial medulla causes antinociception on formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **122**, 286–90 (2014).

19. Mohammad-Pour Kargar H., *et al.* Microinjection of orexin-A into the rat locus coeruleus nucleus induces analgesia via cannabinoid type-1 receptors. *Brain Res.* **1624**, 424–432 (2015).
20. Zhu Y., *et al.* Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J. Pharmacol. Sci.* **92**, 259–66 (2003).
21. Dohi K., *et al.* CSF orexin A concentrations and expressions of the orexin-1 receptor in rat hippocampus after cardiac arrest. *Neuropeptides* **40**, 245–50 (2006).
22. Inutsuka A., *et al.* The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Sci. Rep.* **6**, 29480 (2016).
23. Chen T., *et al.* Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex. *Nat. Commun.* **9**, 1886 (2018).
24. Garbuzova-Davis S., *et al.* Blood-Spinal Cord Barrier Alterations in Subacute and Chronic Stages of a Rat Model of Focal Cerebral Ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **75**, 673–88 (2016).
25. Dang G., *et al.* Alterations in the spinal cord and ventral root after cerebral infarction in non-human primates. *Restor. Neurol. Neurosci.* **36**, 729–740 (2018).
26. Freire M. A. M., *et al.* Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front. Neurosci.* **3**, 175–81 (2009).
27. Koyanagi S., *et al.* Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. *Nat. Commun.* **7**, 13102 (2016).
28. Ji R.-R., *et al.* Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 533–48 (2014).
29. Shih H.-C., *et al.* Targeting brain-derived neurotrophic factor in the medial thalamus for the treatment of central poststroke pain in a rodent model. *Pain* **158**, 1302–1313 (2017).
30. Choi S.-R., *et al.* Spinal Nitric Oxide Synthase Type II Increases Neurosteroid-metabolizing Cytochrome P450c17 Expression in a Rodent Model of Neuropathic Pain. *Exp. Neurobiol.* **28**, 516–528 (2019).
31. Iadecola C., *et al.* Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **15**, 378–84 (1995).
32. Hervera A., *et al.* The spinal cord expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases and their contribution in the maintenance of neuropathic pain in mice. *PLoS One* **5**, e14321 (2010).
33. Yang Y., *et al.* Role of nitric oxide synthase in the development of bone cancer pain and effect of L-NMMA. *Mol. Med. Rep.* **13**, 1220–6 (2016).
34. Hu X., *et al.* Vascular Endothelial-Specific Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase-1–Deficient Mice Reveal That Vascular Endothelium Plays an Important Role in Removing Asymmetric Dimethylarginine. *Circulation* **120**, 2222–2229 (2009).
35. Leiper J. M., *et al.* Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with

- distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.* **343 Pt 1**, 209–14 (1999).
36. Tamiya S., *et al.* Establishment of a central post-stroke pain model using global cerebral ischaemic mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 615–20 (2013).
 37. Hylden J. L., *et al.* Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* **67**, 313–6 (1980).
 38. Nakamoto K., *et al.* The activation of supraspinal GPR40/FFA1 receptor signalling regulates the descending pain control system. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 1250–62 (2015).
 39. Nawa A., *et al.* Inducible nitric oxide synthase-mediated decrease of intestinal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic conditions. *Life Sci.* **86**, 402–9 (2010).
 40. Harada S., *et al.* Involvement of GPR40, a long-chain free fatty acid receptor, in the production of central post-stroke pain after global cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **744**, 115–123 (2014).
 41. Mihara Y., *et al.* Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Mol. Pain* **7**, 8 (2011).
 42. Zhang P., *et al.* Repetitive ischemia increases myocardial dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 expression. *Vasc. Med.* **22**, 179–188 (2017).
 43. Qi J., *et al.* Rab7b Overexpression-Ameliorated Ischemic Brain Damage Following tMCAO Involves Suppression of TLR4 and NF- κ B p65. *J. Mol. Neurosci.* **68**, 163–170 (2019).
 44. Dang G., *et al.* Dynamic secondary degeneration in the spinal cord and ventral root after a focal cerebral infarction among hypertensive rats. *Sci. Rep.* **6**, 22655 (2016).
 45. Ghebremariam Y. T., *et al.* A novel and potent inhibitor of dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a modulator of cardiovascular nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **348**, 69–76 (2014).
 46. Leiper J. M. The DDAH-ADMA-NOS pathway. *Ther. Drug Monit.* **27**, 744–6 (2005).
 47. Wang H., *et al.* DDAH1 plays dual roles in PM2.5 induced cell death in A549 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1860**, 2793–801 (2016).
 48. Wang S., *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 regulates nerve growth factor-promoted differentiation of PC12 cells in a nitric oxide-dependent but asymmetric dimethylarginine-independent manner. *J. Neurosci. Res.* **90**, 1209–17 (2012).
 49. Luo Y., *et al.* Asymmetric dimethylarginine exacerbates A β -induced toxicity and oxidative stress in human cell and *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* **79**, 117–26 (2015).
 50. Goodwin G. H., *et al.* A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* **38**, 14–9 (1973).
 51. Wang H., *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**, 248–51 (1999).

