



Title	急性炎症痛におけるカリウム－クロール共輸送体KCC2の発現減少に対するTrkB受容体の役割についての研究
Author(s)	敦賀, 健吉
Description	配架番号 : 1690
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7004号
Issue Date	2016-12-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7004
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64460
Type	doctoral thesis
File Information	Kenkichi_Tsuruga.pdf



学 位 論 文

急性炎症痛におけるカリウムクロール共輸送体 KCC2
の発現減少に対する TrkB 受容体の役割についての研究
(A study on the role of TrkB receptor on downregulation of a
potassium chloride cotransporter KCC2 in the spinal cord
during acute inflammatory pain)

2016 年 12 月

北 海 道 大 学

敦 賀 健 吉

学 位 論 文

急性炎症痛におけるカリウムクロール共輸送体 KCC2
の発現減少に対する TrkB 受容体の役割についての研究
(A study on the role of TrkB receptor on downregulation of a
potassium chloride cotransporter KCC2 in the spinal cord
during acute inflammatory pain)

2016 年 12 月

北 海 道 大 学

敦 賀 健 吉

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	1 3 頁
考察	2 6 頁
総括及び結論	3 0 頁
謝辞	3 1 頁
引用文献	3 2 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として発表した.

- 1 . Kenkichi Tsuruga, Toshikazu Hashimoto, Ryoko Kato, Rui Kato, Yousuke

Uchida, Tetsutaro Hase, Yuji Morimoto

Plantar injection of formalin in rats reduces the expression of a potassium chloride cotransporter KCC2 in the spinal cord and a kinase inhibitor suppresses this reduction.

Biomedical Research 37, 243-249 (2016)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

- 1 . Kenkichi Tsuruga, Toshikazu Hashimoto, Rui Kato, Yuji Morimoto

Acute pain induced by intraplantar formalin is associated with TrkB receptor-dependent downregulation of KCC2 in rat.

International Association for the Study of Pain, August 29 - September 2, 2010, Montreal, Quebec, Canada

緒言

痛みは動物にとって身体への危険を察知し回避するための防御機構の一部であり、警報としての重要な役割を果たしている。しかし過度な痛みは警報としての役割を超え強い生体ストレスとなり、神経障害痛などの慢性痛では痛みが防御機構としての働きをなしておらず、生体にとって単なる苦痛でしか無い。痛みは肉体的にも精神的にも強いストレスであり、これらの痛みを軽減し治療することは苦痛の軽減のために非常に大切であるが、痛みの発生機序、増幅機構についてはまだ不明な点も多く現在でも難治性の痛み苦しむ患者は多数存在する。通常、侵害受容刺激によって興奮した一次求心線維は脊髄後角で二次侵害受容ニューロンにシナプス伝達し、さらに脊髄視床路などを上行し脳へと伝わり痛みとして認知されるが、現在はこの痛みの伝達経路に様々な異常が生じることで病的な痛みを引き起こしていると考えられている。

痛みの増幅機構の一つとして、侵害受容刺激は一次求心線維を興奮させるだけではなく神経の可塑性変化も引き起こすことが報告されている^{1,2}。この変化には侵害受容刺激のシナプス伝達の機能変化も含まれている。γ-アミノ酪酸（Gamma-aminobutyric acid: GABA）は脊髄後角に存在する主要な抑制性神経伝達物質の一つであるが、この GABA が神経障害痛において放出量が減少しているという報告や³、脊髄後根神経節（Dorsal root ganglion: DRG）で GABA-A 受容体の mRNA が減少しているという報告があり⁴、GABA の減少が痛みの増強を引き起こすと考えられてきた。しかし最近の知見によると、ナトリウムクロール共輸送体（sodium-potassium chloride cotransporter 1: NKCC1）やカリウムクロール共輸送体（potassium-chloride cotransporter 2: KCC2）といった陽イオンクロール共輸送体が神経細胞内のクロールイオンの調節に大きな役割を果たしていることが判明した^{5,6,7}。NKCC1 は主に中枢神経系に発現しており、KCC2 は主に脊髄後角浅層に発現している⁸。NKCC1 は細胞内のナトリウムイオン、カリウムイオン、クロールイオンを増加させるのに対して、KCC2 は細胞内のカリウムイオンとクロールイオンを減少させる働きをもっている。これらの共輸送体により変化したクロールイオン濃度が、GABA の作用を抑制性から興奮性に変化させることがあると報告されている。幼若な神経細胞では成体に比べて NKCC1 の発現が多く KCC2 の発現が少ないため細胞内のクロールイオン濃度は高く維持されており、GABA-A 受容体開口時のクロールイオン流入量や方向を変化させ、抑制性神経伝達物質である GABA の作用を興奮性へ

と逆転させている．この GABA の作用逆転は側頭葉てんかんにおいても確認されており⁹，さらには神経障害痛を代表とするある種の痛み刺激においてもこの逆転現象が確認されている¹⁰．過去の研究では，活性化ミクログリアより放出された脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor: BDNF）が脊髄 II 層の二次ニューロンの GABA に対する作用を興奮性に変化させ¹¹，また BDNF が脊髄後角において TrkB 受容体を介して KCC2 を減少させると報告されている¹²．このことから，神経障害痛においては KCC2 の発現減少が GABA の作用を逆転させ痛みの増強を引き起こしている可能性があり，ミクログリアが KCC2 発現量の主たる調節因子であると考えられている．

一方，最近の研究によると，陽イオンクロール共輸送体は急性炎症性痛の発生についても何らかの影響を与えている可能性がある^{13,14}．現在までに，侵害性内臓刺激が脊髄神経における急速な一時的 NKCC1 リン酸化を引き起こすという報告や¹⁵，完全フロイントアジュバント注射による末梢性炎症刺激が脊髄後角の KCC2 発現を減少させるという報告がある¹⁶．

Nomura らは，ラット足底へのホルマリン注射による急性炎症痛が 5 分後に脊髄後角 I, II 層における KCC2 タンパク発現量と KCC2 免疫反応の減少を引き起こすと報告しており¹³，無髄の一次求心線維である C 線維から放出される BDNF が KCC2 の発現減少を引き起こしているのではないかと考察した．この仮説を支持するものとして，ホルマリン注射による痛み行動は BDNF 欠損マウスにおいて減弱するという報告がある¹⁷．しかし急性炎症痛において脊髄後角で KCC2 発現が減少する機序にはまだ不明な点が多い．

今回の研究では急性炎症痛における痛み増強の作用機序を解明すべく，Nomura らの報告にあるラット足底へのホルマリン注射 5 分後の脊髄後角の KCC2 発現減少について研究を行った．まず「実験 1」では KCC2 の発現減少に TrkB 受容体が影響している可能性を検討するため，ホルマリン注射前にキナーゼ阻害剤をくも膜下投与することで KCC2 の発現減少が抑制されるか実験し，急性炎症痛における KCC2 発現減少が神経障害痛と同様に BDNF によるものである可能性を評価した．次に「実験 2」では KCC2 発現減少にミクログリアが関係している可能性を検討するため，ホルマリン注射による TrkB, BDNF, 活性化ミクログリアのマーカーである Iba1, C 線維のマーカーであるイソレクチン B4 (Isolectin B4: IB4) の免疫組織化学的反応の左右比の変化を画像的に解析し，BDNF がミクログリア以外から放出されている可能性を評価した．そして「実験 3」では KCC2 と TrkB,

Iba1 と BDNF, BDNF と IB4 の蛍光二重染色をそれぞれ行い, C 線維が急性炎症痛における KCC2 発現減少に影響している可能性を評価した. 最後に「実験 4」で KCC2 と BDNF の mRNA 量が急性炎症痛で変化しているか in situ hybridization 法を用いて評価した.

略語表

本文及び図中で使用した略語は以下のとおりである.

BDNF 脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor)

DAB 3,3'-ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine)

DRG 脊髄後根神経節 (Dorsal root ganglion)

GABA γ -アミノ酪酸 (Gamma-aminobutyric acid)

IB4 イソレクチン B4 (Isolectin B4)

KCC2 カリウム-クロール共輸送体 (Potassium-chloride cotransporter 2)

NKCC1 ナトリウム-クロール共輸送体 (Sodium-potassium chloride cotransporter 1)

PB リン酸バッファー (Phosphate buffer)

PBS リン酸バッファー生理食塩水 (Phosphate-buffered saline)

PBST Triton X 添加 0.01 M PBS (Phosphate-buffered saline with Triton X)

実験方法

【実験動物】

本研究の動物実験はすべて「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠して行った。雄性 Sprague-Dawley ラットを日本 SLC（浜松）より 9 週齢で購入し、北海道大学実験動物飼育施設にて飼育、10 週齢で実験に用いた。飼育期間は滅菌気流下に恒温（24℃）、恒湿（40–60%）の環境下で自由給水、自由給餌で飼育した。ラットの実験時点での体重は 300–350 g であった。

【急性炎症痛モデルの作成】

ホルマリン注射による急性痛モデルの作成は既報に従い施行した¹⁸。その方法は、27 ゲージ針を用いてラットの左足底に 5%ホルマリンを 50 μ l 皮下注入するものである。刺激群において痛み刺激は注入直後より誘発され、ラットが組織採取のために麻酔をかけられるまで持続していた。対照群には生理食塩水を 50 μ l 皮下注入した。

「実験 1：急性炎症痛における KCC2 の減少とキナーゼ阻害剤 K252a の影響についての検討」

【急性炎症痛モデルの作成】

急性炎症痛における KCC2 の変化を確認するために、前述の方法で刺激群（n=5）、対照群（n=5）を作成した。

【薬物のくも膜下投与】

K252a はチロシンキナーゼをはじめとした幅広いキナーゼ阻害剤であり、Trk 受容体ファミリーの阻害剤として働く。急性痛刺激における TrkB 受容体の関与を解析するために、キナーゼ阻害剤 K252a（Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA）2 μ g を 10 μ l の 0.01% DMSO に溶解し、K252a 投与群（n=5）に対しホルマリン注射の 15 分前に Mestre らの方法¹⁹に則してくも膜下注入を行った。すなわち、セボフルランによる吸入麻酔下にラットを

しっかりと腹臥位で固定し、第 5 腰椎と第 6 腰椎の椎間めがけて 25 μ l マイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) に 27 ゲージ針を接続して穿刺した。進めた針がくも膜下腔に到達したことを後肢もしくは尾の動きによって確認した。対照群として溶媒である 0.01% DMSO 10 μ l のみをくも膜下注入した群 (n=5) を作成した。ラットは薬液を注入した後に麻酔から覚醒させ、完全に麻酔から回復したことを確認した後両群に対して前述のホルマリン注射を行った。

