

学位論文

ウシ由来ラクトフェリンによる顎顔面領域
異所性疼痛の抑制機構

学位申請者 堀江 佳代

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医
科学専攻

(主指導教官：谷本 幸太郎 教授)

2016 年度

目次

緒言	4
試料と方法	8
1. 実験動物.....	8
2. 薬剤の髄膜下投与のための準備	8
3. オトガイ神経切断、異所性疼痛モデルラットの作成	8
4. von Frey filaments を用いた機械的疼痛逃避行動試験の実施	9
5. 薬剤の髄膜下投与.....	9
1) オトガイ神経切断後の BLF の投与.....	9
2) オトガイ神経切断後の Withaferin A (NFκB p65 inhibitor) の投与	9
3) オトガイ神経切断後の LPS-RS (TLR4 antagonist) の投与.....	9
4) オトガイ神経切断後の SB203580 (p38 MAPK inhibitor) の投与.....	10
5) オトガイ神経切断後の IL-18 Binding Protein (IL-18 BP) の投与.....	10
6. Western blot 解析	10
7. 免疫組織蛍光染色.....	12
8. 免疫沈降.....	13
結果	15
1. オトガイ神経切断後の三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 p-p38 MAPK、IL-18、及び LRP1 の経時的発現変化について.....	15
2. 三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 の局在	17
2-1 三叉神経脊髄路核における p-p38 MAPK の局在の確認について	19
3. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する BLF 髄腔内投与の影響	20
1) BLF 髄腔内投与による疼痛閾値の変化.....	20

2) BLF 投与後の p-p38、p-p65、p-IKKb、IL-18 の発現変化.....	21
3) BLF 髄腔内投与後の細胞内への取り込みと、TRAF6 との結合について	23
4. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する LPS-RS (TLR4 antagonist) の影響.....	24
1) LPS-RS 髄腔内投与による疼痛閾値の変化.....	24
2) LPS-RS 投与後の p-p38、p-p65、IL-18 の発現変化.....	25
5. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する Withaferin A (NFκB p65 inhibitor) の影響	27
1) Withaferin A 髄腔内投与による疼痛閾値の変化.....	27
2) Withaferin A 髄腔内投与による、p-p65、p-IKKb、IL-18、および p-p38 のタンパク発現変化.....	28
6. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する SB203580 (p38 MAPK inhibitor) の影響	30
1) SB203580 髄腔内投与による疼痛閾値の変化.....	30
2) SB203580 髄腔内投与による p-p38、IL-18、p-p65 の発現変化	31
7. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する IL-18 Binding Protein (IL-18 BP) の影響.....	33
1) IL-18 BP 髄腔内投与による疼痛閾値の変化.....	33
2) IL-18 BP 髄腔内投与による IL-18 の発現変化	34
考察	36
1. 実験モデルの設計と有用性について	36
2. オトガイ神経切断後、BLF 髄腔内投与の効果.....	37
2-1 ラクトフェリンの生理活性について	37
2-2 異所性疼痛に対する BLF の効果について.....	38

2-3 BLF 髄腔内投与後の分子メカニズムについて.....	38
2-4 BLF の細胞内への取り込みについて.....	39
3. オトガイ神経切断後 TLR4 antagonist (LPS-RS) 髄腔内投与の効果.....	40
3-1 TLR4 について	40
3-2 異所性疼痛に対する LPS-RS (TLR4 antagonist) の効果について.....	41
3-3 LPS-RS 髄腔内投与後の分子メカニズムについて.....	42
3-4 オトガイ神経切断後の pNFκB p65 のリン酸化について.....	42
4. 異所性疼痛モデルと、NFκB p65 の関連性について	43
4-1 NFκB p65 について	43
4-2 異所性疼痛に対する Withaferin A (NFκB inhibitor) の効果について ...	44
4-3 Withaferin A 髄腔内投与後の分子メカニズムについて.....	44
5. 異所性疼痛モデルと、p38 MAPK の関連性について	45
5-1 p38 MAPK について	45
5-2 異所性疼痛に対する SB203580 の効果について.....	46
5-3 SB203580 髄腔内投与後の分子メカニズムについて	46
6. 異所性疼痛モデルと IL-18 の関連性について.....	47
6-1 IL-18 について	47
6-2 IL-18BP 髄腔内投与後の IL-18 のタンパク発現について	48
総括.....	50
参考文献.....	52

緒言

強い刺激が身体に加えられた時に“痛み”が生じ、これが引っ込め反射などの生体防御反応を引き起こす。すなわち、“痛み”の刺激としての役割は原始的機能であり、これがないと生体の安全が脅かされる。一方、慢性疼痛は急性疾患の通常の経過あるいは創傷の治癒に要する妥当な時間を超えて持続する痛みである。すなわち、慢性疼痛とは生体防御の意味を失い、“痛み”自体が疾患 (Sweet, 1984; 津田と井上, 2007) となる。慢性疼痛のひとつに、末梢神経あるいは中枢神経傷害により引き起こされる神経因性疼痛がある。口腔顎顔面領域においては、持続性の灼熱痛を伴う抜歯後カウザルギー、顎関節に発現する筋筋膜痛症、顎矯正手術やインプラント埋入後に発現する慢性疼痛などが神経因性疼痛に該当する (Koyess and Fares 2006)。

一方、末梢神経傷害後の神経因性疼痛の発現部位は、その傷害を受けた末梢神経の支配領域と一致しないことがしばしば認められる (Tal and Bennett, 1994)。このように、疼痛の感受部位と疼痛の発生源とが異なる状態は異所性疼痛と呼ばれている (Koyess and Fares 2006)。このような病態は三叉神経支配領域でも生じることが知られており、例えば下顎の歯に歯髄炎などの病巣があるにも拘わらず、上顎の痛みとして認知することがある。異所性疼痛は、的確な鑑別診断の大きな障壁となりうる。すなわち、異所性疼痛が認められる部位への治療を行っても効果がなく、原因となる病巣を根治しないと治療効果が現れない。また、異所性疼痛の発現メカニズムについては不明な点が多くあり、一般的な非ステロイド性抗炎症薬や鎮痛薬の効果が少ないことも、治療をより困難にしている。末梢神経傷害を伴う異所性疼痛は患者の QOL を低下させ、その原因となる疾患の治療を妨げるため、適切なペインコントロールが必要とされる。した

がって、三叉神経系における異所性疼痛の治療を確立することは喫緊の課題である。

三叉神経は眼神経、上顎神経、下顎神経の3本の枝を持ち、その支配領域が明確であることから、異所性疼痛モデルの開発には適している。そこで、臨床症状に近似した三叉神経支配領域における異所性疼痛を再現した動物実験モデルの開発がなされた。下歯槽神経 (IAN: inferior alveolar nerve)、あるいはオトガイ神経 (MN: mental nerve) を切断後、上顎神経支配領域であるラットの髭部皮膚 (whisker pad) (平沢と岡本, 1992) において疼痛閾値の低下が認められた (Iwata et al., 2001; Piao et al., 2006; Takahashi et al., 2011)。この実験モデルでは、オトガイ神経は完全に切断されているため、オトガイ神経の支配領域である下口唇皮膚においては疼痛閾値の低下は認められなかった (Takahashi et al., 2011)。すなわち、オトガイ神経切断 (MNT: MN transaction) は異所性疼痛のみを発症することになる (Takahashi et al., 2011)。一方、口腔顎顔面領域における痛覚を含む感覚刺激は、一次求心性ニューロンの興奮を介して三叉神経脊髄路核の二次ニューロンへ、次いで上位の視床や大脳皮質へ伝達され、特定の感覚として認知される。このうち、一次ニューロンと二次ニューロンがシナプスを形成する三叉神経脊髄路核については、これまでの研究結果から慢性疼痛の発症機序を解明する上でとりわけ重要であると考えられている。

神経膠細胞は星状膠細胞、希突起膠細胞、小膠細胞の3種に大別される。従来、これらの神経膠細胞は、ニューロンの周辺組織の恒常性を維持するなど、ニューロンに対し補助的な役割を演じると考えられてきた。しかし、ニューロンとともに中枢神経系を構成する細胞群である神経膠細胞が、神経因性疼痛の発生に関与していることが明らかにされた。すなわち末梢神経傷害後、星状膠細胞および小膠細胞の形態が静止型から活性型へ変化し、その数も増加するこ

と (Garrison, Dougherty and Carlton 1994, Jin et al., 2003; Piao et al., 2006; Takahashi et al., 2011)、星状膠細胞または小膠細胞の活性化阻害薬を髄腔内投与すると神経因性疼痛が抑制されること (Meller et al., 1994; Milligan et al., 2000; Milligan et al., 2003; Piao et al., 2006; Qin et al., 2006; Ying et al., 2006) が確認された。また、小膠細胞には adenosin triphosphate (ATP) 受容体や Toll-like receptor (TLR) など様々な受容体を発現していることが知られている。末梢神経傷害後、リガンドがこれらの受容体に結合することにより、小膠細胞内情報伝達分子のリン酸化や炎症性サイトカインの放出が引き起こされると報告されているが、不明な点は多い。

ラクトフェリンは、母乳・涙・汗・唾液などの外分泌液中に含まれる、分子量約 80 kDa の鉄結合性糖タンパク質である。ラクトフェリンは、牛乳中に含まれることが初めて報告された (Sorensen M et al., 1939)。その後、ヒトとウシの乳より精製され、アミノ酸配列が決定された (Sanchez, Calvo and Brock 1992)。ラクトフェリンは、抗菌活性、抗ウイルス作用、骨誘導活性、抗癌作用、脂質代謝改善効果、抗炎症作用などの多様な生物学的作用を持つことが知られている (Farnaud and Evans 2003; Azzam et al., 2007; Bharadwaj et al., 2009; Tsuda et al., 2002; Chandra Mohan et al., 2006; Kawazoe et al., 2013; Haversen et al., 2002; Machnicki et al., Zimecki and Zagulski 1993)。このうち抗炎症作用については、In vitro の実験系で、ウシ由来ラクトフェリン (Bovine Lactoferrin: BLF) は lipopolysaccharide (LPS) によって誘導される TNF- α 、IL-6、IL-1 β の産生を抑制されることが知られている (Haversen et al., 2002; Machnicki et al., 1993)。実際、強い炎症反応を伴う辺縁性歯周炎や関節リュウマチに対するラクトフェリンの応用を目指した研究も報告されている (Hayashida et al., 2004; Shimizu et al., 2011; Inubushi et al., 2012)。ラクトフェリンは食品由来のタンパク質であるため安全性が高いと考えられ、現在多くの研究者によりその基礎研究と臨床応用が行われている。前述したように、三叉神経傷害後に、三叉神経脊髄路核において TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの過剰な産生状態、いわゆるサイトカインス

トームを引き起こし、これが異所性疼痛を引き起こすと考えられている。関与している炎症性サイトカインとして、ごく最近の報告で IL-18、IL-6 の報告もあり (Inoue et al., 2006; Sun et al., 2012)、さまざまなサイトカインが関与していると考えられている。本研究では小膠細胞からの IL-18 の分泌増加が末梢神経損傷後、脊髄後角に認められることから、顎顔面領域での異所性疼痛での検討を試みた。さらにここにおいて、ラクトフェリンは末梢神経傷害後の病態痛に対する鎮痛効果が期待されるが、いままで検討がなく、詳細は全く不明である。そこで本研究では、ラットオトガイ神経切断モデルを用いて、BLF の異所性疼痛への鎮痛効果を検証するとともに、その作用機序を明らかにすることとした。また、ラクトフェリンを細胞内へ担体輸送する受容体として、LDL 受容体の 1 つである Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) が報告されているが、中枢での発現については報告が無いため、本実験では確認を行った。

本研究で検討した項目は、以下のとおりである。

1. オトガイ神経切断後の三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65、p-p38 MAPK、IL-18、及び LRP1 の経時的発現変化について
2. 三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 の局在
3. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する BLF 髄腔内投与の影響
4. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する LPS-RS (TLR4 antagonist) の影響
5. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する Withaferin A (NFκB p65 inhibitor) の影響
6. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する SB203580 (P38 MAPK inhibitor) の影響
7. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する IL-18 binding protein (IL-18 BP) の影響

試料と方法

1. 実験動物

実験動物として 8 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット（日本チャールズ・リバー、横浜）を用いた。動物の取り扱いは、広島大学自然科学研究支援開発センター動物実験施設倫理委員会の承認を受け（実験許可番号：f0009-0003-5）、国際疼痛学会の実験指針を順守して行った（Zimmermann, 1983）。

2. 薬剤の髄膜下投与のための準備

薬剤投与の準備を行った。ペントバルビタール（共立製薬、東京）腔内投与（0.5 ml/kg）による深麻酔下で、ポリエチレンチューブ（PE10; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA）を第一、第二頸椎間から埋入し、チューブ先端を三叉神経脊髄路核相当部である第三頸椎付近の髄膜下に留置し、5-0 号絹製縫合糸（アルフレッサファーマ、大阪）を用いて固定し、他端を皮膚外に位置させカニューレとしたのち、皮膚縫合した。外科的侵襲による疼痛発生の影響を排除するため、1 週間の休息期を設けた後、オトガイ神経切断処置を施し、タイムスケジュールに従って機械的逃避行動試験を行った。

3. オトガイ神経切断、異所性疼痛モデルラットの作成

ペントバルビタール（共立製薬）腹腔内投与（0.5 ml/kg）による深麻酔下で左側オトガイ神経を剖出し、5-0 号絹製縫合糸（アルフレッサファーマ、大阪）を用いて結紮後、結紮部遠位を 1 mm 切断した。その後、1 週間後に機械的逃避行動試験を実施し、異所性疼痛の発症を確認した。

4. von Frey filaments を用いた機械的疼痛逃避行動試験の実施

von Frey フィラメント (North Coast Medical, Inc., Morgan Hill, CA, USA) を用いた。術者は軍手を装着し、ラットの前足と頭部を手のひらにつつまこむように屈ませる姿勢を取らせるよう訓練し、上口唇のヒゲ部皮膚 (whisker pad) にフィラメントを垂直に押し当て、頭部を急速に動かした場合を反応ありと判断した。フィラメントは垂直に押し当てることで屈曲圧が 0.02-100g の圧力がかかるようになっている。5回フィラメントを押し当て、反応回数を記録した後、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて回帰曲線を作成し、effective force 50 (EF50) を算出した。EF50 値は 50% の頻度で von Frey filaments に反応する値として用いられる。

5. 薬剤の髄膜下投与

1) オトガイ神経切断後の BLF の投与

オトガイ神経切断処置を行い、慢性疼痛を発症させて1週間後、実験群 (n=4) に対し、BLF (SUNSTAR、大阪) を生理食塩水溶媒で 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整したものを、対照群 (n=4) には、生理食塩水、albumin を生理食塩水溶媒にて 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整したものを、10 μl のハミルトンシリンジを用いて、20 μl ずつ投与した。albumin は BLF と同等の分子量のためコントロールとして用いた。

