

日本医療研究開発機構 女性の健康の包括的支援実用化研究事業 事後評価報告書



I. 基本情報

研究開発課題名：（日本語）女性特有の慢性疼痛緩和を目指した痛みの性差形成機構の解明
（英 語）Female-specific pain relief: Elucidation of sex differences in chronic pain

研究開発実施期間：令和3年4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）木口 倫一
（英 語）Norikazu Kiguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）和歌山県立医科大学・薬学部・生体機能解析学研究室・准教授
（英 語）Department of Physiological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University

II. 研究開発の概要

(和文) 2ページ以上

1. 研究開発の概要

痛みに対する感受性には性差がある。一般的に女性は痛みに強いと言われてきたが、ヒトやマウスを用いた研究から、女性は男性よりも痛みに敏感であることが示されている。また女性は出産など性特有のライフイベントを有することに加え、片頭痛、関節リウマチや線維筋痛症などの強い痛みを伴う疾患の罹患率が男性よりも高い。したがって、真に女性が活躍できる社会を実現するためには、女性の痛みの発症機序を理解し、女性を対象とした疼痛治療を確立することが不可欠である。しかしながら、これまでの痛み研究は男性を主体として進められてきたため、女性における痛みの調節機構・慢性疼痛の分子基盤は殆ど明らかにされていない。

近年、神経障害性疼痛などの慢性疼痛において脊髄グリア細胞の関与が注目されている。ミクログリア抑制薬を用いた先行研究から、雄マウスの神経障害性疼痛はミクログリア依存的である一方で、雌マウスでは非依存的であると考えられてきた。しかし我々は、その抑制効果自体に性差が存在することを見出した。グリア細胞の活性化抑制機構の相違が痛みの性差を形成する根幹であり、アンドロゲンシグナルを応用することで女性の慢性疼痛に奏功する画期的な治療法を確立できると考えた。そこで本研究では、アンドロゲンシグナルを介したグリア細胞抑制機構の解明ならびに痛みの性差の基盤を成す疼痛調節因子の同定を目標とし、女性の生活の質を飛躍的に改善できる新たな治療戦略を提唱するための研究を行った。

『アンドロゲン依存性の新規疼痛調節因子の同定』

坐骨神経の部分結紮による神経障害性疼痛モデルマウスにプロピオン酸テストステロン (TP) またはジヒドロテストステロン (DHT) を全身腹腔内投与すると、雌マウスにおいてその用量・投与回数依存的にアロディニア (異痛症) や痛覚過敏が抑制された。対照的に、雄マウスで同様の実験を行っても神経障害性疼痛の抑制効果は観察されなかった。さらに雌マウスにおいて、神経傷害後に生じる脊髄ミクログリアの活性化が TP や DHT の投与によって抑制されることも見出し、アンドロゲンによって顕著な改善効果が認められる慢性疼痛モデルを特定した。加えて、坐骨神経部分結紮モデルにおけるミクログリア抑制薬 (PLX3397) に対する感受性は、雌マウスに比べて雄マウスの方が高く、この性差がアンドロゲンレベルに応じて変化することも明らかにしており、アンドロゲンシグナルを応用することによって雌の慢性疼痛を調節できることが示唆された。

アンドロゲン受容体 (AR) の核局在が顕著に認められる後根神経節や脊髄後角組織を用いたトランスクリプトーム解析において、アンドロゲン依存的に発現が変動する遺伝子群を抽出し、その中には疼痛関連遺伝子が多く含まれるとともに、それらが AR と相互作用する転写因子群によって制御される可能性を見出した。さらに ATAC シーケンスによるエピゲノム解析を行い、雄マウスでクロマチン構造がオープンになっているゲノム領域を特定し、それらの一部はアンドロゲン受容体結合配列 (ARE) を有していることも明らかにした。Gene Ontology 解析によって、様々なイオンチャネルやトランスポーターの発現がアンドロゲンの影響を受けることが示唆され、アンドロゲンが神経細胞の機能を制御することを裏付ける知見が得られた。

『アンドロゲンシグナルを介したグリア細胞調節機構の解明』

雌マウスに TP や DHT を全身投与した後の一次感覚神経および脊髄後角を用いた免疫組織化学解析において、AR シグナルの活性化を示す核局在が主に神経細胞で増加していた一方で、ミクログリアやアストロサイトではそのような現象が観察されず、アンドロゲンの主な標的細胞は神経細胞である可能性が示唆された。この AR の発現パターンは、健常雄マウスの一次感覚神経や脊髄後角においても同様であり、精巣切除 (GDX) によってアンドロゲンレベルを低下させたマウスではその発現が大幅に低下していたことから、生体内のアンドロゲンレベルに応じて AR シグナルが活性化されていることが示された。