【組織の固定と凍結切片の作成】

足底に注射し 5 分経過した後に、ラットにペントバルビタール 100 mg/kg を腹腔内投与した。十分な麻酔深度に達した後に開胸して心臓を露出した。心尖部から 18 ゲージカニュレを刺入し、カニュレの先端部が大動脈基部に位置するように調節した。カニュレを通してヘパリン添加 0.1 M リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) 100 ml で灌流し、続けて 0.1 M リン酸バッファー (PB) に溶解した 4%パラホルムアルデヒド (4°C) 500 ml で灌流して組織を固定した。固定終了後にラットの頭部を切断し、脊髓を摘出した。摘出した標本を 4°C の 4%パラホルムアルデヒドに 4 時間浸して、続けて 0.1 M PB に溶解した 20%ショ糖溶液に 4°C で 24 時間以上浸した。

すべてのラットについて、腰膨大部レベルで約 5 mm の長さで脊髓標本を切り出した。−15°C に保温されたクライオトーム (CM1850; Leica, Heidelberg, Germany) 内で標本を O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン, 東京) に包埋し凍結させた後、アビジン-ビオチン複合体染色用に厚さ 30 μ m の横断切片を作成し、0.01 M PBS 中に浮遊切片として収集した。

【免疫組織染色】

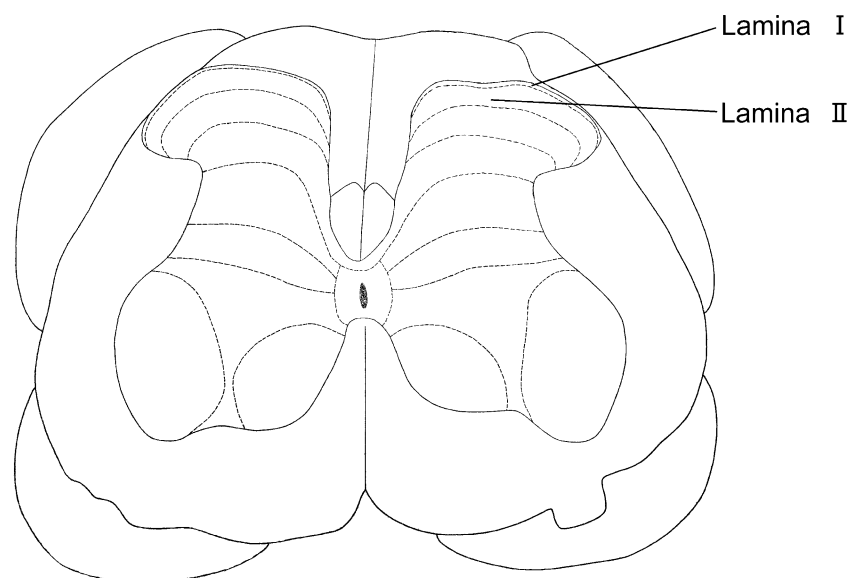
切り出した脊髓の浮遊切片を内因性ペルオキシダーゼ失活のために 0.3% 過酸化水素水加メタノール中で 30 分振盪させ、その後非特異的な反応を防ぐ目的で、0.3% Triton X 添加 0.01 M PBS (PBST) に 3% ロバ血清 (Chemicon International, Temecula, CA, USA) を加えた溶液中に浮かべ室温で 1 時間振盪しブロッッキングした。次に、一次抗体としてウサギ抗 KCC2 抗体 (1:10,000, Millipore, Temecula, CA, USA) を含む 1% ロバ血清加 PBST 中で、4°C で一晩振盪し反応させた。PBST で洗浄した後、二次抗体である

ビオチン標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:200, Jackson Immuno Research Laboratories)を含む 1%ロバ血清加 PBST 中で, 室温で 1 時間反応させた. PBST で洗浄し, ペルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン複合体 (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) と 1 時間反応させた. 0.01 M PBS で洗浄した後に, ニッケル添加 3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) で黒色に発色させた (DAB substrate kit, Vector Laboratories). 0.01 M PBS で洗浄し染色を終了した. 染色された切片をスライドグラス上に配置し, エタノールとキシレンで処理した後に封入した.

【DAB 染色した KCC2 陽性領域の解析】

脊髄後角での KCC2 の発現変化量を解析するために, DAB で KCC2 染色を行った脊髄切片を光学顕微鏡 (Olympus Model BX51 Research Photomicroscope, オリンパス, 東京) で観察し, 各ラットからランダムに 5 切片をデジタルカメラ (Olympus DP70 digital camera system, オリンパス) で撮影した. 得られた画像の KCC2 陽性領域について, 画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて光学密度の定量化処理を行い刺激側/健側の比を求めた. 各ラットの 5 切片について KCC2 陽性領域の刺激側/健側の平均値を求め、さらに各群のラットの平均値を求めることで最終的に各群の刺激側/健側比とした. この KCC2 陽性領域の刺激側/健側比の解析者は今回の研究目的を知らされずに測定を行った. 脊髄 I 層と II 層の判別にはラット脊髄の図解書²⁰を使用した (図 1).

図 1. ラット腰髄における脊髄 I 層, II 層の図解



The rat brain in stereotaxic coordinates²⁰ Figure 117 を改変. Lamina I : 脊髄 I 層. Lamina II : 脊髄 II 層.

【統計学的解析】

数値は平均値±標準誤差で表記した. 統計学的解析は Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いた. Mann-Whitney の U 検定を用いて検定を行い, 危険率 0.05 未満を統計学的に有意と判定した.

「実験 2 : 急性炎症痛における TrkB, BDNF, Iba1, IB4 の変化についての検討」

【急性炎症痛モデルの作成】

【組織の固定と凍結切片の作成】

前述のようにホルマリン注射を施行 (TrkB, BDNF, Iba1, IB4 各群 n=5) し, 腰髄横断凍結切片を作成, 収集した.

【免疫組織染色】

切り出した脊髄の浮遊切片を内因性ペルオキシダーゼ失活のために 0.3% 過酸化水素水加メタノール中で 30 分振盪させ、その後非特異的な抗原抗体反応を防ぐ目的で、0.3% Triton X 添加 0.01 M PBS（以下 PBST）に 3% ロバ血清（Chemicon International, Temecula, CA, USA）を加えた溶液中に浮かべ室温で 1 時間振盪しブロッキングした。次に、一次抗体としてニワトリ抗 TrkB 抗体（1:1000, Promega）、ニワトリ抗 BDNF 抗体（1:1000, Promega）、またはウサギ抗 Iba1 抗体（1:10000, 和光純薬工業）を含む 1% ロバ血清加 PBST 中で、4℃で一晩振盪し反応させた。PBST で洗浄した後、二次抗体であるビオチン標識ロバ抗ニワトリ IgG 抗体（1:200, Jackson Immuno Research Laboratories）、または Iba1 抗体を一次抗体とした場合ビオチン標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体（1:200, Jackson Immuno Research Laboratories）を含む 1% ロバ血清加 PBST 中で、室温で 1 時間反応させた。その後は実験 1 と同様の方法で染色、スライドグラス上に封入した。

IB4 の免疫組織染色の場合は前述の免疫組織染色と同様の手順でブロッキングを行い、ビオチン標識 IB4（1:200, Promega）を使用し反応させ、その後は実験 1 と同様の方法で染色、スライドグラス上に封入した。

【DAB 染色した各陽性領域の解析】

【統計学的解析】

実験 1 と同様の方法で施行、解析した。

「実験 3：急性炎症痛における BDNF, KCC2 と共発現している因子についての検討」

【急性炎症痛モデルの作成】

【組織の固定と凍結切片の作成】

前述のようにホルマリン注射を施行し、実験 1 と同様の方法で組織を固定、標本を O.C.T. compound に包埋し凍結させた後、蛍光免疫組織染色用に厚さ 15 μm の横断切片を作成し、0.01 M PBS 中に浮遊切片として収集した。

【蛍光免疫組織染色】

[BDNF と Iba1, KCC と TrkB の蛍光二重染色]

ホルマリン注射による BDNF と Iba1, そして KCC2 と TrkB の発現変化を解析するために、蛍光二重染色を行った。ホルマリンまたは生理食塩水を注入したラットの腰髄浮遊切片を 0.3% PBST に 3% ロバ血清を加えた溶液中に浮かべ室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体としてニワトリ抗 BDNF 抗体 (1:400, Promega) とウサギ抗 Iba1 抗体 (1:2,000, 和光純薬工業), またはニワトリ抗 TrkB 抗体 (1:400, Promega) とウサギ抗 KCC2 抗体 (1:2,000, Millipore) を含む 1% ロバ血清加 0.01 M PBST 中で、4℃で一晩振盪し反応させた。0.01 M PBST で洗浄した後、二次抗体として Cy3 標識ロバ抗ニワトリ IgG 抗体 (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories) と Cy2 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を含む 1% ロバ血清加 PBST 中で、遮光して室温で 1 時間反応させた。0.01 M PBS で洗浄後、スライドガラス上に配置し、封入剤として VectaShield (Vector Laboratories) を使用し封入した。

[BDNF と イソレクチン B4 の蛍光二重染色]

BDNF の脊髄後角浅層における発現を解析するために、BDNF と C 線維の標識であるイソレクチン B4 (IB4) の蛍光二重染色を行った。前述と同様の手順でブロッキングを行い、一次抗体はニワトリ抗 BDNF 抗体 (1:400, Promega) とフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識 IB4 (1:200, Promega) を使用し反応させ、前述の通りに洗浄した後 Cy3 標識ロバ抗ニワトリ IgG 抗体 (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用い二重染色を行った。

【蛍光顕微鏡による BDNF と Iba1 または IB4, KCC2 と TrkB の局在の解析】

急性痛刺激による脊髄後角での BDNF, Iba1, KCC2 の発現変化や BDNF と Iba1 または IB4, KCC2 と TrkB の共発現変化を解析するため、蛍光二重染色した切片を蛍光顕微鏡 (Olympus Model BX Research Photomicroscope, オリンパス) で観察した。各ラット標本から最もよい状態で染色された 1 切片を選択し、両側の脊髄後角を視野内に収めた状態で、BDNF の Cy3 染色 (赤色に染色される) と Iba1 の Cy2 染色 (緑色に染色される), または IB4 の FITC 染色 (緑色に染色される) を、それぞれデジタルカメラ (Olympus DP70 digital camera system, オリンパス) で撮影

