

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19689032  
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛における神経ガイダンス因子の多角的アプローチによる分子標的の解明  
 研究課題名（英文） Multilateral approaches for elucidation of the molecular targets of axonal guidance factors in neuropathic pain.  
 研究代表者  
 紙谷 義孝（KAMIYA YOSHINORI）  
 横浜市立大学・医学部・助教  
 研究者番号：90381491

研究成果の概要：脊髄後角における Sema3A 単独での疼痛抑制作用機序を明らかにするため、プロテオミクス解析および Sema3A の神経因性疼痛軽減効果の長期効果検討した。

坐骨神経絞扼神経障害モデルラットの脊髄において Sema3A(2000u/week)によって特異的に変化するタンパク質を 2D-DIGE 法を用いて解析し 3 種を同定、iTRAQ 法によりリン酸化タンパク質の検出も可能であった。

Sema3A による疼痛軽減効果は L5 腰神経結紮モデルラットにおいても認められ、広く神経因性疼痛に認められる作用であることが明らかになったが、疼痛完成後の投与は無効で、一旦軽減した疼痛行動も Sema3A 投与を中止後元に戻るということが明らかになった。

#### 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
年度			
総計	9,700,000	2,910,000	12,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：神経因性疼痛、神経ガイダンス因子、病態生理学、プロテオミクス、イオンチャネル

#### 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛を含むいわゆる慢性痛は現在に至るまでその治療は困難を極め、疼痛メカニズムの解明が治療法の開拓といった観点からも必須である。私は神経ガイダンス因子が末梢神経障害による神経因性疼痛モデル動物の脊髄後角神経終末の神経回路リモデリングに重要な役割を果たしているとの仮説の下、坐骨神経絞扼モデルラットのくも膜下腔に反発性神経ガイダンス因子の一つであるセマフォリン 3A (Sema3A) を投与し、

神経因性疼痛形成初期の疼痛行動がほぼ完全に抑制され、脊髄後角に対する免疫組織学的検討では無随神経終末の脱落が有意に抑制されていることを明らかにした (Anesthesiology 105; A704, 2006)。しかし、Sema3A による神経因性疼痛抑制作用の機序はほとんどわかっていない上、投与後長期にわたる効果は検討していない。一方 Sema3A の細胞内シグナル伝達の全容は明らかになっていないが、受容体である Plexin/Neuropilin complex を介して small

GTPase の一種 Rac1, CRMP, LIM kinase, ERK1/2 といった細胞内リン酸化酵素を活性化させることが示唆されている (J Clin Invest 109(8); 993-998, 2002、Eur J Neurosci 23(9); 2247-54, 2006)

## 2. 研究の目的

本研究では脊髄後角および後根神経節 (DRG) における Sema3A の疼痛抑制作用機序を明らかにする目的で以下の研究を計画した。

(1) : 神経因性疼痛モデルラットの脊髄及び DRG における、プロテオミクス解析の手法を用いたタンパク発現及びタンパクリン酸化のプロファイリング解析。

(2) : Sema3A による神経因性疼痛軽減効果の長期的な効果を行動的にフォローした上でプロテオミクス解析を行い、Sema3A が神経因性疼痛の治療ターゲットとなりうるかどうかを検討するとともに神経因性疼痛完成にかかわる分子を同定する。

