

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04113

研究課題名(和文) 傷害一次感覚ニューロンのコネクトーム解析による脊髄後角疼痛伝達異常の解明

研究課題名(英文) Aberrant axo-axonic synaptic reorganization in the calcium channel subunit alpha2 delta-1/L1-CAM-containing central terminals of injured c-fibers in the spinal cord of a neuropathic pain model

研究代表者

野口 光一 (Noguchi, Koichi)

兵庫医科大学・医学部・学長・教授

研究者番号：10212127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経傷害性疼痛モデルにおいて、損傷C線維終末での形態的な変化はL1-CAMという細胞間接着因子陽性の肥大したvaricosityとして捉える事ができた。変化したL1-CAM陽性終末では、L1-CAMそのもののリン酸化と疼痛治療薬であるpregabalinの標的分子である  $\alpha 2 - 1$  の共存した集積を認めた。また3次元的に得た画像を基にL1-CAM陽性終末とシナプス終末・樹状突起間のシナプスを定量的に解析した結果、L1-CAM陽性の損傷 C線維は、新たにシナプスの接着を作っている事が解った。これらの変化は疼痛治療薬であるpregabalinの投与で阻害される事が解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は難治性疼痛である神経傷害性疼痛のメカニズムとして可視化できるシナプス結合様式の変化を想定できた事に学術的な意義をもつ。また形態変化の現場に発現する再生・形態変化関連の分子を治療戦略ターゲットをとして研究対象とする事で、対象とする分子群を想定できる。また、in vitroの実験系でも形態変化のアクセシが可能となることから、in viroからの還元できる実験系を豊富に想定できる事になる。本研究が目指した形態変化と疼痛の関連を明らかにできれば新たな治療・創薬などの可能性を広げる社会的意義を持つと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the synchronized alterations in  $\alpha 2 - 1$ , L1-CAM and phosphorylated L1-CAM expression patterns in the injured c-fibers following peripheral nerve injury. These molecules were co-localized in hypertrophic varicosities in the central terminals of injured c-fibers of neuropathic pain model rats. Quantitative analyses revealed that the peripheral nerve injury reduced dendritic synaptic contacts but promoted aberrant axo-axonic contacts on the hypertrophic varicosities in which  $\alpha 2 - 1$ , L1-CAM and pL1-CAM were present. In the dorsal horn, administration of the anti-allodynic drug pregabalin inhibited the increase in  $\alpha 2 - 1$  expression and suppressed the hypertrophy of L1-CAM labeled varicosities. Our findings highlight the formation of aberrant spinal circuits that mediate the convergence of local neuronal signals onto injured c-fibers, suggesting that these hypertrophic varicosities may be important in the mechanisms underlying neuropathic pain.

研究分野：疼痛基礎研究

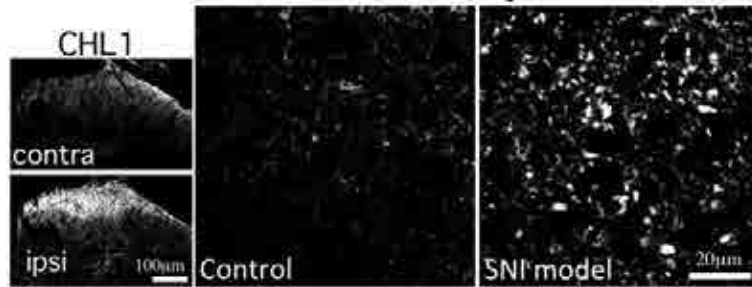
キーワード：神経障害性疼痛 プロテアーゼ 脊髄後角 シナプス可塑性 細胞間接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