し、付属のコンピュータシステムで各画像を合成した。細胞レベルでの共発現の有無については共焦点顕微鏡（FLUOVIEW FV1000-D, オリンパス）を用いて強拡大像で脊髄後角を撮影し、付属のコンピュータシステムで各画像を合成した。KCC2 の Cy3 染色と TrkB の Cy2 染色についても同様に撮影、合成を行った。

「実験 4：急性炎症痛における KCC2 と BDNF の mRNA 量の変化についての検討」

【急性炎症痛モデルの作成】

急性炎症痛における KCC2 と BDNF の mRNA 量の変化を確認するために、前述の方法で刺激群（n=2）、対照群（n=2）を作成した。

【In situ hybridization】

ラットを麻酔後、放血死させた。脊髄を取り出し、O.C.T. Compound（サクラファインテックジャパン）に包埋し液体窒素で凍結した。厚さ 16 μ m の凍結切片を作製し、シランでコーチティングしたスライドガラスに貼付けた。

用いたプローブは、rat Kcc2 (Slc12a) (NM_134363) の 911-955 と 2281-2325, rat Bdnf (NM_001270630) の 191-235 と 961-1005 に相補的なオリゴヌクレオチドである。このアンチセンスプローブを terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT; Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用し、³³P-dATP で標識した。ハイブリダイズした切片は、オートラジオグラフ用乳剤に浸漬させ、4℃で 8~12 週間露光させた。乳剤切片は現像後に、ヘマトキシリンで核染色を行い、暗視野と明視野で観察した。

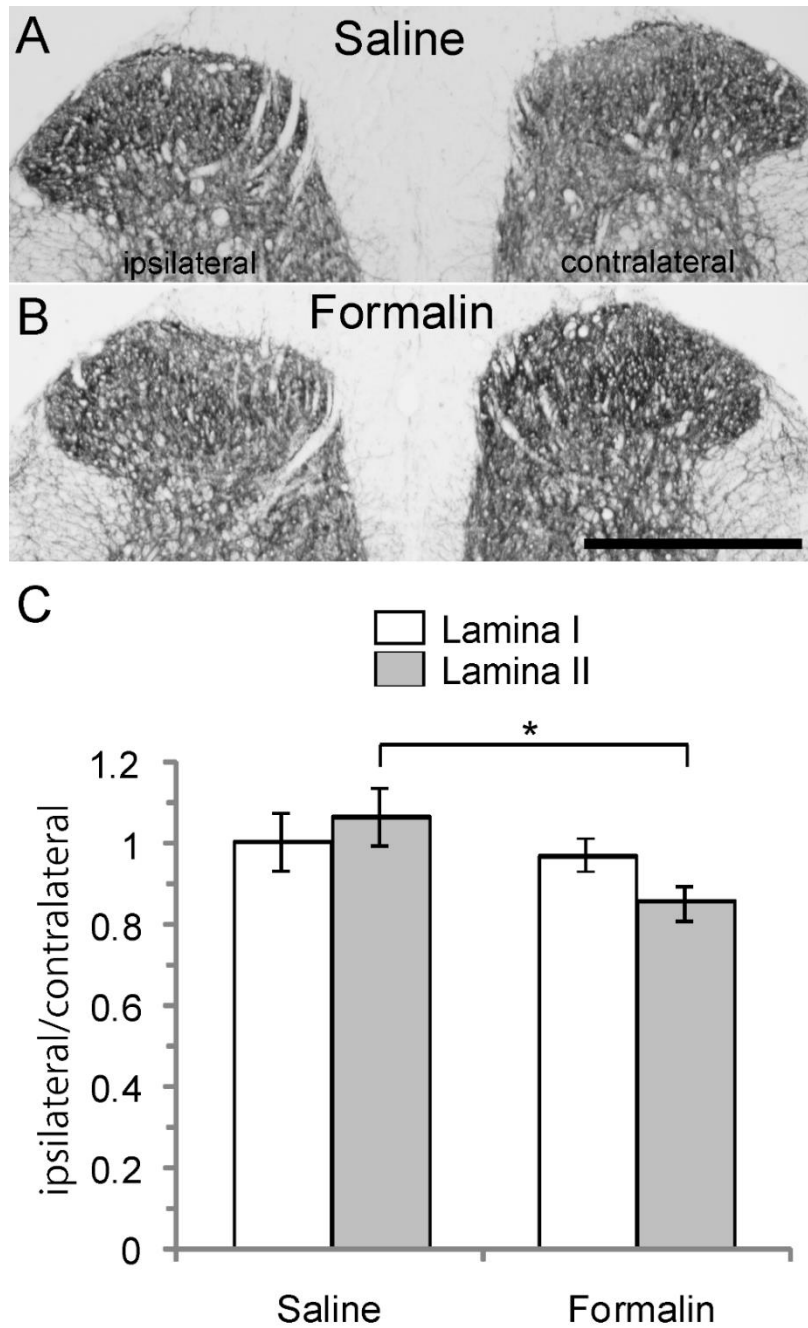
重複しないアンチセンスプローブを使用した in situ hybridization 法では、同じ陽性像を示した。特異性はさらに、アイソトープ無標識のプローブを大量に加えた時に、シグナルが消失することで裏付けられた。

実験結果

「実験 1」

ホルマリン注射によって KCC2 陽性領域が刺激側で有意に減少するかを検討した結果を図 2 に示す.

図 2. ホルマリン注射後の脊髄後角における KCC2 発現変化

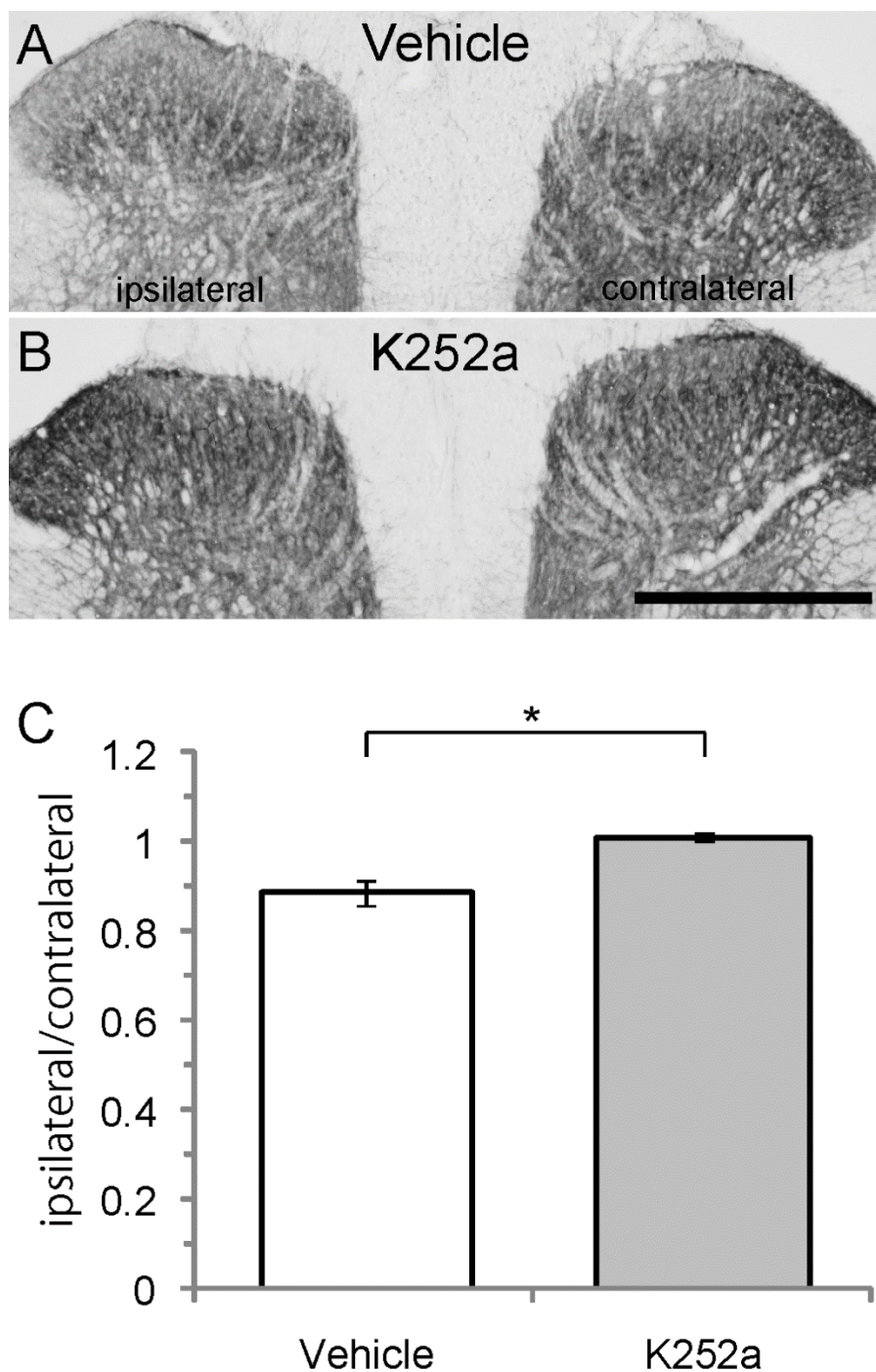


スケールは $500\mu\text{m}$. (図 2A, B). *: 対照群と比較して $P < 0.05$ で有意差あり. (図 2C). 各群 $n=5$.

過去の報告ではホルマリン注射の 5 分後に刺激側の脊髄後角 I , II 層の KCC2 発現量は健側に比べて有意に減少したとされているが, 実験 1 の結果では KCC2 陽性領域の変化は脊髄 II 層において最も大きく認められた (図 2A, B). 光学密度の定量化を行い刺激側/健側の KCC2 発現比を求めた結果, 脊髄 I 層での KCC2 の発現比はホルマリン注射群 (0.96 ± 0.04) と対照群 (1.01 ± 0.07) との間で有意な変化を認めなかったが, 脊髄 II 層での KCC2 の発現比はホルマリン注射群 (0.85 ± 0.05) において対照群 (1.07 ± 0.07) と比べて有意に減少していた (図 2C).

神経障害痛における KCC2 の発現減少には TrkB 受容体が関与しているという報告¹²があり, ホルマリン注射による急性痛においても TrkB 受容体の関与が存在しているのかを検討した. 我々は前述のホルマリン注射群で最も KCC2 発現変化の大きかった脊髄 II 層でホルマリン注射群とホルマリン注射+くも膜下 K252a 投与群における刺激側/健側の KCC2 発現比を比較した. その結果を図 3 に示す.

