

脊髄抑制性介在ニューロンにおける
Extracellular Signal-Regulated Kinase 2(Erk2)
のマウス慢性疼痛モデルに対する役割に関する研究

寺島 早人

(麻酔・蘇生医学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

目 次

| | | |
|-------|------------------------------------|------|
| 第 1 章 | 緒言 | 1 頁 |
| 第 2 章 | 方法 | |
| 第 1 節 | 倫理 | 6 頁 |
| 第 2 節 | 実験動物 | 6 頁 |
| 第 3 節 | 麻酔 | 7 頁 |
| 第 4 節 | 免疫染色法 | 7 頁 |
| 第 5 節 | 疼痛モデル | 9 頁 |
| 第 6 節 | 行動学的評価 | 9 頁 |
| 第 7 節 | 統計解析 | 12 頁 |
| 第 3 章 | 結果 | |
| 第 1 節 | GABA 作動性ニューロン特異的 ERK2 遺伝子欠損マウスの性質 | 13 頁 |
| 第 2 節 | 侵害受容性疼痛における GABA 作動性ニューロン ERK2 の役割 | 13 頁 |

| | |
|--|------|
| 第3節 神経障害性疼痛における GABA 作動性ニューロン ERK2 の役割 | 14 頁 |
| 第4節 坐骨神経結紮後のリン酸化 ERK2 の比較 | 15 頁 |
| 第4章 考察 | 16 頁 |
| 第5章 結論 | 19 頁 |
| 謝辞 | 20 頁 |
| 引用文献 | 21 頁 |
| 図表および解説 | 23 頁 |

第1章 緒言

臨床上、「痛み」は患者の訴えのなかで最も多い。痛みは常に主観的であり、そして不快な感覚であるが、生体防御にとって重要な役割を担っている。疼痛反応は組織障害の回避や察知のための生体アラートシステムという生理的意味をもつが、一部の痛みは慢性疼痛と呼ばれる様な組織障害が治癒したあとも痛みだけが残る疼痛反応の機能的障害を引き起こすことがある。慢性疼痛は身体の生理機能や精神状態にも悪影響を及ぼし、睡眠障害、抑うつ、食欲不振などの症状を引き起こし生活の質を著しく低下させる。近年、慢性疼痛に対する治療薬が使用されるようになったが、全ての患者に効果があるものではなく、有効な治療法が確立されたとは言えないのが現状である。慢性疼痛のなかでも神経系の損傷や機能異常に起因しているものは神経障害性疼痛と呼称され、軽微な触覚刺激を痛みとして感じる「アロディニア」と、痛みを通常よりも強く感じる「痛覚過敏」などの特徴的な症状を呈する。神経障害性疼痛のメカニズム解明は慢性疼痛に対する有効な治療法開発の鍵となると考えられ、多くの研究が行われている。

細胞外シグナル調節キナーゼ extracellular signal-regulated kinase (ERK; ERK1/2 を含む) は MAPK ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼであり様々な細胞応答に関与している。動物実験において ERK の上流にある MEK の活性化を MEK 阻害薬で阻害すると記憶・学習に異常がみられることから、ERK は海馬などのニューロンの可塑性において重要な役割を果たしていると考えられる

(1)。疼痛領域においても ERK は、脊髄後角や後根神経節 (DRG) の痛みを伝達するニューロンの可塑性において重要な役割を果たしており、痛みシグナル伝達の修飾に関係していると考えられる。カプサイシンやホルマリンをげっ歯類の後肢足底皮下へ注射すると脊髄後角のリン酸化 ERK 陽性ニューロンが投与後 1 分以内に増加する (2)。この陽性ニューロンの数は疼痛刺激の強さに依存しており、熱刺激でも温度が高い方が陽性細胞の数が多い。また、触覚刺激や非常に短い時間 (10 秒以内) の侵害刺激ではこのようなリン酸化は誘導されない。また炎症性疼痛を測定するホルマリンテスト (ホルマリンをマウス後肢の足底皮下に注射し、それに対する疼痛様行動を計測するテストで、投与後 5 分以内に認められる第 1 相性反応と投与後 10~40 分頃に再度認められる第 2 相性反応が観察される。第 2 相性反応は中枢性感作を反映すると考えられている) においてホル

マリリン投与前に MEK 阻害薬を髄腔内投与すると、第 2 相性反応が大きく抑制されることから、脊髄ニューロンにおける ERK のリン酸化は中枢性感作に関係していると考えられる(2)。

ホルマリンテストの第 2 相の反応のような急性期中枢性感作における分子メカニズムについて、ERK による電位依存性カリウムチャネル Kv4.2 のリン酸化によるものが提唱されている。ERK が Kv4.2 を直接リン酸化し、その結果として A 型カリウム電流が減少することによってニューロンの興奮性が増加する(3)。

このニューロンの興奮性の増加が中枢性感作メカニズムの一つだと考えられる。ちなみに Kv4.2 をノックアウトしたマウスでは急性期中枢性感作は起こらない(3)。

ERK のアイソフォームである ERK1 と ERK2 はアミノ酸配列が 80%以上同じであり、両者とも MEK1/2 によってリン酸化される。そのため、MEK 阻害薬を用いると ERK1 と ERK2 の両方のリン酸化が阻害される。そのため、MEK 阻害薬を用いた解析では、二つのアイソフォームの違いを詳細に解析するには限界があった。そこでわれわれのグループでは ERK2 を部位特異的に標的遺伝子欠損(ノックアウト)したマウスを作出し、疼痛における ERK の役割を解析した。その結果、中枢

神経特異的に ERK2 をノックアウトしたマウスではホルマリンテストにおいて第 2 相性反応が野生型マウスと比較して大きく抑制された(4)。また、このマウスを用いて神経障害性疼痛モデルを坐骨神経結紮により作製したところ、野生型マウスと比較して症状が大きく緩和されていた。一方、 ERK1 を全身でノックアウトしたマウスでは野生型マウスと比較して有意な差はなかった。これらの結果から、脊髄後角ニューロンにおける ERK2 がこれらのメカニズムに大きく関与しているのに対し、ERK1 は痛みシグナルの調節にはほとんど関わっていないことが明らかとなった。

脊髄後角には脳へ投射するニューロンの他にも多くの介在ニューロンが存在し、それらが脊髄後角内で回路を形成している。介在ニューロンには興奮性のものと抑制性のものがあり、gate control 仮説を支持するシナプス伝達の修飾を行っている可能性がある。GABA_A 受容体拮抗薬であるビククリンの髄腔内投与によって痛覚過敏やアロディニアが惹起されることから(5)、脊髄後角内の GABA_A 作動性(抑制性)介在ニューロンの機能喪失による脱抑制(disinhibition)が神経障害性疼痛メカニズムに関係していると考えられる。脊髄スライスにおいても痛覚を伝達する神経線維である A δ 線維や C 線維の刺激によってリン酸化 ERK