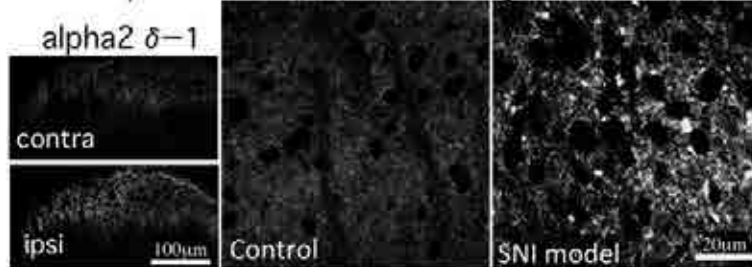
### 1. 研究開始当初の背景

疼痛病態の分子メカニズムの研究、特に神経障害性疼痛モデルの脊髄の研究について我々の業績から判ってきたことは、ニューロン、グリア細胞において増加する液性因子・またはそれに対する受容体の変化で脊髄以降のニューロンの興奮性を大きく修飾していることである。既存の神経サーキットを利用する事を前提としたこの疼痛メカニズムに加えて、疼痛基礎研究において重要でありながらまだ解明されていないことは、脊髄において一次求心性ニューロンがどのように他のニューロンやグリア細胞などの連絡性(コネクトビリティ)を変化させているかという動的変化の詳細である。

CHL1は後角でVaricosity様の増加を示す



alpha2 δ-1は後角でVaricosity様の増加を示す



これまで報告したのは損傷した一次求心性終末の変化である。上の2つの図に示すように末梢神経損傷に増加する接着因子 CHL1 と Ca<sup>2+</sup>チャンネル alpha2 δ-1 サブユニットは脊髄内の損傷軸索終末において著明な Varicosity を作る事がわかった。この Varicosity は最大径 10µm ほどにもなり、通常認められる CGRP 陽性 varicosity の3-5倍に肥大した変化を認めた。alpha2 δ-1 サブユニットはシナプス新生を起こし、その結合阻害剤で神経傷害性疼痛治療薬である gababentinoids (gababentin, pregabalin)はこの varicosity が動的変化のプラットフォームとなり得ると想定して本研究課題の研究を進めた。

### 2. 研究の目的

慢性疼痛、特に神経障害性疼痛モデル動物の脊髄後角を使用して以下の項目を検討する

- 1) 障害を受けた一次感覚ニューロンの神経終末における異常 varicosity について
  - a. 障害を受けた一次感覚ニューロンの神経終末における異常 varicosity の定量的解析
  - b. 異常 varicosity の増加と、脊髄後角における可塑性関連因子との関係
  - c. 上記の異常 varicosity のシナプス・樹状突起との接着構造の解析

- 2) 脊髄後角での異常 varicosity に影響を与える因子の解析

異常 varicosity の接着構造に影響を与える因子の解明

以上の点を三次元的な定量的組織構造に基づいて解析する事を目的としたコネクトーム解析を行う。

### 3. 研究の方法

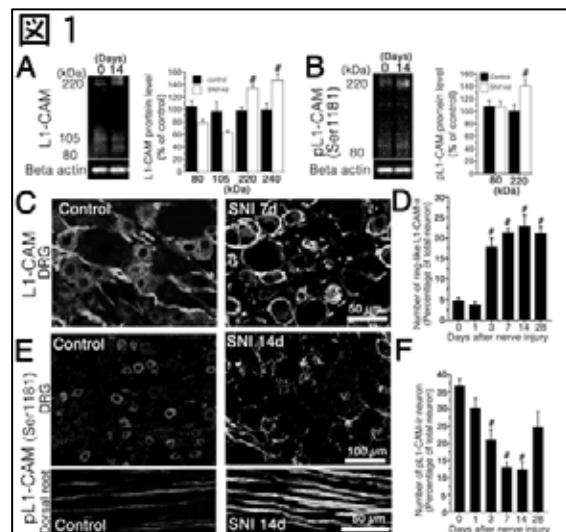
1) 脊髄後角の免疫組織化学法にて以下について検討した。

①脊髄後角の一次求心性 C 線維終末の形態を明らかにできた。②定常的発現を示し、且つ神経傷害性疼痛モデルに応答して脊髄後角で変化を検出した。③細胞表面に存在し、alpha2 δ-1 サブユニット陽性と共存して脊髄後角で varicosity を形成していた。

2) 1) で明らかにした終末構造を、マーカータンパクなどとの共存を指標に定性的に解析し、3次元構造を再構築し末梢神経傷害とシナプスと varicosity、樹状突起との関連を定量的に解析した。