2) オトガイ神経切断後の Witherferin A (NF κ B p65 inhibitor) の投与

オトガイ神経切断処置を行い、慢性疼痛を発症させて1週間後、実験群 (n=4) に対し NF κ B 拮抗薬である Witherferin A を生理食塩水溶媒で 6.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.63 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整したものを、対照群 (n=4) には、生理食塩水を、10 μl のハミルトンシリンジを用いて、10 μl ずつ投与した。

3) オトガイ神経切断後の LPS-RS (TLR4 antagonist) の投与

オトガイ神経切断処置を行い、慢性疼痛を発症させて1週間後、実験群 (n=4)

に対し TLR4 antagonist である LPS-RS (Hycult biotech, Urden, Neitherlands) を生理食塩水溶媒で 0.01 µg/µl、0.001 µg/µl に調整したものを、対照群 (n=4) には、生理食塩水、を、10 µl のハミルトンシリンジを用いて、20 µl ずつ投与した。

4) オトガイ神経切断後の SB203580 (p38 MAPK inhibitor) の投与

オトガイ神経切断処置を行い、慢性疼痛を発症させて1週間後、実験群 (n=4) に対し MAPK p38 inhibitor である SB203580 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を生理食塩水溶媒で 0.5 µg/µl、0.05 µg/µl に調整したものを、対照群 (n=4) には、生理食塩水を、10 µl のハミルトンシリンジを用いて、20 µl ずつ投与した。

5) オトガイ神経切断後の IL-18 Binding Protein (IL-18 BP) の投与

オトガイ神経切断処置を行い、慢性疼痛を発症させて1週間後、実験群 (n=4) に対し IL-18 BP (R&D, Urden, Neitherlands) を PBS 溶媒で 0.1 µg/µl、0.01 µg/µl に調整したものを、対照群 (n=4) には、生理食塩水を、10 µl のハミルトンシリンジを用いて、20 µl ずつ投与した。

6. Western blot 解析

エーテル (和光純薬工業、大阪) 深麻酔下でラットの脊髄および腹大動脈を切断し放血致死させた後、断頭し脳幹を含む脳をすばやく摘出し、ドライアイスで凍結させた。そのあと脳幹から ovex を中心に前頭断厚さ 2 mm 程度のスライス片を 3 枚作成し、断面上の三叉神経中位核尾側核移行部および尾側核部分をパンチドアウトしサンプルを規格化した (Paxinos and Watson, 2006)。このサンプルに radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (ナカライテスク、京都) と phosphatase inhibitor cocktail (ナカライテスク) を混和した液を 200 µl 添加し、凍らせたガラスビーズを用いてホモゲナイズした後、上精を

1°C, 15,000 rpm にて遠心し分離し、Bradford protein assay (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) と VARIO SCAN FLASH (Theamo scientific, Waltham, MA, USA) によってタンパク濃度を定量した。次いで、25 µg のタンパクを 5×Blue Loading Buffer (Cell Signaling Technology、東京) に混和し、100°C5 分間で Heat block した後、15%アクリルアミドゲル上で、SDS-PAGE 電気泳動して分離した。それをニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad laboratories) 上に転写した。ブロッキングはブロッキングエース (ATTO, 東京) を用い、1 時間振盪した。

一次抗体にはウサギ抗 LRP1 抗体 (1:100000; Hycultbiotech)、ウサギ抗リン酸化 MAPK p38 (p-p38 MAPK) 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 MAPK p38 (p38 MAPK) 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、ウサギ抗リン酸化 NFκB p65 (p-NFκB p65) 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 NFκB p65 (NFκB p65) 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、ウサギ抗リン酸化 IKKb 抗体 (1:500; Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 IKKb 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、ヤギ抗 IL-18 抗体 (1:500; R&D systems)、マウス抗 β-actin 抗体 (1:2000; Cell Signaling Technology) を使用し、4°C over night で反応させた。二次抗体には HRP 標識抗ウサギ抗体 (1:1000; GE Healthcare, Fairfield, CT, USA)、HRP 標識抗マウス抗体 (1:1000; GE Healthcare)、HRP 標識抗ヤギ抗体 (1:1000; R&D systems) を用いた。リン酸化タンパクの発現を確認した後、EzReprobe (ATTO) によって同一のメンブレン上の抗体をはがし、総タンパクを検出した。

検出には Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用い、Chemi DocTM XRS⁺ (Bio-Rad laboratories) で撮影した。

撮影した画像は、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を

用いて数値化し、NFκB p65、IKKb、と MAPK p38 リン酸化タンパクと総タンパクの比を、IL-18 は β-actin との比を計算し、算出した数値は全て、Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いて分散分析 (ANOVA) を行った後、Dunn-Bonferroni test によって、有意水準 1%もしくは 5%条件下で、各群の有意差検定を行った。

7. 免疫組織蛍光染色

ペントバルビタール (共立製薬、東京) 腹腔内投与 (0.5 ml/kg) による深麻酔で、4%パラホルムルデヒド (メルク、東京)、0.1M リン酸緩衝液 (PBS; pH7.4 シグマアルドリッチ、東京) を含む固定液を用いてラットの還流固定を行った。灌流固定後脳幹を摘出し、同固定液に 3 時間浸漬した。次に、4 °C で 30%スクロースを含む 0.01M PBS (三菱化学ヤトロン、東京) に 3 日間浸漬した。その後、凍結マイクロトーム (Leica, Wetzlar, Land Hessen, Germany) を用いて、厚さ 30 μm の連続凍結切片を作製した。

内因性ペルオキシダーゼを不活化させるため、1 %過酸化水素水を含む PBS (シグマアルドリッチ、東京) で 30 分間処理し、0.1 %トリトン X-100 (シグマアルドリッチ) を含む PBS (PBST) による洗浄後、非特異的反応を抑制するために、室温で 3 % Normal goat serum を含む PBST でブロッキングし、一次抗体に切片を一晩浸漬させた。一次抗体としてヤギ抗 Iba1 抗体 (1:400; abcam, Cambridge, MA, USA)、ウサギ抗 p-NFκB p65 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology) 抗体、ヤギ抗 IL-18 抗体 (1:500; R&D systems)、マウス抗 GFAP 抗体 (1:10,000; Millipore, Bedford, CA, USA)、マウス抗 NeuN 抗体 (1:3,000; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を用いた。一次抗体浸漬後、PBST で洗浄し、蛍光標識二次抗体を 120 分間反応させた染色後、Vectorsield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Lsm5 Pascal; Carl Zeiss,

Oberkochen, Germany) を用いて Alexa Fluor 488 (適正励起波長 496 nm) および Alexa Fluor 568 (適正励起波長 578 nm) に対し、レーザーを照射し切片の観察および写真撮影を行った。

また、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体、Alexa Fluor 568 標識抗ヤギ抗体 (1:400; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) を用いた。

8. 免疫沈降

BLF 200 µg/rat 髄腔内投与 24 時間後の脳幹部サンプルを摘出し、コントロールとして無処置脳幹部サンプルを用いた。サンプルはタンパク当量 1000 µg 用意し、IP ライセートを液量 600 µl に調整した。Input 用のサンプルを 25 µg 当量分を BLF 髄腔内投与+IgG 群、無処置群、BLF 髄腔内投与+TRAF6 群に 3 つのチューブに分注ストックし-80 °Cで保存した。

IP ライセートしたサンプルを 10 秒×4 回、超音波処理しタンパクを切断処理した後、BLF 髄腔内投与+IgG 群は HRP 標識抗ウサギ抗体 (1:25; Amersham Biosciences) を、BLF 髄腔内投与+TRAF6 群は、ウサギ抗 TRAF6 抗体 (1:20; Hycultbiotech) を添加し、4°C over night で回転させた。その後、IP ライセートで洗浄したアガロース IgG 担体 25 µg (Roche, Switzerland) を添加し 1 時間回転し反応させた後、Low Salt Buffer、High Salt Buffer、HEPE、TE の順に洗浄し、IP elution Buffer 40 µl を添加し、室温にて 15 分間シーソー振とう器上で振盪し、担体を切断した後に、温度 4°C、回転速度 1000 rpm で、15 分間遠心回転した後、上清を回収し IP サンプルとした。

回収した IP サンプルと Input サンプルを 5×Blue Loading Buffer (Cell, Signaling Technology) に混和し、100°Cで 5 分間 Heat block した後、15%アクリルアミドゲル上で、SDS-PAGE 電気泳動して分離した。それをニトロセルロースメンブレ

ン (Bio-Rad laboratories) 上に転写した。ブロッキングはブロッキングエース (ATTO) を用い、1 時間振盪した。

マウス抗 BLF 抗体 (1:500; Hycultbiotech)、ウサギ抗 TRAF6 抗体 (1:500; Hycultbiotech)、マウス抗 β -actin 抗体 (1:2000; Cell Signaling Technology) を使用し、4°C over night で反応させた。二次抗体には HRP 標識抗ウサギ抗体 (1:1000; Amersham Biosciences)、HRP 標識抗マウス抗体 (1:1000; Amersham Biosciences) を用いた。

結果

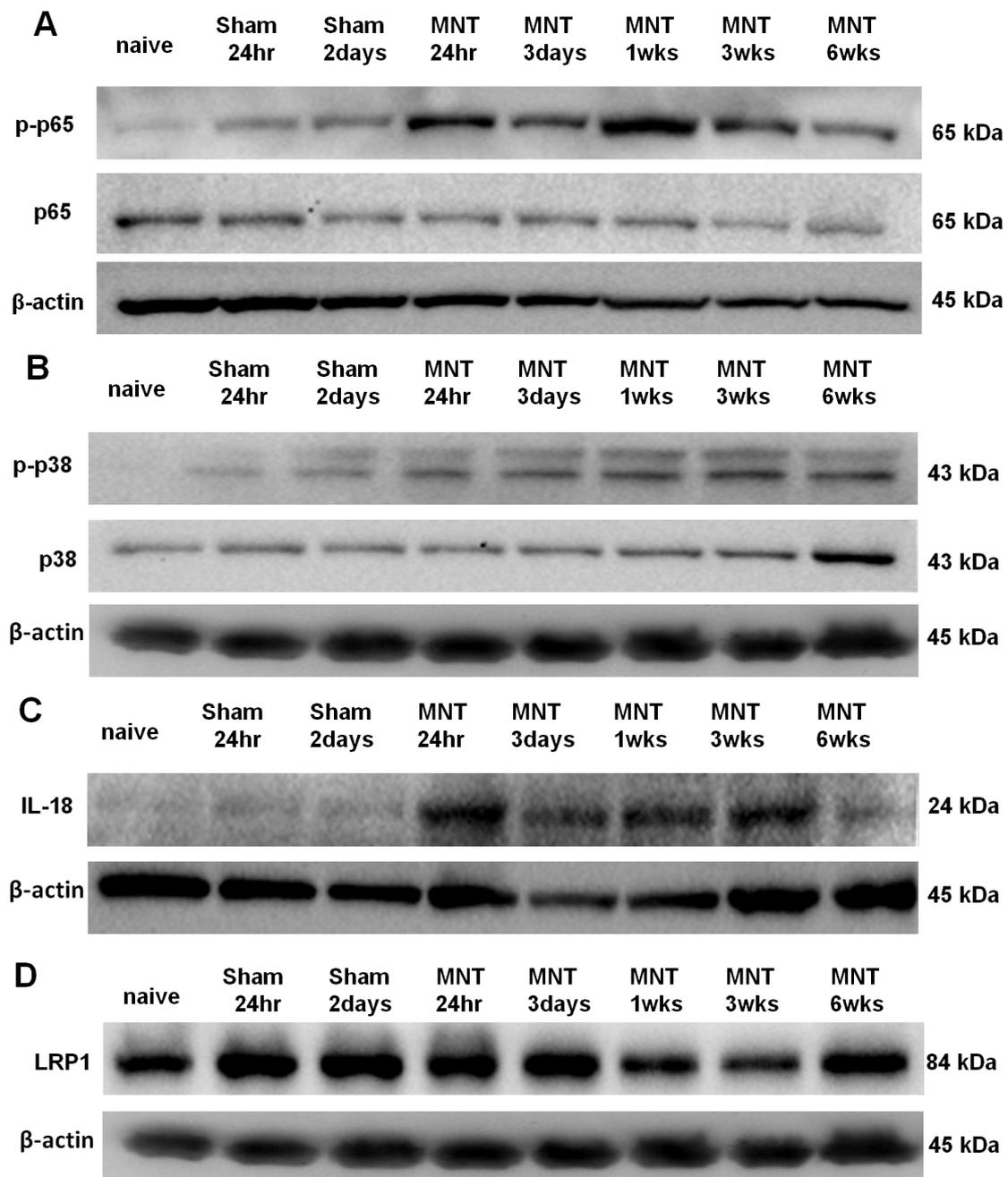
1. オトガイ神経切断後の三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 p-p38 MAPK、IL-18、及び LRP1 の経時的発現変化について

ラットオトガイ神経切断後、24 時間から 6 週間までの長期に渡り異所性疼痛が発生することが報告されている (Takahashi et al., 2011; Murasaki et al., 2013)。そこで、ラットオトガイ神経切断 24 時間から 6 週間後の、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (subnucleus caudalis:Vc) における NFκB p65 及び p38 MAPK のリン酸化、IL-18、LRP1 の経時的発現変化について Western blot 解析を用いて検討を行った。

- 1) 無処置動物と偽手術 (sham ope) 動物の、NFκB p65 及び p- NFκB p65 発現量はほぼ同じであった。オトガイ神経切断 24 時間から 6 週間後の NFκB p65 の発現は、無処置動物及び sham ope 動物と同レベルであった。しかし、オトガイ神経切断 24 時間から 6 週間後、p-NFκB p65 の発現増加、すなわち NFκB p65 のリン酸化が認められた (図 1-A)。
- 2) 無処置動物と sham ope 動物の、p38 MAPK 及び p-p38 MAPK 発現量はほぼ同じであった。オトガイ神経切断 24 時間から 6 週間後の p38 MAPK の発現は、無処置動物及び sham ope 動物と同程度であった。しかし、オトガイ神経切断 24 時間から 6 週間後、p-p38 MAPK の発現増加、すなわち p38 MAPK のリン酸化が認められた (図 1-B)。
- 3) 無処置動物と sham ope 動物の、IL-18 の発現量は同程度であった。オトガイ神経切断 24 時間から 6 週間後の IL-18 の発現は、無処置動物及び sham ope 動物と比較すると発現増加が認められた (図 1-C)。

- 4) いずれの実験動物においても、同程度の LRP1 の発現が認められた (図 1-D)。

図 1 オトガイ神経切断後の Vc における LRP1、p-p65、p-p38、IL-18 のタンパク発現変化



2. 三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 の局在

末梢神経傷害後、脊髄後角または三叉神経脊髄路核の小膠細胞に p-p38 が発現すると報告されている (Murasaki, Watanabe et al., 2013)。一方、末梢神経傷害後の p-NFκB p65 の局在は明らかにされていない。そこでオトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 の局在を検討するために、オトガイ神経切断3日後の三叉神経脊髄路核における p-NFκB p65 の発現を、小膠細胞、星状膠細胞、ニューロンとの二重蛍光標識抗体法で検討した。