陽性ニューロンの数が増加するが、触覚を伝達する神経線維である A β 線維の刺激では増加しない(2)。一方、ピククリン存在下では A β 線維の刺激でもリン酸化 ERK 陽性ニューロンの数が増加する(6)。つまり、脱抑制下では弱い刺激でも ERK のリン酸化が誘導される。

過去の研究では脊髄後角のニューロンにおける ERK2 が中枢性感作と神経障害性疼痛の発症に関与していることがわかっていた。しかし ERK2 の役割について、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを区別することができなかった。そこで本研究では GABA 作動性（抑制性）ニューロン特異的に ERK2 を標的遺伝子欠損したマウスを用いて GABA 作動性(抑制性)ニューロンにおける ERK2 の疼痛に対する役割を明らかにすることを目的とした。

第1章 方法

第1節 倫理

本研究は、防衛医科大学校動物実験委員会(倫理委員会承認番号 21008)及び組換え DNA 実験安全委員会(承認番号 2018-5)の承認を受けて実施した。また動物実験を行うにあたっては国際疼痛学会の倫理委員会が定めたガイドラインを厳守した。

第2節 実験動物

動物は学内動物実験施設にて 12 時間明暗サイクル、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、適切な給水給餌で管理飼育された、生後 8–10 週齢の C57BL/6Jc1 マウスを使用した。*Erk2* が GABA 作動性ニューロン特異的に欠損したマウスの作出は *Erk2* を loxp 配列で挟み込んだ *Erk2* flox マウスと、GAD67 遺伝子特異的プロモータの制御下に cre を発現するノックインマウスとの掛け合わせによって達成した。以後、*Erk2* を GAD67 特異的に欠損したマウス (*Erk2*^{flox/flox}; *GAD67-Cre*(+)) を *Erk2*^{CKO(GAD67)} と表記する。*Erk2* flox マウスは当研究室の佐藤および健康長寿医療センターの遠藤昌吾によって作製された。コントロールマウスとして、*Erk2*^{flox/flox}; *GAD67*-

Cre(-)マウスを使用した。

第3節 麻酔

三種混合麻酔

神経障害性疼痛モデル作成時及び免疫染色法の灌流固定には、ミダゾラム (SANDO, Tokyo, Japan) 2 mL、ドミトール (Nippon Zenyaku Kogyo Company, Kouriyama, Japan) 1.875 mL、ベトルフェール (Meiji Seika Pharma Company, Tokyo, Japan) 2.5 mL を生理食塩水 18.625 mL で希釈して 25 mL 溶液を作成し、腹腔内に投与し麻酔薬として使用した。

第4節 免疫染色

Erk2 のリン酸化を観察するために免疫染色を Satoh らの報告(7)を参考にし
て行った。検体を採取するために、マウスに麻酔薬として三種混合麻酔薬を
0.15mL 腹腔内に投与し、4% PFA (paraformaldehyde) で経心灌流固定した後、
脊髄の L3-L6 を採取した。検体を 4%PFA 溶液中で 1 時間後固定した後、1×PBS
(Phosphate buffered saline)に移しパラフィンで包埋した。パラフィンブロッ

クはロータリーマイクロトーム (MICROM HM355S; Microm International GmbH, Walldorf, Germany) を用いて 5 μm に薄切した。切片をスライドガラスに載せ、キシレンで脱パラフィンした後に、Antigen unmasking solution (H-3300; Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA) を添加して 121°C で 5 分間オートクレーブを行った。その後、Nonspecific staining blocking reagent (Dako, Glostrup, Denmark) を用いてブロッキングを 30 分間行い、1 次抗体を添加して 4°C の加湿環境に一晩静置した。1 次抗体には、抗 GABA 抗体 (A2052, rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich, St. Louis, 1:500)、抗 GABA 抗体 (A0310, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, St. Louis, 1:100)、抗 phospho-Erk1/2 抗体 (#4370, rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology, 1:200)、抗 Erk2 抗体 (610104, mouse monoclonal, BD Transduction Laboratories, 1:200) を使用した。

蛍光染色には 2 次抗体として Alexa-Fluor 546-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-11035, Thermo Fisher Scientific, 1:100)、Alexa-Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (A-11001, Thermo Fisher Scientific, 1:100) を使用した。切片の観察には Nikon fluorescence microscopy system CS1DW (Nikon, Tokyo, Japan) と electron-multiplying (EM) CCD digital camera

C9100-13 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を使用した。

第5節 疼痛モデル

1. 侵害受容性疼痛モデル

Otsubo らの報告(4)を参考にして、足底に2%ホルマリン水溶液(20 μ L)を注射して作製した。2%ホルマリン水溶液はホルムアルデヒド液(Wako pure chemical industries, Osaka, Japan)を用いて作製した。

2. 神経障害性疼痛モデル

Kawaguchi らの報告(8)を参考にして坐骨神経部分結紮(partial sciatic nerve ligation; PSNL)モデル(Seltzer model)を作製した。三種混合麻酔薬を腹腔内注射して麻酔をし、腹臥位に固定した。その後、右大腿上部に小切開を加え坐骨神経を露出し、背側(頰骨神経側)1/2-1/3を8-0絹糸で結紮した。筋膜および皮膚ともに、閉創には5-0絹糸を用いた。

第6節 行動学的評価

全ての行動実験は同一人物が行い、データ収集が終了してからコントロール

マウスとノックアウトマウスの確認を行う盲検法を用いた。

1. Formalin test

侵害受容性疼痛を評価するために行った。マウスをホルマリンテスト実施1時間前に幅 22 cm、長さ 17 cm、高さ 14 cm のアクリル製の箱に入れ、測定環境に馴化させた。その後、2%ホルマリン溶液 20 μ L をマウスの左足底に注射し、疼痛行動（足を振る、足を咬む、足を舐めるなど）の持続秒数を 60 分間（5 分×12 回）測定した。ホルマリン誘発疼痛モデルは、炎症性疼痛に対する反応と炎症性の刺激による神経細胞の可塑性を研究するために使用される。マウスの後肢にホルマリンを皮下注射すると、二相性の侵害受容反応（注射した肢を舐める/噛む/持ち上げる行動）が誘発される。最初の段階は、化学物質が侵害受容器を直接活性化するためと考えられており (9)、5 分から 10 分程度持続する。この最初の段階に続き、相と相の間の短い静止反応がある。静止反応の後、第 2 相は約 30 分続く。この第 2 相は、第 1 相で上昇した求心性活動によって引き起こされる脊髄神経細胞の使用依存的変化から生じる中枢性感作と関連していると考えられている (10) (11)。

