

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18790184  
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛に対して NCAM が担う役割の解析による治療薬の探索  
 研究課題名（英文） Search for an analgesic drug based on analysis of NCAM role in neuropathic pain  
 研究代表者  
 坂井 敦 (SAKAI ATSUSHI)  
 日本医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：30386156

研究成果の概要：神経因性疼痛に対して鎮痛作用を有するグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）の作用標的候補として神経接着因子である NCAM の解析を行い、脊髄後角において NCAM を発現する細胞や NCAM を刺激する事で鎮痛効果が得られることを明らかにした。また、GDNF 発現レンチウイルスベクターを利用することにより疼痛発症部位に特異的且つ長期的に痛みを取り除くことができる事を示した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経因性疼痛、GDNF、NCAM

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経因性疼痛は中枢または末梢神経系の障害に起因する異痛症と痛覚過敏を特徴とした慢性疼痛である。しかし、この疼痛は従来の鎮痛薬の有効性が低く、難治性であるため、早急な神経因性疼痛の発症、維持機構の解明に基づいた新規の鎮痛薬の開発が強く望まれていた。また患者は既に慢性疼痛が確立して痛みを序し難い状況で治療を求めていることが多々あり、この点において発症段階での予防を考えるだけでなく慢性化した疼痛を取り除くことが重要とな

る。

(2) グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF) は神経因性疼痛が確立した後においても、鎮痛作用を有することが明らかにされていたが、その作用機序は受容体を含め、不明であった。一方、GDNF に対する受容体として Ret が従来から知られていたが、細胞接着因子である neural cell adhesion molecule (NCAM) も GDNF の受容体として機能することが新たに明らかにされた。

(3) 我々は神経因性疼痛で脊髄後角において NCAM mRNA の発現が低下し、GDNF の

投与により回復することを見出し、GDNFの鎮痛効果においてNCAMが重要な役割を担っている可能性が示されていた。

## 2. 研究の目的

神経因性疼痛においてNCAMが侵害情報伝達回路の可塑的变化に伴う痛覚過敏に役割を担っている可能性が示唆されたが、NCAMが脊髄後角においてどの細胞群に発現し、侵害情報伝達においてどのような役割を担っているのかは全くの未知であった。従って、本研究では神経因性疼痛におけるNCAM signalingの役割に焦点をあて、これを詳細に明らかにすることにより、慢性化した疼痛を緩和することができる新規の鎮痛薬を見つけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経因性疼痛モデルの作製と痛覚検査

5週齢、雄性のSprague-Dawleyラットもしくは8週齢、雄性のC57BL/6Jマウスを用いた。すべての手術はペントバルビタールの腹腔内投与による深麻酔下において行った。神経因性疼痛モデルは慢性絞扼性傷害モデル及びL5 spinal nerve ligation (SNL)モデルを用いた。痛覚の指標として、後肢足底に機械的刺激及び熱刺激を行い、その刺激に対する回避行動を疼痛反応として観察した。

### (2) 脊髄髄腔内への薬物投与

神経因性疼痛モデルの作製前にポリエチレンチューブを小脳延髄槽から先端が脊髄腰膨大部に届くまで挿入した。チューブを挿入したラットは麻痺などの障害がないことを確認した上で、神経因性疼痛モデルを作製した。疼痛が出現し慢性化した手術後7日目に浸透圧ポンプを取り付け、この浸透圧ポンプを用いてGDNF (12 µg/day)やNCAMに対するアンチセンス(AS)及びミスマッチオリゴヌクレオチド(ODN; 1 nmol/day)、NCAM mimetic peptide(50 µg/day)であるC3ペプチド(ASKKPKRNKA)の四量体であるC3dペプチドとそのコントロールペプチド(ASAAPAANIKAの四量体)を持続投与した。オリゴヌクレオチドの塩基配列は5'-AGATCCTTAGTTCGCGCATTGTA-3 (アンチセンス) および5'-GTCCATGTACATCTAGTCAGTTGA-3 (ミスマッチ)とした。

### (4) *In situ* hybridization

動物はPBS (pH 7.2) と4%パラホルムアルデヒド(0.1 M PBS、pH 7.2)を順次心臓から全身灌流することで固定し、クリオスタットで厚さ10 µmに薄切した。ラットNCAM cDNA (GeneBank accession number NM\_031521)

の854-1587番目の塩基配列に相補的なdigoxigenin標識RNAプローブを作製してin situ hybridizationを行い、BM purpleにより発色させた。

### (5) 免疫組織化学染色

*In situ* hybridizationと同様に切片を作製し、二重免疫組織化学染色を行った。NCAMと神経細胞のマーカーであるMAP2、アストロサイトのマーカーであるGFAP、ミクログリアのマーカーであるIba1に対する抗体やGDNF依存性のDRG神経細胞のマーカーであるレクチンIB4(FITC標識)を反応させた。Alexa Fluor 488もしくはAlexa Fluor 594標識二次抗体を反応させ、共焦点顕微鏡により観察した。