アンドロゲンの疼痛抑制作用に関与する細胞を特定するため、神経細胞またはグリア細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと AR^{flx/flx} マウスをそれぞれ交配し、Cre-loxP システムによる各細胞特異的 AR 欠損マウスを作製して解析に用いた。ミクログリア特異的に AR を欠損させた雌マウスの神経障害性疼痛は TP や DHT の投与により抑制されたが、一次感覚神経特異的に AR を欠損させた雌マウスではその効果が消失していたことから、雌マウスの慢性疼痛を緩和するアンドロゲンの標的細胞は一次感覚神経であることが明らかになった。さらに一次感覚神経特異的に AR を欠損させた雄マウスの痛覚閾値は野生型と比較して低下することや、健常雌マウスにアンドロゲンを投与した際の痛覚閾値の上昇にも一次感覚神経の AR が重要であることを同時に証明した。

『痛みを可視化する新規ライブイメージングシステムの確立と応用』

ミクログリアを蛍光標識したマウスの脊髄組織切片を用いて共焦点ライブイメージングを行い、ミクログリアの糸状仮足、移動距離、細胞体面積などを解析することで、神経障害性疼痛の病態を反映する脊髄ミクログリアの活性化を可視化に成功した。ミクログリアの時間軸を含めた細胞挙動を観察し、神経障害性疼痛が形成される過程の早期において活性化ミクログリアの細胞数が増加し、その中には突起の伸長・退縮を行うのみでなく、組織内を大きく移動する細胞が含まれていることを明らかにした。またミクログリア阻害薬であるミノサイクリンの影響を評価したところ、活性化ミクログリアの各種パラメータが抑制され、行動解析の結果がライブイメージングによって裏付けられることを証明した。またミノサイクリンの効果は添加後数十分以内で観察されたことから、マウス脊髄組織のライブイメージングシステムにより、ミクログリアの活性変化を高感度に捉えられる可能性を示すことができた。ミクログリアを抑制し、慢性疼痛を改善するための候補となる分子や化合物の効果を評価できるとともに、より有効な成分を絞り込むためのスクリーニング系としての応用が期待できる。

本研究の成果として、アンドロゲンが一次感覚神経に直接作用して様々な疼痛関連分子の発現を調節しており、アンドロゲンシグナルを応用することで女性の慢性疼痛を改善できる可能性が示唆された。加えて、慢性疼痛の病態を反映する脊髄ミクログリアの細胞挙動を可視化するライブイメージングを確立し、慢性疼痛治療薬の薬効評価やスクリーニングにも応用できる可能性を示すことができた。今後は上記の研究成果をもとに、女性の慢性疼痛に有効な治療標的分子の候補を絞り込み、それらの詳細な作用メカニズムを解析する。最終的に臨床へのトランスレーショナル研究ならびに創薬研究へと展開することで、女性の健康を包括的に支援する新しい疼痛治療戦略の実用化を目指す。

2. 顕著な成果

(1) アンドロゲンが雌マウスの慢性疼痛を改善する病態モデルの確立

概要：(200 字程度)

坐骨神経の部分結紮による神経障害性疼痛モデルマウスにプロピオン酸テストステロン (TP) またはジヒドロテストステロン (DHT) を全身腹腔内投与すると、その用量・投与回数依存的にアロディニア (異痛症) や痛覚過敏が雌マウスでのみ抑制された。さらに神経傷害後に生じる脊髄ミクログリアの活性化が TP や DHT の投与によって抑制されることも見出し、アンドロゲンによって顕著な改善効果が認められる慢性疼痛モデルを確立した。

(2) 慢性疼痛を担うミクログリアの性差に及ぼすアンドロゲンの影響の証明

概要：(200 字程度)

坐骨神経の部分結紮による神経障害性疼痛モデルマウスにミクログリア抑制薬である PLX3397 を与えると、

アロディニアや痛覚過敏が雄マウスでのみ抑制された。PLX3397 に対するミクログリアの感受性は、雌マウスと比較して雄マウスの方が高いことが明らかになり、この性差は精巣摘出（GDX）によりアンドロゲンレベルを低下させた雄マウスでは消失することから、アンドロゲン依存的な現象であることを証明した。

