

平成 22 年 3 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791063

研究課題名（和文） 脳由来神経成長因子および麻酔薬の直接可視化

研究課題名（英文） Development of method for real time visualization of brain derived growth factor and anesthetics

研究代表者

柴田 晶カール （ SHIBATA SHO CARL ）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：70432490

研究成果の概要（和文）：我々は「脳由来神経成長因子（BDNF）および BDNF によるシグナル伝達に抑制に関わる麻酔薬を蛍光イメージ法で直接観察する手法の開発」を目的とし 1 分子レベルで蛍光ラベルした BDNF が、特異的受容体に結合する過程をリアルタイム観察することを計画し蛍光プローブ作成を行った結果、活性を保持した Qdot 融合 BDNF の新たな合成・精製法を確立した。他の神経成長因子への応用が可能であり重要な研究成果といえる。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for fusing Qdot-fluorescent probes with brain derived growth factor without destroying the biological binding properties of the growth factor protein. The method can also be applied to other proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	0	2,600,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度	0		
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

研究分野：麻酔学

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：麻酔学、一分子、脳由来神経成長因子、蛍光イメージ法、量子ドット

1. 研究開始当初の背景

今日では癌の診断・治療の進歩は大きく向上し、患者治療率の上昇や生存期間の延長を可能にしている。特に癌の早期診断が可能になり、また副作用の少ない抗がん剤による治療や的確な外科的治療を可能にする腫瘍マーカーや病理診断をはじめとする腫瘍組織の同定技術の発展により多くのがん患者が救われている。しかし、これらの良好な成果の一方で、がんに伴う精神的、肉体的痛みにつ

いては、ここ数年前までは同様の熱意や科学的な関心が得られていなかったと考えられる。近年、多くのがん患者が痛みや苦痛を抱えていることが理解され、その現実を反映してホスピスや緩和医療の発展し、大きく向上していると考えられる。モルヒネを中心としたオピオイドによる緩和ケアを始めとして、癌性疼痛や神経因性疼痛に対して、多くの治療薬が開発されており、新薬の開発も臨床・基礎研究レベルでも精力的に実行されてい

る。また、椎間板ヘルニアや外傷による神経への損傷は、しばしば慢性の神経因性疼痛を引き起こすことが知られている。こうした慢性神経因性疼痛は、多くの場合難治性で治療の特効薬が存在しない。このような背景に置いて疼痛発生メカニズムの分子機構の解明をすすめることは、痛みの治療に大きく貢献すると考えられる。神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) および脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) は、それぞれ異なる神経系ではあるが痛みの発生メカニズムに関わっていることが知られておりそれぞれの情報伝達系の理解も進んできている。

BDNF は、これまでに主に神経細胞に対して、神経細胞の保護や抗アポトーシス作用を發揮することに関心がもたれていった。BDNF に関する主な研究はこうした作用が障害された神経の再生に重要な役割を果たすと考えられている。その一方で、BDNF が痛みの伝達メカニズムに関与することが近年知られるようになった。早期の炎症による疼痛モデルでは、BDNF は炎症時や神経障害時に他の伝達物質とともに小型脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) ニューロンの中枢端より放出され、後角細胞上で NMDA 受容体をチロシンリン酸化することで疼痛情報伝達の促進に関与していると考えられている。また、慢性の痛みにも BDNF が関与していることが明らかになってきている。神経への障害によって生じる神経因性疼痛では、自発痛、痛覚過敏があり、まれに本来痛みを感じないような刺激に対して痛みを感じるようなアロディニアという異常感覚をとまなうことがあり、慢性疼痛の病態の一つ原因となる。ラットの神経因性疼痛モデルや坐骨神経切断モデルでは、BDNF の発現量がアロディニア発症に寄与することが示唆されてきた。

NGF および BDNF の関与するシグナル伝達経路に関するこれまでの主要な研究では、多数の細胞を固定し、破壊した後分子の集団としての活性化状態を計測する生化学的手法や組織切片レベルでの電気てきな変化を調べるといった手法が使用されており、分子機構のネットワークの解明、分子間の相互作用を明らかにするという成果を上げてきた。