(3) : (1)の結果明らかになった標的分子に対して遺伝子操作を行うことにより生じる行動学的、組織学的、電気生理学的変化の解析。

## 3. 研究の方法

(1) : 神経因性疼痛モデルラットの脊髄及び DRG における、プロテオミクス解析の手法を用いたタンパク発現及びタンパクリン酸化のプロファイリング解析。

神経因性疼痛モデルラットは雄性SDラット (220-270g) を用いた。薬剤投与用くも膜下カテーテルとして神経障害モデル作成の2-3日前にYakshらの方法に従いラット頸部からポリエチレンチューブ (PE10) を挿入し、24時間以上の観察時間の後、神経障害がないものに対して左坐骨神経結紮によりCCIモデルを作成した。この際薬剤投与群として、ラットにおいても効果が確認されているChick-Sema3A精製タンパク、10 unit/ $\mu$ Lに希釈、総量2000unit)及び加熱による不活性化Sema3Aタンパク (10 unit/ $\mu$ Lに希釈、総量2000unit)を浸透圧ミニポンプ (Alzet社製)に充填し、くも膜下カテーテルに接続、タンパク投与を行った。7日間の神経因性疼痛完成期間を経た後、von Frey法による機械的刺激、Hargreaves法による熱刺激に対する疼痛閾値を測定し、痛覚過敏状態を確認した。CCI、偽手術、CCI+Sema3A、CCI+boiled Sema3A、偽手術+Sema3A、偽手術+boiled Sema3Aの各モデルラットを冷生食にて還流し、L5を中心として8mm程度の脊髄を摘出後、液体窒素を用いて凍結後直ちに左右の脊髄後角を分離、PhosphoProtein Purification Kit (QIAGEN)を用いてタンパクを抽出した。

二次元ディフュージョン電気泳動展開 (2D-DIGE)法: それぞれのモデルの脊髄組織3四分の抽出タンパクに対し、ミニマルラベリング法で蛍光色素ラベリング (Cydyne, アマシヤム社)を行い、コントロールラット

の脊髄組織から抽出したタンパクは別の色でラベリングを行った。それぞれのタンパクを混合して2D-DIGEを行った (Ettan DIGE システム、アマシヤム社)。タンパクスポットのシグナル強度の定量化を行った後に、コントロールに比べて大きく発現変動 (1.5倍、 $P < 0.05$ ) していたスポットについてタンパク質量分析 (LC-MS/MS) を用いてタンパク質の同定を行い、疼痛モデルラットの脊髄組織のタンパク発現プロファイルを作製した。

リン酸化タンパク検出法: タンパクの抽出までは2D-DIGE法と同様に行う。精製タンパクを還元の後、トリプシンによる消化を行い、Sigma Phos-selectを用いてリン酸化ペプチドを精製する。精製ペプチドをiTRAQ法を用いて分離後Q-TOF-LC-MSを用いて測定した。

(2) : Sema3A による神経因性疼痛軽減効果の長期的な効果を行動的にフォローした上でプロテオミクス解析を行い、Sema3A が神経因性疼痛の治療ターゲットとなりうるかどうかを検討するとともに神経因性疼痛完成にかかわる分子を同定する。

先行研究と同様にCCIモデルラットに対してSema3Aを経くも膜下カテーテル的し、手術後手術後7週まで機械的刺激による疼痛閾値を測定した。また、異なった神経因性疼痛のモデルとしてラット第5腰神経を結紮切離するSpinal Nerve Ligation (SNL)モデルを用いて、Sema3Aのくも膜下腔投与の影響を検討した。Yakshらの原法によるくも膜下カテーテル留置法は神経障害を生じる率が高く、Brennanらの方法に準じて腰椎からくも膜下カテーテルを留置する方法に代え、Sema3Aの投与方法もSNL作成時の1回のみ2000unit/20-30 $\mu$ Lに変更した。疼痛閾値は手術前、術後3、5、7、10、12、15、17日後の各点で測定した。

(3) : (1)の結果明らかになった標的分子に対して遺伝子操作を行うことにより生じる行動学的、組織学的、電気生理学的変化の解析

脊髄の電気生理学的検討は当研究室では初めての実験手法であり、本研究では脊髄スライスの作成法を適正化すると同時に、疼痛知覚の伝達や疼痛における血圧・心拍数の上昇に深く関与する上、かつて当院薬理学教室と共同研究を行っていた際に実際に電気生理学的実験を行っていたこともある脳幹部の孤束核 (Nucleus tractus solitarius: NTS) を用いて、多点皿電極を用いたシナプス伝達測定の前準備実験を行った。具体的には生後3-4週のSDラットを用いてイソフルランによる麻酔後断頭し、NTSを含む250-300 $\mu$ mの厚さの脳幹部スライスを作成し、MED64system

