

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07856

研究課題名(和文) BEGAINによって調節される慢性疼痛特異的な脊髄内伝達回路の解明と創薬への試み

研究課題名(英文) Elucidation of chronic pain-specific intraspinal transmission circuits modulated by BEGAIN and drug development

研究代表者

片野 泰代 (KATANO, Tayo)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60469244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛時には、体性感覚の伝達様式が変化し痛覚過敏やアロディニアが生じる。これまでに本病態発症に関わる分子としてBEGAIN (brain enriched guanylate kinase associated protein) を同定した。本課題では、慢性疼痛時の神経細胞活性化パターンの違いを、野生型とBEGAIN欠損マウス間で明らかにした。さらに、BEGAIN欠損により生じる後シナプス肥厚部(PSD)画分での網羅的な発現変動解析を実施した。そしてBEGAINとの機能的相互作用が予想される分子群を同定した。今後これらの分子検証により、慢性疼痛病態機序の解明と新たな創薬標的の同定が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アンメットメディカルニーズのある慢性疼痛の創薬開発を目指す研究である。慢性疼痛の原因は未だ不明な点も多く、関わる分子の多くも明らかではない。我々はこれまでに新たな関連分子としてBEGAINを同定している。そして、本研究ではBEGAIN欠損マウスを用いた疼痛モデルの解析から1)疼痛病態時に活性化する神経細胞を同定し、2)脊髄後角でのシナプスタンパク質の発現変動変解析から、BEGAINと機能的に相互作用する分子を同定した。この成果は慢性疼痛機序の解明と、新たな創薬ターゲットの同定につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)： In the chronic pain, the somatosensory transmission is altered, resulting in abnormal sensations such as hyperalgesia and allodynia. We have identified BEGAIN (brain enriched guanylate kinase associated protein) as a novel molecule involved in the chronic pain. Here, we clarified the differences in neuronal activation patterns in the spinal dorsal horn that occur in chronic pain between wild-type and BEGAIN-knockout mice. In addition, we analyzed the expression levels of proteins in the postsynaptic density (PSD) fraction caused by BEGAIN deficiency. We identified more than 20 proteins that are predicted to functionally interact with BEGAIN. In the future, we will examine the functions of these molecules to elucidate the pathological mechanisms of chronic pain and to clarify their efficacy as drug targets.

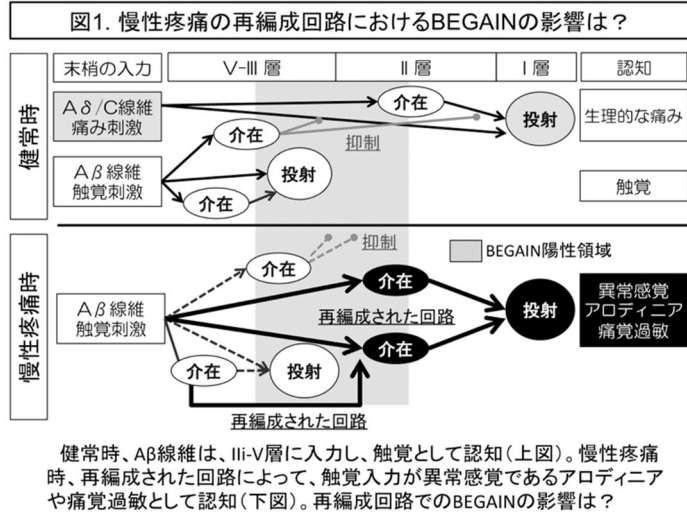
研究分野：疼痛神経科学

キーワード：慢性疼痛 脊髄後角 抑制性ニューロン PSD プロテオミクス 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛では、触覚を痛みと感じるアロディニアや弱い痛みを非常に強い痛みと認識する痛覚過敏が生じる。これら異常感覚を生じる神経系での伝達様式の変化は、シナプス分子による伝達効率や神経細胞間の投射パターンの変化による回路の再編成 (図1下) が関与すると理解されている。しかしながら、本病態の理解は未だ十分ではなく、効果的な治療薬を開発するには、慢性疼痛時に形成される回路の再編成とそこに関わる新規分子を標的とした研究が必要である。

本研究課題において、解析対象とする BEGAIN は、侵害刺激を伝える A δ や C 繊維と、一部の触覚を伝える A β 線維の両方が入力する脊髄後角 Ii-IIIo 層で発現している (図1)。そしてこの領域は、複数の興奮および抑制性の介在ニューロンが存在し、これら介在ニューロンによる回路の再編成が生じる領域でもある。さらに、BEGAIN は同領域で慢性疼痛時に増加することから、慢性疼痛時の回路の再編成に重要な機能を担うと考えられる。



