

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20026

研究課題名(和文)ミトコンドリアの fission・fusion が神経障害性疼痛に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Inhibition of Mitochondrial Fission Protein Reduced Mechanical Allodynia and Suppressed Spinal Mitochondrial Superoxide

研究代表者

神田 浩嗣 (KANDA, Hirotugu)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00550641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの分裂は神経細胞の構造と機能の維持に重要である。HIVに関連した神経障害性疼痛のメカニズムは、ほとんど解明されていない。今回の研究によりHIVに関連した神経障害性疼痛の病態発生にミトコンドリアの分裂が重要な役割を担っていることを示した。本研究のデータより、HIV蛋白のgp120によって引き起こされた神経障害性疼痛においてミトコンドリアの分裂を抑制することで疼痛が軽減されることが明らかとなった。このことは、HIV患者の慢性疼痛を治療する新しいアプローチの確証となる。

研究成果の概要(英文)：In summary, mitochondrial division is critical for the maintenance of the structure and function of neurons. Although the mechanisms underlying HIV-related neuropathic pain are poorly understood, the current results provide important insights into the pathogenesis of mitochondrial division in the HIV-related neuropathic pain state.

研究分野：麻酔科・疼痛管理

キーワード：神経障害性疼痛 ミトコンドリア 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経障害性疼痛モデルは数多く報告されている。部分的神経損傷モデルは、Bennett によって考案された絞扼性神経損傷モデル (Pain 1988;33:87-107)、Chung によって修飾が加えられた脊髄神経結紮モデル (Pain 1992;50:355-363) が代表的である。また、Streptozocin を用いた糖尿病性神経障害性疼痛モデル、HIV 関連神経障害性疼痛モデルを用いた研究等が行われている。本研究では広く神経障害性疼痛の研究分野で用いられている絞扼性神経損傷モデルを用いることとした。

(2) ミトコンドリアから産生される活性酸素が神経障害性疼痛に影響を与えることが知られている。また、Bailey らは、活性酸素がミトコンドリアの生合成、細胞内輸送、fusion(融合)と fission などの動的変化を抑制すると報告した (Free Radic Res;37:585-596)。ミトコンドリアが細胞内で活性酸素を産生する際、fission を繰り返しその個体数を増加させ活性酸素の産生を増加させていることが示唆されている(図 1 参照)。すなわち、生体内における活性酸素の産生とミトコンドリアの fission あるいは fusion による個体数の増減は相互にバランスを保っており、この機構の破綻が神経障害性疼痛発症の要因になっていると推測することができる。

2. 研究の目的

(1) 神経障害性疼痛は、難治性の疼痛であり様々な治療が試みられているが有効な方法は確立されていない。また、現在に至るまで数多くの研究がなされているが、その詳細は明らかになっていない。本邦の超高齢化に伴い神経障害性疼痛を有する患者の数は増加の一途を辿ることが予想される。本疾患のメカニズムを分子生物学的に解明し有効な治療法を究明することが求められる。本研究の目的は、神経障害性疼痛モデルラットに対してアンチセンス法を用いた遺伝子導入を行いミトコンドリアの fission(分裂)を抑制し、その治療の有効性、ミトコンドリアより産生される活性酸素 (reactive oxygen species;ROS) とその下流シグナルと考えられている pCREB と pC/EBP、更には GABA 作動性抑制系へ与える影響を Western Blotting, 免疫染色法を用いて解明することである。また、同様に活性酸素のスキャベンジャーである phenyl-N-tert-butyl nitrone(PBN) をくも膜下に投与し機械的アロディニアが減弱する

かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 絞扼性神経損傷モデルを作成し、アンチセンスオリゴを用いた遺伝子導入を行いミトコンドリアの fission を触媒する Drp1 の発現を抑制させる。遺伝子導入前後の機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応を von Frey フィラメントと Hot plate テストを用いて評価する。同様の遺伝子導入を行い、ミトコンドリアより産生される活性酸素の脊髄後角における発現と局在を活性酸素マーカーである MitoSox Red を用いた免疫染色法、さらに pCREB と pC/EBP の発現と局在を 1 次抗体・2 次抗体を用いた免疫染色法で解析する。遺伝子導入後の GABA 作動性抑制系への影響を調べる為、GAD(Glutamic Acid Decarboxylase)67 の発現量を Western Blotting 法で解析する。