2. von Frey test

Otsubo らの報告(4)を参考にし、機械刺激には 0.008 g - 300 g の荷重を与えられる von Frey フィラメントを用い、刺激に対する PSNL モデルマウスの足挙げや足振りなどの逃避行動を指標としてアロディニアを評価した。マウスをテスト実施 1 時間前に直径 10 cm×高さ 20 cm の遮光したプラスチック容器に入れ、高さのあるメッシュ台に乗せ、測定環境に馴化させた。テストは最も荷重の少ない 0.008 g のフィラメントから実施した。ひとつのフィラメントで 1 秒間の足底刺激を 5 回ずつ加え、そのうち 3 回以上に逃避行動がみられた場合を「反応あり」とした。「反応なし」の場合には、0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4、2.0 g の順番で荷重がかかるフィラメントを使用して同様の操作を繰り返し、「反応あり」となるまで荷重をあげていった。最終的に「反応あり」となったフィラメントの荷重値 (g) を、そのマウスのアロディニア閾値として記録した。結紮側と非結紮側の測定間隔は 5 分以上あけて実施した。測定は坐骨神経部分結紮前と結紮後 1、4、7、14、21、28、35 日に行った。

3. Plantar test

Kawaguchi らの報告(8)を参考に行った。熱刺激に対する PSNL モデルマウスの足挙げ行動を指標として熱痛覚過敏を評価した。熱刺激には足底に 5 mm 程度の狭い範囲で熱刺激を加えると同時に自動的にタイマー稼働し、マウスが足挙げを行うと熱刺激とタイマーが停止する測定装置 (PAW Thermal Stimulator, Department of Anesthesiology, UC San Diego) を使用した。マウスをテスト実施 1 時間前に直径 10 cm×高さ 20 cm の遮光したプラスチック容器に入れ、測定装置のガラス板に乗せ、測定環境に馴化させた。熱刺激によるマウスの足挙げ反応までの時間が 7 秒になるように、あらかじめ熱刺激の強さを調節した。マウスの足底に熱刺激を与え、足挙げ反応までの時間を 3 回計測し、その平均秒数を用いた。結紮側と非結紮側の測定間隔は 5 分以上あけて実施した。測定は坐骨神経部分結紮前と結紮後 1、4、7、14、21、28、35 日に行った。

第 7 節 統計解析

統計解析には Graph Pad Prism8 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA,

USA) を使用し、Two-way repeated measures (RM) ANOVA および Bonferroni post hoc test、また等分散性が棄却された時は Kruskal-Wallis test および Dunn's post hoc test を用いて行った。エラーバーは標準偏差を示す。

第3章 結果

第1節 GABA 作動性ニューロン特異的 ERK2 遺伝子欠損マウスの性質

コントロールマウスと *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスの脊髄の GABA 作動性ニューロンにおける ERK2 発現を免疫染色で比較した (図 1)。コントロールマウスは脊髄の GABA 作動性ニューロンにおける *Erk2* の発現が認められたが、*Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスでは認められなかった。検体はコントロールマウスと *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスからそれぞれ 4 匹ずつ採取した。

第2節 侵害受容性疼痛における GABA 作動性ニューロン *Erk2* の役割

炎症性疼痛および中枢性感作における GABA 作動性ニューロンの ERK2 活性化の役割を明らかにするために、*Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスのホルマリン試験における挙動を評価した。

図 2 に示すように、コントロールマウス及び *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスは、雌雄共

にホルマリンに対して典型的な二相性の侵害受容反応を示し、炎症性疼痛に対する反応に差は見られなかった。

第3節 神経障害性疼痛における GABA 作動性ニューロン Erk2 の役割

これまでに、ERK2 が神経障害性疼痛の発症に寄与していることが報告されている (4)。本研究では、PSNL モデルの *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスを用いて、熱の侵害刺激に対する熱痛覚過敏および、通常無害な非侵襲性機械的刺激 (触覚) に対する疼痛反応である機械的アロディニアにおける GABA 作動性ニューロンの ERK2 の関与を評価した。

熱痛覚過敏を調べた Plantar 試験において、PSNL 手術をした *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスとコントロールマウスの術側の足底の放射熱に対する反応は健側と比較して、術後 35 日の期間で雌雄ともに有意差があり、神経障害性疼痛の症状である熱痛覚過敏の発症を認めた (図 3)。

PSNL 術側の足底の放射熱に対する反応は *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスとコントロールマウスで比較すると、雌雄ともに有意差があった (図 3)。特に 21 日目以降の過敏性において、*Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスではコントロールマウスと比較して寛解し

ていることがわかった。

機械的アロディニアを調べた von Frey 試験では、PSNL 手術をした *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスとコントロールマウスの術側の足底における機械的刺激に対する逃避行動の閾値は健側と比較して、術後 35 日の期間において雌雄ともに有意差があり、神経障害性疼痛の症状であるアロディニアの発症を認めた (図 4)。

PSNL 術側の機械的刺激に対する逃避行動の閾値は術後 35 日の期間において *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスとコントロールマウスを比較すると雌雄ともに有意差があった (図 4)。特に 28 日目以降の機械的刺激に対するアロディニアにおいて、*Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスではコントロールマウスと比較して寛解していることがわかった。

第 4 節 坐骨神経結紮後のリン酸化 ERK2 の比較

坐骨神経結紮後の脊髄後角における ERK のリン酸化について免疫染色法を用いて調べた (図 5)。検体は PSNL 前と PSNL15 分後、PSNL10 日後、PSNL21 日後、PSNL35 日後のコントロールマウス及び *Erk2^{CKO(GAD67)}* マウスからそれぞれ 4

匹ずつ採取した。

コントロールマウスにおいては坐骨神経結紮前の脊髄後角ではリン酸化 ERK の発現は少数見られる (図 5A) が、坐骨神経結紮 15 分後にはリン酸化 ERK の発現が増加し、GABA と共発現が認められるものと共発現していないものがあった (図 5B) 。坐骨神経結紮 10 日後以降の脊髄後角ではリン酸化 ERK2 の発現は減少しており、コントロールマウスにおいてリン酸化 ERK の大部分は GABA と共発現が認められたが、共発現していないものも見られることがあった (図 5CDE) 。

Erk2^{CKO(GAD67)} マウスはコントロールマウスと同様に坐骨神経結紮前の脊髄後角ではリン酸化 ERK の発現は少ない (図 5A) が、坐骨神経結紮 15 分後にリン酸化 ERK が多数見られるようになり (図 5B)、結紮後 10 日以降では減少した (図 5CDE) が、GABA とリン酸化 ERK との共発現は認めなかった。

第 4 章 考察

1. 侵害受容性疼痛における GABA 作動性ニューロン ERK2 の関与

中枢性感作は慢性痛の重要な基盤であると考えられている。このような病的

な痛みに重要な役割を果たしている中枢性感作であるが(12)、その詳細な仕組みは不明な点が多い。

ホルマリン投与による炎症性痛の疼痛反応において、*Erk2*^{CKO(GAD67)}マウスはコントロールマウスと比較して差がみられなかった(図2)。ホルマリンテストの第1相はホルマリンによる直接的な侵害刺激であるが、GABA作動性ニューロンにおけるERK2は第1相反応においては重要な働きをしていないことがわかった。また、第2相でも有意な差はみられなかった。ホルマリンテストの第2相は、第1相で誘発される脊髄神経細胞の可塑化により起こるといわれている(12)。今回の結果から、GABA作動性ニューロンERK2は中枢性感作において重要な役割を担っていないことが示唆された。