オトガイ神経切断側の三叉神経脊髄路核において、赤で染色された NFκB p65 のリン酸化が無処置側と比較して発現増加しており、さらに緑で染色された星状膠細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性細胞と重なった (図 2-A a-f)。すなわち、オトガイ神経切断側の三叉神経脊髄路核において、星状膠細胞に発現する NFκB p65 のリン酸化が確認された。一方 p-NFκB p65 は、小膠細胞のマーカーである Iba1 陽性細胞と共局在を示さず、さらに神経細胞のマーカーである neuronal nuclear antigen (NeuN) との共局在も示さなかった (図 2-A g-l)。

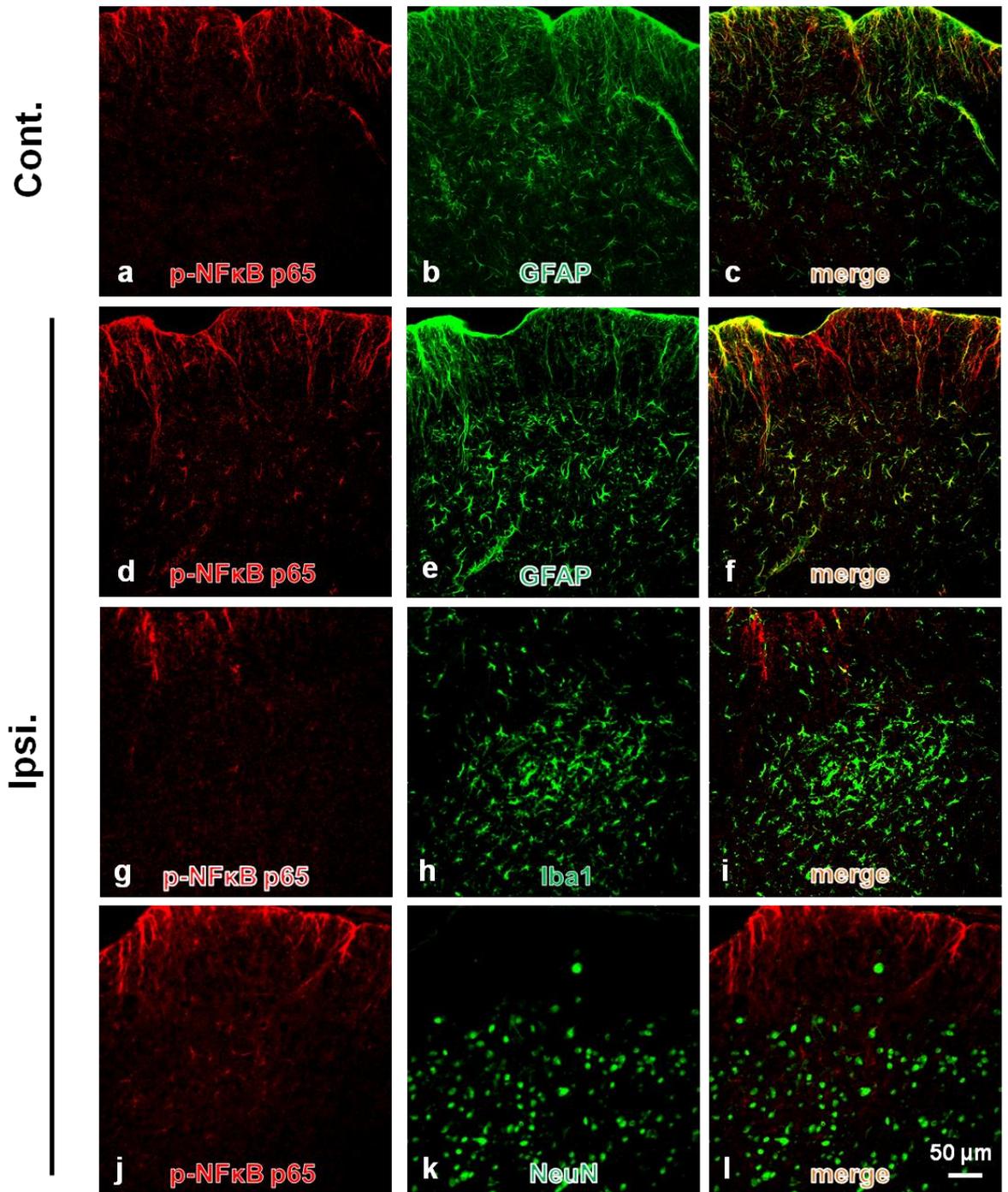


図 2-A オトガイ神経切断 3 日後の Vc における p-p65、小膠細胞、星状膠細胞および神経細胞の発現

2-1 三叉神経脊髄路核における p-p38 MAPK の局在の確認について

次に、オトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核における p-p38 MAPK が小膠細胞上に発現するかどうかについて、確認実験を行った。赤で染色された小膠細胞のマーカである Iba1 陽性細胞と、緑で染色された p-p38 MAPK 発現箇所が一致した (図 2-B a-c)。

以上より、小膠細胞と p-p38 MAPK の共局在が示された。

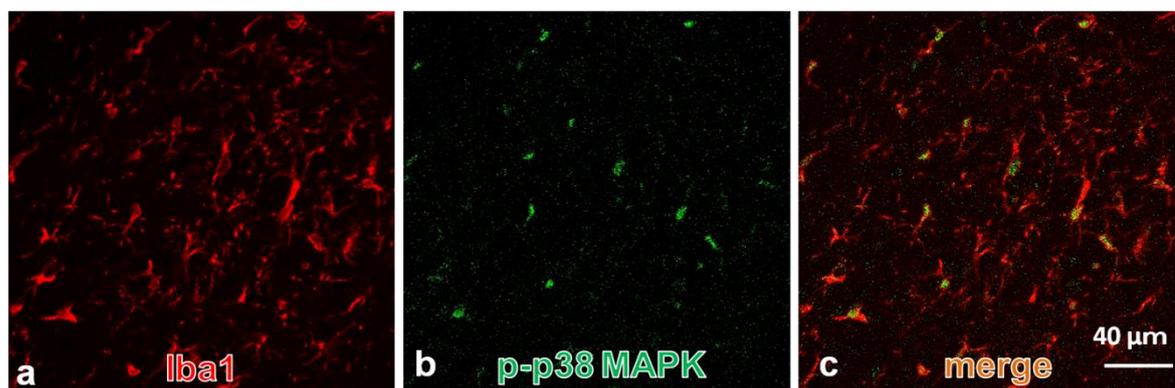


図 2-B オトガイ神経切断 3 日後の Vc における p-p38、小膠細胞の発現

3. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する BLF 髄腔内投与の影響

1) BLF 髄腔内投与による疼痛閾値の変化

BLF がオトガイ神経切断後の異所性疼痛に与える影響について調べた。全ての実験群においてチューブ手術一週間後の EF50 値はチューブ手術前と比較して有意な差は認められず、チューブ手術による上顎神経支配領域の疼痛閾値に対する影響はなかった。全ての実験群でオトガイ神経切断 1 週間後に EF50 値の有意な低下が認められ、異所性疼痛の発現が確認された。BLF (200 $\mu\text{g}/\text{rat}$) を投与すると、EF50 値は 24 時間から 2 日後まで上昇した。一方、saline、albumin (200 $\mu\text{g}/\text{rat}$)、BLF (20 $\mu\text{g}/\text{rat}$) を投与した場合、有意な EF50 値の上昇は認められなかった (図 3)。以上の結果より、BLF による濃度依存的な異所性疼痛の抑制が確認された。

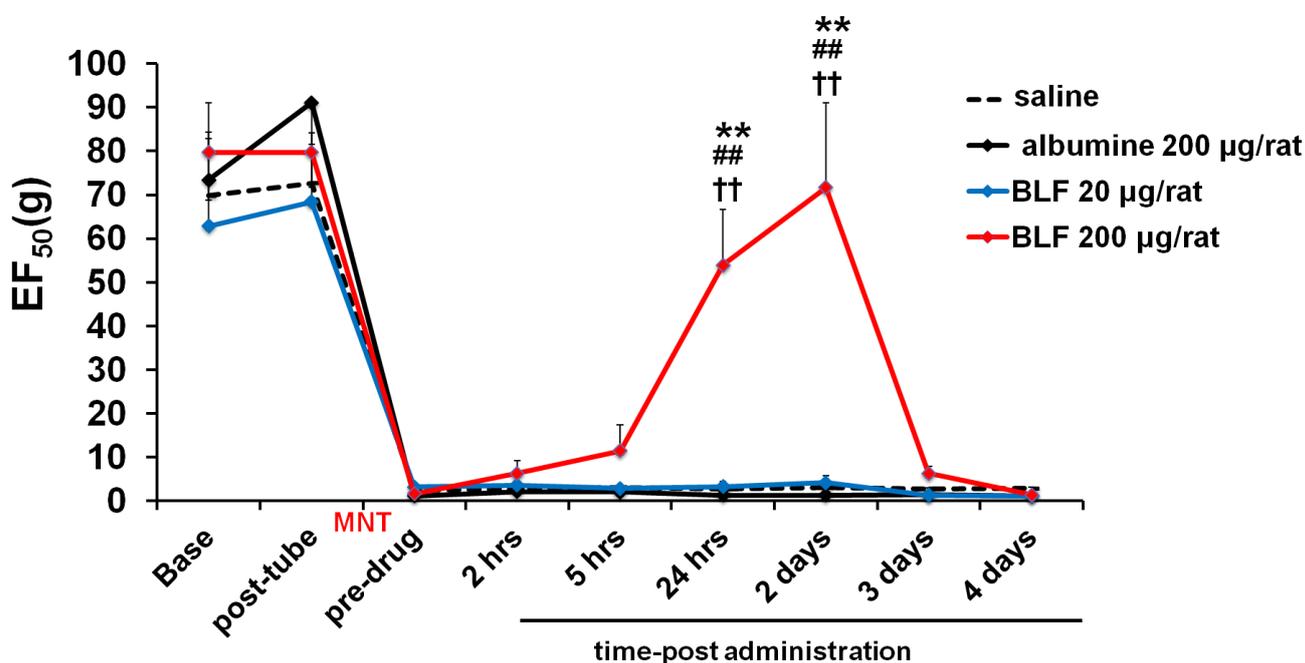


図 3 オトガイ神経切断後、BLF 髄腔内投与による疼痛閾値の変化

**** p<0.01, vs pre-drug, ## p<0.01, vs saline, ††p<0.01, vs albumin, n=5**

2) BLF 投与後の p-p38、p-p65、p-IKKb、IL-18 の発現変化

次に BLF の鎮痛効果メカニズムを分子レベルで解明するために、BLF 投与が NFκB p65 及び p38 MAPK のリン酸化、及び IL-18 の発現に与える影響について、Western blot 解析を用いて検討を行った。p-p38、p-p65、p-IKKb の発現は、saline、albumin (200 μg/rat) 投与群のいずれにおいても無処置群と比較して有意に増加した。BLF 高濃度投与群 (200 μg/rat) では、その増加が有意に抑制されたものの、低濃度投与群 (20 μg/rat) では抑制されなかった (図 4 A-C)。末梢神経傷害後に脊髄後角において炎症性サイトカイン IL-18 が増加すると報告されている。また IL-18 の産生は、p38 によって制御されている。そこで、BLF が IL-18 の発現に与える影響についても調べた。IL-18 の発現は、saline、albumin (200 μg/rat) 投与群のいずれにおいても無処置群と比較して有意に増加した。BLF 高濃度投与群 (200 μg/rat) では、その増加が有意に抑制されたが低濃度投与群 (20 μg/rat) では抑制されなかった (図 4 D)。

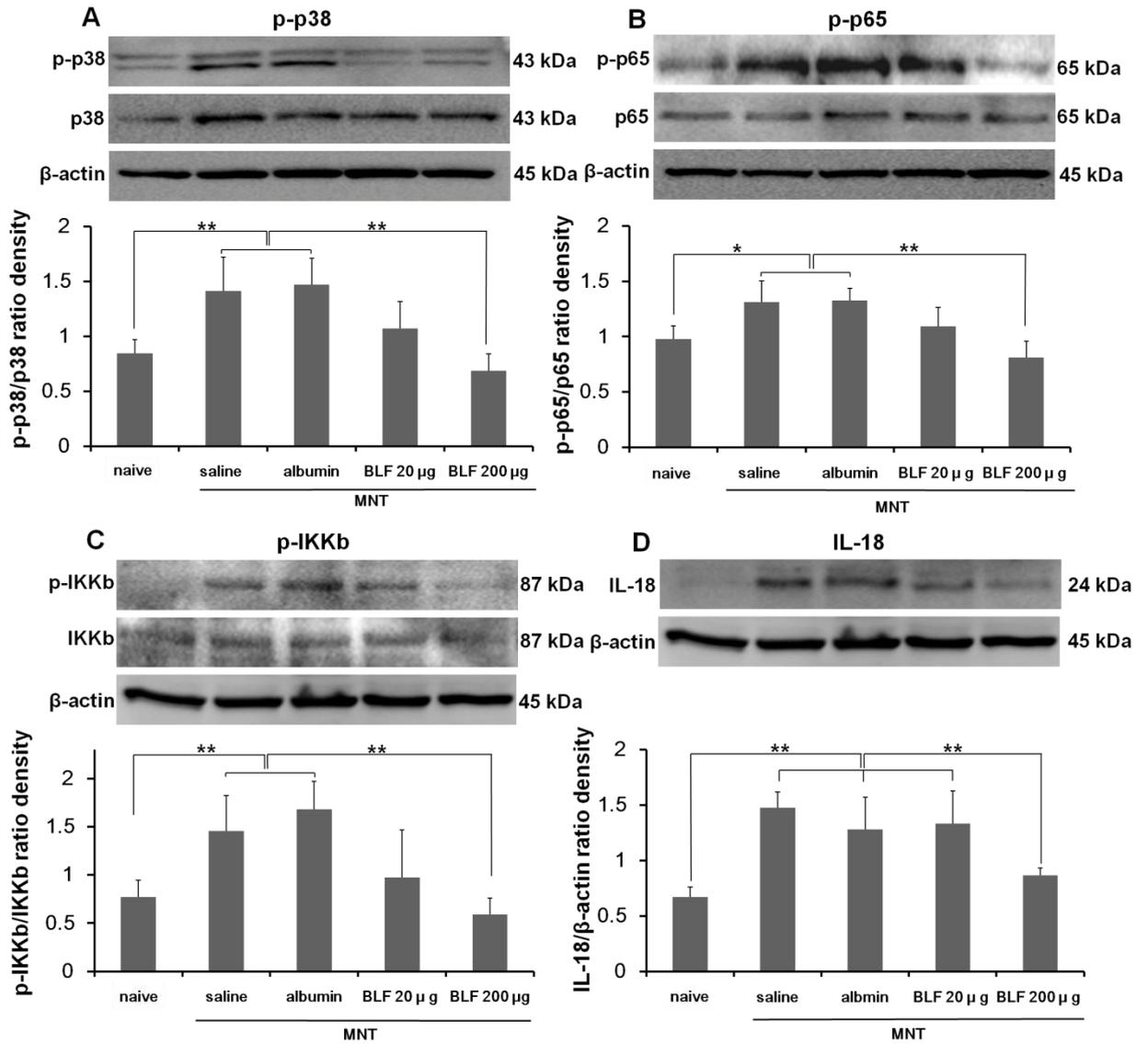


図 4 BLF 投与によるオトガイ神経切断後のタンパク発現変化

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 5$

3) BLF 髄腔内投与後の細胞内への取り込みと、TRAF6 との結合について

骨髄由来幹細胞を用いた培養実験系では、BLF は細胞内に LRP1 を介し細胞内に取り込まれ 細胞膜近傍に存在する TRAF6 と結合する。TRAF6 は、TNF receptor associated factor (TRAF) protein family として、TNF 受容体スーパーファミリーのシグナル伝達を仲介するタンパクとして同定された。TRAF6 は、膜受容体の細胞質内に発現している CD40 を介し活性化される。CD40 が活性化されると、直接結合していた TRAF6 がリクルートされ、その後のシグナル伝達を仲介しているといわれている。BLF が結合した TRAF6 は、下流の NF κ B p55、P38 MAPK の活性を抑制されることが報告されている。髄腔内投与した BLF の細胞内への取り込みと TRAF6 への結合を確認するために、抗 TRAF6 抗体を用いた免疫沈降を行った。抗 TRAF6 抗体によって免疫沈降した BLF 髄腔内投与群のみにバンドが検出された (図 5)。したがって、BLF は髄腔内投与した後、細胞内に担体輸送され細胞膜近傍に存在する TRAF6 と結合することが示された。