図 3. K252a による KCC2 発現減少の抑制



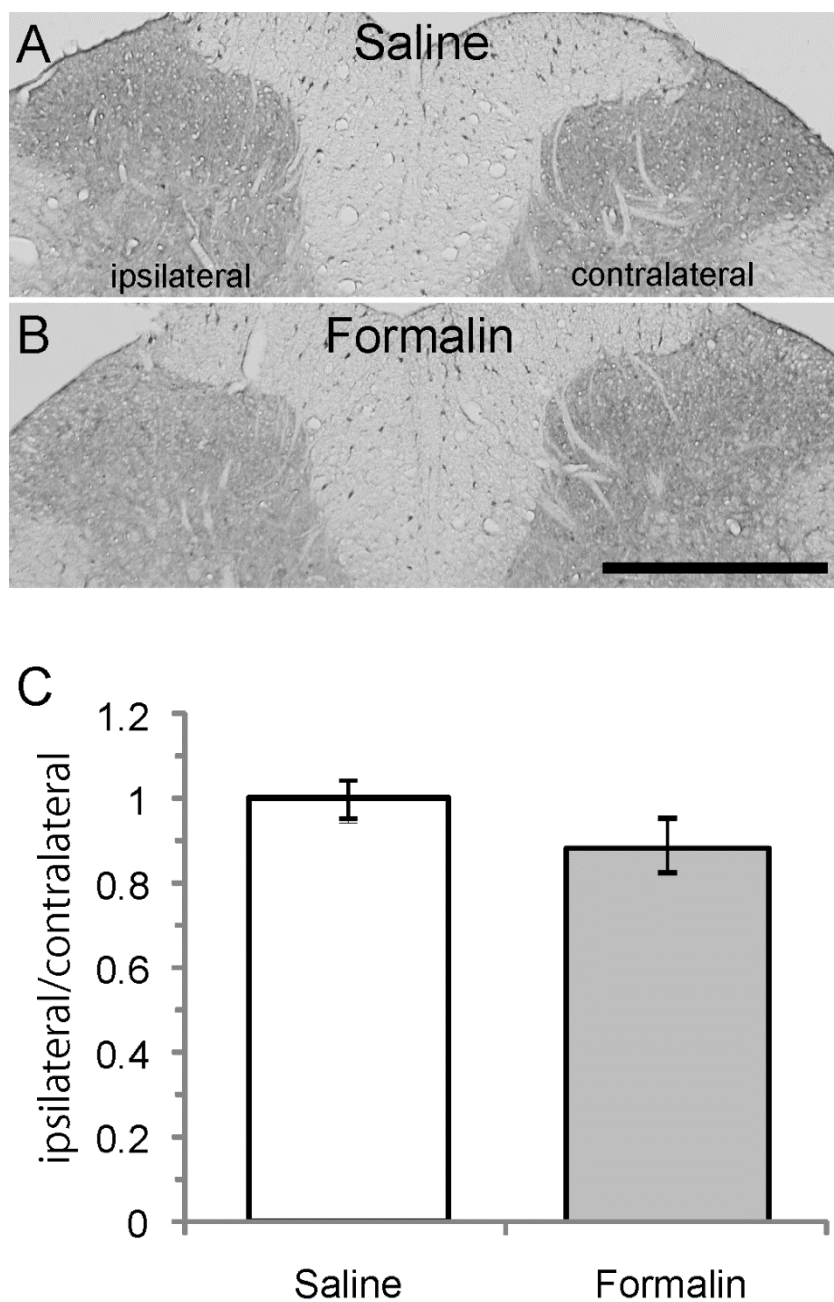
スケールは $500\mu\text{m}$. (図 3A, B). *: 対照群と比較して $P < 0.05$ で有意差あり. (図 3C). ホルマリン注射の 5 分後に TrkB 受容体拮抗薬の K252a くも膜下注入群 (1.01 ± 0.01) では対照群 (0.89 ± 0.04) と比べて有意に患側の KCC2 陽性領域の減少が抑制されていた (図 3A, B, C). 各群 $n=5$.

「実験 2」

実験 1 の結果によって、急性炎症痛においても BDNF によって TrkB 受容体を介した KCC2 の発現減少が生じている可能性が示された。神経障害痛においては活性化ミクログリアが BDNF の放出源であったが、C 線維もまた BDNF の放出源として考えられる。ホルマリン注射 5 分後の脊髄 II 層刺激側において BDNF や TrkB 受容体、そしてミクログリアや C 線維に変化が生じているのかを確認した。

ホルマリン注射によって TrkB 陽性領域の刺激側／健側比が変化するかを検討した結果を図 4 に示す。

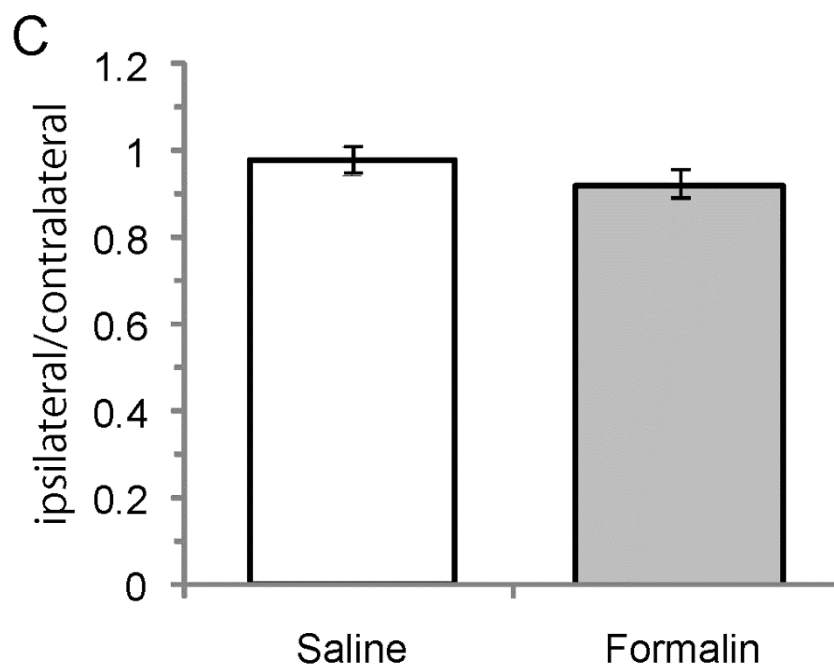
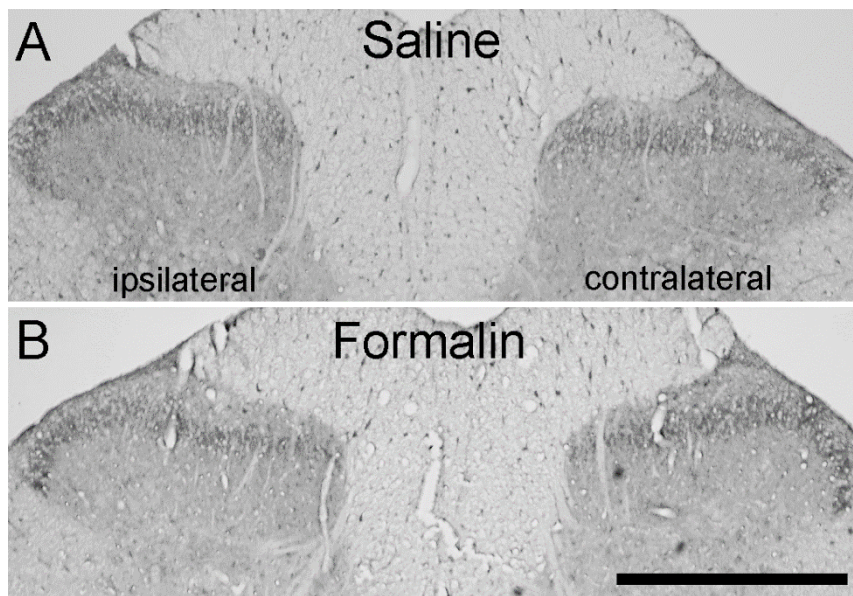
図 4. ホルマリン注射後の脊髄 II 層における TrkB 発現変化



スケールは $500\mu\text{m}$. TrkB 陽性領域はホルマリン注射群において刺激側で減少する傾向を示した (図 4A, B) が, 光学密度の定量化を行い刺激側/健側の TrkB 発現比を求めた結果, ホルマリン注射群 (0.89 ± 0.07) と対照群 (1.01 ± 0.05) との間で有意差は認められなかった (図 4C). 各群 $n=5$.

ホルマリン注射によって BDNF 陽性領域の刺激側／健側比が変化するかを検討した結果を図 5 に示す.

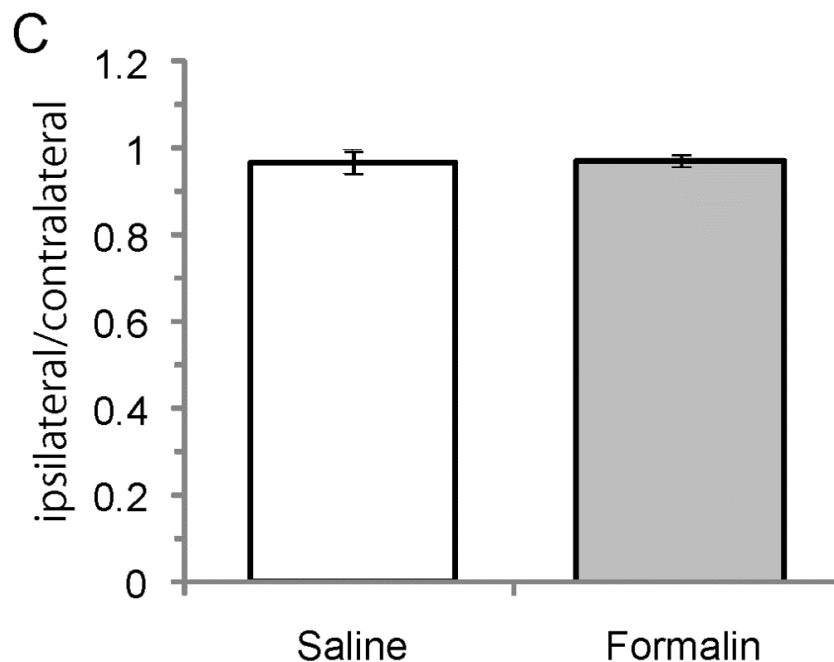
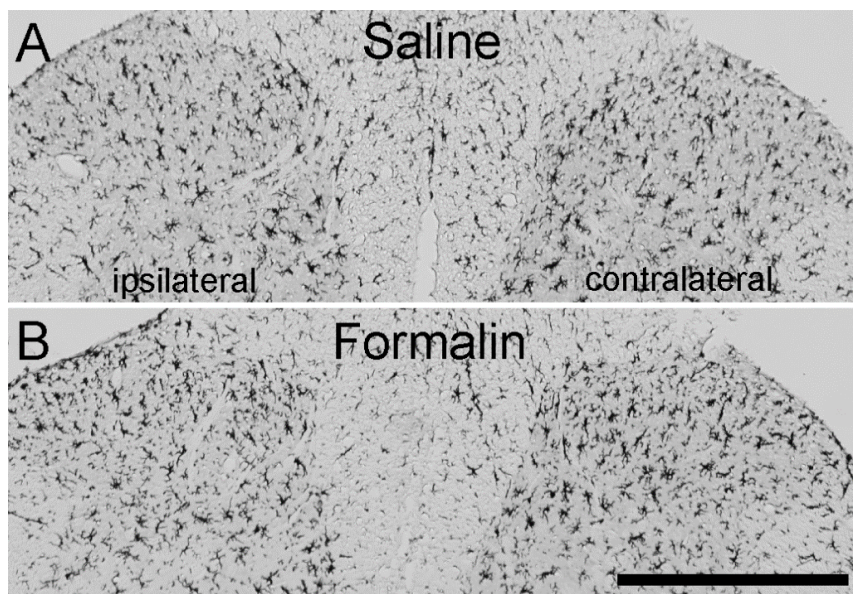
図 5. ホルマリン注射後の脊髓 II 層における BDNF 発現変化