2. 神経障害性疼痛におけるGABA作動性ニューロンERK2の関与

以前の研究では中枢神経特異的にERK2をノックアウトしたマウスはコントロールマウスと比較し、坐骨神経部分結紮モデルにおいて有意にアロディニアが減弱しており、脊髄ERK2が神経障害性疼痛発症に関与していることを示していた(4)。今回の研究では*Erk2*^{CKO(GAD67)}マウスはコントロールマウスと比べてアロディニアと熱痛覚過敏を発症したが、21日目以降に寛解していた。このこ

とよりアロディニア及び熱痛覚過敏の発症には GABA 作動性ニューロン ERK2 は関与していないものの、痛みが長期化した際の痛みの維持に関与していると考えられる。

過去の研究により脊髄後角の ERK1/2 は A 型カリウムチャネルの Kv4.2 をリン酸化し、A 型電流を減少させることで結果として神経細胞の興奮性が増加することがわかっており、中枢性感作における ERK の重要な役割であると考えられている (13, 14)。このように ERK は神経の性質を変化させるような役割をしている。抑制性 GABA ニューロンにおいて ERK2 がどのような働きをしているかは明らかにできないが、神経障害性疼痛には GABA ニューロンの機能変化が関係していることが示唆されている。慢性期の脊髄後角において、本来であれば痛みの伝達に対して抑制性に働く GABA ニューロンが何らかの影響を受けて機能減退または不全を起こしている可能性があり、ERK2 がこの可塑性に関係している可能性がある。そのため、ERK2 が欠損するとこの可塑的变化が起こらず、結果として GABA ニューロンの機能が維持されることによって慢性期の痛みが寛解された可能性が考えられる。

3. 本研究の限界

本研究の限界として、GABA 作動性ニューロンが今回調べた脊髄後角以外にも広く存在していることが挙げられる。それらの GABA 作動性ニューロンにおける ERK2 が神経障害性疼痛の維持に影響を与えている可能性がある。

第 5 章 結論

1 脊髄後角 GABA 作動性ニューロンの ERK2 は、神経障害性疼痛の発症に関与していないが維持に関与している。

2 脊髄後角 GABA 作動性ニューロンの ERK2 は、炎症性疼痛に関与していない。

謝辞

今回の研究を実施にするにあたり、ご指導を賜りました防衛医科大学校麻酔学講座教授 池田健彦先生に深く感謝致します。また、昼夜を問わず細部に至るまで多大なるご指導を賜りました防衛医科大学校生化学講座教授 佐藤泰司先生に感謝申し上げます。また、動物管理等につきましてご指導頂きました防衛医科大学校生化学講座実験助手 高宮希代子氏に感謝致します。また、研究にご協力いただきました、防衛医科大学校 麻酔学講座 スタッフ、研究科、専修医の先生方、地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 遠藤昌吾先生に感謝申し上げます。

引用文献

1. Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem.* 1999;6(5):478-90.
2. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci.* 1999;2(12):1114-9.
3. Hu HJ, Glauner KS, Gereau RWt. ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents. *J Neurophysiol.* 2003;90(3):1671-9.
4. Otsubo Y, Satoh Y, Kodama M, Araki Y, Satomoto M, Sakamoto E, Pages G, Pouyssegur J, Endo S, Kazama T. Mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia is impaired in mice deficient for ERK2 in the central nervous system. *Pain.* 2012;153(11):2241-52.
5. Loomis CW, Khandwala H, Osmond G, Hefferan MP. Coadministration of intrathecal strychnine and bicuculline effects synergistic allodynia in the rat: an isobolographic analysis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296(3):756-61.
6. Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(3):818-30.
7. Satoh Y, Kobayashi Y, Takeuchi A, Pages G, Pouyssegur J, Kazama T. Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *J Neurosci.* 2011;31(3):1149-55.
8. Kawaguchi M, Satoh Y, Otsubo Y, Kazama T. Molecular hydrogen attenuates neuropathic pain in mice. *PLoS One.* 2014;9(6):e100352.
9. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain.* 1996;64(2):345-55.
- 10.Coderre TJ, Melzack R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J*

Neurosci. 1992;12(9):3671-5.

11. Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*. 1987;30(3):349-60.

12. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. 2009;10(9):895-926.

13. Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, Brenner GJ, Wang H, Van Der Meer C, Befort K, Woolf CJ, Ji RR. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci*. 2004;24(38):8310-21.

14. Yu LN, Sun LH, Wang M, Wang LJ, Wu Y, Yu J, Wang WN, Zhang FJ, Li X, Yan M. EphrinB-EphB Signaling Induces Hyperalgesia through ERK5/CREB Pathway in Rats. *Pain Physician*. 2017;20(4):E563-E74.

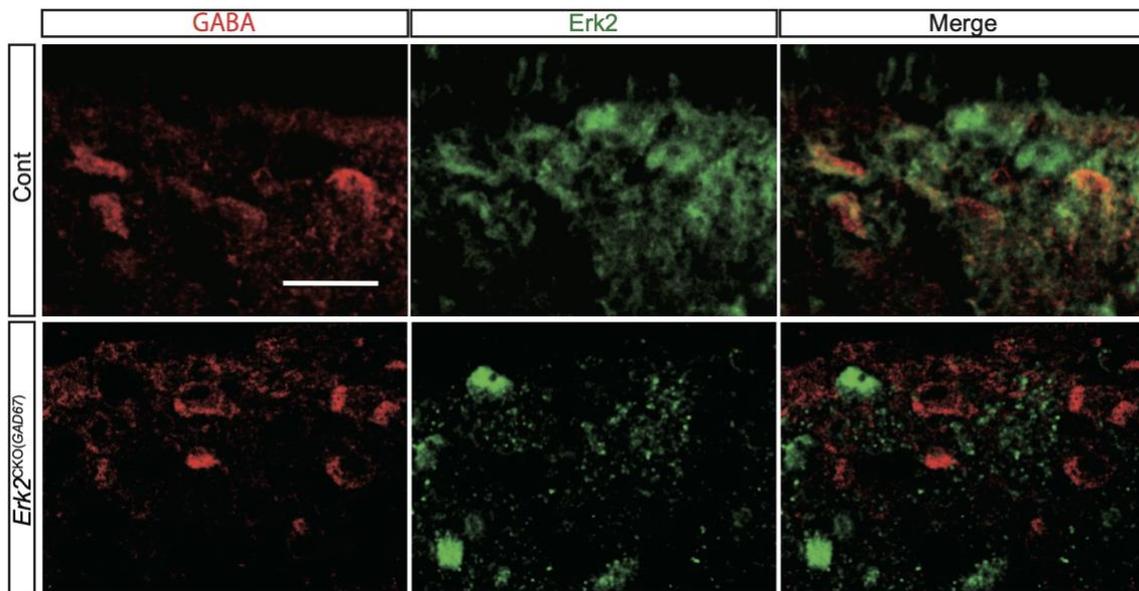


図1 コントロールマウスでは GABA 作動性ニューロンにおいて ERK2 の発現が見られたが、*Erk2*^{CKO(GAD67)}では見られなかった。

抗 ERK2 抗体と抗 GABA 抗体を用いた二重染色法により、脊髓後角における GABA (赤)、Erk2 (緑) の発現を解析した。スケールバー：20 μm。