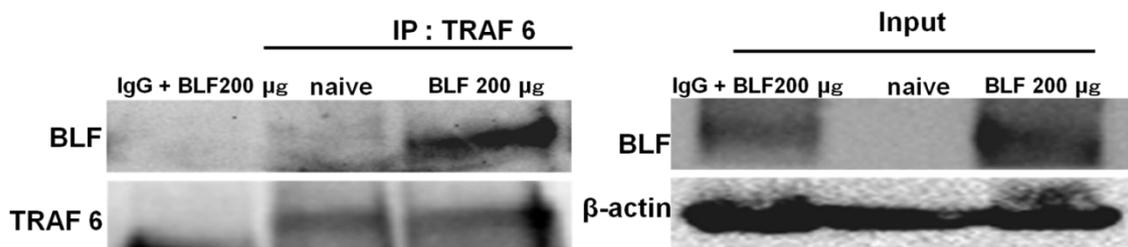


図 5 BLF 髄腔内投与後の抗 TRAF6 抗体による免疫沈降を抗 BLF 抗体で検出

4. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する LPS-RS (TLR4 antagonist) の影響

1) LPS-RS 髄腔内投与による疼痛閾値の変化

TRAF6 は細胞膜近傍に存在し、その上流となる受容体として Toll Like Receptor が知られている (Takeda et al., 2004)。特に TLR4 は小膠細胞に発現し、末梢神経傷害後の神経因性疼痛の発現に関与していると報告されている (Yao et al., 2013)。そこで、TLR4 の antagonist である LPS-RS を髄腔内投与が、オトガイ神経切断後の異所性疼痛に与える影響について調べた。全ての実験群においてチューブ手術一週間後の EF50 値はチューブ手術前と有意な差は認められず、チューブ手術による上顎神経支配領域の疼痛閾値に対する影響はなかった。全ての実験群でオトガイ神経切断 1 週間後に EF50 値の有意な低下が認められ、異所性疼痛の発現が確認された。LPS-RS (0.2 $\mu\text{g}/\text{rat}$) を投与すると、EF50 値は 2 時間から 2 日後まで上昇した。一方、saline、LPS-RS (0.02 $\mu\text{g}/\text{rat}$) を投与した場合、有意な EF50 値の上昇は認められなかった (図 6)。以上の結果より、LPS-RS による濃度依存的な異所性疼痛の抑制が確認された。

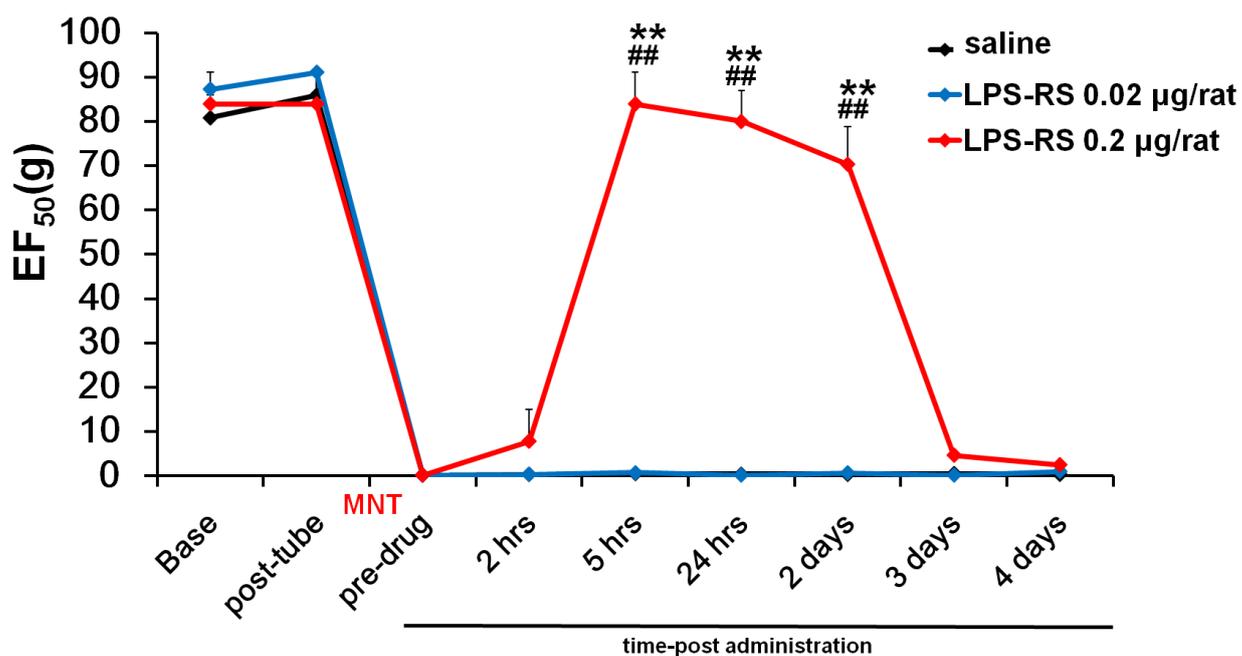


図 6 LPS-RS 投与後の疼痛閾値の変化

**** p<0.01, vs pre-drug, ## p<0.01, vs saline, n=4**

2) LPS-RS 投与後の p-p38、p-p65、IL-18 の発現変化

次に LPS-RS の鎮痛効果メカニズムを分子レベルで解明するために、LPS-RS 投与が NF κ B p65 及び p38 MAPK のリン酸化、及び IL-18 の発現に与える影響について、Western blot 解析を用いて検討を行った。p-p38 の発現は、saline 投与群において無処置群と比較して有意に増加し、LPS-RS 高濃度投与群 (0.2 μ g/rat) では、その増加が有意に抑制されたものの、低濃度投与群 (0.02 μ g/rat) では抑制されなかった (図 7 A, B)。IL-18 の発現は、saline 投与群において無処置群と比較して有意に増加し、LPS-RS 投与群で有意な差は認められなかったが、無処置群と同程度の発現を認め、saline 投与群と比較して明らかな発現の抑制が認められた。p-p65 の発現は、saline、LPS-RS 高濃度投与群 (0.2 μ g/rat) ,低濃度投与群 (0.02 μ g/rat) のいずれにおいても無処置群と比較して有意に増加した (図 7 C)。以上の結果より、小膠細胞上における TLR4 に制御される下流のシグナルは、p38 MAPK であることが示唆された。

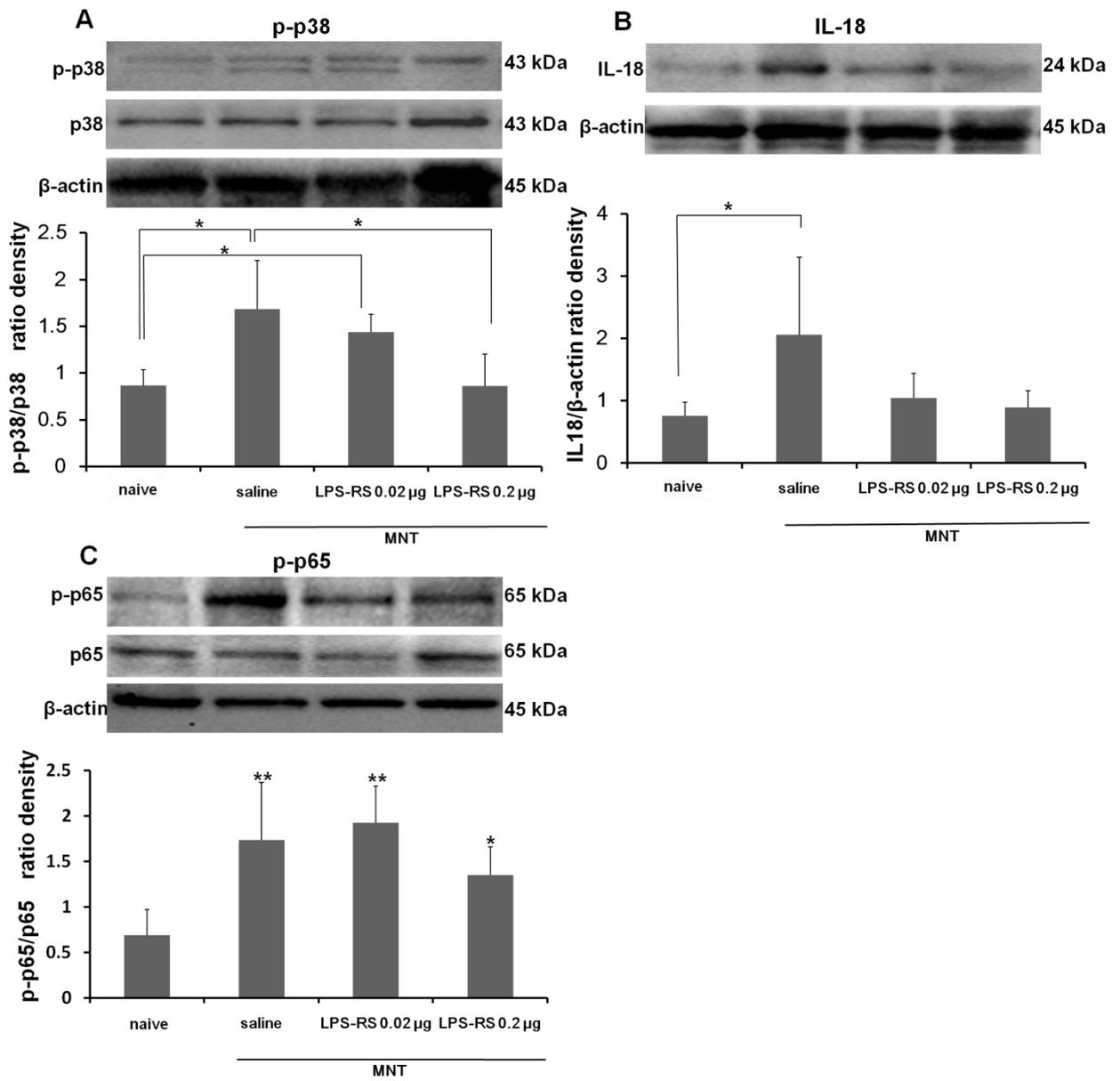


図 7 LPS-RS 投与によるオトガイ神経切断後のタンパク発現変化

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, vs naive, $n = 4$

5. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する Withaferin A (NFκB p65 inhibitor) の影響

1) Withaferin A 髄腔内投与による疼痛閾値の変化

オトガイ神経切断後、長期にわたる p-NFκB p65 の発現が認められることから、p-NFκB p65 と異所性疼痛の関連性が考えられた。Withaferin A は特異的 NFκB inhibitor として知られているが、神経因性疼痛に対する鎮痛効果を目的とした報告は全くない。そこで、Withaferin A の髄腔内投与が、オトガイ神経切断後の異所性疼痛に与える影響について調べた。全ての実験群においてチューブ手術一週間後の EF50 値はチューブ手術前と有意な差は認められず、チューブ手術による上顎神経支配領域の疼痛閾値に対する影響はなかった。全ての実験群でオトガイ神経切断 1 週間後に EF50 値の有意な低下が認められ、異所性疼痛の発現が確認された。Withaferin A (63 μg/rat) を投与すると、EF50 値は 2 時間から 3 日後まで上昇した。一方、saline、Withaferin A (6.3 μg/rat) を投与した場合、有意な EF50 値の上昇は認められなかった (図 8)。以上の結果より、Withaferin A による濃度依存的な異所性疼痛の抑制が確認された。