しかし、これらの手法では、生きた1細胞レベルでのネットワークの個々の分子の挙動や分子の空間・時間情報を明らかにすることは不可能である。細胞内情報伝達ネットワークには、外部シグナルを増幅、抑制したりするフィードバック機構やループ、異なるネットワーク間のクロストークやシグナル分岐などが存在し複雑であるため、ネットワークの特性を調べるには生きている細胞でタンパクの活性の変化を実時間で計測する必要がある。そこで、本研究は、BDNF に関わるシ

グナル伝達を蛍光イメージング法で直接観察する手法を開発することを目的としている。また、そうした複雑なメカニズムのもとで、臨床的に使われている痛みの抑制薬である局所麻酔がどのように痛みのシグナルを抑制するかについても、この研究で明らかにしたいと考えている。

2. 研究の目的

脳由来神経成長因子 (BDNF) は、神経細胞上面の特異的な TrkB 受容体に結合すると様々な情報伝達経路の活性化を行い、下流の情報伝達分の活性化を行う神経栄養因子としての機能以外にも小分子神経伝達物質として働くことが知られている。BDNF が TrkB と結合することで、数十ミリ秒オーダーで TTX 抵抗性 Na チャネル (Nav1.9) が開き脱分極が生じる。TrkB と Nav1.9 を使った再構成系の実験で TrkB、Nav1.9 を HEK 細胞に共発現させ BDNF による脱分極反応の再現がなされている。BDNF の高親和性受容体である TrkB からのシグナルが直接的に、あるいは、間接的に極めて迅速に Nav1.9 に伝えられ、チャンネルを開くというモデル考えられてきた。このモデルでは、BDNF が TrkB に結合してから極めて短い時間で脱分極反応が起こることと Nav1.9 にあきらかなタンパク相互作用部位がないことから TrkB が直接 Nav1.9 の gating メカニズムに関与していることが示唆されている。

しかし、実際には BDNF の結合 (刺激入力) と Nav1.9 のチャンネル開口 (応答出力) の間の空間的、時間的特性はわかっていない。このような入力・応答出力関係が成立するには本当に直接的な相互作用が必要なのか? また、入力と出力応答には、どのようなカップリング関係にあるのか、つまり結合した BDNF の一分子は何個の Nav1.9 チャンネルを開くことができるのか? 本研究では、最先端の光学顕微鏡技術を用いて、BDNF の結合から Nav1.9 の開口までの入力・応答関係をナノメートル・ミリ秒単位の分解能で直接可視化する手法を開発し、その情報伝達の仕組みの解明を目的とする。

3. 研究の方法

この研究では、対物型全反射顕微鏡によりエバネッセント場を生じさせ、生きた細胞でタンパク質 1 分子をイメージングすることで個々の生体分子機能を見ることが本研究の土台であり、世界で初めて BDNF の動的な情報伝達過程を 1 分子レベルで検出することに特色がある。生きた細胞で、どの部位で、いつ、どのように活性化が生じるかを実時間で明らかにすることを最終的な目的とする。このために顕微鏡下で長時間蛍光観察が可能なプローブが必要となる。

1 分子レベルで蛍光ラベルした BDNF が、neruoblastoma 由来細胞 SH-SY5Y に結合する過程を、対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡を用いて観察するために、まずは BDNF への蛍光ラベルを行う。長時間観察可能で幅広い励起波長をもつ量子ドット (Qdot) を蛍光ラベルとして選び、BDNF に融合量子ドット融合方法、精製方法を立案、実行することとした。同時に並行して全反射顕微鏡下で蛍光プローブが観測するための計測系、顕微鏡一体型細胞培養装置の設置をおこなった。

4. 研究成果

事業開始当初、諸外国の研究であきらかにな

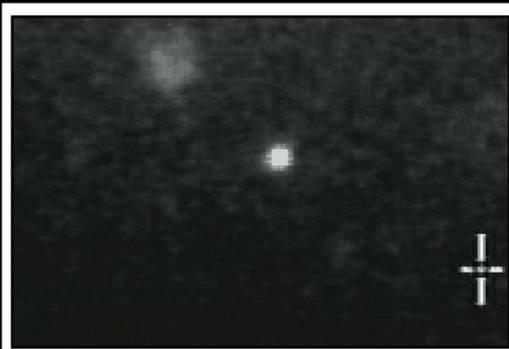


図 1 神経細胞膜上に結合した QdotBDNF の蛍光画像

った。具体的には量子ドット (Qdot) の BDNF への融合が難しく、通常の融合過程では BDNF の生体試料としての活性がほとんど失われるといったこと、また融合過程に使用される触媒が細胞毒性をもつため、融合過程後に精製を行わなければならないといったことで