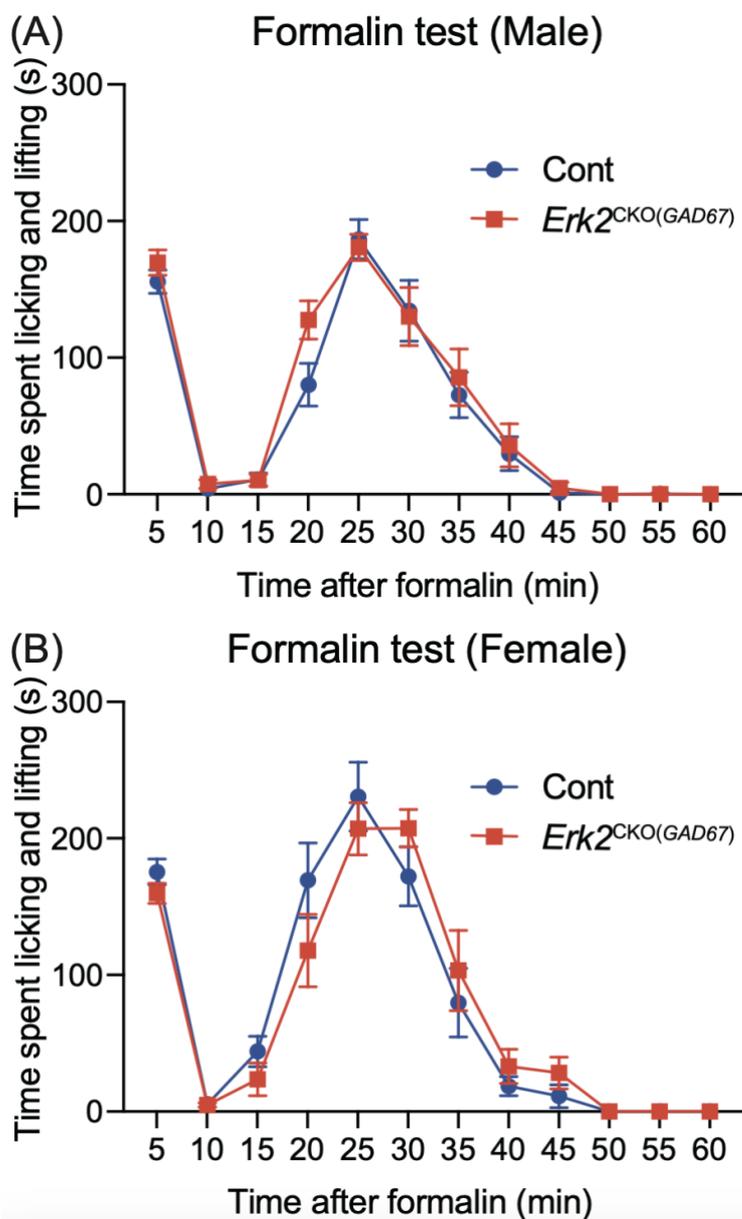


図2 炎症性疼痛においてコントロールマウスと *Erk2*^{CKO(GAD67)}マウスを比較すると雌雄ともに有意差がみられない。

横軸は時間経過、縦軸は疼痛行動時間を示す。

(A) 雄におけるコントロールマウスと *Erk2*^{CKO(GAD67)}マウスでは侵害受容反応は genotype の要因では主効果は認められなかった ($F_{1,9} = 1.14$, $p = 0.3134$, Two-

way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 10)。交互作用 (genotype × 時間) は有意ではなかった ($F_{3, 218, 28.96} = 0.7368$, $p = 0.5474$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 10)。

(B) 雌におけるコントロールマウスと $Erk2^{KO(GAD67)}$ マウスの間に genotype の要因では主効果は認められなかった ($F_{1,9} = 0.1233$, $p = 0.7335$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 10)。交互作用 (genotype × 時間) は有意ではなかった ($F_{11,99} = 1.603$, $p = 0.1095$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 10)。

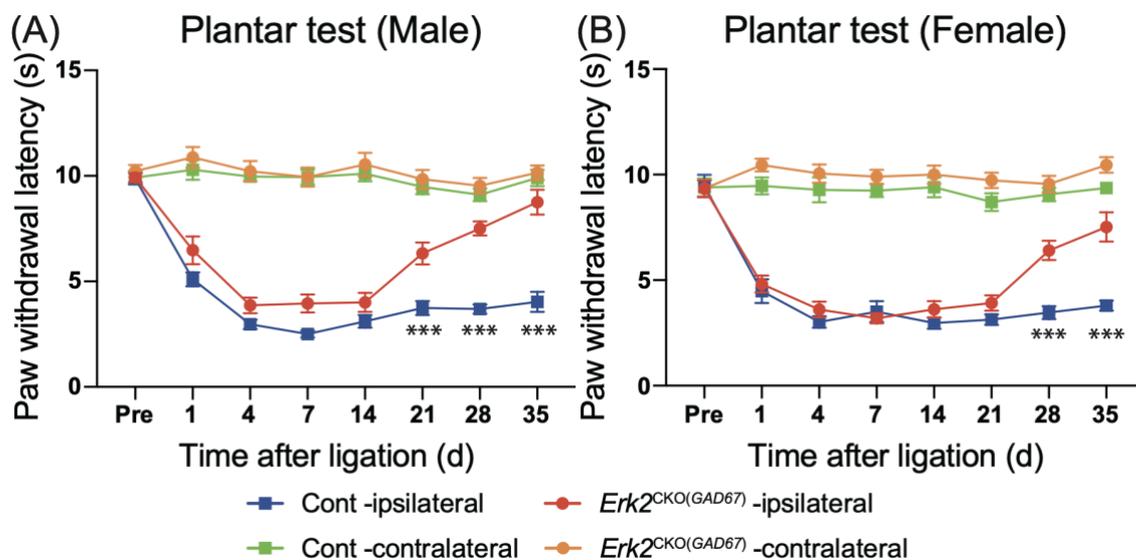


図3 坐骨神経部分結紮モデルにおいて、*Erk2^{CKO(GAD67)}*マウスではコントロールマウスと同様に結紮側の熱痛覚過敏が発症したが、より早く寛解した。