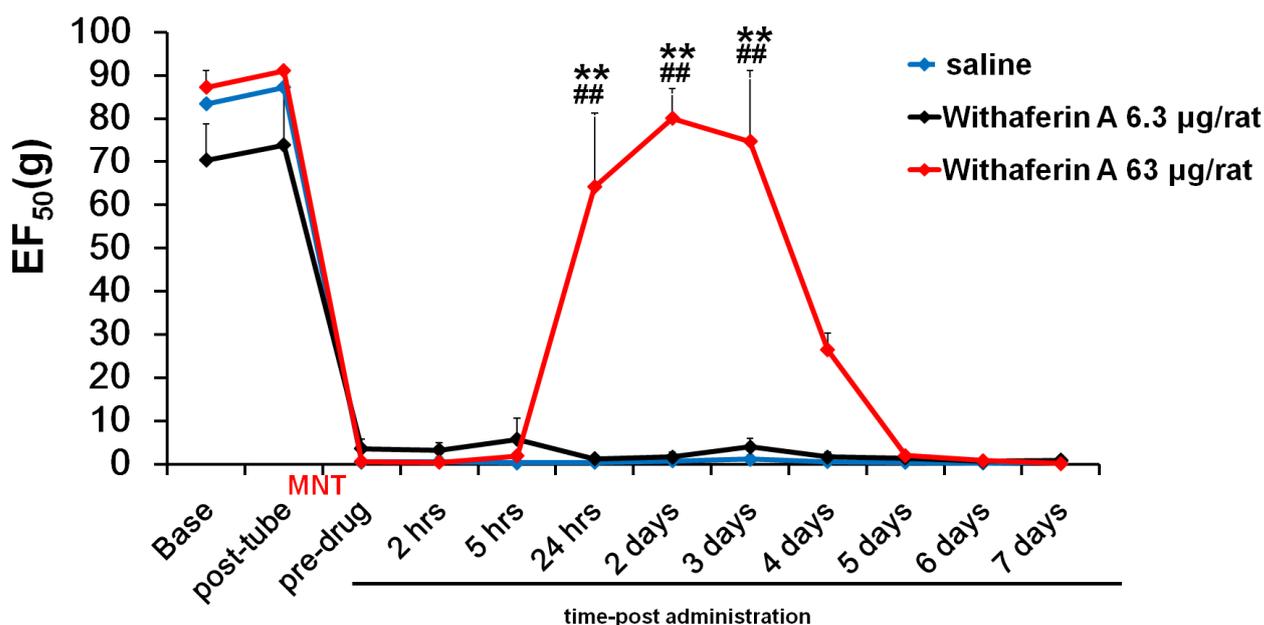


図 8 Withaferin A 投与後の疼痛閾値の変化

** p<0.01, vs pre-drug, ## p<0.01, vs saline, n=4

2) Withaferin A 髄腔内投与による、p-p65、p-IKKb、IL-18、及び p-p38 のタンパク発現変化

NF- κ B 活性化経路は古典的経路 (canonical pathway) と非古典的経路 (non-canonical pathway) の 2 経路に大別される。古典的経路では、NF κ B は、I κ B α と結合することによりその活性を抑制されている。しかし、I κ B α のリン酸化を誘導する IKKb がリン酸化されると I κ B α がリン酸化され、NF κ B から分離する。この結果、NF- κ B がリン酸化される。Withaferin A は NF κ B p65 の特異的阻害薬であることは知られているが、p38 に対する影響は不明である。そこで、Withaferin A の鎮痛効果メカニズムを分子レベルで解明するために、Withaferin A 投与が p-NF κ B p65、p-IKKb、IL-18、及び p-p38 の発現に与える影響について、Western blot 解析を用いて検討を行った。その結果、p-NF κ B p65、p-IKKb、IL-18、及び p-p38 の発現は、saline 投与群において無処置群と比較して有意に増加した。p-NF κ B p65 と IL-18 については、Withaferin A (63 μ g/rat or 6.3 μ g/rat) 投与群で saline 投与群と比較して、その発現が抑制された。また、p-IKKb と p38 MAPK については、Withaferin A (63 μ g/rat) 投与群で saline 投与群と比較して、その発現が抑制された。(図 9 A-D)。以上の結果より、NF κ B p65 あるいは P38 MAPK のリン酸化を抑制することにより、IL-18 の分泌が抑制されることが示唆された。

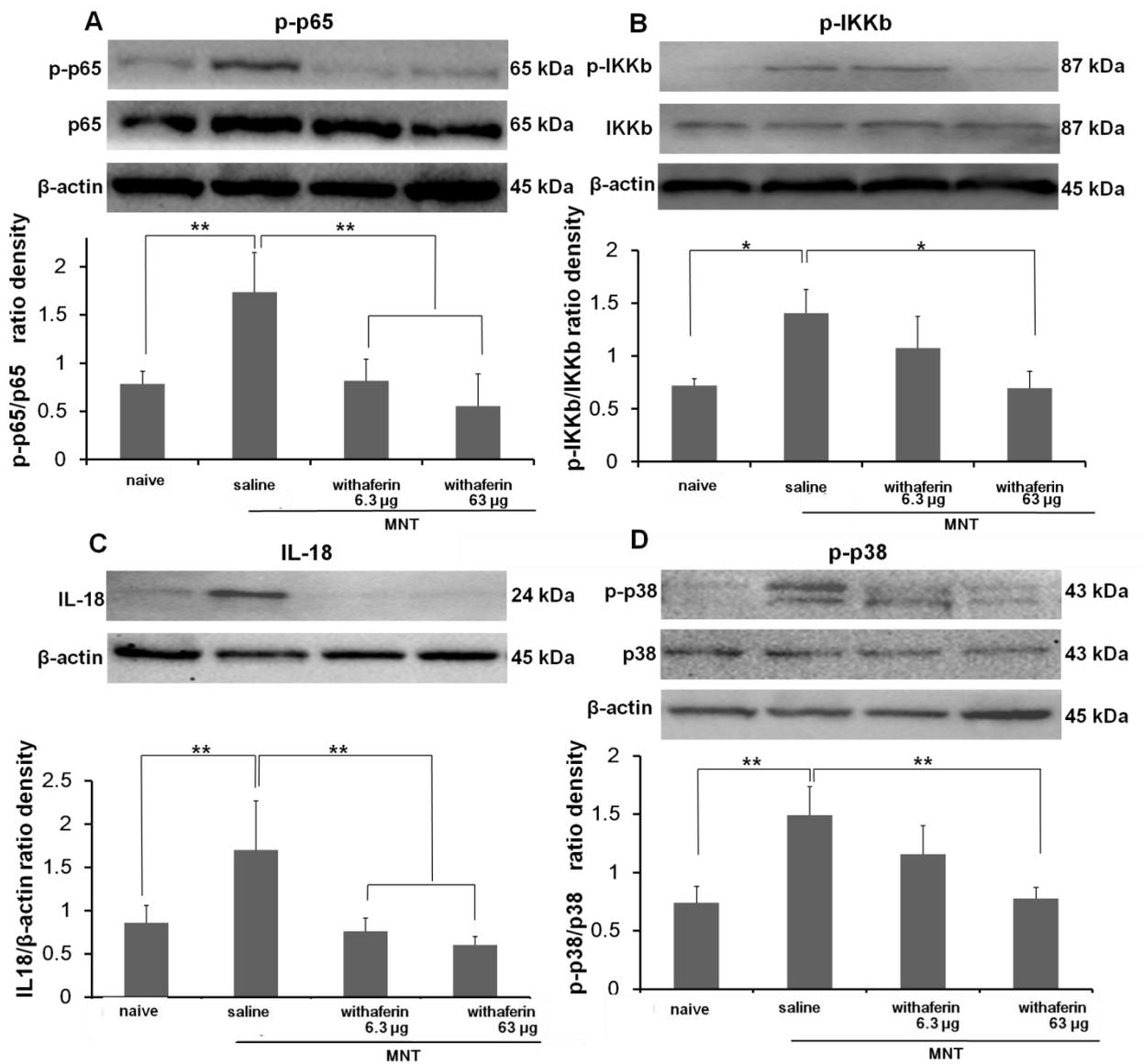


図 9 Withaferin A 投与によるオトガイ神経切断後のタンパク発現変化

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 4$

6. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する SB203580 (p38 MAPK inhibitor) の影響

1) SB203580 髄腔内投与による疼痛閾値の変化

オトガイ神経切断後、長期にわたる p-p38 の発現が認められることから、p-p38 と異所性疼痛の関連性が考えられた。一方、SB203580 は特異的 p38 の阻害薬として知られている。そこで、SB203580 の髄腔内投与が、オトガイ神経切断後の異所性疼痛に与える影響について調べた。全ての実験群においてチューブ手術一週間後の EF50 値はチューブ手術前と有意な差は認められず、チューブ手術による上顎神経支配領域の疼痛閾値に対する影響はなかった。全ての実験群でオトガイ神経切断 1 週間後に EF50 値の有意な低下が認められ、異所性疼痛の発現が確認された。SB203580 (10 µg/rat) を投与すると、EF50 値は 2 時間から 2 日後まで上昇した。SB203580 (1.0 µg/rat) を投与すると、EF50 値は 24 時間後に上昇した。一方、Saline を投与した場合、有意な EF50 値の上昇は認められなかった (図 10)。以上の結果より、SB203580 による濃度依存的な異所性疼痛の抑制が確認された。

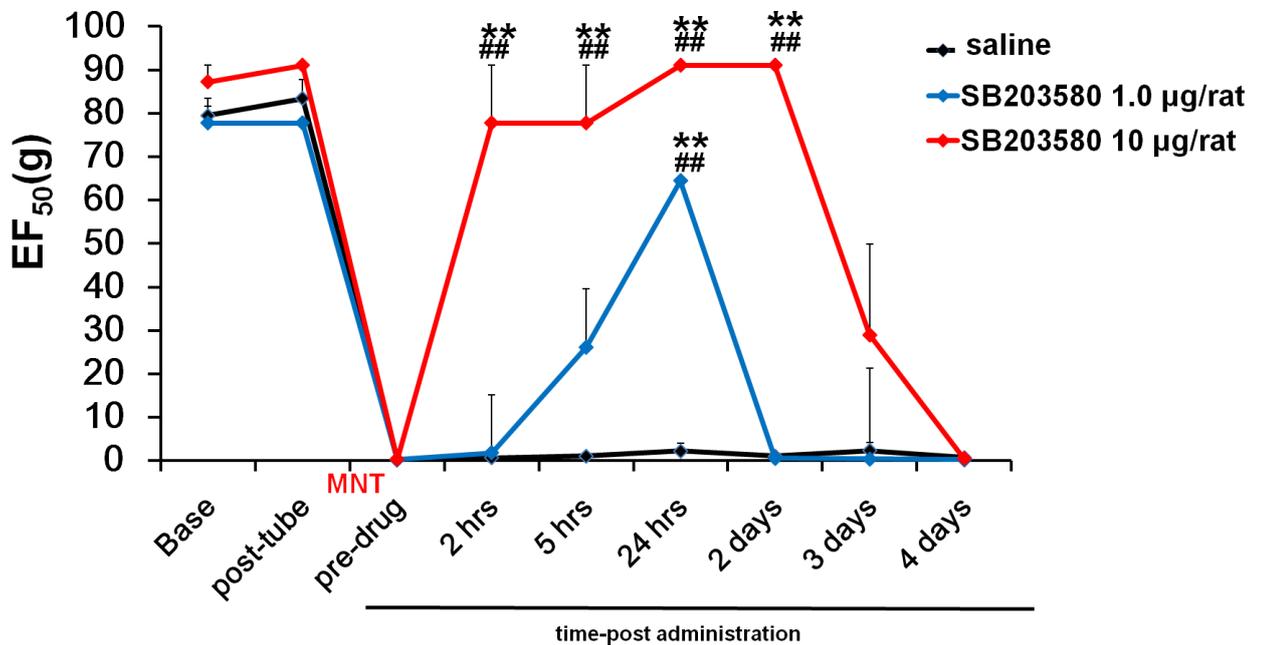


図 10 SB203580 投与後の疼痛閾値の変化

** $p < 0.01$, vs pre-drug, ## $p < 0.01$, vs saline, $n = 4$

2) SB203580 髄腔内投与による p-p38、IL-18、p-p65 の発現変化

SB203580 の鎮痛効果メカニズムを分子レベルで解明するために、SB203580 投与が p-NF κ B p65、p-p38、及び IL-18 の発現に与える影響について、Western blot 解析を用いて検討を行った。

p-p38、IL-18、p-p65 の発現は、saline 投与群において無処置群と比較して有意に増加した。p-p38、IL-18 については SB203580 高濃度投与群 (5.0 μ g/rat)、低濃度投与群 (0.5 μ g/rat) のいずれにおいても、その増加が有意に抑制された (図 11 A, B)。p-p65 の発現は、SB203580 高濃度投与群 (5.0 μ g/rat)、低濃度投与群 (0.5 μ g/rat) のいずれにおいても無処置群と比較して有意に増加し、抑制は認められなかった (図 11 C)。以上の結果より、p38 MAPK を抑制することにより IL-18 の産生が抑制されることが示唆された。

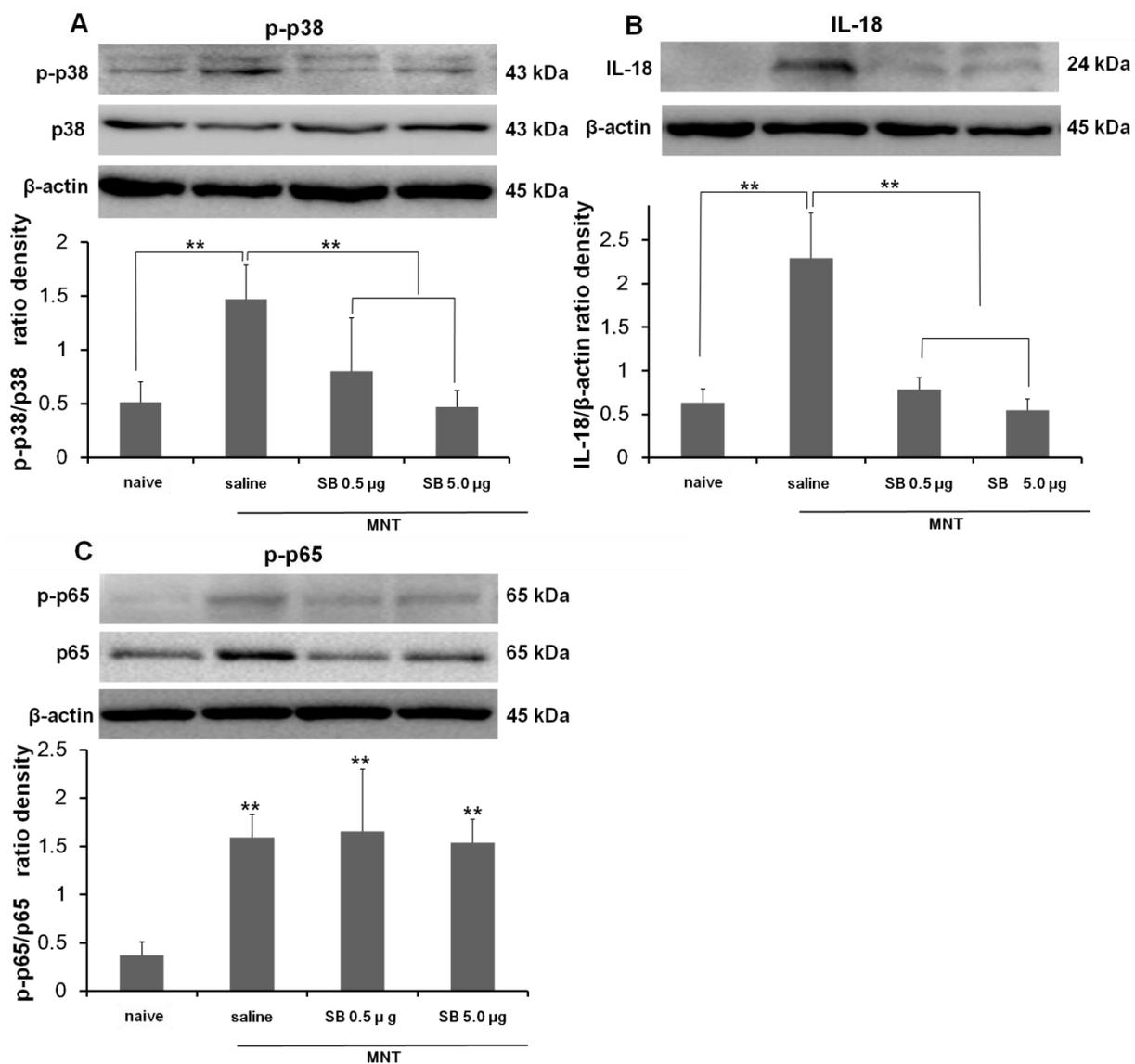


図 11 SB203580 投与によるオトガイ神経切断後のタンパク発現変化

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, vs naive, $n = 4$

7. オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛に対する IL-18 Binding Protei (IL-18 BP) の影響