スケールは $500\mu\text{m}$. BDNF 陽性領域は刺激側と健側, 対照群とも脊髓 II 層に多く観察されたが (図 5A, B), 刺激側／健側の発現比は注射群 (0.93 ± 0.04) と対照群 (1.00 ± 0.03) との間で有意差は認められなかった (図 5C). 各群 $n=5$.

ホルマリン注射によって Iba1 陽性領域の刺激側／健側比が変化するかを検討した結果を図 6 に示す.

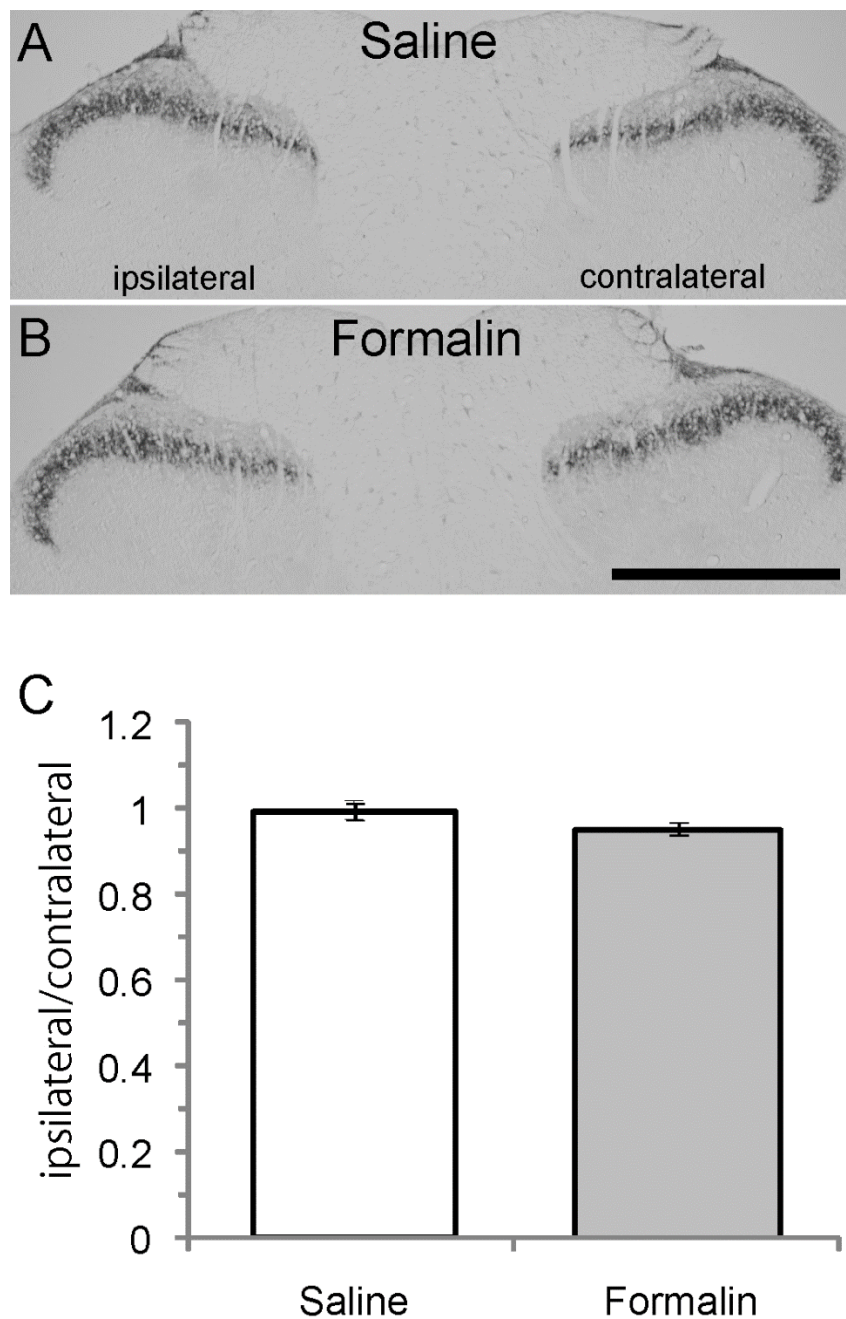
図 6. ホルマリン注射後の脊髄 II 層における Iba1 発現変化



スケールは $500\mu\text{m}$. 形態学的には注射群において刺激側, 健側の両方で活性化ミクログリアが増加しているように見えたが (図 6 A, B), Iba1 陽性領域の刺激側／健側の発現比は注射群 (0.98 ± 0.01) と対照群 (0.98 ± 0.03) との間で有意差は認められなかった (図 6C). 各群 $n=5$.

ホルマリン注射によって IB4 陽性領域の刺激側／健側比が変化するかを検討した結果を図 7 に示す.

図 7. ホルマリン注射後の脊髄 II 層における IB4 陽性領域の変化



スケールは $500\mu\text{m}$. IB4 陽性領域はほぼ脊髄 II 層に局限しており (図 7 A, B), 刺激側／健側の発現比は注射群 (0.96 ± 0.02) と対照群 (1.00 ± 0.02) との間で有意差は認められなかった (図 7C). 各群 $n=5$.

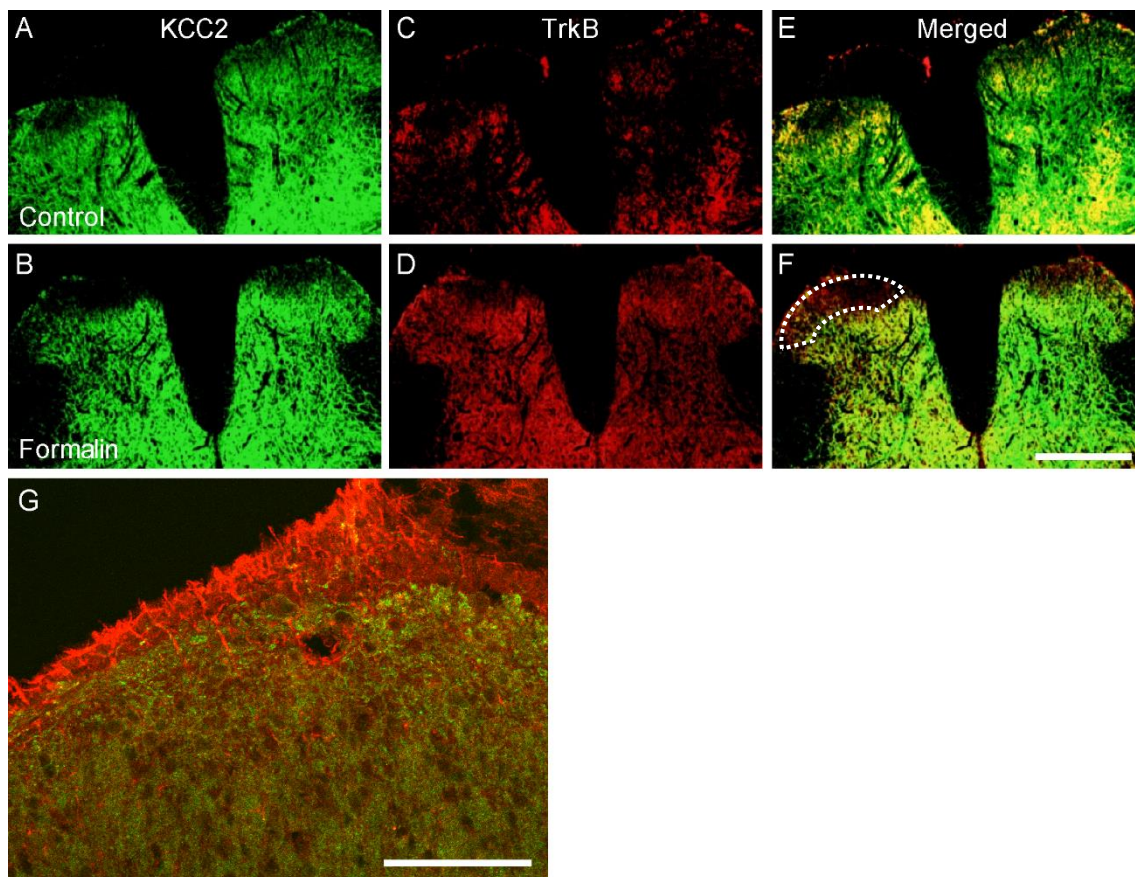
「実験 3」

実験 2 の結果では、ホルマリン注射による BDNF の放出を確認することは出来なかった。しかし BDNF 陽性領域は脊髄 II 層に多く存在していることから KCC2 の発現減少に BDNF が関与している可能性は否定しきれないと判断し、我々は BDNF の放出源についてさらなる検討を加えた。

実験 2 より視覚的にはホルマリン注射 5 分後であってもミクログリアは活性化している可能性が示唆されたが、刺激側／健側の発現比には有意差は認められなかった。また、IB4 陽性領域も脊髄 II 層にほぼ限局していることから C 線維が BDNF の放出源である可能性も考えられた。

まず KCC2 を発現している細胞が TrkB 受容体も発現していることを確認するため、KCC2 と TrkB の蛍光二重染色によってその局在を調べた結果を図 8 に示す。