(A) 雄のコントロールマウス (n = 12) と *Erk2^{CKO(GAD67)}* (n = 12) の痛覚過敏の経過を確認した ($p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA, Cont ipsilateral vs. *Erk2^{CKO(GAD67)}* ipsilateral, n = 12 for each, followed by Bonferroni post hoc test, $***p < 0.001$)。雄のコントロールマウスは、PSNL と同側の足と対側の足を比較すると熱刺激に対して強い過敏性を示し、足引き遅延に主効果が認められた ($F_{1,11} = 488.2$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。交互作用(side × 時間)に関しても有意差が認められた ($F_{7,77} = 27.9$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。雄の *Erk2^{CKO(GAD67)}*

マウスも同様に PSNL と同側の足は対側の足を比較すると熱刺激に対して強い過敏性を示し、足引き遅延に主効果が認められた ($F_{1,11} = 118.8$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。交互作用 (side \times 時間) についても有意差が認められた ($F_{7,77} = 26.46$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。雄の PSNL 手術をした $Erk2^{CKO(GAD67)}$ マウスとコントロールマウスの術側の足底の放射熱に対する反応は術後 35 日の期間において genotype の要因で主効果が認められた ($F_{1,11} = 47.8$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。交互作用 (genotype \times 時間) についても有意差が認められた ($F_{7,77} = 13.73$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。ベースラインの足引き遅延は、手術前に有意差はなかった ($p > 0.9999$, Bonferroni's multiple comparisons test)。

(B) 雌のコントロールマウス ($n = 12$) と $Erk2^{CKO(GAD67)}$ ($n = 12$) の痛覚過敏の経過を確認した ($p = 0.006$, Two-way RM ANOVA, Cont ipsilateral vs. $Erk2^{CKO(GAD67)}$ ipsilateral, $n = 12$ for each, followed by Bonferroni post

hoc test, *** $p < 0.001$)。雌のコントロールマウスはPSNL手術後から35日目までの観察期間の間、PSNLと同側の足が対側の足を比較して熱刺激に対して強い過敏性を示し、足引き遅延に主効果が認められた ($F_{1,11} = 426.6$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。交互作用(side × 時間)に関する有意差が認められた ($F_{3,964,43.6} = 22.11$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。雌の $Erk2^{CKO(GAD67)}$ マウスも同様にPSNLと同側の足は対側の足を比較すると熱刺激に対して強い過敏性を示し、足引き遅延に主効果が認められた ($F_{1,11} = 318.3$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。交互作用(side × 時間)に関する有意差が認められた ($F_{4,12,45.32} = 32.68$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。雌のPSNL手術をした $Erk2^{CKO(GAD67)}$ マウスとコントロールマウスの放射熱に対する反応は術後35日の期間において genotype の要因で主効果が認められた ($F_{1,11} = 11.49$, $p = 0.006$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。交互作用(genotype × 時間)に関する有意差が認

められた ($F_{7,77} = 10.85$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。ベースラインの足引き遅延は、手術前に有意差はなかった ($p > 0.9999$, Bonferroni's multiple comparisons test)。

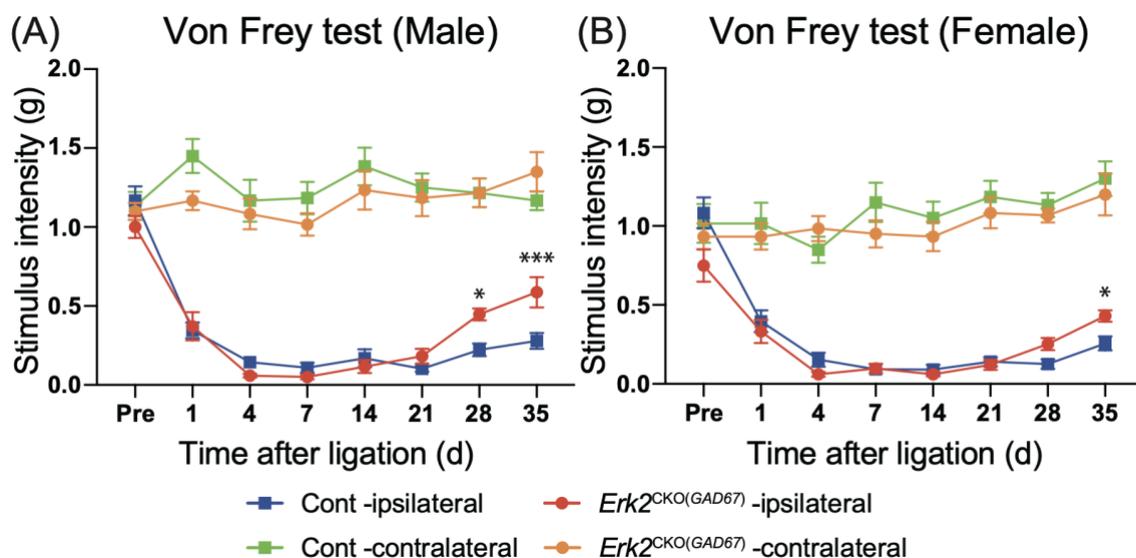


図4 坐骨神経部分結紮モデルにおいて、*Erk2*^{CKO(GAD67)}マウスではコントロールマウスと同様に結紮側のアロディニアが発症したが、より早く寛解した。