1) IL-18 BP 髄腔内投与による疼痛閾値の変化

オトガイ神経切断後、長期にわたる IL-18 の発現が認められることから、p-p38 と異所性疼痛の関連性が考えられた。一方、IL-18BP はマクロファージから分泌され、IL-18 と結合することによりその活性を阻害する。そこで、IL-18 BP の髄腔内投与が、オトガイ神経切断後の異所性疼痛に与える影響について調べた。

全ての実験群においてチューブ手術一週間後の EF50 値はチューブ手術前と有意な差は認められず、チューブ手術による上顎神経支配領域の疼痛閾値に対する影響はなかった。全ての実験群でオトガイ神経切断 1 週間後に EF50 値の有意な低下が認められ、異所性疼痛の発現が確認された。IL-18 BP (2.0 µg/rat) を投与すると、EF50 値は 5 時間から 3 日後まで上昇した。IL-18 BP (0.2 µg/rat) を投与すると、EF50 値は 24 時間から 2 日後まで上昇した。一方、saline を投与した場合、有意な EF50 値の上昇は認められなかった (図 12)。以上の結果より、IL-18 BP による濃度依存的な異所性疼痛の抑制が確認された。

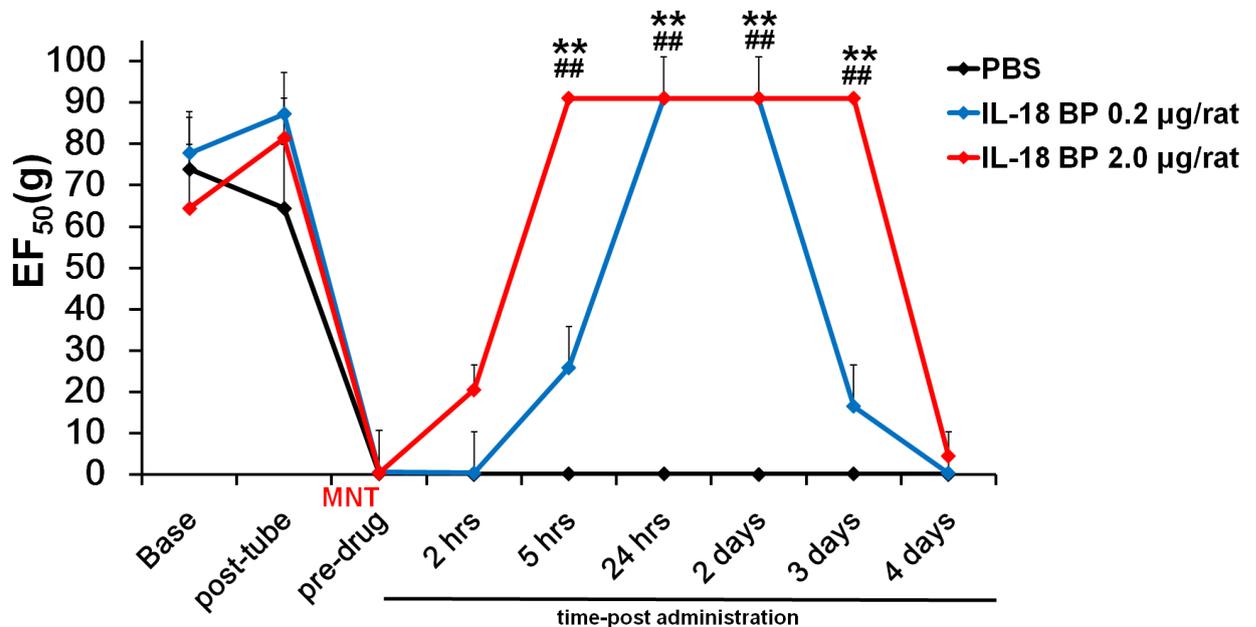


図 12 IL-18 BP 投与後の疼痛閾値の変化

2) IL-18 BP 髄腔内投与による IL-18 の発現変化

オトガイ神経切断後、IL-18 BP 髄腔内投与したラット三叉神経脊髄路核におけるタンパク発現変化を Western blot 解析で検討した。

無処置と比較して、saline 投与で IL-18 の分泌発現は増加しており、その発現増加は IL-18 BP 投与で発現抑制された。さらに IL-18 BP 投与によって、IL-18 と IL-18 BP との分子量の総和である 60 kDa 相当部に不明瞭なバンドが出現した。このことから、IL-18 BP は、オトガイ神経切断によって、細胞外へ分泌増加した IL-18 に結合することで、その活性を抑制したと示唆された。

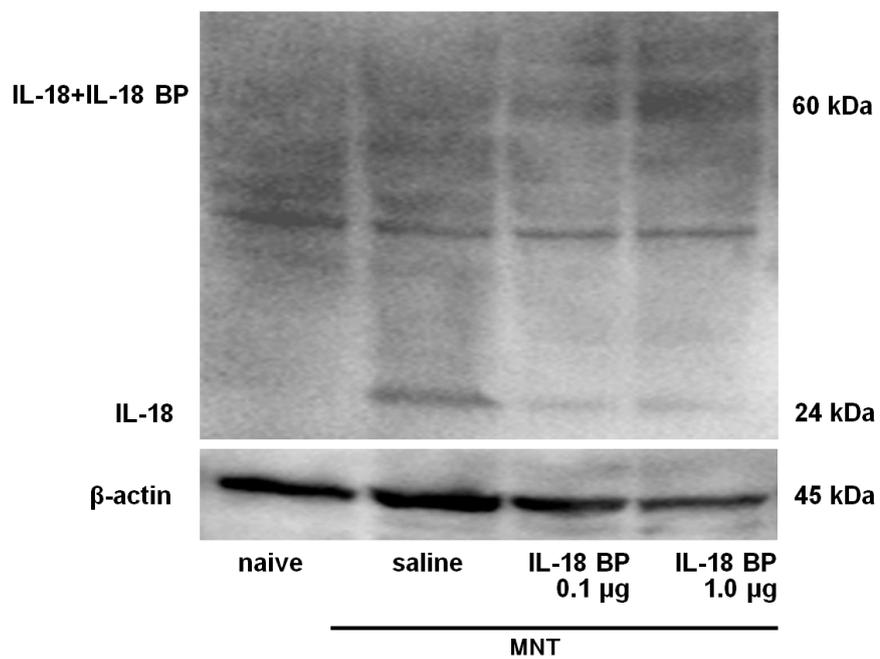


図 13 IL-18 BP 投与によるオトガイ神経切断後の IL-18 の発現

考察

1. 実験モデルの設計と有用性について

1988年から1992年にかけて、Bennettら (Bennett and Xie 1988)、Sltzerら (Bennett and Xie 1988; Seltzer, Dubner and Shir 1990; Kim and Chung 1992)、Chungら (Kim and Chung, 1992) が坐骨神経や脊髄神経の部分結紮を施した神経因性疼痛モデルを報告し、現在もこのモデルの主流である。部分結紮である理由は、完全結紮によって、麻痺があらわれ、動物での疼痛評価が困難になるためである。一方で、三叉神経は眼神経、上顎神経、下顎神経が、顔面感覚の上部、中央部、下部の感覚を各々担っており、その神経支配領域が明確に区分されていることから、異所性疼痛モデルの開発に適している。過去の報告を参考に (Piao et al., 2006; Takahashi et al., 2011)、下顎神経の終末神経であるオトガイ神経を固く結紮してから、遠位側を1 mm 切り取った神経損傷モデルを作製し、その後上顎神経支配領域である whisker pad において機械的痛覚過敏が生じることを用いて実験を行った。オトガイ神経を完全切断することで、下顎神経支配領域では麻痺が生じていることが容易に想像されるが、上顎支配領域に、神経因性疼痛である痛覚過敏が認められることから、異所性疼痛とともに、神経因性疼痛のモデルとして有用であると考えられる。また、末梢神経領域の炎症反応が、中枢神経の神経膠細胞の活性化や疼痛域値の低下を引き起こすと報告されているが (Iwata et al., 1998)、このモデルでは、皮膚切開と神経剖出のみを行った偽手術後、EF50 値は低下せず、異所性疼痛が発症しなかったことが既に報告されている (Takahashi et al., 2011)。さらに、オトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核において、小膠細胞の特異的タンパクである Iba1 の発現レベルが長期にわたり増加することや、それに伴う p38 MAPK の発現亢進が認められることが確認されており、対照と

して偽オペ後の三叉神経脊髄路核の Iba1、p-p38 MAPK の増加は認められないことが明らかとなっている (Murasaki et al., 2013)。

本研究では、ポリエチレンチューブ埋入術や、オトガイ神経切断時に伴う皮膚切開や神経剖出などの外科的処置の影響を調べるために、髄腔内投与のためのカニューレ形成する tube ope を行う前と、tube ope 1 週間後のオトガイ神経切断前の各タイムポイントで疼痛閾値を計測した。結果として、疼痛閾値の低下は認められず、皮膚切開などの外科的侵襲が痛覚過敏を誘発しないことが確認された。さらにオトガイ神経切断 1 週間後、薬剤を髄腔内投与する前に疼痛閾値を計測することで、異所性疼痛の発症を確認した。

本研究では、2013 年の Murasaki らの報告 (Murasaki et al., 2013) をもとに、経時的な NFκB p65、p38 MAPK 及び IL-18 さらに LRP1 のタンパク発現レベルを確認した。すると、オトガイ神経切断後、長期にわたって、NFκB p65、p38 MAPK のリン酸化亢進と、IL-18 の分泌増加が認められ、これらのシグナル伝達系と、炎症性サイトカインが、異所性疼痛に深い関連があることが示唆された。また、LRP1 については無処置、偽手術、オトガイ神経切断後においても、いずれも高発現しており、中枢神経領域での存在が確認された。

2. オトガイ神経切断後、BLF 髄腔内投与の効果

2-1 ラクトフェリンの生理活性について

ラクトフェリンは哺乳類の分泌液に存在し、免疫活性作用や抗菌作用をもつさまざまな生理活性を有する 80 kDa という比較的大きな糖タンパク質である。数多くの生理活性を持ち、とくに抗炎症作用については、さまざまな炎症系サイトカインで検討されている (Inubushi et al., 2012)。In vitro の実験系で、LPS 刺激後の骨芽細胞によって産生される IL-1β、TNFα がラクトフェリンによって抑制される。実際、in vivo でラクトフェリンを経口投与すると、歯周病、関節

リウマチによる骨変形の改善が認められている (Inubushi et al., 2012)。一方、三叉神経傷害後に誘発される三叉神経脊髄路核における持続的な炎症性サイトカインの分泌増加が、異所性疼痛の主な原因として知られている。そこで、本研究では、ラクトフェリンが持つ炎症性サイトカインの抑制作用による、異所性疼痛の抑制を仮説として設定し、中枢神経領域の異所性疼痛に対するラクトフェリンの鎮痛効果とその分子メカニズムについて初めて報告した。

2-2 異所性疼痛に対する BLF の効果について

BLF の神経因性疼痛への効果について現在ほとんど報告されていない。そのため、まず BLF の神経因性疼痛への効果を検討するために、オトガイ神経切断により誘発させた異所性疼痛を持つラットに対し、BLF を髄腔内投与し、経時的に機械的逃避行動試験を行った。その結果、オトガイ神経切断によって誘発された異所性疼痛が、BLF 髄腔内投与後、BLF 高濃度群で有意に抑制された。この効果は、ウシ由来 albumin の同濃度群には認められなかった。さらに、saline や BLF の低濃度投与群においても疼痛は抑制されなかった。すなわち、BLF を高濃度で髄腔内へ投与することで、異所性疼痛が抑制されることが判明した。

2-3 BLF 髄腔内投与後の分子メカニズムについて

前述したように、異所性疼痛は、高濃度 BLF の髄腔内投与によって抑制されることが明らかとなった。そこで、タンパク発現レベルではどのような発現変化が起こっているのかを、三叉神経脊髄路核の組織サンプルを用いて western blot 解析を行った。三叉神経脊髄路核の尾側核部分の組織サンプルでは小膠細胞の局所凝集と、小膠細胞の特異的タンパクである Iba1 が強発現していることはよく知られている。犬伏らの報告 (Inubushi, et al., 2012) を参考に、NFκB p65 や p38 MAPK の細胞内シグナルに着目し、細胞から分泌される炎症性サイトカ

インとして、IL-18に着目した。IL-18は、1995年IFN- γ 誘導因子として初めて兵庫医科大学でクローニングされたサイトカインであり、当初はIFN- γ を介したTh1型免疫応答を誘導する結果、マクロファージの活性化や抗アレルギー作用が注目されていた。しかしその後の研究でIL-18はTh1型免疫応答を誘導したあと、Th1細胞から分泌したサイトカインやケモカインを介してTh2細胞を活性化しアレルギー疾患の発症と、慢性炎症状態を維持することが報告されている（Okamura et al., 1995; Nakanishi et al., 2001）。ごく最近では、坐骨神経損傷モデルにおける神経因性疼痛において、IL-18は、P2X7受容体を介したp38 MAPKのリン酸化亢進によって、小膠細胞から分泌されることが報告されている（Yang et al., 2015）。本研究では、オトガイ神経切断による、三叉神経脊髄路核におけるNF κ B p65とp38 MAPKのリン酸化発現亢進、およびIL-18の分泌増加が、いずれも高濃度BLFを髄腔内投与することにより発現抑制された。さらに、NF κ B p65においてはそのリン酸化をIKKbのリン酸化を介することで誘導されているため、IKKbのタンパク発現レベルの検討も行った。その結果、オトガイ神経切断後、IKKbのリン酸化が発現亢進したが、高濃度BLFの髄腔内投与により抑制された。以上の結果から、BLFによるNF κ B p65およびp38 MAPKのシグナル伝達の阻害と、IL-18の産生抑制が確認された。

2-4 BLFの細胞内への取り込みについて

BLFは牛乳由来のラクトフェリンであり、経口摂取可能で、主な副作用の報告がない安全性の高いタンパク質である。経口摂取後のBLF取り込みについてはいまだ議論の余地はあるが、血液・脳、脊髄関門を通過し、中枢の髄液中にまで侵入していくことが報告されている（竹内 et al., 2004）。しかし、BLF髄腔内投与後の、中枢神経領域の細胞への取り込みと、その作用については報告が