3) 1) で明らかにした構造中で、形態変化やシナプス新生に関与する分子の発現を検討した。

4) 3) で明らかにした分子を阻害する事で脊髄後角のシナプスについて三次元的に解析を行った。

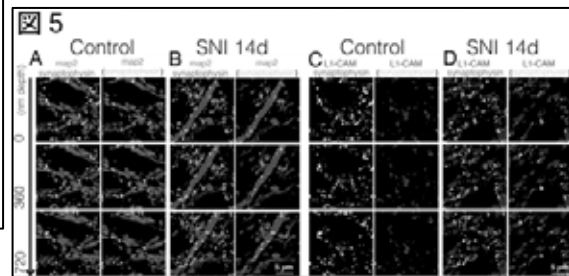
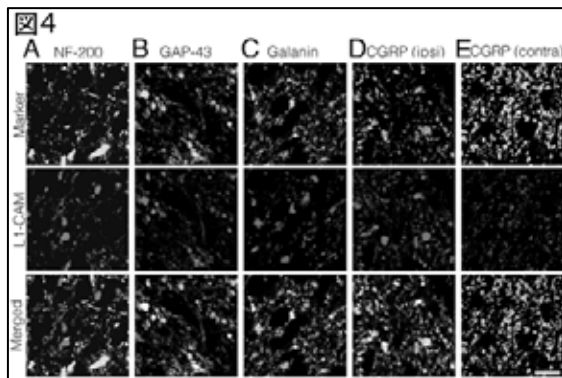
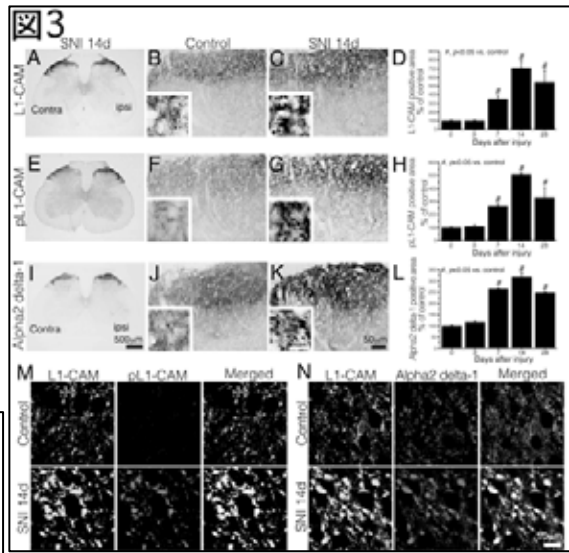
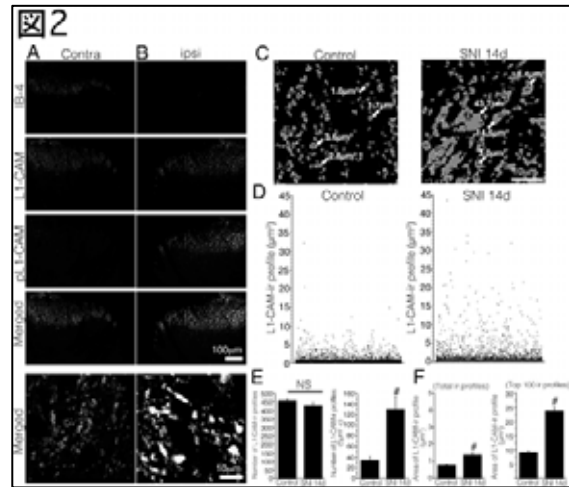