（３）雌マウスの慢性疼痛を調節するアンドロゲンの標的細胞の特定

概要：（200 字程度）

雌マウスに TP や DHT を全身投与し、アンドロゲン受容体（AR）の局在を免疫染色によって評価したところ、一次感覚神経や脊髄後角神経において AR シグナルの活性化を示す核局在が観察された。TP や DHT の投与による神経障害性疼痛抑制効果は、ミクログリアではなく、一次感覚神経特異的に AR を欠損させた雌マウスにおいて消失していたことから、アンドロゲンの標的細胞は一次感覚神経であることを証明した。

（４）オミクス解析によるアンドロゲン依存性遺伝子のクラスターの特定

概要：（200 字程度）

後根神経節および脊髄後角組織を用い、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。雌雄差、アンドロゲン投与、および GDX によって発現変化が認められる遺伝子を網羅的に分析し、アンドロゲン依存的に発現が変動する遺伝子のクラスターを特定した。さらに解析を進め、それらの中には疼痛関連遺伝子が多く含まれるとともに、AR と相互作用する転写因子群によって発現が制御される可能性を見出した。

（５）ライブイメージングを用いたミクログリア動態の評価系の確立

概要：（200 字程度）

ミクログリアを蛍光標識したマウスの脊髄組織切片において、共焦点ライブイメージングシステムを用いてミクログリアの細胞挙動を解析した。糸状仮足、移動距離、細胞体面積などの変化に基づき、神経障害性疼痛の病態を反映したミクログリアの活性化状態を可視化した。これらのパラメータはミクログリア阻害薬の処置によって抑制され、行動解析の結果がライブイメージングによって裏付けられることを証明した。

Emerging evidence indicates that females are more sensitive to pain than males, and have a higher prevalence of diseases associated with severe pain, such as migraines and fibromyalgia, than men. To realize a society in which females can play an active role, it is essential to understand the pathogenesis of pain and establish sex-specific pain treatments. In this study, we investigated the mechanisms of female-specific pain relief by androgen signaling and proposed a novel pharmacotherapy that can dramatically improve the quality of life of females.

In a mouse model of neuropathic pain caused by partial sciatic nerve ligation (PSL), allodynia (pain caused by normally innocuous stimuli), hyperalgesia and microglial activation were suppressed by the systemic administration of testosterone propionate or dihydrotestosterone in female mice but not in male mice. Moreover, we found that the susceptibility of microglia to a microglial inhibitor (PLX3397) in the PSL model was greater in male mice than in female mice. Immunohistochemical analysis of dorsal root ganglia and spinal dorsal horn tissues revealed the expression of androgen receptor (AR) in the nuclei of neurons but not in glial cells. Transcriptomic and epigenomic analyses have revealed several groups of genes, including many pain-related genes, the expression of which is affected by androgens. Gene Ontology analysis suggests that the expression of various ion channels and transporters is affected by androgens, providing insight into the changes in neuronal function caused by androgens.

To identify the mechanisms underlying the chronic pain-relieving effects of androgens, neuronal- or glial cell-specific conditional AR knockout (AR-cKO) mice were generated using the Cre-loxP system and analyzed. The effects of androgens on PSL-induced neuropathic pain in female mice were canceled in primary sensory neuron-, but not microglia-, specific AR-cKO mice, implying that androgens relieve neuropathic pain in female mice through AR signaling in sensory neurons. Furthermore, we demonstrated that the pain threshold of male AR-cKO mice in primary sensory neurons was lower than that of wild-type mice and that AR in primary sensory neurons is also important for the increase in pain threshold following the administration of androgens to healthy female mice.

We performed confocal live imaging using spinal cord tissue sections from mice with fluorescence-labeled microglia and analyzed the filopodia, migration distance, and cell body area of the microglia to visualize the activation of spinal microglia, which reflects the pathology of neuropathic pain. We also evaluated the effects of the microglial inhibitor, minocycline, which suppressed various parameters of activated microglia, thus proving that the results of the behavioral analysis were supported by a live imaging system. It might be possible to evaluate the effects of candidate molecules and compounds that suppress microglia and improve chronic pain and to be used as a screening system for narrowing down more effective ingredients.

Collectively, we revealed that androgens act directly on primary sensory neurons and change the expression of various pain-related molecules and that chronic pain in females might be improved by androgen signaling. We established a live imaging system to assess the properties of neuropathic pain-related microglia and demonstrated its usefulness for screening drugs for chronic pain treatment. Further studies could propose a new pain treatment strategy that comprehensively supports female health by developing it into translational research in clinical practice and drug discovery research, leading to its practical application.