ない。一方、間葉系幹細胞の培養実験系では、BLF は、LDL レセプターの一つである LRP1 を介して細胞内に取り込まれ、細胞膜近傍の TRAF6 に結合し、その下流にある NFκB p65、p38 MAPK のリン酸化を抑制し、炎症系サイトカインの分泌抑制を誘導することが報告されている (Inubushi et al., 2012)。すなわち、BLF が炎症系サイトカインの分泌抑制の作用を発揮するには、細胞内への取り込みが必要である。そのため、本研究においても、BLF の細胞内への取り込みを検討した。LRP1 の中枢神経領域での存在は今まで報告がなかったが、今回、三叉神経脊髄路核における経時的なタンパク発現レベルを検討した結果、オトガイ神経切断前後で著明な変化はなく、一定に高発現が認められたことより、中枢神経領域における LRP1 の存在は確認できた。そのため、オトガイ神経切断後著しく分化増殖する小膠細胞だけでなく、星状膠細胞や神経細胞にも存在する可能性は強く示唆される。さらに、BLF 髄腔内投与後の延髄組織で、抗 TRAF6 抗体で免疫沈降した後、BLF の発現を認めたことから、BLF は中枢神経系のいずれかの細胞内に、LRP1 を介して担体輸送され、TRAF6 に結合したことが示唆された。

以上より、髄腔内投与された BLF は中枢神経領域において、いずれかの細胞の中に担体輸送され、TRAF6 と結合することにより、下流の NFκB p65、p38 MAPK のリン酸化亢進を抑制し、さらに IL-18 の分泌増加を抑制し、オトガイ神経切断後に誘発された異所性疼痛を抑制することが明らかとなった。

3. オトガイ神経切断後 TLR4 antagonist (LPS-RS) 髄腔内投与の効果

3-1 TLR4 について

前述の実験結果から、細胞内に取り込まれた BLF は TRAF6 と結合することによって、細胞内シグナルカスケードの阻害とそれに伴う炎症性サイトカインの阻害効果をもたらすことが示唆された。そこで TRAF6 の上流を制御する受容体

について考察した。TRAF6 の上流制御する受容体には、ほぼ全ての Toll like receptor や IL-1 受容体、IL-18 受容体が知られている (Mabilleau, Chappard and Sabokbar 2011; Burns et al., 1998)。一方で、小膠細胞の細胞膜上においては、数多くの受容体が存在しており、ATP 受容体である P2X4、P2X7 や Toll like receptor のうち TLR4、TLR2、TLR 7、および細胞内小胞の膜上に TLR9 などが報告されている (Yao et al., 2013; Hong et al., 2010, Chen et al., 2009; Matsuda et al., 2015; Zhao, Zhang and Li 2015)。P2X4、P2X7 は特に、末梢神経損傷後、増加する ATP など神経伝達物質をリガンドとして、小膠細胞の細胞内シグナルカスケードを活性化し、p38 MAPK のリン酸化を介して炎症性サイトカイン IL-18 の分泌を誘導することが報告されている (Yao et al., 2013; Matsuda et al., 2015)。しかし、In vitro の実験系で、TLR4 は小膠細胞の細胞膜上に存在し、LPS 刺激により活性化されることが報告 (Lafrance et al., 2010) されているものの、TLR4 を介した IL-18 の発現調節については報告がない。そこで本研究では、TRAF6 の上流の受容体として TLR4 に着目することにし、TLR4 の antagonist である LPS-RS を用いて実験を行った。TLR4 は、外因性リガンドである LPS、内因性リガンドである細胞外マトリックスの構成成分であるプロテオグリカンや、熱ショックプロテイン (HSP) 類によって活性化される受容体である (Marshak-Rothstein 2006)。In vitro の小膠細胞では、LPS による TLR4 の活性化とそれに伴う TNF α 、IL-1 β 、IL-6 の産生亢進についての報告がある (Bai et al., 2014; Yang et al., 2015)。

3-2 異所性疼痛に対する LPS-RS (TLR4 antagonist) の効果について

LPS-RS は TLR4 の antagonist であり、*Rhodobacter sphaeroides* による LPS 成分である。LPS-RS はそのリピド A のアシル基の数が 5 つであるペンタアシルのため、リガンドとして作用しても、その後の免疫活性が生じない。このことか

ら、TLR4 の antagonist として利用されている。本研究では、まず LPS-RS の神経因性疼痛への効果を検討するために、オトガイ神経切断によって誘発させた異所性疼痛を持つラットに対し、LPS-RS を髄腔内投与し、経時的に機械的逃避行動試験を行った。その結果、オトガイ神経切断によって誘発された異所性疼痛が、LPS-RS 髄腔内投与後、LPS-RS 高濃度群で抑制されることが示された。一方、saline や低濃度 LPS-RS 投与群では、抑制は認められなかった。すなわち、LPS-RS を高濃度で髄腔内へ投与することにより、異所性疼痛が抑制されることが明らかとなった。

3-3 LPS-RS 髄腔内投与後の分子メカニズムについて

次に、タンパク発現レベルではどのような発現変化が起こっているのかを、三叉神経脊髄路核の組織サンプルを用いて western blot 解析を行った。p38 MAPK リン酸化と IL-18 のタンパク発現レベルは、オトガイ神経切断後、発現増加し、LPS-RS を髄腔内投与すると、その発現増加が抑制された。しかし、NFκB p65 のリン酸化のタンパク発現レベルに関しては、LPS-RS を高濃度で髄腔内投与すると、やや減少傾向を認めるものの有意な抑制を認めなかった。

3-4 オトガイ神経切断後の pNFκB p65 のリン酸化について

NFκB p65 のリン酸化の局在を確認するため、オトガイ神経切断3日後の三叉神経脊髄路核中位核尾側核移行領域を免疫蛍光二重染色した。その結果、NFκB p65 のリン酸化は星状膠細胞に局在していることが示され、尾側核において異常凝集していた小膠細胞とは共局在を示さなかった。これらの結果を踏まえると、小膠細胞の膜状に存在する TLR4 の下流で NFκB p65 の制御はされない可能性が示唆された。

4. 異所性疼痛モデルと、NFκB p65 の関連性について

4-1 NFκB p65 について

NFκB は 1986 年、核内の免疫グロブリンの K 鎖遺伝子のエンハンサー領域に直接結合する転写因子として働くタンパク質として同定された (Sen and Baltimore 1986)。当初は、B 細胞特有の細胞内タンパク質と考えられていたが、後にほぼ全ての動物種の全ての細胞に存在することが判明した。さらに、活性化された NFκB は、核内へ移行し主に免疫応答の制御反応を誘導する転写因子として働く。通常、NFκB は細胞質内に不活性型 NFκB として存在しており、inhibitor of NFκB (IκB) との複合体を形成し、その活性が抑えられている。しかし、何らかのストレス応答で、IκB kinase (IKK) がリン酸化され、IκB がリン酸化しユビキチン化することにより、NFκB p65 がリン酸化、核内移行し、IL-1、IL-2、IL-6、TNFα、および cox2 など炎症性サイトカインの転写活性が亢進する (Sitcheran, Cogswell and Baldwin 2003; Hayden and Ghosh 2004)。この過剰な炎症性サイトカインの存在が、癌や多くの自己免疫疾患の原因と考えられている (Tergaonkar et al., 2006) ため、NFκB の活性化阻害剤の研究がなされている。NFκB 阻害剤の多くは、天然の植物や昆虫からの防御物質から抽出される。例えば、フェロモン的一种である 3 つのイソプレンからなるセスキテルペン類に分類される、ナツシロギク由来のフィバーフェー (Guzman et al., 2005)、ブドウの皮由来のレスベラトロール (Guzman et al., 2005)、クミンに含まれるクルクミン (Guzman et al., 2005)、そしてインドの原生種のナス科常緑低木であるアシュワガンダの根や葉から抽出される Withaferin A などがある。Withaferin A は、古くからインドの伝統医学であるアーユルヴェーダにおいて、抗炎症、抗免疫反応、抗疲労などの作用で使用されている (Bargagna-Mohan et al., 2007)。また、Withaferin A は強力な IκBα kinase (IKK complex) の阻害剤であり、IKK complex のリン酸化を阻害することで、NFκB の活性を抑えていることも報告されている

ため (Bargagna-Mohan et al., 2007; Gambhir et al., 2015)、本研究で NF κ B p65 の阻害薬として用いた。

4-2 異所性疼痛に対する Withaferin A (NF κ B inhibitor) の効果について

まず Withaferin A の神経因性疼痛への効果を検討するために、オトガイ神経切断によって誘発させた異所性疼痛を持つラットに対し、Withaferin A を髄腔内投与し、経時的に機械的逃避行動試験を行った。その結果から、オトガイ神経切断によって誘発された異所性疼痛が、Withaferin A 髄腔内投与後、Withaferin A 高濃度群において抑制された。この効果は、saline や Withaferin A 低濃度投与群では認められなかった。すなわち、Withaferin A を高濃度で髄腔内へ投与することで、異所性疼痛は抑制されることが判明した。

4-3 Withaferin A 髄腔内投与後の分子メカニズムについて

タンパク発現レベルではどのような変化が生じているのかを三叉神経脊髄路核の組織サンプルを用いて western blot 解析した。その結果、IKKb、NF κ B p65 のリン酸化と IL-18 のタンパク発現レベルは、オトガイ神経切断後に増加し、Withaferin A を髄腔内投与することにより抑制された。最近では、Withaferin A に強力な抗腫瘍効果が認められることが報告されている (Gambhir et al., 2015)。たとえば、白血病細胞や黒色腫細胞に対して、Bcl-1/p38 MAPK/Akt/ROS のリン酸化を亢進し、カスパーゼを発現抑制することで、アポトーシスへ機転させる報告がある (Mandal et al., 2008)。さらに、乳がん細胞の細胞培養実験系では、Withaferin A を添加処理すると、p38 MAPK のリン酸化が亢進し、それによる癌細胞のアポトーシスへのスイッチングが認められると報告されている (Zhang et al., 2011; Nakajima et al., 2013)。そこで、今回の実験においても Withaferin A 投与後の p38 MAPK のタンパク発現レベルについて検討を行った。p-p38 MAPK の

タンパク発現レベルは、オトガイ神経切断後に亢進し、Withaferin A 投与 24 時間後では、その発現増加が有意に抑制された。本結果は、これまで癌細胞などにおいて報告されてきた、Withaferin A による p38 MAPK のリン酸化亢進を介したアポトーシス促進効果とは異なることが示された。

以上の結果から、Withaferin A はオトガイ神経切断後に生じるリン酸化 IKKb、NFκB p65、及び p38 MAPK の発現誘導をともに抑制し、IL-18 の分泌増加を抑制することが明らかとなった。この IL-18 の分泌抑制については、NFκB p65 と p38 MAPK の制御のうちどちらであるのかは、不明のままであった。

5. 異所性疼痛モデルと、p38 MAPK の関連性について

5-1 p38 MAPK について

MAPK とは、セリン/スレオニンキナーゼのひとつであり、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼである。p38 MAPK、ERK、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) 等が MAPK ファミリーとして知られている。酸化ストレス、紫外線照射、熱ショック、浸透圧ショック、サイトカインなどの刺激を受けると活性化され、細胞の分化や増殖、あるいはその逆のアポトーシス、オートファジーを誘導する (Yang et al., 2015)。

神経因性疼痛では、坐骨損傷モデルにおいて、末梢神経損傷後の脊髄後角において、小膠細胞が異常活性を呈し、異常凝集していることが報告されている (Murasaki et al., 2013)。さらに、その小膠細胞において p38 MAPK のリン酸化が発現増強されている。オトガイ神経切断による異所性疼痛モデルにおいても、p38 MAPK のリン酸化は主に小膠細胞上のみで確認され、神経細胞や、星状膠細胞上では認められない。このことは過去の神経因性疼痛における多数の報告と一致している (Gosselin et al., 2010)。さらに、オトガイ神経切断後、p38 MAPK のリン酸化は、タンパク発現レベルで長期間継続して亢進し、小膠細胞の異

常活性は、末梢神経損傷後、神経因性疼痛初期だけではなく、長期的な活性を示すことが明らかとなっている (Murasaki et al., 2013)。

また、p38 MAPK 阻害薬が自己免疫疾患や炎症プロセスに対し治療薬となる可能性があるため、近年盛んに研究が進められている (Goldstein and Gabriel, 2005)。MAPK 阻害薬の一つに SB203580 がある。SB203580 は、p38 MAPK の選択的阻害剤であり、p38 MAPK および Hsp27 のリン酸化で誘導される MAPKAPK-2 の活性化を阻害する合成薬剤である。その鎮痛効果は、神経因性疼痛モデルで数多く報告されているが (Goldstein and Gabriel 2005; Zhang et al., 2014;)、顔面領域の異所性疼痛モデルにおいては、眼窩下神経拘扼モデルでの報告しかない (Ma et al., 2012; Ito et al., 2013)。さらに本研究では、BLF 髄腔内投与によってオトガイ神経切断後の p38 MAPK のリン酸化発現亢進が抑制されたことから、SB203580 を用いた p38 MAPK の阻害によって異所性疼痛に対する効果について検討した。

5-2 異所性疼痛に対する SB203580 の効果について

オトガイ神経切断後に誘発された異所性疼痛は、SB203580 投与群において抑制が認められた。この鎮痛効果は、高濃度群で顕著に、また長期に認められた。さらに、誘発された異所性疼痛は saline 投与群では抑制されなかったことから、SB203580 の髄腔内投与は異所性疼痛の鎮痛効果を持つことが明らかとなった。

5-3 SB203580 髄腔内投与後の分子メカニズムについて

次に、タンパク発現レベルではどのような発現変化が起こっているのかを三叉神経脊髄路核の組織サンプルを用いて western blot 解析を行った。p38 MAPK のリン酸化と IL-18 のタンパク発現レベルは、オトガイ神経切断後に発現増加し、SB203580 を髄腔内投与すると増加は抑制された。また、NFκB p65 のリン酸化のタンパク発現レベルもオトガイ神経切断後に発現増加したが、SB203580

の髄腔内投与により、その発現増加が抑制されることはなかった。以上の結果から、SB203580はp38 MAPKに特異的に作用していることが明らかとなり、さらに、IL-18の分泌の顕著な抑制が認められたことから、IL-18は、小膠細胞内のp38 MAPKのリン酸化を介して産生されることが示唆された。

6. 異所性疼痛モデルとIL-18の関連性について

6-1 IL-18について

IL-18はIL-1ファミリーに属し、IL-1 β と同様に、通常時においては前駆体で細胞内に存在しており、Caspase-1の活性化により切断され、成熟型となると細胞外に分泌される。IL-1 β 前駆体は健常時、血清や血球内、造血細胞内には存在しないのに対し、IL-18は健常時においても、血球内、造血細胞内に存在していることが報告されている (Dinarello et al., 2013; Fujita et al., 2011)。中枢神経系では、IL-18は小膠細胞から産生されることが既に報告されており、分泌されたIL-18は、IL-18R α/β を有する細胞に作用し、NF κ B p65を活性化し、炎症性サイトカインの誘導を促すとされている (善本 2005)。IL-18R α/β のmRNAは、Northern blot解析によって視床下部や小脳、海馬領域からの神経細胞、小膠細胞、星状膠細胞に幅広く発現している。さらに、星状膠細胞については、免疫蛍光二重染色によってIL-18R α/β タンパクの局在が明らかとなっている (Alboni et al., 2010; Miyoshi et al., 2008)。さらに、IL-18の活性を阻害する血清成分として、生体内に、IL-18BPが分泌されていることが知られており、正常時にはIL-18BPはIL-18よりも過剰に存在することでIL-18の活性を抑制し、炎症反応時にはIL-18が多量に発現されることで炎症反応に向かうと考えられている (善本 2005)。