2. 研究の目的

本研究では、i) BEGAIN が、慢性疼痛依存的にどのような発現制御を受け、疼痛の伝達様式の変化に関与するのかを明らかにする。さらに、ii) BEGAIN の分子機序の解明と、BEGAIN を標的とした慢性疼痛の創薬のシーズを探索することを目的とする。

i) BEGAIN の脊髄後角内神経回路へ及ぼす影響についての解析

BEGAIN は、IB4 と PKC γ 陽性の Ii-IIIo 層に跨って層状に発現する。そして BEGAIN は、一次求心性線維の細胞体では検出されないことから、PKC γ 同様に脊髄後角の特定の介在ニューロンで発現することが予想される。しかしながら、BEGAIN の mRNA は脊髄後角の特定の層での偏在はなく、前角の運動ニューロンも含め灰白質全体で発現する。一方、生理的な痛覚伝達に異常はなく、アロディニアの発症のみが有意に抑制される。加えて、脊髄への興奮性入力が増加する慢性疼痛時に、BEGAIN は脊髄後角の後シナプス肥厚部 (PSD) 画分で増加する。これらの結果から、BEGAIN は慢性疼痛に関係し、タンパク質レベルでの発現と局在は、末梢からの入力によって調節される可能性がある。

ii) BEGAIN の分子機序の解明と創薬標的とした相互作用解析

BEGAIN は慢性疼痛時に PSD で増加することから、シナプス部で受容体など機能性タンパク質との複合体形成を促進することで、シナプスの伝達効率を促進させ、アロディニアや痛覚過敏に関わると予想される。しかしながら、BEGAIN は機能性ドメイン等を有さず、未だその分子機能は不明である。そのことから、シナプス画分における相互作用分子を同定し、複合体としての機能から、BEGAIN タンパク質機能の解明を目指す。相互作用分子の同定と複合体として慢性疼痛への関与が明らかになれば、複合体を創薬標的とし低分子化合物を探索する。

3. 研究の方法

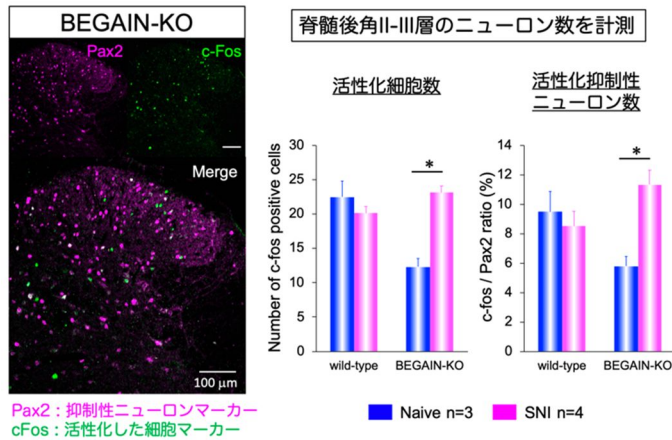
i) マウスで神経障害性疼痛モデルを作製、アロディニア発症時に生じた脊髄内の再編成回路を、神経細胞の活性化 (cFos を指標) から同定する。さらにこの回路に BEGAIN の発現がどのように関与するかを、作製中の BEGAIN-Cre ドライバー (BEGAIN-Cre) マウスを用いて明らかにする。さらに BEGAIN-knockout (KO) マウスを対照とし、BEGAIN 欠損が脊髄内神経細胞の活性化パターンへ与える影響についても評価する。

ii) BEGAIN は不溶性であることから、リコンビナントタンパク質を用いた pull down や免疫沈降法では相互作用分子を同定することが困難であった。よって、BEGAIN-Cre マウスを用いて、BEGAIN 陽性細胞を tdTomato で可視化、フローサイトメーターで BEGAIN 陽性細胞を回収、細胞内含有分子について網羅解析を実施する。BEGAIN-KO マウスを対照とし、脊髄後角 PSD 画分での比較プロテオミクス解析を実施、相互作用分子を探索する。

4. 研究成果

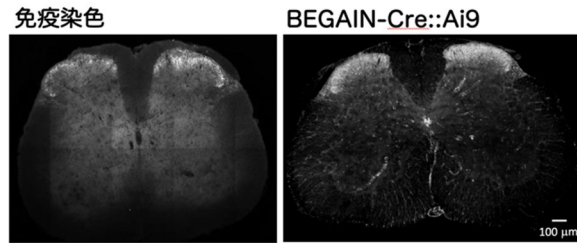
i) 神経障害性疼痛は、BEGAIN-KO マウスで有意に抑制される。この表現型について、神経細胞の活性化が抑制されていると予想した。本仮説を検証するために、神経障害性疼痛モデルの腰部脊髄を用いて免疫組織染色をおこなった。解析は、BEGAIN が発現する II-III 層で実施、cFos 陽性である活性化した神経細胞を可視化、計測した。その結果、II-III 層で野生型マウスに比べ BEGAIN-KO マウスでより多くの活性化ニューロンが検出されるという予想と異なる結果となった。そのことから、活性化した神経細胞の性格付けとして Pax2 陽性の抑制性ニューロンでの活性化を調べた。その結果、BEGAIN-KO では Pax2 陽性の神経細胞の顕著な活性化が認められた(図2)。そのことから、BEGAIN 蛋白が脊髄内の抑制性の神経回路に作用することで、機械的アロディニアを抑制している可能性が示唆された。