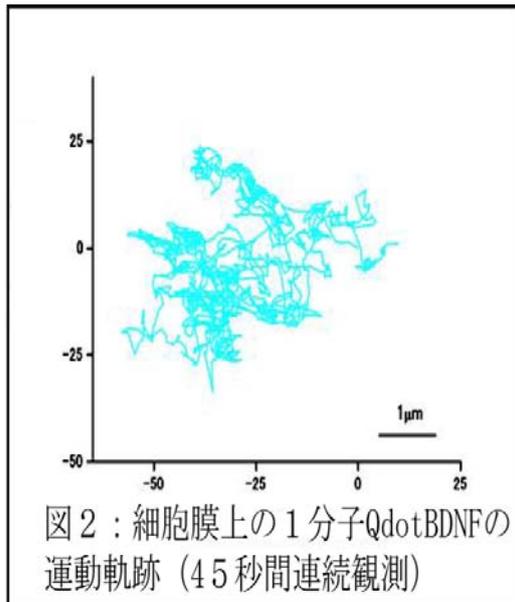


図 2 : 細胞膜上の 1 分子 QdotBDNF の運動軌跡 (45 秒間連続観測)

ある。このため当初の研究計画を変更し、

新たな量子ドット融合方法、精製方法の改良を優先して実験する必要が生じた。その結果、活性を保持した Qdot 融合 BDNF (QdotBDNF) の新たな合成・精製方法を立案し、新たな量子ドット融合方法、精製方法の改良を行い、活性を保持した QdotBDNF の新たな合成・精製方法を確立した。新しく合成された QdotBDNF の活性は、TrkB 受容体をもつ PC12D 細胞との結合能で確認を行った。顕微鏡下で生きた状態でインキュベートされた PC12D 細胞を設置し観察しながら、QdotBDNF をメディウムに加えると数秒後に細胞膜への QdotBDNF の結合が見られた。さらに TRK 受容体と結合し QdotBDNF-TrkB 複合体として動的に細胞上をブラウン運動しながら拡散する様子が見られた。全反射型顕微鏡下での QdotBDNF の蛍光観察時間は、平均で約 50 秒近くあり、長時間観察可能であった。最長のものでは、3 分間可能のプローベも存在した。QdotBDNF-TrkB 複合体として動的に細胞上細胞膜上をブラウン運動しながら拡散する様子を観測できた。これまでの神経成長因子の融合蛍光プローベの可能時間は Cy3NGF で数秒間であり、観測時間が約 10 倍長いプローベが完成したことになる。

また、予想外の成果としては、全反射顕微鏡による励起光の照射深度は試料ガラスプレートからせいぜい 100nm であるが、Qdot は輝度が高く安定しているため全反射型顕微鏡で作られる弱いエバネッセント場でも小胞体のカーゴとして細胞内に取り込まれた後に輸送される様子も観測することができた。

QdotBDNF 融合過程に使用される触媒が細胞毒性についても、生成過程でゲルろ過をくりかえし行うことで克服が可能であった。QdotBDNF の回収率が 1 割まで減少するものの、全反射型顕微鏡下の細胞インキュベータで QdotBDNF を加えた PC12D 細胞の長時間観察が可能であった。Qdot 融合 BDNF の新たな合成・精製方法を確立したという意味では意義深く、そのほかの神経成長因子への応用が可能であるため重要な研究成果といえる。本研究により BDNF が細胞膜上の受容体への結合や結合後の受容体の細胞膜上の挙動を観測する上で強力な蛍光プローブが完成したこととなり、特に Qdot 融合 BDNF と TrkB 受容体複合体が細胞内に取り込まれた後の小胞体輸送の追跡への応用が可能であるため必要な基盤技術となると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 晶カール (SHIBATA SHO CARL)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：70432490

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：