6-2. 異所性疼痛に対するIL-18BPの鎮痛効果について

異所性疼痛時、三叉神経脊髄路核に過剰発現している IL-18 と髄腔内投与した IL-18 BP が結合し、疼痛が抑制されるのではないかと仮説を設定した。疼痛逃避行動試験の結果、IL-18 BP の髄腔内投与によって、濃度に依存した作用時間の差はあったが、オトガイ神経切断後誘発される異所性疼痛を抑制した。

6-2 IL-18BP 髄腔内投与後の IL-18 のタンパク発現について

次に、三叉神経脊髄路核における IL-18 のタンパク発現レベルを確認した。IL-18 BP を髄腔内投与すると、成熟型 IL-18 の発現が無処置動物と同程度まで抑制された。IL-18 BP と IL-18 の分子量はそれぞれ 42 kDa と 18 kDa であるが、その総和である 60 kDa 相当部に非常に薄い特異的バンドが出現していた。従って、IL-18 BP がシナプス間隙に過剰分泌された IL-18 と特異的に吸着することで、異所性疼痛を抑制すると考えられた。

今後の課題について

BLF はオトガイ神経切断後に星状膠細胞に増加する p-NFκB p65 を抑制することが明らかとなったが、p-NFκB p65 の異所性疼痛に対する役割は依然不明のままであった。また、小膠細胞から分泌された IL-18 は異所性疼痛を誘発することが示唆されたが、具体的にどのようにして異所性疼痛を誘発するのかは不明であった。IL-18 receptor は星状膠細胞膜および神経細胞膜に発現しているとの報告もあり (Alboni et al., 2010; Miyoshi et al., 2008)、さらなる検討が必要である。

本研究では BLF の経口投与については検討していない。タンパク質はアミノ酸レベルまで分解されてから腸管内で吸収されるため、BLF の経口投与ではその機能を発揮できない可能性がある。しかし、BLF を大豆レシチンでリポソーム化すると、タンパク構造が維持されたまま腸管内で吸収され、BLF の機能

が発揮されると報告されている (Ishikado et al. 2005)。鎮痛効果を目的とした BLF の臨床応用には、大豆レシチンでリポソーム化した BLF を経口投与した実験系が不可欠である。

総括

本研究では、オトガイ神経切断モデルを用いて、TLR4 と炎症性サイトカイン IL-18 に着目して、BLF による顎顔面領域異所性疼痛への抑制機構について、細胞内シグナルとして、p38 MAPK と NFκB p65 について着目し、異所性疼痛の抑制機構のメカニズムについて検討した。その結果以下の所見が認められた。

1. オトガイ神経切断後、長期にわたる p38 MAPK、pNFκB p65 のリン酸化と、IL-18 の分泌増加が認められた。また、中枢神経における LRP1 の存在が確認された。
2. BLF 投与後、リン酸化 p38、p65 と IL-18 の産生と異所性疼痛の抑制が認められました。さらに、BLF は、髄腔内投与後、細胞内に担体輸送され、TRAF6 と結合した。
3. TLR4 アンタゴニストである LPS-RS 投与後、p38MAPK のリン酸化と IL-18 の産生増加の抑制と異所性疼痛の抑制が認められた。しかし、NFκB p65 リン酸化の産生増加の抑制は認められず、リン酸化 NFκB p65 の局在は、アストロサイト細胞膜上に存在した。
4. NFκB インヒビターである、Withaferin A 投与後、p38 MAPK、NFκB p65 のリン酸化と IL-18 の産生増加の抑制と異所性疼痛の抑制が認められた。
5. P38 MAPK のインヒビターである SB203580 投与後、p38MAPK のリン酸化と IL-18 の産生増加の抑制と異所性疼痛の抑制が認められた。
6. 細胞外へ分泌された IL-18 を IL-18BP で吸着すると、異所性疼痛が抑制された。

以上の結果より、BLF は、オトガイ神経切断後の活性化小膠細胞と星状膠細胞の両方に作用している可能性が明らかとなった。BLF は、小膠細胞に発現する p38 MAPK のリン酸化と IL-18 の産生を抑制することにより、鎮痛効果を発揮した。BLF の髄腔内投与は異所性疼痛に対して非常に高い鎮痛効果を示した。また、BLF は食品由来の安全性の高いタンパクである。従って、BLF は治療困難な異所性疼痛に対する非常に有効な手段であると考えられた。

参考文献

Alboni, S., D. Cervia, et al., (2010). "Interleukin 18 in the CNS." J Neuroinflammation 7: 9

Azzam HS, Goertz C, Fritts M, Jonas WB (2007). Natural products and chronic hepatitis C virus. *Liver Int* 27(1):17-25.

Bharadwaj S, Naidu AG, Betageri GV, Prasadarao NV, Naidu AS (2009). Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 20(9):1603-1611.

Bai, L., C. Zhai, K. Han, Z. Li, J. Qian, Y. Jing, W. Zhang & J. T. Xu (2014) Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci Bull*, 30, 936-48.

Bargagna-Mohan, P., A. Hamza, Y. E. Kim, Y. K. A. Ho, N. Mor-Valknin, N. Wendschlag, J. J. Li, R. M. Evans, D. M. Markovitz, C. G. Zhan, K. B. Kim & R. Mohan (2007) The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. *Chemistry & Biology*, 14, 623-634.

Bennett, G. J. & Y. K. Xie (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33, 87-107.

Burns, K., F. Martinon, et al., . (1998). "MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling." Journal of Biological Chemistry 273(20): 12203-12209.

Chung, J. M., H. K. Kim & K. Chung (2004) Segmental spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Methods Mol Med*, 99, 35-45.

Chandra Mohan, K. V., R. Kumaraguruparan, D. Prathiba & S. Nagini (2006) Modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes and redox status during chemoprevention of hamster buccal carcinogenesis by bovine lactoferrin. *Nutrition*, 22, 940-6.

Chen, K. Q., J. Huang, Y. Liu, W. H. Gong, Y. H. Cui & J. M. Wang (2009) Synergy of TRIF-dependent TLR3 and MyD88-dependent TLR7 in up-regulating expression of mouse FPR2, a promiscuous G-protein-coupled receptor, in microglial cells. *Journal of Neuroimmunology*, 213, 69-77.

Dinarello, C. A., D. Novick, S. Kim & G. Kaplanski (2013) Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*, 4, 289.

Farnaud, S. & R. W. Evans (2003) Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*, 40, 395-405.

Fujita, T., C. Shimizu, Y. Fuke, A. Satomura, M. Abe, K. Kaizu, K. Matsumoto & M. Soma (2011) Serum interleukin-18 binding protein increases with behavior different from IL-18 in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*, 92, e66-9.

Gambhir, L., R. Checker, D. Sharma, M. Thoh, A. Patil, M. Degani, V. Gota & S. K. Sandur (2015) Thiol dependent NF-kappaB suppression and inhibition of T-cell mediated adaptive immune responses by a naturally occurring steroidal lactone Withaferin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 289, 297-312.

Garrison, C. J., P. M. Dougherty & S. M. Carlton (1994) GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol*, 129, 237-43.

Goldstein, D. M. & T. Gabriel (2005) Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development. *Curr Top Med Chem*, 5, 1017-29.

Gosselin, R. D., M. R. Suter, R. R. Ji & I. Decosterd (2010) Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist*, 16, 519-31.

Guzman, M. L., R. M. Rossi, L. Karnischky, X. J. Li, D. R. Peterson, D. S. Howard & C. T. Jordan (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, 105, 4163-4169

Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol* 220(2):83-95.

Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E (2004). Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci* 66(2):149-154.

Haversen, L., B. G. Ohlsson, M. Hahn-Zoric, L. A. Hanson & I. Mattsby-Baltzer (2002) Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol*, 220, 83-95.

Hayden, M. S. & S. Ghosh (2004) Signaling to NF-kappa B. *Genes & Development*, 18, 2195-2224.

Hong, J., I. H. Cho, et al., . (2010). "Microglial Toll-like Receptor 2 Contributes to Kainic Acid-induced Glial Activation and Hippocampal Neuronal Cell Death." Journal of Biological Chemistry 285(50): 39447-39457

Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, Kudo Y, Ao M, Ishikado A et al., . (2012). Molecular mechanisms of the inhibitory effects of bovine lactoferrin on lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 287(28):23527-23536.

Ishikado, A., et al.

2005 Liposomalization of lactoferrin enhanced it's anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull* 28(9):1717-21.

Ito, G., Y. Suekawa, M. Watanabe, K. Takahashi, T. Inubushi, K. Murasaki, N. Hirose, S. Hiyama, T. Uchida & K. Tanne (2013) P2X7 receptor in the trigeminal sensory nuclear complex contributes to tactile allodynia/hyperalgesia following trigeminal nerve injury. *Eur*

Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23(10):4017-4022.

Kawazoe A, Inubushi T, Miyauchi M, Ishikado A, Tanaka E, Tanne K *et al.*, . (2013). Orally Administered Liposomal Lactoferrin Inhibits Inflammation-Related Bone Breakdown Without Interrupting Orthodontic Tooth Movement. *J Periodontol* 84(10):1454-1462.

Koyess E, Fares M (2006). Referred pain: a confusing case of differential diagnosis between two teeth presenting with endo-perio problems. *Int Endod J* 39(9):724-729.

Mandal, C., A. Dutta, A. Mallick, S. Chandra, L. Misra & R. S. Sangwan (2008) Withaferin A induces apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in leukemic cells of lymphoid and myeloid origin through mitochondrial death cascade. *Apoptosis*, 13, 1450-64.

Miyoshi, K., K. Obata, T. Kondo, H. Okamura & K. Noguchi (2008) Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J Neurosci*, 28, 12775-87.

Murasaki, K., M. Watanabe, K. Takahashi, G. Ito, Y. Suekawa, T. Inubushi, N. Hirose, T. Uchida & K. Tanne (2013) P2X7 receptor and cytokines contribute to extra-territorial facial pain. *J Dent Res*, 92, 260-5

Mabilleau, G., D. Chappard, *et al.*, . (2011). "Role of the A20-TRAF6 axis in lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis." *J Biol Chem* 286(5): 3242-3249.

Marshak-Rothstein, A. (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." *Nature Reviews Immunology* 6(11): 823-835.

Matsuda, T., N. Murao, *et al.*, . (2015). "TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus." *Nature Communications* 6.

Machnicki M, Zimecki M, Zagulski T (1993). Lactoferrin Regulates the Release of Tumor-Necrosis-Factor-Alpha and Interleukin-6 in-Vivo. *Int J Exp Pathol* 74(5):433-439.

Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF (1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33(11):1471-1478.

Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ *et al.*, . (2000). Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 861(1):105-116.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S *et al.*, . (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23(3):1026-1040.

Murasaki K, Watanabe M, Takahashi K, Ito G, Suekawa Y, Inubushi T *et al.* (2013). P2X7 receptor and cytokines contribute to extra-territorial facial pain. *J Dent Res* 92(3):260-265.

Nakajima, H., Y. Wakabayashi, *et al.*, . (2013). "An Extract of *Withania somnifera* Attenuates Endothelin-1-stimulated Pigmentation in Human Epidermal Equivalents through the Interruption of PKC Activity Within Melanocytes (vol 25, pg 1398, 2011)." *Phytotherapy Research* 27(7): 1106-1106.

Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda & M. Kurimoto (1995) Cloning of a New Cytokine That Induces Ifn-Gamma Production by T-Cells. *Nature*, 378, 88-91.

Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ *et al.*, . (2006). Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 121(3):219-231.

Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B *et al.*, . (2006). The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res* 55(4):442-450.

Ruland, J. and T. W. Mak (2003). "Transducing signals from antigen receptors to

nuclear factor kappa B." Immunological Reviews 193(1): 93-100.

Sanchez L, Calvo M, Brock JH (1992). Biological Role of Lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood* 67(5):657-661.

Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences." Cell 46(5): 705-716.

Sitcheran, R., P. C. Cogswell, et al., . (2003). "NF-kappa B mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism." Genes & Development 17(19): 2368-2373.

Shimizu E, Kobayashi T, Wakabayashi H, Yamauchi K, Iwatsuki K, Yoshie H (2011). Effects of orally administered lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on clinical and bacteriological profiles in chronic periodontitis patients. *Int J Dent* 2011(405139).

Selzer, M. A. & M. Carsky (1990) Treatment alliance and the chronic schizophrenic. *Am J Psychother*, 44, 506-15.

Sorensen M., Sorensen S.P.L. (1939): The proteins in whey. *Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*, 23, 55–99.

Sweet WH (1984). Deafferentation pain after posterior rhizotomy, trauma to a limb, and herpes zoster. *Neurosurg* 15(6):928-932

Tergaonkar, V. (2006). "NF kappa B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target." International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38(10): 1647-1653.

Takeda, K. & S. Akira (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16, 3-9.

Takahashi K, Watanabe M, Suekawa Y, Ito G, Inubushi T, Hirose N et al., . (2011). IL-1beta in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. *Eur J Pain* 15(5):467

e461-414.

Tsuda H, Sekine K, Fujita K, Ligo M (2002). Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms--a review of experimental and clinical studies. *Biochem Cell Biol* 80(1):131-136.

Ying B, Lu N, Zhang YQ, Zhao ZQ (2006). Involvement of spinal glia in tetanically sciatic stimulation-induced bilateral mechanical allodynia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 340(4):1264-1272.

Yang, X. W., Y. H. Li, et al., . (2015). "Safflower Yellow regulates microglial polarization and inhibits inflammatory response in LPS-stimulated Bv2 cells." *Int J Immunopathol Pharmacol*.

Yao, L. L., E. M. Kan, et al., . (2013). "Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia." *Journal of Neuroinflammation* 10.

Zhao, X. H., T. Zhang, et al., . (2015). "The up-regulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant." *Brain Research Bulletin* 111: 97-103.

Ishikado, A., H. Imanaka, T. Takeuchi, E. Harada & T. Makino (2005) Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull*, 28, 1717-21.

井上和秀 (2008). 痛みの病態生理学 最近の知見から 痛みとグリアの働き. 理学療法 25(6):959-966.

津田誠, 井上和秀(2007). 神経因性疼痛と脊髄ミクログリアの ATP 受容体. BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 59(9):953-959.

善本, 知. (2005) アレルギー・アトピー性疾患 アレルギー性疾患とサイトカイン/転写因子 サイトカインとアレルギー性疾患 IL-18とアレルギー. *日本医師会雑誌*, 133, 491-492.

竹内, 崇., 友. 土屋, 健. 林田 & 悦. 原田 (2004) ラクトフェリンによるモルヒネ耐性発現遅延効果とその作用機序. ミルクサイエンス, 53, 315-319.