本研究では、当初予定していた絞扼性神経損傷モデルでの動物行動学データが安定しなかった為、神経障害性モデルとして HIV 関連神経障害性疼痛モデルを用いた。

4. 研究成果

ミトコンドリアの Fission は、ミトコンドリアの構造と機能の維持に重要な役割を持つ。今回の研究で、我々は以下について示した。

- (1) gp120 投与による疼痛モデルにおいて、くも膜下投与アンチセンス Drp1 と mdivi-1 の両方で、機械的アロディニアが減少した(図 1)。
- (2) 脊髄の Drp1 の発現は、アンチセンス Drp1 のくも膜下投与によって減少した(図 2)。
- (3) くも膜下投与 PBN は、gp120 疼痛モデルの機械的アロディニアを減弱した(図 3)。
- (4) 脊髄後角のミトコンドリアのスーパーオキシドは、アンチセンス Drp1 もしくは mdivi-1 のくも膜下投与によって抑制された(図 4)。

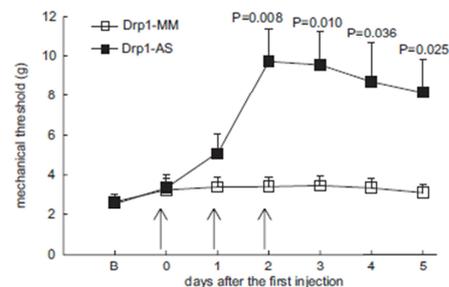


図1 アンチセンスDrp1をくも膜下に投与すると、機械的アロディニアが減少した。

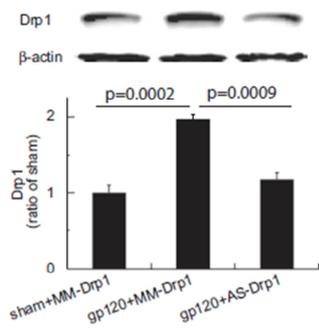


図2 脊髄のDrp1の発現は、アンチセンスDrp1のくも膜下投与によって減少した。

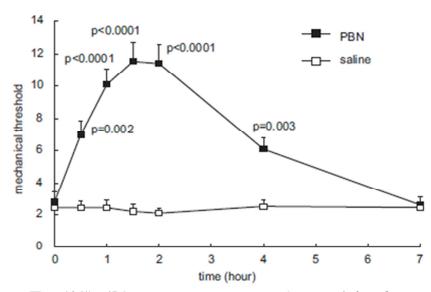


図3 くも膜下投与phenyl-N-tert-butyl-nitronelは、gp120疼痛モデルの機械的アロディニアを減弱した。

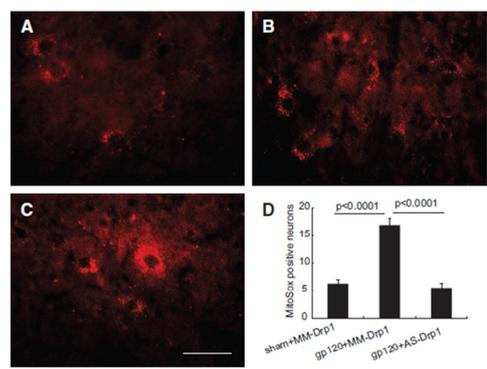


図4 脊髄後角のミトコンドリアの活性酸素は、アンチセンスDrp1も膜下投与によって抑制された。

Drp1 は、Dynamin GTPase superfamily のひとつである。Drp1 は、主に細胞質に存在するが、ミトコンドリアの Fission の際には細胞質からミトコンドリアの Fission の場所の予想される場所まで移動する。加えて、ミトコンドリアの数、形態、動態を制御することは、様々なミトコンドリアの機能を維持するうえで重要である。しかしながら、過度の Fission もしくは fusion がミトコンドリアの機能にどう影響するかは不明である。ばらばらになったミトコンドリアが存在する細胞では、ミトコンドリアの Ca²⁺イオンの取り込みとミトコンドリア内の Ca²⁺イオンの拡散は減弱していることが報告されており、このことはミトコンドリアの Fission と fusion の不均衡が正常な Ca²⁺イオンの恒常性を壊すことを示唆している。ミトコンドリアの fission による破片は、高グルコースが引き

