

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：萌芽研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19659388

研究課題名（和文） 神経根性疼痛における細胞外プロテアーゼ tPA の関与

研究課題名（英文） Contribution of extra-cellular protease, tPA to the radicular pain

研究代表者

野口 光一 (NOGUCHI KOICHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10212127

研究成果の概要：本研究は、神経根への損傷が引き起こす脊髄内での細胞外環境の改変に着目したもので、神経の病的・生理的両面の可塑性に関与している蛋白分解系である、組織型 plasminogen activator(tPA)の活性と神経根症の引き起こす疼痛との関係を解明することを目的としている。以下の新規所見を見いだした。

1. ラットのL5神経根損傷モデルを作成し、脊髄後角でのtPA発現の経時的な変化を確認しその変化を定量した結果、術後3日目をピークに7日目まで有意に増加していた。
2. 脊髄後角でのtPA発現と、各種のマーカー蛋白とtPAを組み合わせた多重染色を行った結果、脊髄後角のアストロサイトがtPAを発現していることが明らかとなった。
3. ラット脊髄後根損傷による脊髄後角のプロテアーゼ活性の変化をIn situ Zymographyを用いて検討した。後根損傷後の脊髄表層において、プロテアーゼ活性の増加が確認され、tPA-STOPを投与するとその変化が消えることより、この脊髄後角におけるプロテアーゼ活性の増加はtPAの活性増加を介していることが明らかとなった。
4. 疼痛行動を起こす脊髄根部分損傷モデルにおいてtPAの発現を検討した結果、アストロサイトでのtPA発現は14日後でも増加していた。後根の部分損傷モデルにおける足底刺激に対する過敏反応は、tPAの特異的阻害剤のtPA-STOPの髄腔内投与によって、有意に抑制されることがわかった。

以上の結果は、英文雑誌GLIAに採択され、発表した。

その後、tPAのプロテアーゼ活性の標的蛋白を見つけるために、laminin, fibronectin, NR-1, BDNFなどを検索してきたが、現時点ではtPAとの新規メカニズムは見つかっていない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：神経解剖学、ペインリサーチ

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：アストロサイト, tPA, グリア, 後根, ニューロパチックペイン, 蛋白分解酵素

1. 研究開始当初の背景

腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄による神経根症の一面は、神経根に対する圧迫や髄核への炎症反応の神経への波及である。しかし、神経根の微小切断を含めた損傷の要素が脊髄後角にどのような影響をおよぼしているかは不明である。本研究は、神経根への損傷が引き起こす脊髄内での細胞外環境の改変に着目したものである。plasminogen activator-plasminの系はよく研究され、神経の病的・生理的両面の可塑性に関与している蛋白分解系である。我々の予備的な実験から、この組織型 plasminogen activator (tPA) の活性が脊髄後角で上昇している事が解った。本研究の最終的な目標はこのtPAが脊髄内で細胞外環境を改変していることを示し、神経根症の引き起こす疼痛にtPAが関与していることを証明することである。

本研究の特色は神経周囲の細胞外環境の変化に着目して神経根損傷による痛みの形成原因を考えている点である。特に神経再生や可塑性関連因子、またマイクログリアの活性化因子であるtPAの酵素活性に依存した細胞外蛋白の分解が神経の興奮性を変調させることを想定している点は、神経根症の病態研究としては、極めて独創的である。本研究ではtPAの発現誘導が、脊髄後角での興奮性上昇を生む分子トリガーとなり、脊髄ニューロンの可塑的变化を引き起こしている事を予想しており、tPAは神経根症の疼痛の治療ターゲットとしても着目すべき分子であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) tPA発現細胞の組織局在の詳細な検討

① tPAの変化は疼痛の発現と関連しているか？ → tPAの局在変化のタイムコースを明らかにする。

② どのような細胞でtPAが変化しているのか？ → アストロサイト以外の細胞について検討する。

(2) tPAの酵素活性と痛み行動に対する影響

① 後根損傷モデル動物に、tPAの阻害剤を与えて疼痛行動を検討

② tPAを脊髄に投与して疼痛行動を確認

(3) tPAが切断すると考えられる蛋白の同定

plasmin, NMDA受容体, laminin, などの分子の切断をウェスタンブロットで検討

(4) tPAまたはその分解産物が働きかける細胞の同定

マイクログリア・アストロサイトの活性化・神経細胞の興奮性等を検討する。

3. 研究の方法

主にtPAに関して、現象面での変化を可能な限り詳細に検討していくことに主眼を置く。高感度かつ高精度の組織学的検証を行い、神経根損傷がtPA分子の挙動にどの程度の変化をもたらすのかを統計的に示すことができるような実験を行った。