52. Zhang J., *et al.* Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* **42**, 1420–8 (2011).
53. Yamasoba D., *et al.* Peripheral HMGB1-induced hyperalgesia in mice: Redox state-dependent distinct roles of RAGE and TLR4. *J. Pharmacol. Sci.* **130**, 139–42 (2016).
54. Muhammad S., *et al.* The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J. Neurosci.* **28**, 12023–12031 (2008).
55. Qiu J., *et al.* High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke* **41**, 2077–82 (2010).
56. Ren P.-C., *et al.* High-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia and spinal astrocytic activation in a mouse model of type 2 diabetes. *Brain Res. Bull.* **88**, 332–7 (2012).
57. Tong W., *et al.* Spinal high-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia in a rat model of bone cancer pain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 572–6 (2010).
58. Zou J. Y., *et al.* Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One* **9**, e87915 (2014).
59. Harris H. E., *et al.* HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 195–202 (2012).
60. Levenson J. M., *et al.* Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* **279**, 40545–59 (2004).
61. Simon R. P., *et al.* Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850–2 (1984).
62. Danaher R. J., *et al.* Histone deacetylase inhibitors prevent persistent hypersensitivity in an orofacial neuropathic pain model. *Mol. Pain* **14**, 1744806918796763 (2018).
63. Zhang H., *et al.* Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *J. Pain* **17**, 775–86 (2016).
64. Allette Y. M., *et al.* Identification of a functional interaction of HMGB1 with Receptor for Advanced Glycation End-products in a model of neuropathic pain. *Brain. Behav. Immun.* **42**, 169–77 (2014).
65. Grace P. M., *et al.* Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 217–31 (2014).
66. Tsuda M., *et al.* JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* **134**, 1127–39 (2011).
67. Tsuda M., *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**, 778–83 (2003).
68. Liu X.-X., *et al.* Regnase-1 in microglia negatively regulates high mobility group box 1-mediated inflammation and neuronal injury. *Sci. Rep.* **6**, 24073 (2016).
69. Christianson C. A., *et al.* Spinal TLR4 mediates the transition to a persistent mechanical

- hypersensitivity after the resolution of inflammation in serum-transferred arthritis. *Pain* **152**, 2881–91 (2011).
70. Vetreno R. P., *et al.* Increased receptor for advanced glycation end product expression in the human alcoholic prefrontal cortex is linked to adolescent drinking. *Neurobiol. Dis.* **59**, 52–62 (2013).
 71. Pichiule P., *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *J. Biol. Chem.* **282**, 36330–40 (2007).
 72. D’Mello R., *et al.* Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* **101**, 8–16 (2008).
 73. Huang J., *et al.* A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* **22**, 1659–1668 (2019).
 74. Stamford J. A. Descending control of pain. *Br. J. Anaesth.* **75**, 217–27 (1995).
 75. Vanegas H., *et al.* Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **46**, 295–309 (2004).
 76. Cucchiaro G., *et al.* The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine. *Neuropharmacology* **50**, 769–776 (2006).
 77. Jones S. L., *et al.* Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res.* **460**, 281–296 (1988).
 78. Peyron C., *et al.* A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat. Med.* **6**, 991–7 (2000).
 79. Hagan J. J., *et al.* Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10911–6 (1999).
 80. Sakurai T., *et al.* Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell* **92**, 573–585 (1998).
 81. de Lecea L., *et al.* The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 322–7 (1998).
 82. Marcus J. N., *et al.* Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **435**, 6–25 (2001).
 83. Kitamura E., *et al.* The effect of orexin-A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia. *Neurosci. Res.* **68**, 154–157 (2010).
 84. HALEY T. J., *et al.* Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **12**, 12–5 (1957).
 85. Villano I., *et al.* Basal Forebrain Cholinergic System and Orexin Neurons: Effects on Attention. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, 10 (2017).