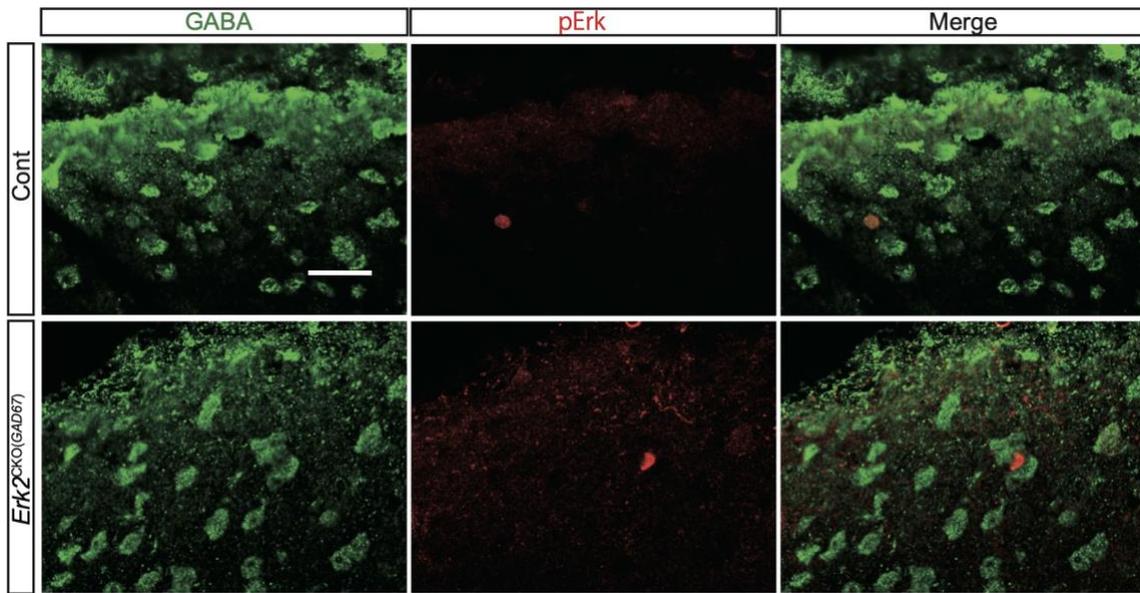
(A) 雄のコントロールマウス (n = 12) と *Erk2*^{CKO(GAD67)} (n = 12) のアロディニアの経過を確認した ($p = 0.0003$, Two-way RM ANOVA, Cont ipsilateral vs. *Erk2*^{CKO(GAD67)} ipsilateral, n = 12 for each, followed by Bonferroni post hoc test, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$)。雄の PSNL 手術後から 35 日目までの観察期間の間、コントロールマウスは、PSNL と同側の機械的刺激に対する逃避行動は対側と比較して強い過敏性を示し、逃避行動の閾値に主効果を認めた ($F_{1,11} = 522.7$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。交互作用(side × 時間)に関しても有意差が認められた ($F_{7,77} = 15.56$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by

Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。雄の $Erk2^{CKO(GAD67)}$ マウスも同様に PSNL 手術後から 35 日目までの期間で逃避行動の閾値に主効果が認められた ($F_{1,11} = 619.9$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。交互作用 (side \times 時間) に関する有意差が認められた ($F_{7,77} = 8.149$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。雄の PSNL 手術をした $Erk2^{CKO(GAD67)}$ マウスとコントロールマウスの機械的刺激に対する逃避行動の閾値は術後 35 日の期間において genotype の要因で主効果は認められなかった ($F_{1,11} = 2.699$, $p = 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$) が、交互作用 (genotype \times 時間) に関しては有意差が認められた ($F_{7,77} = 4.539$, $p = 0.003$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。ベースラインの逃避行動の閾値は、手術前に有意差はなかった ($p = 0.1927$, Bonferroni's multiple comparisons test)。

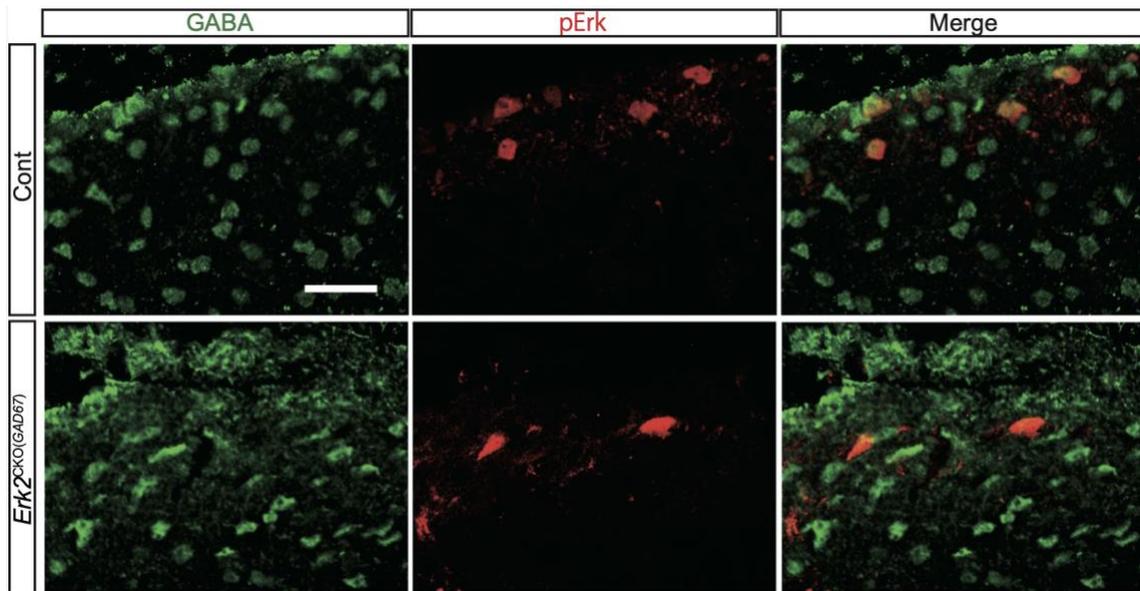
(B) 雌のコントロールマウス ($n = 12$) と $Erk2^{CKO(GAD67)}$ ($n = 12$) のアロディニアの経過を確認した ($p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA, Cont ipsilateral

vs. *Erk2*^{CKO(GAD67)} ipsilateral, n = 12 for each, followed by Bonferroni post hoc test, * $p < 0.05$)。雌のコントロールマウスは、PSNL 手術後から 35 日目までの期間で PSNL と同側の機械的刺激に対する逃避行動は対側と比較して強い過敏性を示し、逃避行動の閾値に主効果を認めた ($F_{1,11} = 191.8$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。交互作用 (side × 時間) についても有意差が認められた ($F_{7,77} = 13.09$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。雌の *Erk2*^{CKO(GAD67)} マウスも同様に PSNL 手術後から 35 日目までの期間で足引き遅延に主効果が認められた ($F_{1,11} = 304.7$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。交互作用 (side × 時間) についても有意差が認められた ($F_{7,77} = 8.342$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12)。雌の PSNL 手術をした *Erk2*^{CKO(GAD67)} マウスとコントロールマウスの機械的刺激に対する逃避行動の閾値は術後 35 日の期間において genotype の要因で主効果を認めなかった ($F_{1,11} = 1.055$, $p = 0.3263$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ n = 12) が、交