#### 4. 研究成果

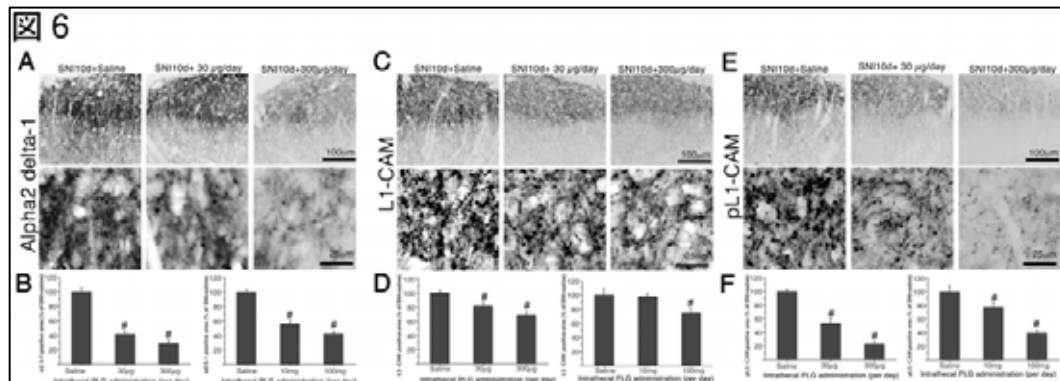
1) 脊髄後角で **varicosity** 解析の対象となる因子として細胞間接着因子である **L1-CAM** を見出した。後根神経節での定量的解析の結果、**L1-CAM** がタンパクの移動の変化を起こすことが解った (図1)。**L1-CAM** は細胞表面に存在しているため、形態解析の対象として適切であり、**varicosity** において **alpha2 delta-1** サブユニットと共存して神経損傷に応答して増加する事が解った。また、同時に **L1-CAM** の細胞内ドメイン (**Ser 1181**) のリン酸化 (**pL1-CAM**) も脊髄後角で同期する事がわかった。

2) **L1-CAM** 陽性の定量的解析では、**C** 線維の終末で有意な肥大が確認できた (図2)。

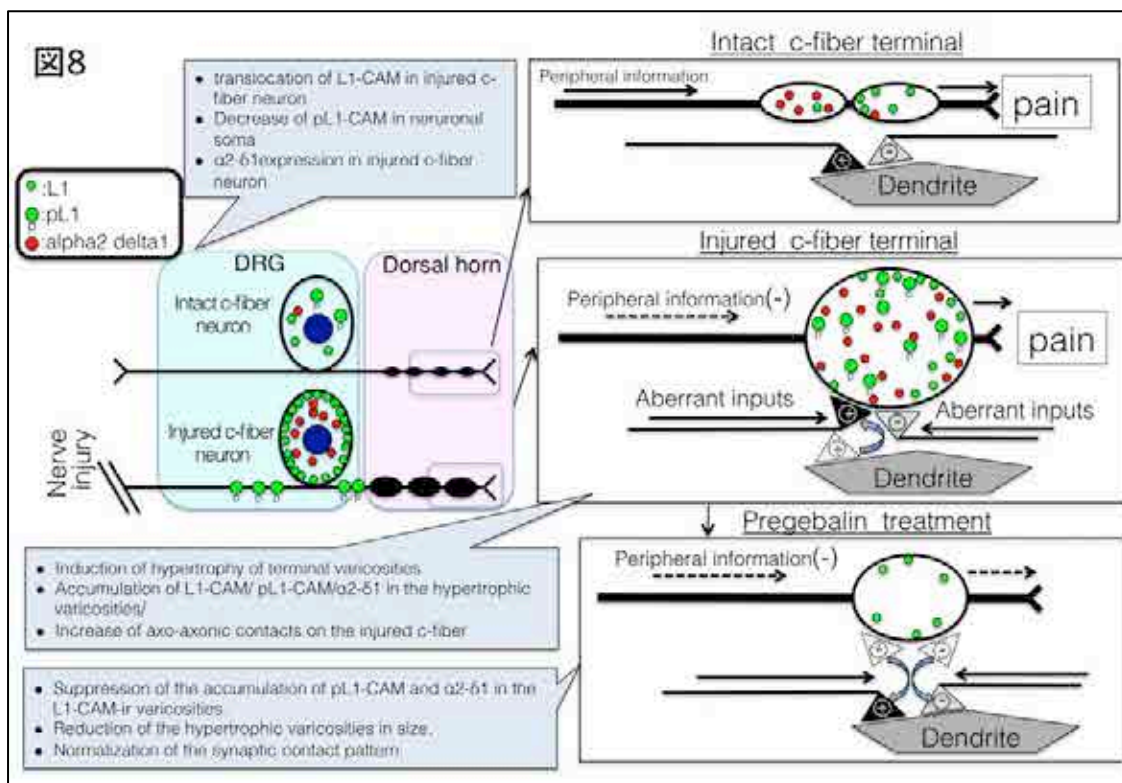
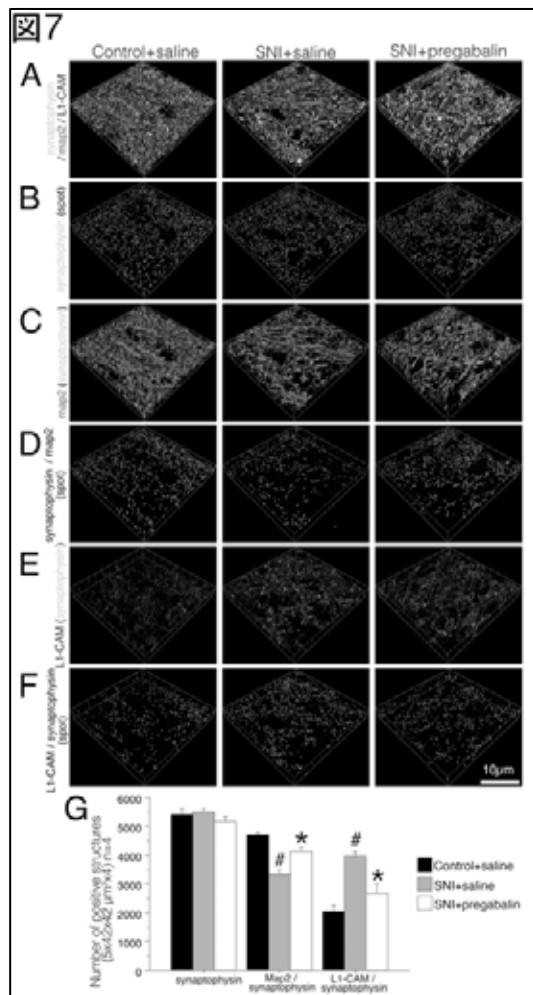
3) 図2で示した **L1-CAM** 陽性の損傷 **C** 線維終末の変化は **pL1-CAM**, **alpha2 delta-1** サブユニットの損傷後の変化と同期し、**varicosity** においてこれら3つの形態変化関連分子が共存する事がわかった (図3)。また、この **varicosity** には損傷後に発現変化した後根神経節由来の神経ペプチドが貯留しており、神経伝達の出力の場である可能性を示唆するデータを得た (図4)。さらにシナプス終末と樹状突起との関連を三次元的に検討した結果、末梢神経傷害に伴って **axo-dendritic synapse** が減少し、**L1-CAM** 陽性 **varicosity** にシナプス終末が新たに接着し、**axo-axonic contact** が増加している事が明らかとなった (図5)。すなわち我々が見出した損傷 **C** 線維終末では入力するシナプスが増加し、また神経伝達物質を貯留・または放出する場であるというプラットフォームである事がわかった。



神経傷害性疼痛モデルラットに対して、**alpha2 delta-1** サブユニットに結合し、また神経傷害性疼痛治療薬である **pregabalin** を慢性投与した。その結果、**alpha2 delta-1** サブユニット、**L1-CAM**, **pL1-CAM** 陽性 **varicosity** の有意な低下が認められた (図6)。



同じ神経傷害性疼痛モデルラットの脊髄後角を用いて損傷c線維終末であるL1-CAMとシナプスマーカーである synaptophysin, 樹状突起・神経細胞体マーカーである map2 の3重染色を行い、3次元構築した画像を基にシナプス終末の数、シナプス終末とL1-CAM陽性終末との axo-axonic contact, axo-dendritic contact の数を定量した。その結果、pregabalin の投与は損傷c線維終末への axo-axonic contact の増加を抑制し、axo-dendritic synapse を減少を抑制する効果が認められた(図7)。また、この効果は抑制性シナプス終末の VGAT を用いて定量した結果も同様であった。すなわち(図8)で示すように末梢神経損傷に伴い、シナプスの変化が脊髄後角でおきる事を明らかにし、これらの異常入力が痛みを伝える損傷したc線維に収束してくることが考えられた。本来、損傷したc線維は末梢からの入力を失っているが、脊髄内の神経からの入力を受ける事で受容野以外からの入力を痛みとして伝える事が可能になり、神経傷害性疼痛治療薬である pregabalin の作用の1つがシナプス変更の阻害である事が解った。これは gababentinoids の薬理作用働であるシナプス新生の阻害が痛み伝達線維上のプラットフォームである肥大した varicosity で働いた事を意味している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shinoda Masamichi、Fukuoka Tetsuo、Takeda Mamoru、Iwata Koichi、Noguchi Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Spinal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion reverses reduction of Kv4.1-mediated A-type potassium currents of injured myelinated primary afferent neurons in a neuropathic pain model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919841196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yang Yanjing、Wang Shenglan、Kobayashi Kimiko、Hao Yongbiao、Kanda Hirosato、Kondo Takashi、Kogure Yoko、Yamanaka Hiroki、Yamamoto Satoshi、Li Junxiang、Miwa Hiroto、Noguchi Koichi、Dai Yi	4. 巻 4
2. 論文標題 TRPA1-expressing lamina propria mesenchymal cells regulate colonic motility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 122402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.122402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okubo Masamichi、Yamanaka Hiroki、Kobayashi Kimiko、Noguchi Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Differential expression of mGluRs in rat spinal dorsal horns and their modulatory effects on nocifensive behaviors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919875026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanda Hirosato、Ling Jennifer、Tonomura Sotatsu、Noguchi Koichi、Matalon Sadis、Gu Jianguo G.	4. 巻 104
2. 論文標題 TREK-1 and TRAAK Are Principal K <sup>+</sup> Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 960 ~ 971.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2019.08.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Huang Tianliang, Okauchi Takashi, Hu Di, Shigeta Mika, Wu Yuping, Wada Yasuhiro, Hayashinaka Emi, Wang Shenglan, Kogure Yoko, Noguchi Koichi, Watanabe Yasuyoshi, Dai Yi, Cui Yilong	4. 巻 15
2. 論文標題 Pain matrix shift in the rat brain following persistent colonic inflammation revealed by voxel-based statistical analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806919891327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okutani Hiroai, Yamanaka Hiroki, Kobayahi Kimiko, Okubo Masamichi, Noguchi Koichi.	4. 巻 66
2. 論文標題 Recombinant interleukin-4 alleviates mechanical allodynia via injury-induced interleukin-4 receptor alpha in spinal microglia in a rat model of neuropathic pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1775-1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23340.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusuyama K, Tachibana T, Yamanaka H, Okubo M, Yoshiya S, Noguchi K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Upregulation of calcium channel alpha-2-delta-1 subunit in dorsal horn contributes to spinal cord injury-induced tactile allodynia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine J	6. 最初と最後の頁 1062-1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.spinee.2018.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K, Dai Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Negative Regulation of TRPA1 by AMPK in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 98-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db17-0503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Noguchi Koichi
2. 発表標題 Molecular mechanism of pain -novel findings in pain research-
3. 学会等名 AOSRA-PM2019 日本区域麻酔学会第6回学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田浩里, 戴毅, 野口光一, グージャングオ.
2. 発表標題 眼窩下神経CCIモデルによる神経障害性疼痛へのKv4.3チャネルの役割
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中志穂, 辻彩乃, 助永憲比古, 野口光一, 廣瀬宗孝.
2. 発表標題 開胸術の周術期における痛みとTRPA1遺伝子のDNAメチル化との関係
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小暮洋子, 王勝蘭, 山本悟史, 野口光一, 戴毅.
2. 発表標題 炎症性腸疾患モデルラットに伴う内臓痛に対する大建中湯の効果
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野口光一.
2. 発表標題 痛みのメカニズム最新の知見
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Noguchi K.
2. 発表標題 Effect of peripheral nerve injury on the Axo-axonic contacts between injured C-fiber and spinal neuron.
3. 学会等名 17th IASP World Congerss on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Noguchi K.
2. 発表標題 Cellullar distribution of brain derived neurotrophic factor in spinal dorsal horn of neuropathic pain model rats
3. 学会等名 17th IASP World Congerss on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y.
2. 発表標題 Nedd4-2 in DRG neurons contributes to diabetic neuropathic pain through TRPA1 channels.
3. 学会等名 17th IASP World Congerss on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山中 博樹  (Yamanama Hiroki)  (20340995)	兵庫医科大学・医学部・講師    (34519)	