86. Ouyang Y.-B., *et al.* Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J. Neurosci.* **27**, 4253–60 (2007).
87. Harada S., *et al.* Involvement of GPR40, a long-chain free fatty acid receptor, in the production of central post-stroke pain after global cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **744**, 115–23 (2014).
88. Yamamoto T., *et al.* Anti-mechanical allodynic effect of intrathecal and intracerebroventricular injection of orexin-A in the rat neuropathic pain model. *Neurosci. Lett.* **347**, 183–186 (2003).
89. Yamamoto T., *et al.* Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 170–176 (2002).
90. Toyama S., *et al.* The analgesic effect of orexin-A in a murine model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Neuropeptides* **61**, 95–100 (2017).
91. Lee H.-J., *et al.* Stress induces analgesia via orexin 1 receptor-initiated endocannabinoid/CB1 signaling in the mouse periaqueductal gray. *Neuropharmacology* **105**, 577–586 (2016).
92. Burgess C. R., *et al.* Narcolepsy: neural mechanisms of sleepiness and cataplexy. *J. Neurosci.* **32**, 12305–11 (2012).
93. Azhdari-Zarmehri H., *et al.* Orexin-a modulates firing of rat rostral ventromedial medulla neurons: an in vitro study. *Cell J.* **17**, 163–70 (2015).
94. Ciriello J., *et al.* Effects of hypocretin and norepinephrine interaction in bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure. *Neuroscience* **255**, 278–91 (2013).
95. Mori T., *et al.* Narcolepsy-like sleep disturbance in orexin knockout mice are normalized by the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology (Berl)*. **233**, 2343–53 (2016).
96. Ochi T., *et al.* The antinociceptive effect of FR140423 in mice: involvement of spinal α 2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **400**, 199–203 (2000).
97. Stone L. S., *et al.* The α 2a adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by α 2 agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. *J. Neurosci.* **17**, 7157–65 (1997).
98. Newman-Tancredi A., *et al.* NLX-112, a highly selective 5-HT_{1A} receptor agonist, mediates analgesia and antidepressant-like activity in rats via spinal cord and prefrontal cortex 5-HT_{1A} receptors, respectively. *Brain Res.* **1688**, 1–7 (2018).
99. Song G. J., *et al.* A Bcr-Abl Inhibitor GNF-2 Attenuates Inflammatory Activation of Glia and Chronic Pain. *Front. Pharmacol.* **10**, 543 (2019).
100. Duffy C. M., *et al.* Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci. Lett.* **606**, 140–4 (2015).
101. Ramos A. J., *et al.* The 5HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. *Brain Res.* **1030**, 201–20 (2004).
102. Gao J., *et al.* Dexmedetomidine modulates neuroinflammation and improves outcome via α 2-

- adrenergic receptor signaling after rat spinal cord injury. *Br. J. Anaesth.* **123**, 827–838 (2019).
103. Sharifi H., *et al.* 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} agonist) Attenuates 6-Hydroxy- dopamine-induced catalepsy and Modulates Inflammatory Cytokines in Rats. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **16**, 1270–5 (2013).
104. Sakakiyama M., *et al.* Preventive and Alleviative Effect of Tramadol on Neuropathic Pain in Rats: Roles of α ₂-Adrenoceptors and Spinal Astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.* **124**, 244–257 (2014).

主論文

1. Matsuura W., Nakamoto K., Tokuyama S. The involvement of DDAH1 in the activation of spinal NOS signaling in early stage of mechanical allodynia induced by exposure to ischemic stress in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1569-1574 (2019)
2. Matsuura W., Harada S., Liu K., Nishibori M., Tokuyama S. Evidence of a role for spinal HMGB1 in ischemic stress-induced mechanical allodynia in mice. *Brain Res.*, **1687**, 1-10 (2018)
3. Matsuura W., Nakamoto K., Tokuyama S. Involvement of descending pain control system regulated by orexin receptor signaling in the induction of central post-stroke pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, in press

副論文

1. Matsuura W., Harada S., Tokuyama S. Effects of Adjuvant Analgesics on Cerebral Ischemia-Induced Mechanical Allodynia. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 856-862 (2016)
2. Matsuura W., Kageyama E., Harada S., Tokuyama S. Unique action mechanisms of tramadol in global cerebral ischemia-induced mechanical allodynia. *Neuroreport*, **27**, 699-704 (2016)