起こす ROS の過剰生産に必要なコンポーネントである。つまり、高グルコース状態に曝される際、ミトコンドリアの fission を阻害することは周期的な ROS(reactive oxygen species) 産生の変動を妨げるということである。最近の報告では、結果として ROS 産生を引き起こすミトコンドリアの Ca²⁺イオン取り込みが、慢性疼痛のシナプス可塑性に重要であることが示されている。酸化ストレスは、多くの複雑かつ相互に関連するシグナル伝達を活性化する。ROS は脊髄の感作に関連する。過去の報告が、フリーラジカルが慢性疼痛のメディエーターとして関連することを示している。慢性疼痛の病理発生学的には、ミトコンドリアの酸化ストレスは、多くの複雑に相互に関連するシグナル伝達の活性化を引き起こす。さらに、さまざまな痛みのモデルにおいて、ROS の蓄積は、主として脊髄後角の神経細胞のミトコンドリアで認められている。ROS スカベンジャーの明らかな鎮痛作用は、カプサイシンによって引き起こされた 2 次的な感覚過敏のモデルで報告されている。ミトコンドリアの酸化リン酸化より産生されたスーパーオキシドは、神経細胞の ROS のほとんどを占める。カプサイシンによって引き起こされた痛みのモデルは、ROS の活動部位を明らかにするよいモデルである。ROS スカベンジャーによる鎮痛作用は、カプサイシンによって引き起こされた 2 次的感覚過敏のモデルで認められており、このことは ROS が脊髄に関連することを示している。最近の報告では ROS は神経障害性疼痛の進行と維持に関連することが示されている。HIVgp120 は、ROS の始動と変異に関連している。ミトコンドリアの fission は ROS の過剰生産に欠かせない可能性がある。今回の報告では、Drp1 によって制御されている脊髄ミトコンドリアの fission の機能の阻害が神経障害性疼痛と、ミトコンドリアのスーパーオキシドを減少させた。このことはミトコンドリアの fission が、HIVgp120 によって引き起こされた神経障害性疼痛に重要な役割があることを示す。Fusion を阻害することと、fission を促進させることにより、酸化ストレスがミトコンドリアの断裂を引き起こすことは報告されている。Kim らは、ミトコンドリアの断片と培養したメラノサイトとメラノーマ細胞で ROS 産生が増加することと、ROS の伝達経路を介してミトコンドリアがメラニン形成を調節している可能性を報告している。過酸化水素の後足底部への皮下注射は、機械的アロディニアを引き起こ

し、そしてそれは mdivi-1 の皮下投与による前処置により抑制される。しかしながら、in vitro の研究で、ラットの原始海馬細胞の培養において、mdivi-1 は酸化ストレスを減少させ、細胞のアポトーシスを減衰させることが報告されている。Drp1 がミトコンドリアの ROS 産生に欠かせないという更なる根拠として、Drp1 と P110 が共に見られる点である。P110 は、新規的な選択的ペプチドであり、Drp1 酵素活性の阻害薬で、P110 もミトコンドリアの fission を阻害し、そしてそれはミトコンドリアが断裂し ROS が産生されることを抑制し、ミトコンドリアの膜電位を強化し、ミトコンドリアの整合性を高める。ミトコンドリアの fission は、てんかん発作の後に増加し、mdivi-1 によりミトコンドリアの fission を阻害すると有意に発作後の酸化ストレスと神経細胞の減少を抑制する。今回の研究で、Drp1 タンパクのノックダウンと mdivi-1 によるミトコンドリアの fission 機能の抑制により、gp120 によって引き起こされた痛みのモデルで、脊髄ミトコンドリアのスーパーオキシドが減少することを発見した。このことはミトコンドリアの fission とそれに続く ROS 産生が慢性痛に関連するということを示している。

<引用文献>

Bailey SM. 文 A review of the role of reactive oxygen and nitrogen species in alcohol-induced mitochondrial dysfunction. Free Radic Res. 2003 Jun;37(6):585-96.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kanda H, Liu S, Iida T, Yi H, Huang W, Levitt RC, Lubarsky DA, Candiotti KA, Hao S Inhibition of Mitochondrial Fission Protein Reduced Mechanical Allodynia and Suppressed Spinal Mitochondrial Superoxide Induced by Perineural Human Immunodeficiency Virus gp120 in Rats. Anesth Analg. 2016 Jan;122(1):264-72.

doi: 10.1213/ANE.0000000000000962.

Onodera Y, Kanao-Kanda M, Kanda H, Sasakawa T, Iwasaki H, Kunisawa T. Pregnancy suppresses neuropathic pain induced by chronic constriction injury

in rats through the inhibition of TNF- . J Pain Res. 2017 Mar 8;10:567-574.

doi: 10.2147/JPR.S121810.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神田浩嗣 (KANDA, Hirotsugu)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：00550641

(2)研究協力者

飯田高史 (IIDA, Takafumi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：40468442

神田恵 (KANDA, Megumi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：50516820

Hao Shuanglin (Hao, Shuanglin)
University of Miami ·
Research Assoc. Professor