図2. BEGAINは抑制性ニューロンの活性化に影響する



ii) これまでの免疫染色法による結果から、BEGAIN が脊髄後角 Iii-IIIo 層の樹状突起に発現することを明らかにしてきた(図3左)。今回 BEGAIN-Cre driver マウスと Ai9 マウスと交配することで、BEGAIN 発現細胞を tdTomato 陽性細胞として可視化できた。脊髄後角での BEGAIN 陽性細胞は II-III 層の介在ニューロンであることが明らかになった(図3右)。よって、本マウス脊髄の tdTomato 陽性細胞をフローサイトメーターを用いて回収を試みた。しかしながら、本研究での条件下では BEGAIN 陽性あるいは陰性のいずれの神経細胞もモインタクトな状態で回収することができなかった。得られた細胞にはダメージが強く、分子同定に使用するための回収細胞の性格付けが困難であった。そのことから、野生型および BEGAIN-KO マウス間での比較プロテオミクス解析を実施、その発現量差から BEGAIN との機能的相互作用分子の探索を行うこととした。

図3. BEGAIN陽性細胞は脊髄II-III層に局在する

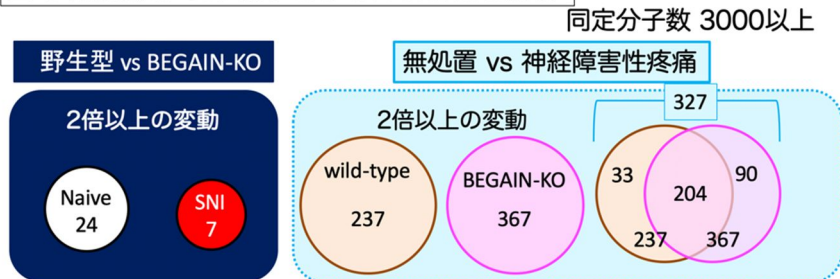


BEGAINタンパク質は、脊髄後角Iii-IIIo層に発現することがわかってきた(左)。今回BEGAIN-CreドライバーマウスとAi9レポーターマウスを交配することで、BEGAIN陽性細胞を可視化した。その結果BEGAIN陽性細胞が脊髄II-III層に局在することが示された(右)。

本プロテオミクス解析の結果、脊髄後角 PSD 画分から 3000 以上のタンパク質を同定した。そして野生型と BEGAIN-KO あるいはそれぞれのマウスでの無処置群と神経障害性疼痛モデル群間での比較解析から、2 倍以上の発現変動を示す分子を多数見出した(図4)。遺伝子群間では、無処置では 24 以上、神経障害性疼痛では 7 つの発現量の異なる分子が同定された。さらに、無処置と神経障害性疼痛間での変動分子として野生型では 237、BEGAIN-KO では 367 が同定された。これら変動群間比較では、より多くの分子を抽出することができた。

これらの有意に変動する分子中には、BEGAIN との機能的な相互作用を示す分子が含まれることが予想される。今後、同定分子との相互作用の検証と BEGAIN 複合体の解析により、BEGAIN 自身の分子機能の解明と鎮痛薬としてのシース化合物の探索が可能になる。

図4. 脊髄後角PSD画分におけるProteomics解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ito Seiji, Pham VuongM, Matsumura Shinji, Katano Tayo, Funatsu Nobuo | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Diabetic neuropathy research: from mouse models to targets for treatment | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neural Regeneration Research | 6. 最初と最後の頁 1870 ~ 1870 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.259603 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 1.Katano, T., Abe, M., Watanabe, M., Sakimura, K. and Kobayashi, T. |
| 2. 発表標題 Comparative analyses of neuronal activation in the spinal dorsal horn for mechanical allodynia after Spared nerve injury between wild-type and BEGAIN-knockout mice. |
| 3. 学会等名 The 1st CJK international Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 片野泰代、阿部学、渡辺雅彦、崎村建司、伊藤誠二、小林拓哉 |
| 2. 発表標題 脊髄におけるBEGAIN陽性介在ニューロンの可視化 |
| 3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Katano, T., Konno, K., Nishida, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Ito, S. and Kobayashi, T. |
| 2. 発表標題 Expression analysis of BEGAIN mRNA and protein in the nervous systems. |
| 3. 学会等名 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 片野泰代、今野幸太郎、西田和彦、渡辺雅彦、崎村建司、小林拓哉、伊藤誠二 |
| 2. 発表標題 脊髄後角における疼痛関連タンパクBEGAIN陽性細胞の機能的特徴 |
| 3. 学会等名 第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学大会/NEURO2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 1.片野泰代、今野幸太郎、高雄啓三、阿部学、崎村建司、宮川剛、渡辺雅彦、伊藤誠二、小林拓哉 |
| 2. 発表標題 Involvement of BEGAIN in memory formation as an excitatory postsynaptic protein in the hippocampus. |
| 3. 学会等名 NEURO2022 / 第45回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|---|---------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 寿野 良二 (SUNO Ryoji) (60447521) | 関西医科大学・医学部・准教授 (34417) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|