(1) 神経根損傷に伴うtPAの発現変化の詳細な検討

ラットのL5神経根損傷モデルを作成し、脊髄後角や後索核でのtPA発現の経時的な変化を確認する。併せてその変化を定量し、tPA発現の変動のタイムコースを明らかにする。

(2) tPAの発現細胞を明らかにする

各種のマーカー蛋白（ニューロン：Neu N、マイクログリア：Iba 1、アストロサイト：GFAP）などとtPAを組み合わせた多重染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を駆使して詳細な局在を明らかにする。

(3) tPAの発現調節に関する検討

tPAの発現調節因子が、MAP kinase である可能性は高く、酵素活性の抑制ではなく転写活性の抑制まで視野にいたる研究の基礎的なデータをとる目的でMAP kinase (MAPK)のインヒビターを投与して、tPAの発現を検討する。

(4) tPA 脊髄における tPA 活性のターゲットを検討する

tPAによって分解をうける可能性のある分子をウェスタンブロット法により検討する。現在まで、plasminogenの活性化とその下流因子として以下の分子を検討した。

① laminin

lamininはtPA-plasminによって分解されることで、その産物が神経細胞の興奮性を上昇させることが知られている。

② fibronectin

神経根損傷後にはアストロサイト、マイクログリア共に活性化されることが知られている。

③ NR-1

NMDA受容体のサブユニットであるNR-1は、tPAによって細胞外の一部を切断され、興奮性が増加するという報告がなされている。

④ BDNF

痛覚の修飾因子であるBDNFは前駆型として細胞外に分泌される。tPA-plasminの系により切断されることで活性化型BDNFに変換される。

(5) tPA活性と疼痛の関連を検討

疼痛行動を起こす脊髄根損傷モデルにおい

てtPAの発現を検討する。予備的な実験では後根の部分損傷モデルで足底に対する刺激で疼痛行動がおこる事を確認している。併せて、tPAの特異的阻害剤である、tPA-STOPを髄腔内へ投与して疼痛行動に対する影響を検討する。またtPAの転写活性を調節しているMAPKが明らかとなった場合、その阻害とtPA発現と疼痛の関連を検討する。

4. 研究成果

これまでに、

(1)ラットのL5神経根損傷モデルを作成し、脊髄後角でのtPA発現の経時的な変化を確認し、その変化を定量した結果、術後3日目をピークに7日目まで有意差を持って増加していた。

(2)脊髄後角でのtPA発現と、各種のマーカー蛋白(ニューロン: NeuN、マイクログリア: Iba1、アストロサイト: GFAP)などとtPAを組み合わせた多重染色を行った結果、脊髄後角のアストロサイトがtPAを発現していることが明らかとなった。

(3)ラット脊髄後根損傷による脊髄後角のプロテアーゼ活性の変化をIn situ Zymographyを用いて検討した。後根損傷後の脊髄表層において、プロテアーゼ活性の増加が確認され、tPA-STOPを投与するとその変化が消えることより、この脊髄後角におけるプロテアーゼ活性の増加はtPAの活性増加を介していることが明らかとなった。

(4)疼痛行動を起こす脊髄根部分損傷モデルにおいてtPAの発現を検討した結果、アストロサイトでのtPA発現は14日後でも増加していた。後根の部分損傷モデルにおける足底刺激に対する過敏反応は、tPAの特異的阻害剤のtPA-STOPの髄腔内投与によって、有意に抑制されることがわかった。ただし、tPA-STOP投与を術時ではなく、術後10日目から投与しても過敏反応の改善は見られず、tPA活性はMechanical Allodyniaの誘導には関与しているが維持には関係ないことが明らかとなった。

以上の結果は、英文雑誌GLIAに採択され、発表された。その後、tPAのプロテアーゼ活性の標的蛋白を見つけるために、laminin, fibronectin, NR-1, BDNFなどを検索してきたが、現時点ではtPAとの新規メカニズムは見つかっていない。

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 17 件)

①. Miyoshi, K., Obata, K., Kondo, T., Okamura, H. and Noguchi, K. (2008)

IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J. Neurosci.*, 28, 12775-12787. 査読有

②. Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.*, 10, 510, 188-206. 査読有

③. Katsura, H., Obata, K., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2008) Transforming growth factor-activated kinase 1 induced in spinal astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *Glia*, 56, 723-733. 査読有

④. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K. and Noguchi, K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain, *J. Neurosci.*, 12, 28, 2892-902. 査読有

⑤. Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain, *Brain*. 131(Pt 5):1241-1251. 査読有

⑥. Obata, K., Katsura, H., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Akira, S. and Noguchi, K. (2008) Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J. Neurochem.*, 105, 2249-2259. 査読有

- ⑦. Sakurai, J., Obata, K., Ozaki, N., Tokunaga, A., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Kondo, T., Miyoshi, K., Sugiura, Y., Matsumoto, T., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in sensory neurons after noxious gastric distention and its involvement in acute visceral pain in rats. *Gastroenterology*. 134(4):1094-103. 査読有
- ⑧. Cui, XY., Dai, Y., Wang, SL., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Chen, J. and Noguchi, K. (2008) Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol Pain*. 30;4(1):17. 査読有
- ⑨. Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.*, 117, 1979-1987. 査読有
- ⑩. Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Activation of fibroblast growth factor receptor by axotomy, through downstream p38 in dorsal root ganglion, contributes to neuropathic pain. *Neuroscience*, 150, 202-211. 査読有
- ⑪. Fukui, T., Dai, Y., Iwata, K., Kamo, H., Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Wang, S., Cui, X., Yoshiya, S. and Noguchi, K. (2007) Frequency-dependent ERK phosphorylation in spinal neurons by electric stimulation of the sciatic nerve and the role in electrophysiological activity. *Mol. Pain*, 3, 18. 査読有
- ⑫. Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2007) Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation. *J. Neurochem.*, 102, 1614-1624. 査読有
- ⑬. Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. *J. Neurochem.*, 102, 1569-1584. 査読有
- ⑭. Mizushima, T., Obata, K., Katsura, H., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321, 28-34. 査読有
- ⑮. Kozai, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Kobayashi, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. *Glia*, 55, 595-603. 査読有
- ⑯. Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., and Noguchi, K. (2007) Alternation of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci*, 25, 1097-1111. 査読有
- ⑰. Ogura, H., Tachibana, T., Yamanaka, H.,

Kobayashi, K., Obata, K., Dai, Y., Yoshiya, S. and Noguchi, K. (2007) Axotomy increases plasma membrane Ca²⁺ pump isoform4 in primary afferent neurons. *Neuroreport*, 18, 17-22. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① Noguchi, K. (2008) MAP kinase regulation of pain: peripheral, central and glial mechanisms. (Workshops) 12th World Congress on Pain, 8.17-22, Glasgow, UK.

② Noguchi, K. (2008) TRP channels and nociception. (Workshops) 12th World Congress on Pain, 8.17-22, Glasgow, UK.

③ Noguchi, K. (2008) Neuropathic pain mechanisms: TRP family and signal transduction molecules. (Plenary lecture) NeuPSIG satellite to the Glasgow 2008 World Congress on Pain, 8.13-15, London, UK.

④ Noguchi, K. (2008) Contribution of Changes in Signal Transduction Molecules in DRG and Spinal Cord to Neuropathic Pain. (Symposium) The 3rd Asian Pain Symposium, 7,18-19, Fukuoka.

⑤ 野口光一(2008)マルチモーダルセンサーTRPA1の機能調節機構。(班会議) 特定領域研究「細胞感覚」平成20年度夏の班会議, 7.1-2, 札幌.

⑥ 野口光一 (2008) 痛み伝達の調節機構-TRPファミリー分子とシグナル伝達-(特別講演) 第22回日本ニューロモデュレーション学会, 5.18, 東京.

⑦ 野口光一 (2007) TRP channel family and cutaneous sensation. (指定講演) 第17回国際痒みシンポジウム, 9.15, 大阪.

⑧ 野口光一 (2007) 侵害刺激センサーTRPA1とその調節機構。(シンポジウム) 特定領域研究「細胞感覚」夏のシンポジウム2007, 8.11, 東京.

⑨ Noguchi, K. (2007) Roles of ERK5 in spinal microglia and primary sensory neurons for

neuropathic pain. (Symposium) 7th IBRO World Congress of Neuroscience, 7.12-17, Melbourne, Australia.

⑩ Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. (Workshop) Second International Congress on Neuropathic Pain, 6.7-10, Berlin, Germany.

[図書] (計 1 件)

① 小畑浩一, 野口光一 (2007) 痛みのメカニズム. 運動器の痛み診療ハンドブック, (山下敏彦編), 南江堂, 東京, 2-17.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 光一 (NOGUCHI KOICHI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10212127

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし