

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592146

研究課題名 (和文)

ニコチンによる神経伝達物質トランスポーター機能発現の修飾とその疼痛制御への関わり

研究課題名 (英文) Nicotinic regulation of the neurotransmitter transporters and its relevance to analgesia

研究代表者

大山 和美 (OYAMA KAZUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手

研究者番号：00253021

研究成果の概要：

歯科臨床でも問題となる神経因性疼痛においてその発症と疼痛制御に、神経伝達物質の再取り込みにより神経伝達を調節するトランスポーターの関与が示唆されている。本研究は、鎮痛効果がすでに知られているニコチンに焦点をあて、ニコチンのこれらトランスポーター機能発現に及ぼす影響と、その疼痛制御への関わりを探索した。その結果、ニコチンはトランスポーター遺伝子発現を促進することが明らかとなった。この機構は脊髄において痛みの伝達を抑制するアドレナリン神経活動を強化すると考えられ、これをターゲットとした新しい疼痛制御の薬物開発に繋がるものと期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：nicotine, dopamine, transporter, transcription, pain

## 1. 研究開始当初の背景

痛みには感覚的側面 (痛覚) と情動的側面 (不快, 不安等) があり, 末梢から中枢に至る痛覚伝導路とそれに対し種々のレベルで修飾を行う多数の神経回路が組み合わさって痛みが成立する。したがって痛みに対する

薬物療法は, 単に痛覚伝導とその脳の上位中枢での受容に対するだけでなく, 情動的側面に対する多様な方法が行われている。例えば, 脳のノルエピネフリン神経はその両者において重要な役割を担っており, 三叉神経痛を始め難治性神経因性疼痛には鎮痛補助薬と

してノルエピネフリントランスポーター (NET) を含むモノアミン神経伝達物質トランスポーターの阻害薬である抗うつ薬が用いられている。しかし、モノアミン神経伝達物質取込み抑制と疼痛制御との関係は十分にはわかっていない。

脊髄での侵害受容ニューロンのシナプス伝達調節には、抑制性のグリシン神経が重要な役割を担っている。最近、我々はグリシントランスポーター (GlyT) 特異的阻害薬の痛覚過敏並びにアロディニアに対する強い抑制作用を見出し、これらに対する新しい薬物療法を提唱した (文献1)。このように、NET だけでなく多くの神経伝達物質トランスポーターは、新規薬物療法のターゲットと考えられる。しかし全ての神経伝達物質において、その痛みに対する制御機構としての役割が明らかになったわけではない。

ニコチンが強い鎮痛効果を有すること、喫煙が疼痛緩和に働くことはよく知られている。しかしそのメカニズムについては不明な点が多い。ニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) を介したその作用は、脊髄・中枢レベルで研究されており、疼痛制御の感覚的側面だけでなくより高次の情動的側面を含む痛みの制御機構への関与が報告されている。我々は、脊髄レベルにおいてニコチンがグリア細胞に発現する  $\alpha 7$  nAChR を介してアロディニアの発生を修飾することを報告した (文献2)。一方、ニコチンが神経伝達物質トランスポーターの機能発現を修飾するという報告もわずかながら存在する (文献3)。したがって、上に述べた我々の報告と考え合わせると、ニコチンの疼痛制御作用に神経伝達物質トランスポーターの関与は十分考慮するに値するだろう。

以上のように、ニコチンによる神経伝達物質トランスポーター機能発現の調節の修飾

を知ることは、疼痛制御の新規薬物療法を考える上で重要な課題である。

文献：

1. Dohi T, Morita K, Morioka N, Abdin MJ, Kitayama T, Kitayama S, Nakata Y. (2006) Role of platelet-activating factor on spinal pain transduction. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 127(1):18-24.
2. Abdin MJ, Morioka N, Morita K, Kitayama T, Kitayama S, Nakashima T, Dohi T. (2006) Analgesic action of nicotine on tibial nerve transection (TNT)-induced mechanical allodynia through enhancement of the glycinergic inhibitory system in spinal cord. *Life Sci.*, in press.
3. Li S, Kim KY, Kim JH, Kim JH, Park MS, Bahk JY, Kim MO. (2004) Chronic nicotine and smoking treatment increases dopamine transporter mRNA expression in the rat midbrain. *Neurosci. Lett.*, 363: 29-32.