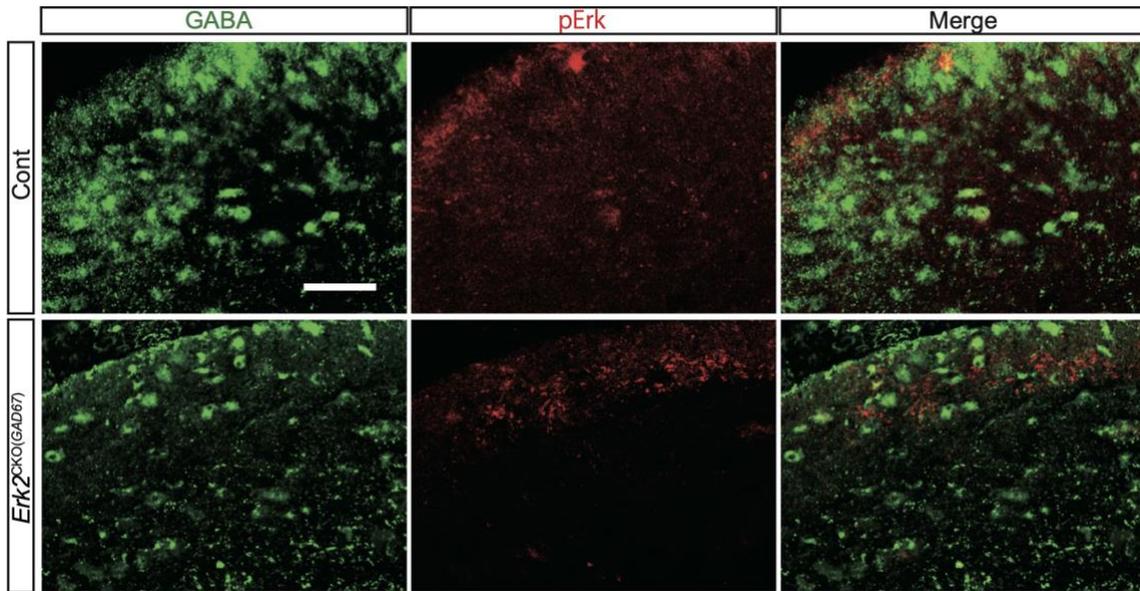
相互作用 (genotype × 時間) に関しては有意差が認められた ($F_{7,77} = 5.213$, $p < 0.0001$, Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; それぞれ $n = 12$)。ベースラインの逃避行動の閾値は、手術前に有意差はなかった ($p = 0.0766$, Bonferroni's multiple comparisons test)。



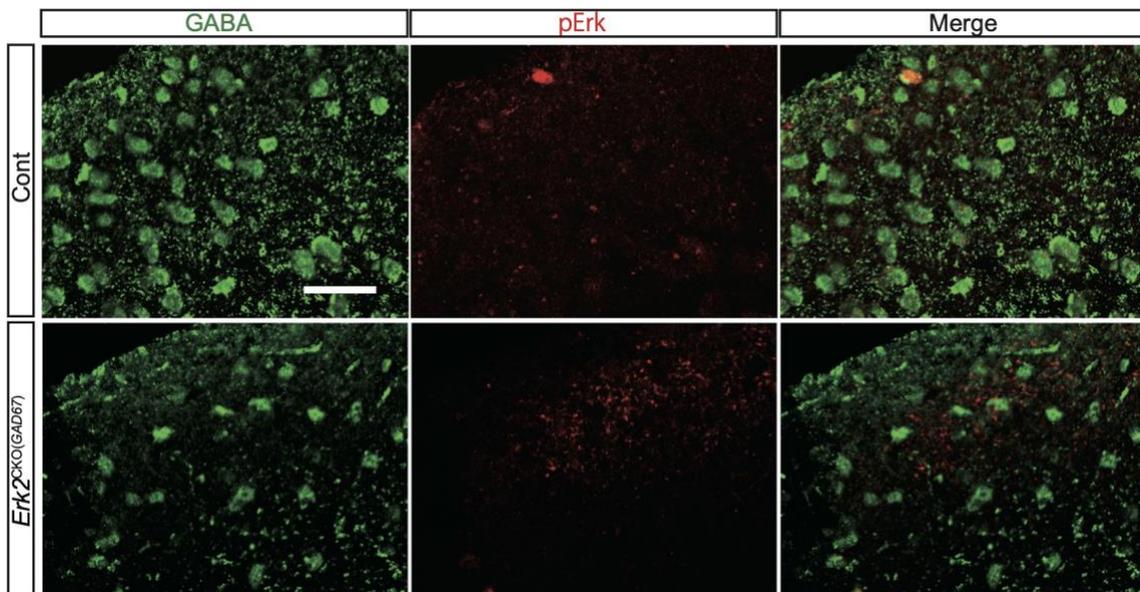
(A) 坐骨神経結紮前



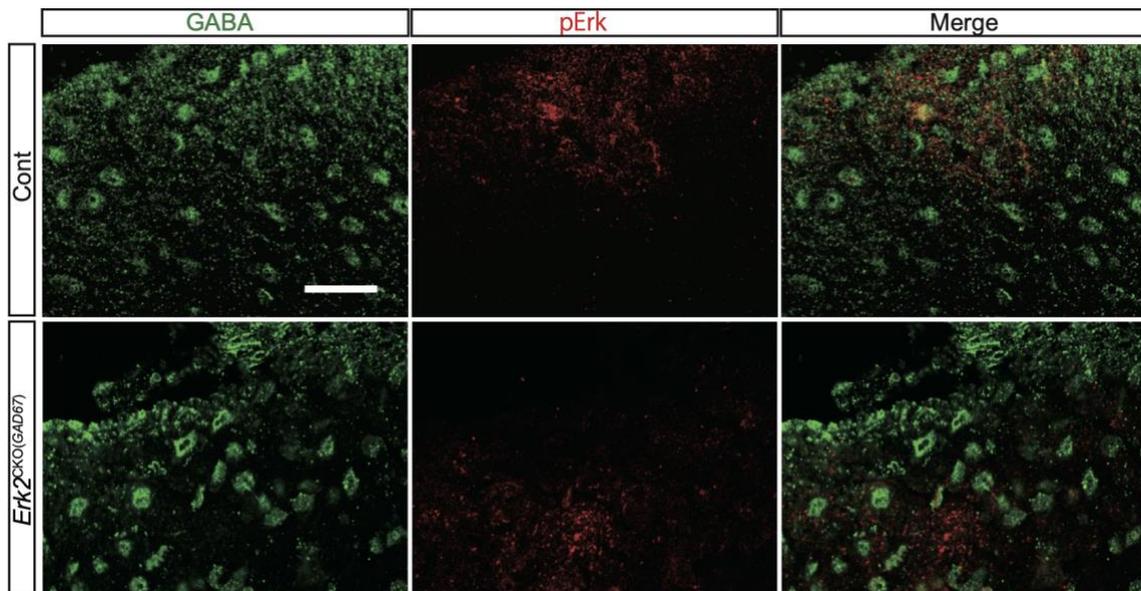
(B) 坐骨神経結紮 15 分後



(C) 坐骨神経結紮 10 日後



(D) 坐骨神経結紮 21 日後



(E) 坐骨神経結紮 35 日後

図 5 坐骨神経結紮後の脊髄後角におけるリン酸化 ERK 発現の変化。
 抗リン酸化 ERK 抗体と抗 GABA 抗体を用いた二重染色法により、坐骨神経結紮前、結紮 15 分後、結紮 10 日後、結紮 21 日後、結紮 35 日後の脊髄後角における GABA (緑)、リン酸化 ERK (赤) の発現をそれぞれ解析した。スケールバー：20 μ m。