図 8. ホルマリン注射による KCC2 と TrkB の発現変化

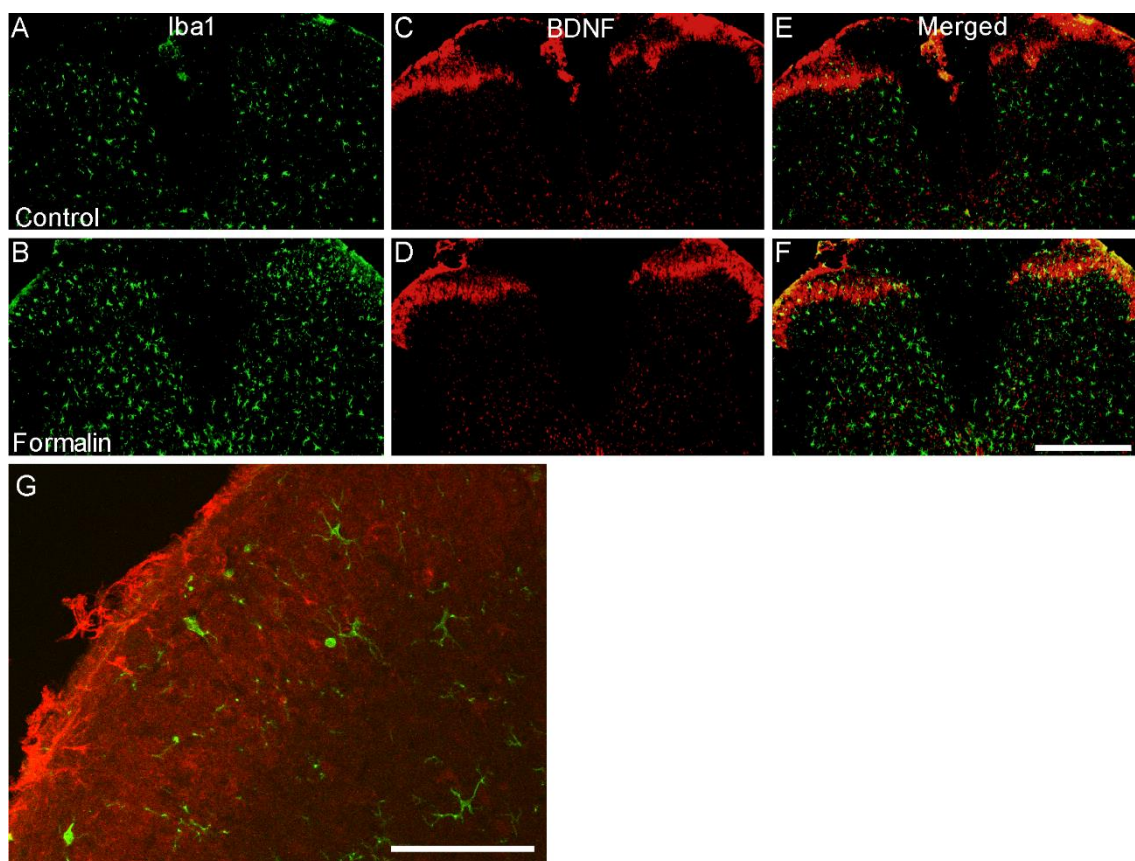


左が刺激側. 免疫染色によって脊髄灰白質の広範囲に KCC2 陽性細胞(緑)と TrkB 陽性細胞 (赤) が確認された (図 8A-D). 免疫二重染色によってホルマリン注射後に脊髄 II 層における KCC2 発現が刺激側で低下していることが確認された (図 8E, F. 点線で囲まれた部分がホルマリン注射側脊髄 II 層). 共焦点顕微鏡像では脊髄後角のほぼ全域において KCC2 と TrkB が共発現していることが示された (図 8G). 黄色に見える部分は TrkB (赤) と KCC2 (緑) が共発現している部分. スケールは A-F が $500\mu\text{m}$, G が $100\mu\text{m}$.

実験 1, 実験 2 で確認された結果と同様に, 脊髄灰白質の広範囲にわたって認められていた KCC2 陽性領域, TrkB 陽性領域がホルマリン注射により刺激側で KCC2 陽性反応が減弱した結果, 合成画像では対照群で認められる KCC2 と TrkB の共発現 (図 8E) が, ホルマリン注射群の刺激側脊髄 II 層で失われているように見えた (図 8F). また, 対照群の脊髄後角の共焦点顕微鏡による観察の結果, KCC2 と TrkB は脊髄後角細胞内に共発現していることが確認された (図 2G). これによって, KCC2 陽性細胞は TrkB 受容体を介した何らかの反応を示す可能性があることが確認された.

次に、BDNF の放出源を明らかにする目的で、BDNF と Iba1 の蛍光二重染色によってその局在を調べた結果を図 9 に示す。

図 9. ホルマリン注射による Iba1 と BDNF の発現変化



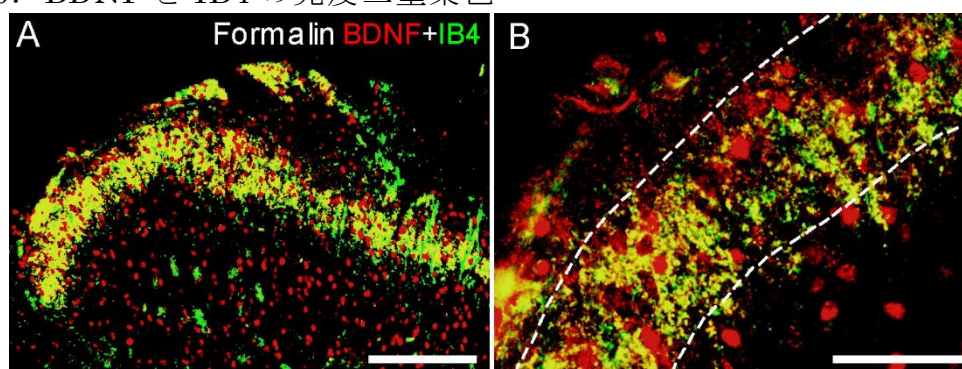
左が刺激側。免疫二重染色では Iba1 と BDNF が II 層でのみ共染色されたが、共焦点顕微鏡像では II 層においても Iba1 と BDNF は共発現していないことが示された。スケールは A-F が $500\mu\text{m}$ ，G が $100\mu\text{m}$ 。

実験 2 でもその傾向は認められていたが、ホルマリン注射群では対照群に比べて Iba1 陽性細胞（緑）が刺激側においても健側においても増加しているように見え、その Iba1 陽性細胞は形態学的にアメーバ状に変化していることから活性化したミクログリアである可能性が強く示唆された(図 9A, B)。対照群の BDNF 陽性反応（赤）は 2 種類のパターンが存在した。ひとつは脊髄 I, II 層以外の灰白質に広範囲に散在する点状の陽性反応であり、もうひとつは脊髄 II 層に一致して高密度に認められる陽性の範囲であった(図 9C)。この結果は過去の報告⁵と一致していた。ホルマリン注射群の BDNF 陽性反応の分布は対照群と同様であった(図 9D)。合成画像では対

照群においてもホルマリン注射群においても脊髄 II 層で Iba1 陽性反応と BDNF 陽性反応が共に認められたが、同一細胞に共発現しているかどうかは確認できなかった (図 9E, F). そこでホルマリン注射群の BDNF と Iba1 蛍光二重染色を共焦点顕微鏡で観察すると (図 9G), その活性化ミクログリアと思われる Iba1 陽性細胞は BDNF と共染性を示しておらず、ホルマリン注射群において Iba1 と BDNF は共発現していないという結果であった.

活性化ミクログリアが BDNF を発現していないが可能性を受けて、ホルマリン注射群で BDNF と IB4 の蛍光二重染色によってその局在を調べた結果を図 10 に示す.

図 10. BDNF と IB4 の免疫二重染色



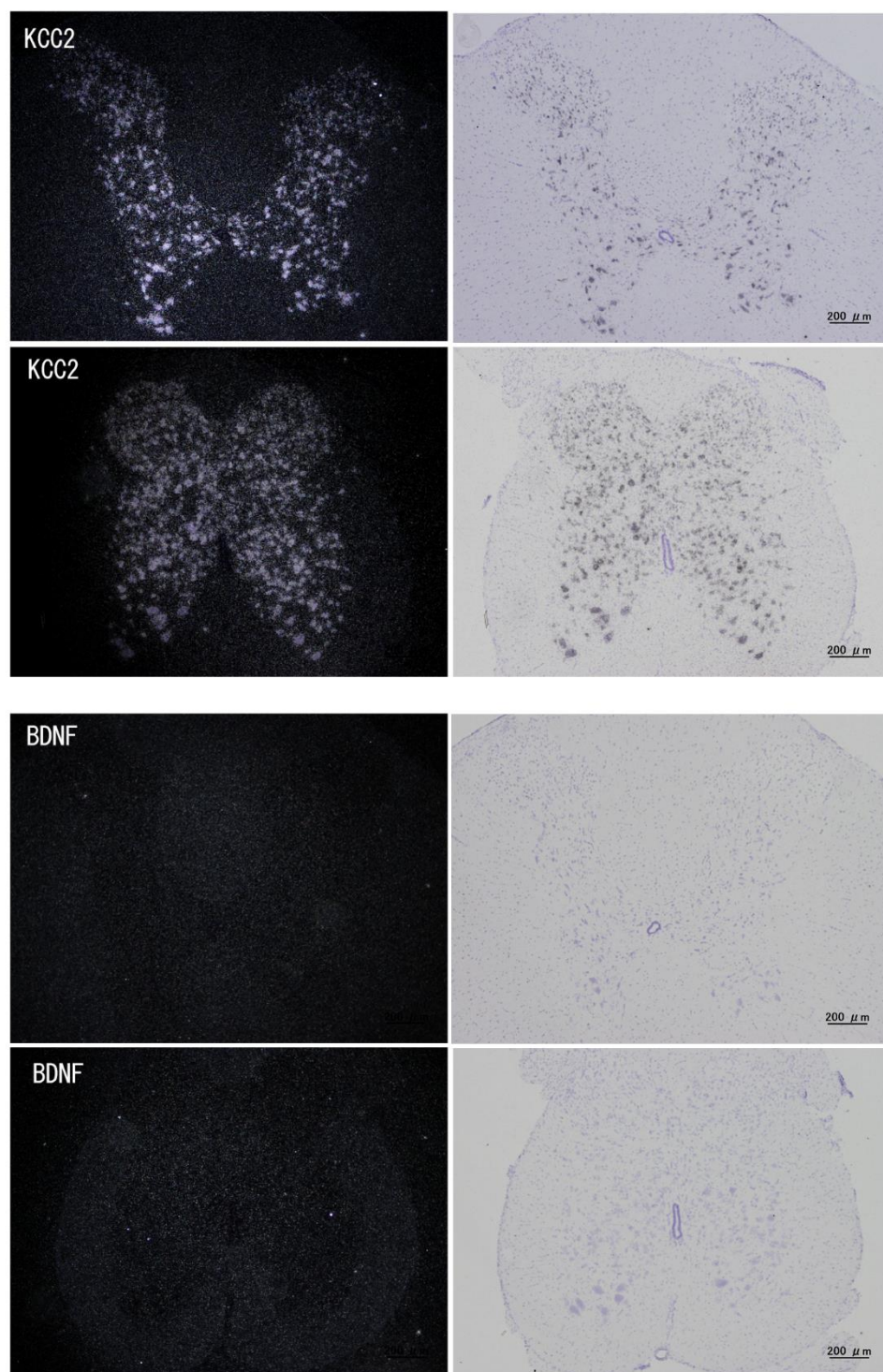
黄色に見える部分は BDNF (赤) と IB4 (緑) が共発現している部分. 破線で囲まれた部分が脊髄 II 層である (図 10B). スケールは A が $500\mu\text{m}$, B が $200\mu\text{m}$.