を用いて NTS への入力線維である tractus solitarius 近傍を刺激することによって生じるシナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) を記録し、その特性を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) : 神経因性疼痛モデルラットの脊髄及び DRG における、プロテオミクス解析の手法を用いたタンパク発現及びタンパクリン酸化のプロファイリング解析。

タンパク 2次元電気泳動法を用いて CCI 単独群と CCI+不活性化 Sema3A 投与群と同様な発現挙動を示し、CCI+Sema3A 群で逆の発現挙動を示すタンパクスポットを同定、質量分析を行った。このような挙動を示す 2次元泳動上のスポットは 35 個同定された。これらのうち質量分析により既知のものとしては 3 種のタンパク (Gamma-enolase, Superoxide dismutase [Cu-Zn], Cytochrome b) が同定された。このうち、Gamma-enolase, Superoxide dismutase [Cu-Zn] は Sema3A 投与により脊髄での発現はそれぞれ 65.3%、65.8%に減少し、Cytochrome b は Sema3A 投与により 7.28 倍に増加した。いずれのタンパクも脊髄及び後根神経節での発現が報告されており、細胞死との関連が指摘されている。これ以外のスポットについては候補分子は挙げられるものの、タンパク質の同定までには至らなかった。



図 1. CCI+Sema3A で変化があったスポットを示した 2次元電気泳動ゲル。

CCI ラットの脊髄組織におけるリン酸化タンパクのプロテオミクス解析については、2D-DIGE に使用したものと同一サンプルを用いてトリプシン消化後リン酸化タンパクを精製し、iTRAQ 法を用いて分析後質量解析を行った。リン酸化ペプチドは質量解析に耐える程度に精製可能で、iTRAQ の結果、リン酸化タンパクの分布パターンは明らかに CCI+Sema3A 群が CCI 単独群、CCI+boiled(不活性化) Sema3A 群とは異なるパターンを示し、脊髄組織に及ぼす Sema3A の特異的影響を示唆する結果となった。今後は CCI+Sema3A 群に特異的に変化しているリン酸化タンパク

を量的に同定するべく実験を継続している。

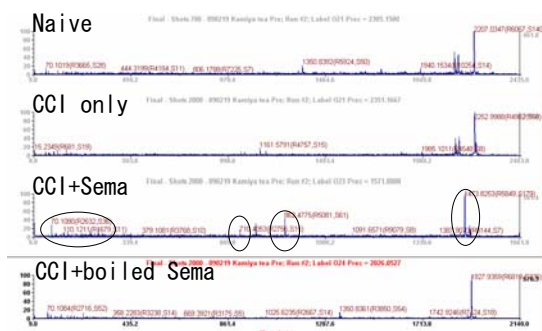
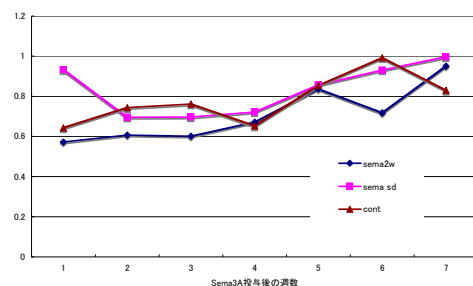


図 2. iTRAQ 法により検出された各サンプルからのリン酸化ペプチドの MS/MS 展開図。CCI+Sema の展開図の円で囲んだピークが Sema3A 投与により特異的に生じているピーク。