### (6) レンチウイルスベクターの作製

GDNFとGFPを同時に発現するレンチウイルスベクターを作製した。ウイルス粒子は4種類のプラスミドベクターを293T細胞にトランスフェクションすることにより作製し、超遠心による濃縮を行った。作製したウイルス粒子はマウスにマイクロシリンジを用いてL4およびL5後根神経節(DRG)や後肢足底、L4/5脊髄後角へ微量投与した。ウイルスベクターによる遺伝子発現はGFPに対するRT-PCR及び免疫組織化学染色により確認した。

### (7) 初代DRG神経細胞培養

5週齢、雄性のSprague-DawleyラットよりL4-5 DRGを摘出し、酵素により細胞をバラバラにした。細胞はPercollによる密度勾配遠心により神経細胞のみを単離し、laminin/poly-D-lysineコートしたガラス上に撒いた。神経突起を観察するためにbeta III tubulinとNCAMに対する抗体とIB4で蛍光免疫染色を行い、細胞体を中心とした同心円を神経突起が通過する回数を求めるSholl解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) GDNFによる神経因性疼痛緩和作用におけるNCAMの役割

二重免疫組織化学染色により、脊髄後角の表層においてNCAMは脊髄の神経細胞及び小型の細胞体を有するIB4陽性の一次求心性線維の中枢末端に存在することを見出した(図1)。

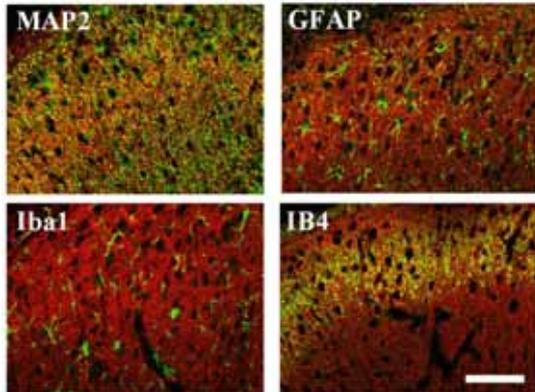


図1 脊髄後角におけるNCAMの発現

これに一致して、NCAMはDRGの小型神経細胞に発現している事を明らかにした。

NCAMに対するAS ODNを脊髄髄腔内に投与することで発現を低下させることにより、正常なラットにおける痛覚過敏の発症や神経因性疼痛の悪化や改善は引き起こされなかったが、GDNFの神経因性疼痛緩和作用は消失した(図2)。

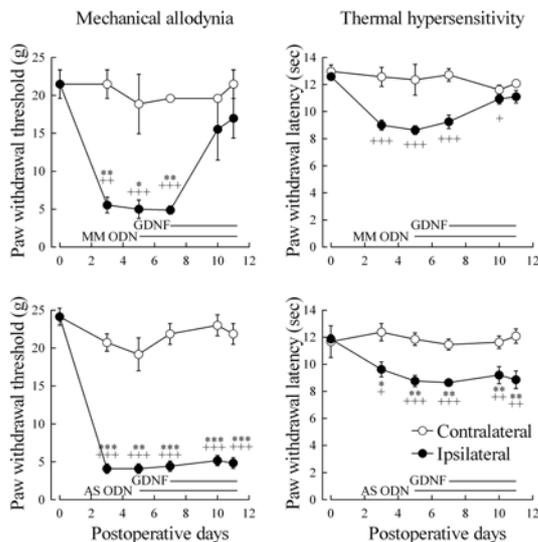


図2 NCAMの発現抑制によるGDNF鎮痛効果の消失

またNCAMの作用を模倣する合成ペプチドC3dを神経因性疼痛モデルラットの脊髄髄腔内に投与することにより、NCAM刺激単独で神経因性疼痛が緩和することが見出された(図3)。以上の結果から、GDNFによる神経因性疼痛の緩和作用にNCAMが必須であることが初めて明らかとなった。さらにNCAMを介した情報伝達

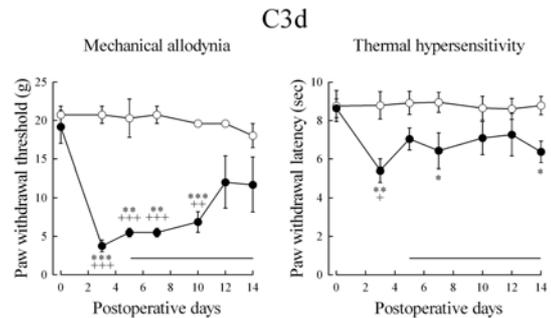


図3 NCAM模倣ペプチドによる鎮痛効果

経路の賦活を促すことが神経因性疼痛に対して有効な鎮痛薬になる可能性が示唆された。

##### (2) レンチウイルスを利用した局所的なGDNF遺伝子発現誘導

レンチウイルスベクターに組み込まれた遺伝子が少なくとも2週間は発現することをPCR及び免疫組織化学染色により確認した。また局所に微量投与することにより投与部位に限局して遺伝子を導入できることが確認された。

正常のマウスに、GDNFを組み込んだウイルスベクターをL4およびL5後根神経節(DRG)や後肢足底、L4/5脊髄へ投与しても機械的刺激に対する痛覚閾値に影響を及ぼさなかった。

L5 SNLを施した神経因性疼痛モデルマウスにおいて、神経結紮を行ったL5 DRGへGDNF発現ウイルスベクターを注入しても鎮痛効果はみられなかったが、L4 DRGへの注入によって疼痛緩和効果が観察された(図4)。

更に、これらのDRG神経の末梢側軸索が終止する後肢足底へのウイルスの投与により鎮痛効果が得られなかったのに対し、中枢側軸索が終止するL4/5脊髄へのウイルス投与によって鎮痛効果が得られた。また、単回のウイルス投与によって、鎮痛効果は少なくとも2週間持続した。

以上の結果から、傷害DRGに隣接する無傷のDRGに存在する細胞もしくはその中枢側末端におけるGDNFシグナリングの賦活が鎮痛効果に重要であることが初めて明らかになった。また、レンチウイルスベクターを利用することで疼痛発症部位特異的に長期間に渡って痛覚過敏のみを抑制できる可能性が示された。

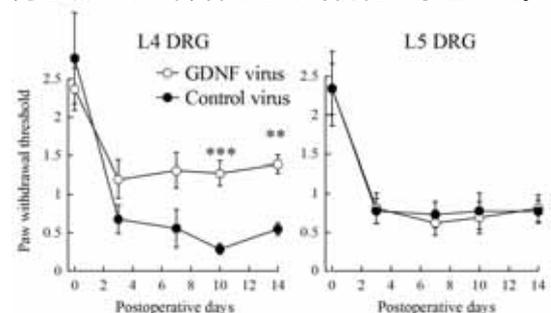


図4 レンチウイルスベクターによるGDNF発現の神経因性疼痛に対する効果

(3) NCAM発現DRG神経細胞に対するGDNFの効果の検討

初代培養細胞においてGDNF依存性の侵害受容性DRG神経細胞のマーカーであるIB4陽性の神経細胞やNCAMの発現を確認した。

培養細胞において、IB4陽性DRG神経細胞は神経突起を伸ばさない細胞の割合がIB4陰性神経細胞より多かった。

培養DRG神経細胞のNCAM発現細胞の割合はGDNF処理により変化しなかった。

培養NCAM陽性神経細胞はGDNF処理することにより、細胞体から近い同心円を通過する神経突起数が上昇する傾向がみられた。

以上の結果から、GDNFがNCAMを介してDRG神経細胞の神経突起形成もしくは分岐を促進する可能性が示された。

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 5件)

Matsumura T, Sakai A, Nagano M, Sawada M, Suzuki H, Umino M, Suzuki H. Increase in hemokinin-1 mRNA in the spinal cord during the early phase of a neuropathic pain state. *British Journal of Pharmacology* 155, 767-774 (2008). 査読有

Sakai A, Suzuki H. NCAM as a target for GDNF-induced analgesia in neuropathic pain. *Journal of Nippon Medical School* 75, 136-137 (2008). 査読有

Sakai A, Asada M, Seno N, Suzuki H. Involvement of neural cell adhesion molecule signaling in glial cell line-derived neurotrophic factor-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 137, 378-388 (2008). 査読有

Sato C, Sakai A, Ikeda Y, Suzuki H, Sakamoto A. The prolonged analgesic effect of epidural ropivacaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesia & Analgesia* 106, 313-320 (2008). 査読有

Nomura H, Sakai A, Nagano M, Umino M, Suzuki H. Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neuroscience Research* 56, 435-440 (2006). 査読有

[学会発表](計 7件)

Atsushi Sakai. Overexpression of GDNF in uninjured DRG neurons exhibits an analgesic effect in a rat neuropathic pain model. 6<sup>th</sup> FENS Forum of European

Neuroscience. July 13, 2008. Geneva Palexpo.

松村朋香. 新規タキキニン hemokinin-1の神経因性疼痛モデル動物における発現の増加. 第81回日本薬理学会年会. 2008年3月18日. パシフィコ横浜.

Atsushi Sakai. NCAM is involved in GDNF-induced analgesia in neuropathic pain. 7th IBRO World Congress of Neuroscience. July 13, 2007. Melbourne Convention Centre.

坂井敦. 神経因性疼痛の発症維持におけるNCAMの関与. 第80回日本薬理学会年会. 2007年3月14日. 名古屋国際会議場.

高須久望子. 神経因性疼痛時におけるDRGニューロンでのstathminの発現上昇. 第80回日本薬理学会年会. 2007年3月16日. 名古屋国際会議場.

坂井敦. GDNFの神経因性疼痛の緩和作用に対するNCAMの関与. 第115回日本薬理学会関東部会、第34回薬物活性シンポジウム. 2006年9月28日. 高崎シティギャラリー高崎市庁舎会議室.

坂井敦. NCAM is involved in the analgesic effect of GDNF on the neuropathic pain. 2006年7月20日. 国立京都国際会館.

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 敦 (SAKAI ATSUSHI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 30386156

(2)研究分担者

(3)連携研究者