脊髄 II 層に C 線維のマーカである IB4 の陽性領域は高密度に認められ、これは BDNF 陽性領域に一致していた (図 10A). 強拡大像で確認したところ、BDNF 陽性領域のうち点状に広く分布している部分と IB4 は共発現しておらず、脊髄後角 II 層に高密度に認められた陽性範囲と IB4 が共発現していることが確認された. 破線で囲まれた部分が脊髄 II 層 (図 10B).

「実験 4」

これまでの結果から、急性炎症痛において BDNF が脊髄 II 層における KCC2 の発現減少を引き起こしている可能性が示唆された. しかしその評価は画像的解析のみであり、我々の仮説の証明にはより多角的な評価が必要と考えられた. そこで *in situ hybridization* 法を用い、ホルマリン注射による KCC2 と BDNF の mRNA 量の変化について調べた (図 11).

図 11. ホルマリン注射による KCC2 と BDNF の mRNA 量の変化



KCC2, BDNF とも上段が対照群, 下段がホルマリン注射群. スケールは $200\mu\text{m}$. KCC2, BDNF どちらもホルマリン注射によって mRNA の発現量に変化は認められなかった. 各群 $n=2$.

考察

今回の研究によって、ホルマリン注射による急性痛刺激は脊髄後角において TrkB 受容体を介して KCC2 を減少させている可能性が示唆されたが、その証明までには至らなかった。

過去の報告では、ホルマリン注射による急性炎症痛によって刺激側の脊髄 I, II 層の KCC2 発現は減少し、刺激側／健側の比はホルマリン注射前と比べて約 20%減少するとされている¹³。本研究でも実験 1 の結果ホルマリン注射によって脊髄浅層の KCC2 発現は減少しており、過去の報告を支持する結果となった。しかし我々の実験では脊髄浅層のうち最も外側に位置する I 層はホルマリン注射後も有意に KCC2 の発現は減少せず、主として KCC2 が変化したのは C 線維が多く含まれる II 層であった (図 2)。神経障害痛や関節痛などの慢性痛を対象として脊髄神経の過興奮について研究した報告^{10,21,22} では脊髄 I 層における検討が多いが、神経障害痛モデルで脊髄 II 層における GABA の抑制作用が減弱したという報告もある³。一方、完全フロイントアジュバントを用いた急性炎症痛の研究では脊髄 II 層で BDNF が興奮性シナプス後電流を増加させたと報告されている²³。脊髄浅層には痛み刺激によって神経の過興奮が生じるメカニズムが存在すると思われるが、急性炎症痛と慢性痛の間には同じ神経の過興奮であっても何らかの異なる作用機序が存在しており、それが主として反応する脊髄層の変化として表れている可能性が考えられた。

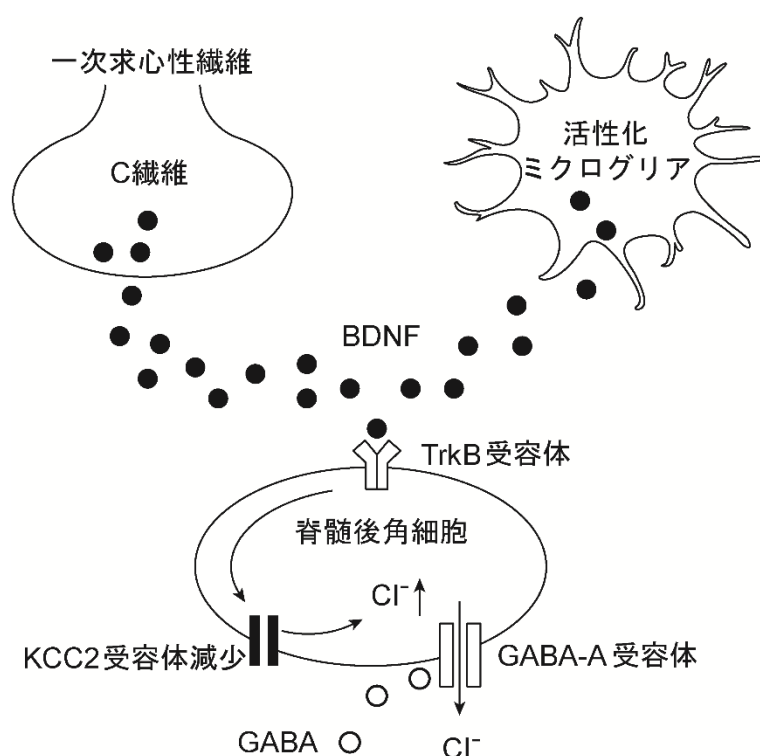
神経障害痛においてはミクログリアが痛覚過敏の主たる制御因子と考えられている。神経障害痛ではミクログリアが活性化し、活性化したミクログリアは BDNF を含む様々な神経伝達物質を放出するようになり²⁴、この BDNF は脊髄 I 層における GABA の抑制電流を逆転化させると報告されている¹¹。一方、神経障害痛では TrkB 受容体を介して KCC2 発現量が減少し、その結果 GABA の作用が逆転するという報告もある^{10,12}。TrkB 受容体は BDNF に高い結合親和性を示しているため、神経障害痛においては活性化ミクログリアから BDNF が放出され、その BDNF は TrkB 受容体を介して KCC2 発現を抑制し GABA の作用を逆転させることで痛覚過敏を引き起こしているのではないかと考えられる。

今回の研究においても、脊髄後角で KCC2 と TrkB が共発現していることが確認された (図 8)。さらにホルマリン注射によって脊髄後角の KCC2 発現は減少し (図 2)、この発現減少はキナーゼ阻害剤である K252a によって抑制された (図 3)。これらの結果は、神経障害痛と同様に急性の炎症痛

においても、BDNF が TrkB 受容体を介して脊髄後角の KCC2 発現を抑制する可能性を示唆している。この仮説を支持するものとして、BDNF が脊髄 II 層細胞の一次求心性線維からの伝達刺激に対する反応を増大させるという報告がある²⁵。以上から、BDNF が急性炎症痛において KCC2 発現減少に大きく寄与する因子のひとつであると考えた。また、KCC2 と TrkB 受容体は脊髄後角のほぼ全域において共発現しており、これは BDNF が脊髄後角細胞に TrkB 受容体を介して直接作用し KCC2 の発現減少を引き起こしている可能性を示唆しており、このため今回の結果や過去の報告¹³で観察されたように、痛み刺激から 5 分という短い時間で KCC2 の発現が減少するものと考えられる。

急性炎症痛において BDNF によって KCC2 の発現が減少する可能性が示唆されたことを受け、次に我々はこの BDNF の放出源を明らかにするための検討を行った。その結果考えられた仮説のシェーマを図 11 に示す。

図 11. GABA の作用逆転機序についての仮説



BDNF が TrkB 受容体を介して脊髄細胞の KCC2 受容体発現が抑制されると、細胞内クロールイオンの増加が生じ、受容体開口時のイオンの流れが逆転することで GABA の作用が抑制性から興奮性に変化する。

神経障害痛において BDNF の放出源は活性化したミクログリアであった (図 11 右). 今回の実験でも, ホルマリン注射後 5 分の時点で脊髄後角に活性化ミクログリアが観察されており (図 6), 急性炎症痛においてもミクログリアが BDNF の放出源である可能性も考えられたが, 過去の研究によると, ATP 刺激によるミクログリアの BDNF 産生を研究した報告ではそのピークは ATP 暴露後 60 分の時点であった²⁴. また, ノックアウトマウスを用いミクログリアの活性化を抑制し痛み行動の変化を研究した報告では, ホルマリン注射後 10 分までの痛み行動に有意差は認められなかった²⁶. 今回の実験のような痛み刺激後 5 分という時間では, ミクログリアは活性化出来ても BDNF を産生, 放出するまでには至っていないのではないかと考えられた. この仮説を裏付けるように, 今回の研究においても活性化ミクログリアのマーカーである Iba1 と BDNF の共発現を認めなかった (図 9G).

急性炎症痛における活性化ミクログリア以外の BDNF の放出源として, 我々は C 線維の可能性を考えた. 実験 3 での蛍光免疫染色で, BDNF は後角全域, 特に II 層に多く発現を認め (図 9D), これは外科的侵襲による BDNF の局在変化について研究した報告⁵の結果と一致していた. また, ホルマリン注射群において BDNF は IB4 と脊髄 II 層で共発現しており (図 10), これは脊髄後角の C 線維終末に BDNF が存在することを示している. 脊髄 II 層は無髄の一次求心性線維である C 線維が二次ニューロンと交通する領域であり, 刺激を受けた C 線維が二次ニューロンへシナプス伝達する際に放出される神経伝達物質のひとつが BDNF であるため^{27,28}, 脊髄 II 層には BDNF が豊富に認められたと考えられた. もし BDNF が直接脊髄 II 層のニューロンに作用して KCC2 の発現低下を引き起こしているのであれば, BDNF の放出源である C 線維は急性炎症痛の主たる制御因子足りうるのではないかと (図 11 左) と我々は考えた.