## 2. 研究の目的

本研究は、疼痛制御に関わる種々の神経系においてその活動を調節する神経伝達物質トランスポーターの役割に焦点を当て、その中枢並びに末梢神経活動の調節と侵害受容・伝達との関係を明らかにすると共に、ニコチンによるその修飾のメカニズムを探索することによりその疼痛制御への応用をめざすものである。

抗うつ薬が鎮痛補助薬として臨床で用いられている事実にもかかわらず、その標的であるモノアミン神経伝達物質トランスポーターが慢性疼痛においてどのような機能変化、発現変化をしているかを詳細に調べた研究は未だない。本研究は、末梢交感神経系並びに種々の中枢神経系において発現する神経伝達物質トランスポーターに焦点を当て、それが関わる疼痛制御のメカニズムをニコ

チンの薬理作用との関係から解明しようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) トランスポーター機能解析

ラット脳シナプトソーム、各トランスポーター遺伝子導入発現細胞系を用い、<sup>[3H]</sup>ラベルしたノルエピネフリン等神経伝達物質をトレーサーとして細胞内への取り込みを測定し、各神経伝達物質トランスポーターの輸送活性がニコチン処置によりどのように変化するか、またその機序（細胞内シグナル伝達系の関与等）を解析する。

#### (2) トランスポーター蛋白発現動態の解析

特異的抗体を用いた免疫染色により神経伝達物質トランスポーター蛋白の①発現量、②細胞内局在（細胞膜への移行traffickingと細胞体・神経突起等細胞内での局在）、並びに③蛋白ターンオーバーを観察する。

#### (3) トランスポーターmRNAの発現動態の解析

各トランスポーター特異的プライマーを用い、リアルタイムRT-PCRによりmRNA発現動態を観察する。

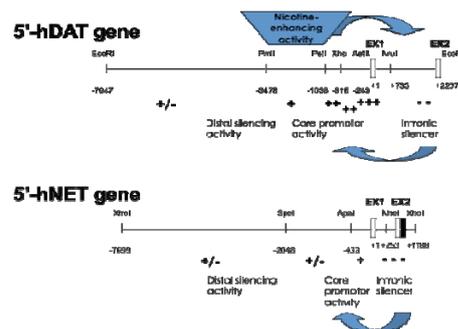
#### (4) トランスポーター遺伝子転写調節の解析

ヒトゲノムBACクローンから各神経伝達物質トランスポーター遺伝子5'領域を単離し、レポータープラスミッドに組み込む。このアッセイ系を用いて、ニコチンの各プロモーター活性に対する影響を調べ、その転写調節の機序を明らかにする。

### 4. 研究成果

まず、ノルアドレナリントランスポーター(NET)遺伝子転写活性に焦点を当て、同じカテゴリーアミントランスポーターに分類されるドパミントランスポーター(DAT)に対する効果と比較検討した。両遺伝子コアプロモーターを含む転写開始上流約10kbのDAT/NET遺伝

子をBACクローンからサブクローニングし、ルシフェラーゼレポータージーンの上流に挿入したコンストラクトを作成して、レポーターアッセイによりその転写活性を解析した。神経細胞由来SK-N-SH細胞に一過性に導入した場合、ニコチンはDAT転写活性を促進したが、NETのそれには影響しなかった。この促進に関わるニコチン応答領域(NicRE)は、転写開始上流3.2-5.7kbに存在することを明らかにした。第1イントロンはコアプロモーター活性に対しサイレンサーとして働くが、この領域を欠失させるとニコチンの転写促進作用が失われたことから、NicREと第1イントロンとの相互作用がニコチンの効果に関わる可能性が示唆された。