(2) : Sema3A による神経因性疼痛軽減効果の長期的な効果の行動学的検討

本研究に先行して行われた研究の結果では、CCI ラットに対して Sema3A 2000unit/week の持続投与により、触刺激による知覚過敏行動は CCI 単独のものが健側の  $65.3 \pm 7.6\%$  だったのに対し  $85.6 \pm 6.6\%$  と有意に逃避潜時の比が増加していたが、Sema3A 投与後 7 週まで観察すると、投与後 2 週間目以降は CCI のみの群と患側の逃避潜時の比は同様になった。また、CCI 施行後 2 週間経ってから Sema3A を 2000unit/week で投与した場合、CCI のみの群と逃避潜時の比は全く同様となった。



	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w
control	64.3	74.4	76.1	65.2	85.4	99.2	83.1
Sema3A	93.3	69.6	69.7	72.2	85.6	93.0	99.6
Sema3A 2week after	57.2	60.7	60.2	67.2	83.6	71.8	95.1

Latency ratio (left/right, %)

図 3. 7 週後までの触刺激逃避潜時の比の推移。

また、異なった神経因性疼痛のモデルとしてラット第 5 腰神経を結紮切離する Spinal

Nerve Ligation (SNL) モデルを用いて、Sema3A のクモ膜下腔投与の影響を検討した。この際、クモ膜下カテーテルの留置経路として腰椎から上方に約 2cm、腰神経の馬尾に相当する部分に達するよう PE10 カテーテルを留置した。頸部からのカテーテル留置では留置後の行動学的脊髄損傷の割合が大きく(自験例で約 20~40%)、研究遂行に重大な影響を及ぼしていたからである。腰部からのカテーテル留置法により脊損率は 10%以下に低下し、以後本法をカテーテル留置法の標準とした。また、実験手技の容易さから Sema3A の投与法を 2000unit(20~30 $\mu$ l)の単回投与とした。疼痛閾値は手術前、術後 3、5、7、10、12、15、17 日後の各点で測定した。その結果、SNL ラットの Sema3A 単回投与においても術後 5 日目までは疼痛行動の減弱が認められたが、7 日目以降は SNL のみのラットと同様の疼痛行動を示した。以上により、Sema3A のクモ膜下腔投与は神経因性疼痛に一般的に疼痛緩和作用を示す可能性が示されたが、その効果は神経障害が完成した後では認められず、また Sema3A の投与中止後比較的速やかに消失してしまうことが明らかになった。

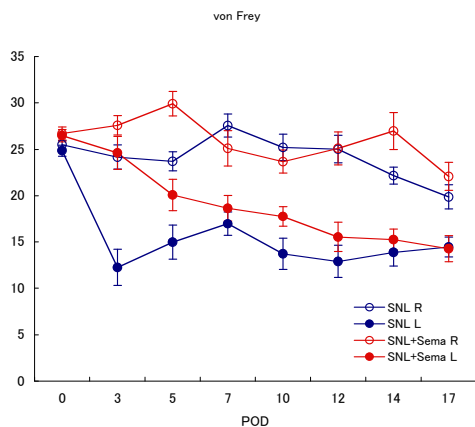


図 4. SNL ラットでの Sema3A 単回投与の触刺激逃避潜時の変化。投与後 5 日後まではコントロール群と比較して傷害側の逃避潜時が延長している傾向があることが判る。  
(3)：電気生理学的変化の解析

予備実験的にラット延髄 NTS における fEPSP の解析を幼弱ラットスライス標本を用いて行った。Tractus solitarius 近傍の電気刺激により、MED64system を用いて 2 次元的な広がりを持つ fEPSP を記録することが可能であった。この fEPSP は AMPA 受容体拮抗薬である CNQX (10 $\mu$ M) によってそのほとんどが消失したことから、AMPA 成分を主とする興奮性のシナプス後電位であることが明らかになった。同時にナトリウムチャンネル阻害薬で