BDNF の mRNA がホルマリン注射群, 対照群とも検出量が少なかった理由を説明するものとして, C 線維終末が存在する脊髄後角には BDNF の mRNA は認められず, C 線維の核が存在する DRG から順行性に BDNF が輸送されて脊髄 II 層に貯蔵されているという過去の報告があげられる^{29,30}. ホルマリン注射によって脊髄後角で BDNF が産生されるのではなく, C 線維終末に貯蔵されていた BDNF が速やかに放出されることで, KCC2 の発現低下が引き起こされているのかもしれない. この仮説を支持するように, 一次求心性線維の電気刺激と脊髄後角での BDNF 放出についての研究において, BDNF 放出は電気刺激後 3 分で増加していた²⁸. 炎症刺激によって DRG において BDNF の mRNA が誘導されることが報告されており³¹, 今

後は急性炎症痛における DRG の変化についてのさらなる研究が必要であろう。

過去の報告においてもホルマリン注射 5 分後の時点では刺激側における KCC2 の mRNA 量は変化していなかった¹³。今回の我々の研究でも同様の結果であり（図 11）、急性炎症痛における KCC2 発現減少の機序を mRNA の変化から説明することは出来なかった。KCC2 の代謝回転は非常に速い周期で行われているという報告はあり³²、急性炎症痛における KCC2 の発現減少は KCC2 合成の減少ではなく分解の促進によるものである可能性は十分考えられる。

神経障害痛のような慢性痛において、活性化ミクログリアから始まる KCC2 の減少、GABA の作用逆転という機序の解明は、難治性と言われる神経障害痛の治療法確立に新たな道筋を示したものと考えられている。今回の研究は、急性炎症痛において C 線維への刺激による BDNF の放出が TrkB 受容体を介して KCC2 の発現減少を引き起こす可能性を示した。それはすなわち急性炎症痛においても神経障害痛と同様に GABA の作用逆転が痛みの発生に関与している可能性を示しており、今回の研究は、急性の炎症痛の治療において新たな戦略が見つけられる可能性を示唆したと考えている。

今回の研究の限界としては、まず行動学的検討を行っていない点が挙げられる。過去のホルマリン注射による痛み行動の変化についての研究では、第 2 相とよばれる注射後 5 分以降の遅い時間帯でのみ BDNF が痛み行動に影響を与えたという報告や³³、第 2 相の時間帯では GABA の阻害剤が痛み行動を抑制したという報告が存在する³⁴。これらの報告は今回の我々の研究結果によって説明が付けられず、急性痛における KCC2 と痛み行動の関係や GABA の作用に対する影響についてはホルマリン注射 5 分後以外における変化の確認も含めさらなる研究が必要であると考えられた。また、今回我々が行った物質の局在変化についての研究では KCC2 のタンパク量についての定量的評価を始め、痛み刺激による活性化ミクログリアの増加も細胞数計測による統計学的検討を加えていないため、急性炎症痛における BDNF の放出源が活性化ミクログリアであるのか、C 線維であるのかの証明が困難であった。我々が立てた仮説を立証するためには DRG における BDNF の mRNA 量変化を含めたさらなる研究を行う必要がある。

総括及び結論

『本研究から得られた新知見』

- ・ ラット足底へのホルマリン注射後 5 分で脊髄 II 層の KCC2 陽性領域が減少すること.
- ・ キナーゼ阻害剤 K252a の投与により, ホルマリン注射における KCC2 陽性領域の減少が抑制されること.
- ・ KCC2 と TrkB は脊髄後角において共発現していること.
- ・ ラット足底へのホルマリン注射後 5 分では活性化ミクログリア上に BDNF は共発現していないこと.

『新知見の意義』

急性炎症痛における痛み増強のメカニズムには不明な点も多かった. 今回, 我々の知見により, 急性炎症痛においても神経障害痛と同様に BDNF が KCC2 発現を減少させ痛みの増強を引き起こしている可能性が示唆された. また, 神経障害痛において BDNF の放出源である活性化ミクログリアが, 急性炎症痛では BDNF の放出源ではない可能性も示唆された.

『今後の研究展開』

まず, 急性炎症痛における KCC2 のタンパク量減少について定量的評価を用いて確認する. そして, TrkB 受容体に対する選択性の高い阻害剤を用い KCC2 の発現減少における BDNF の影響を調べる. また, 行動学的評価を行い急性炎症痛における KCC2 の発現変化が実際の痛み行動に影響を与えているか確認する必要がある. その上で BDNF の放出源についての研究のため, ホルマリン注射 5 分後におけるミクログリアの活性化や DRG の C 線維核における BDNF 産生の変化について検討を加えていく必要があると考える.

『今後の課題』

ラットへのホルマリン注射による急性炎症痛モデルは注射後 5 分~10 分程度までの時期であり, その後は神経障害痛のモデルとなることから, 急性炎症痛モデルの作成時に神経障害痛モデルが混入するリスクが常にある. そのため, 急性炎症痛の研究にホルマリン注射を使用することは最適ではないのかもしれない. しかし, ラットへのホルマリン注射による痛み研究は歴史が長く, 現在までに多くの知見が得られている. 今後, 急性炎症痛モデルにおいての研究が進むことで, 痛みの増強機構の全貌を解明していくことが可能になると考える.

謝辞

本学位論文を作成するにあたり，研究の諸端を与えてくださり，多大なるご支援を頂いた侵襲制御医学講座・森本 裕二教授に心より感謝致します．また直接の御指導御鞭撻を賜りました橋本 聡一先生，加藤 亮子先生，加藤 類先生，内田 洋介先生，長谷 徹太郎先生に厚く御礼申し上げます．そして実験について多くのご助言とご協力を頂いた解剖学講座組織解剖学分野・岩永 敏彦教授に深く感謝致します．実験に御協力頂いた侵襲制御医学分野，組織解剖学分野の皆様の御理解と御厚意に感謝いたします．

また，本研究中ラットに対するアナフィラキシーを発症した際，救命頂いた北海道大学病院救急部の方々の御尽力に対して厚く御礼申し上げます．

引用文献

1. D'Mello, R. & Dickenson, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* 101, 8-16 (2008).
2. Woolf, C.J. & Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-1769 (2000).
3. Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H. & Woolf, C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci.* 22, 6724-6731 (2002).
4. Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T. & Noguchi, K. Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA_A receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain* 78, 13-26 (1998).
5. Li, C.Q., Xu, J.M., Liu, D., Zhang, J.Y. & Dai, R.P. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to the pain hypersensitivity following surgical incision in the rats. *Mol. Pain.* 4, 27 (2008).
6. Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. & Kaila, K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255 (1999).
7. Wang, C., Shimizu-Okabe, C., Watanabe, K., Okabe, A., Matsuzaki, H., Ogawa, T., Mori, N., Fukuda, A. & Sato, K. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 139, 59-66 (2002).
8. Morales-Aza, B.M., Chillingworth, N.L., Payne, J.A. & Donaldson, L.F. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol. Dis.* 17, 62-69 (2004).
9. Pathak, H.R., Weissinger, F., Terunuma, M., Carlson, G.C., Hsu, F.C., Moss, S.J. & Coulter, D.A. Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 14012-14022 (2007).
10. Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., S  k, A., De Koninck, P. & De Koninck, Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic

- pain. *Nature* 424, 938-942 (2003).
11. Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W. & De Koninck, Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021 (2005).
 12. Miletic, G. & Miletic, V. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain* 137, 532-539 (2008).
 13. Nomura, H., Sakai, A., Nagano, M., Umino, M. & Suzuki, H. Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neurosci. Res.* 56, 435-440 (2006).
 14. Wu, L.A., Huang, J., Wang, W., Wang, W., Wang, X.J. & Wu, S.X. Down-regulation of K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 in mouse medullary dorsal horn contributes to the formalin-induced inflammatory orofacial pain. *Neurosci. Lett.* 457, 36-40 (2009).
 15. Galan, A. & Cervero, F. Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience* 133, 245-252 (2005).
 16. Zhang, W., Liu, L.Y. & Xu, T.L. Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152, 502-510 (2008).
 17. Zhao, J., Seereeram, A., Nassar, M.A., Levato, A., Pezet, S., Hathaway, G., Morenilla-Palao, C., Stirling, C., Fitzgerald, M., McMahon, S.B., Rios, M., Wood, J.N. & London Pain Consortium. Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 539-548 (2006).
 18. Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. & Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17 (1992).
 19. Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G. & Eschalier, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 32, 197-200 (1994).
 20. George, P. & Charles, W. *The rat brain in stereotaxic coordinates.*

Academic Press. San Diego, 1986.

21. Almarestani, L., Waters, S.M., Krause, J.E., Bennett, G.J. & Ribeiro-da-Silva, A. De novo expression of the neurokinin 1 receptor in spinal lamina I pyramidal neurons in polyarthritis. *J. Comp. Neurol.* 514, 284-295 (2009).
22. Prescott, S.A., Sejnowski, T.J. & De Koninck, Y. Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Mol. Pain.* 2, 32 (2006).
23. Matayoshi, S., Jiang, N., Katafushi, T., Koga, K., Furue, H., Yasaka, T., Nakatsuka, T. & Zhou, X.F. Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat. *J. Physiol.* 569, 685-695 (2005).
24. Trang, T., Beggs, S. & Salter, M.W. Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers. Arch.* 452, 645-652 (2006).
25. Garraway, S.M., Petruska, J.C. & Mendell, L.M. BDNF sensitizes the response of lamina II neurons to high threshold primary afferent inputs. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2467-2476 (2003).
26. Jha, M.K., Jeon, S., Jin, M., Lee, W.H. & Suk, K. Acute phase protein lipocalin-2 is associated with formalin-induced nociception and pathological pain. *Immune. Netw.* 13, 289-294 (2013).
27. Lever, I.J., Bradbury, E.J., Cunningham, J.R., Adelson, D.W., Jones, M.G., McMahon, S.B., Marivizón, J.C. & Malcangio, M. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J. Neurosci.* 21, 4469-4477 (2001).
28. Lever, I.J., Cunningham, J., Grist, J., Yip, P.K. & Malcangio, M. Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1169-1174 (2003).
29. Conner, J.M., Lauterborn, J.C., Yan, Q., Gall, C.M. & Varon, S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.* 17, 2295-2313 (1997).
30. Zhou, X.F. & Rush, R.A. Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons.

- Neuroscience* 74, 945-953 (1996).
31. Mannion, R.J., Costigan, M., Decosterd, I., Amaya, F., Ma, Q.P., Holstete, J.C., Ji, R.R. & Acheson, A. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9385-9390 (1999).
 32. Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipila, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saama, M. & Kaila, K. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci.* 24, 4683-4691 (2004).
 33. Thompson, S.W., Bennett, D.L., Kerr, B.J., Bradbury, E.J. & McMahon, S.B. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7714-7718 (1999).
 34. Kaneko, M. & Hammond, D.L. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 928-938 (1997).