Summary of the effect of nicotine on transcriptional expression of DAT/NET gene

上記検討から、当初予想したNET転写活性に対するニコチンの影響が認められなかったため、これまでの研究で示唆されていたニコチンのNET発現調節の機序は転写後修飾である可能性が強くなった。このNET転写後修飾の機序に焦点を当て、PC12細胞をノルアドレナリン神経細胞モデルとして用い解析を行った。

NET mRNA発現レベルの解析は、RT-PCR法により探索した。ニコチンは用いたいずれの濃度(1-1000uM, 48h)、処置時間(6-48h)においてもNET mRNAの発現量に影響を及ぼ

さなかった。しかし、短時間のニコチン処置の効果を調べた結果、10 $\mu$ Mニコチン2時間処置により一過性のNET mRNAレベルの上昇が観察された。

ウェスタンブロット法によるPC12細胞NET蛋白発現の解析において、ニコチン処置(10 $\mu$ M, 48h)は、NET蛋白発現量に対して有意な変化をもたらさなかった。しかし、ニコチン6時間処置ではNET蛋白発現量の増加が認められた。

以上の結果から、ニコチンはnAChRを介したNET遺伝子転写あるいは転写後の調節機構によりNET mRNA量を増加させ、蛋白発現を増加させることが示された。NET蛋白発現の増加は、ノルアドレナリン再取り込みの促進によりシナプス間隙でのクリアランスを増加させることでノルアドレナリンのターンオーバーを促進し、アドレナリン神経伝達を強化すると考えられる。ニコチンのこうした効果は、侵害受容における脊髄下降性抑制路の賦活化をもたらし、これがニコチンの鎮痛効果の背景をなす可能性が示唆された。

ニコチンにより修飾される神経伝達物質トランスポーターの機能発現の解析により、(1)脊髄における侵害受容伝達、(2)末梢交感神経系による侵害受容の修飾、(3)上位中枢における痛覚伝導・伝達、(4)扁桃核、視床下核等における痛覚受容の情動的修飾において、ノルアドレナリン神経伝達にNETが果たす役割を考えると、今回我々が明らかにしたニコチンによるNET機能発現調節は、侵害受容伝達の修飾という観点から重要な意味を持つ。これらの結果は、慢性疼痛等の病態時における中枢神経活動を解析する上で有用であり、新規薬物療法の基盤を与えるものと思われる。

## 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 1 件)

① 北山滋雄, 十川千春, 十川紀夫: カテコールアミントランスポーターの薬理.

Clinical Neuroscience, 26巻10号, 1104-1106, 2008, 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

① 十川紀夫, 大山和美, 十川千春, 平井幹士, 森田克也, 土肥敏博, 北山滋雄: ニコチンによるヒトドパミントランスポーター遺伝子転写活性の促進作用. 第82回日本薬理学会年会, 2009/3/16, 横浜市

② 十川紀夫, 大山和美, 十川千春, 平井幹士, 森田克也, 土肥敏博, 北山滋雄: ヒトドパミントランスポーター遺伝子転写活性に対するニコチンの調節作用について. 第50回歯科基礎医学会学術大会, 2008/9/24, 東京都

③ 大山和美, 十川千春, 十川紀夫, 平井幹士, 小谷洋平, 松岡礼子, 森田克也, 土肥敏博, 北山滋雄: ニコチンによるヒトドパミントランスポーター遺伝子転写活性の調節. 第113回日本薬理学会近畿部会, 2008/6/20, 岡山市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 和美 (OOYAMA KAZUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手

研究者番号: 00253021

(2) 研究分担者

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80177873

十川 千春 (SOGAWA CHI HARU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10253022

十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30236153

(2) 連携研究者

土肥 敏博 (DOHI TOSHIHIRO)

広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00034182