ある TTX (1  $\mu$ M) によりシナプス前電位を示す fiber volley 共々消失したことから確かにシナプス後電位であることが確認できた。同時に脊髄を用いたスライスの作成を試みたが、作成方法が良くなかったためかシナプス電位は記録できなかった

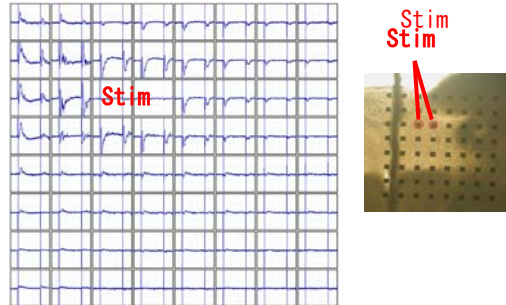


図 5. ラット延髄スライス標本を用いて記録された NTS における fEPSP

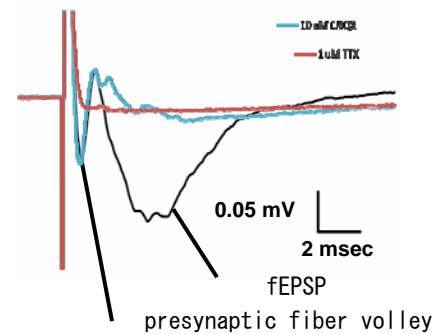


図 6. NTS における fEPSP は TTX 及び CNQX によって消失する。

以上により MED64 system を用いて生理学的なシナプス後電位を記録することが可能であることが証明できたが、脊髄スライスを用いた電気生理学的実験への適応は試料の調製から再検討する必要があると結論できた。

また、研究計画では盛り込まれていた組織学的検討であるが、組織の調製法の基本的事項が守られていなかったため染色性が安定せず、その評価は困難なものとなってしまった。このため現在追試を兼ねて試料の調製を再度行い、今まで行って来た IB4、CGRP の免疫染色に加え、その他のニューロペプチドやグリア細胞のマーカー、リン酸化 MAP-kinase に対する免疫染色などを行っている。また、今回プロテオミクス解析によって明らかになった候補分子に対しても免疫染色を行っているところである。

以上の結果に関して一部をまとめて学会発表及び英文学術誌への投稿準備を進めているところである。本研究に関する付帯事項

として、本研究計画を提案した時点で私は本学医学部生理学教室に異動が内定しており、かなり野心的で盛りだくさんな研究計画を意図的に立案したが、実際は講座再編の都合により異動は実現せず、麻醉科学講座にとどまりつつ本研究を遂行することになった。本研究計画の中で私自身初めて行う実験も多くあり、学内の研究協力者の力添えである程度進捗を得ることができたが結果的には満足いく結果とは言えないことを正直に認識せねばならない。本来であれば3年から4年かけて遂行すべき大きな事案であったと思われる。幸い本研究を通じて、学内に多くの共同研究者を得ることができ、部分的にはあるが本研究を継続できる環境を形成することができたことがもっとも大きな成果とも言えよう。

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

#### 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) Kamiya Y, Kikuchi T, Inagawa G, Miyazaki H, Miura M, Morita S, Goto T. Lidocaine concentration in cerebrospinal fluid after epidural administration: a comparison between epidural and combined spinal-epidural anesthesia. *Anesthesiology*. 2009 May;110(5):1127-32.

[学会発表] (計3件)

(1) Echigo N, Andoh T, Kamiya Y, Goto T. Effects of erythropoietin on the intracellular calcium concentration of rat primary cortical neurons. *Euroanaesthesia 2009*, June 7, 2009, Milano, Italy

(2) Kamiya Y, Kicuchi T, Inagawa G, Miyazaki H, Goto T. *Euroanaesthesia 2009*, June 8, 2009, Milano, Italy

(3) 藤井桃、室田裕大、紙谷義孝、五嶋良郎. ラット孤束核のシナプス活動に対するL-DOPAの影響. 第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜、東京.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHINORI)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：90381491