

機関番号：34406

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20602011

研究課題名 (和文) 神経ペプチドノシスタチン結合タンパク質による疼痛制御

研究課題名 (英文) Regulation of pain transmission by a neuropeptide nocistatin binding protein.

研究代表者

芦高 恵美子 (OKUDA-ASHITAKA EMIKO)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：50291802

研究成果の概要 (和文)：神経ペプチドノシスタチンは、神経損傷後の慢性痛や炎症性疼痛に対し抑制効果を示す。我々は、マウス脊髄シナプス膜よりノシスタチンに結合するタンパク質 (Nocistatin binding protein, NSP) を同定した。ノシスタチンは神経組織に広く存在している N 末端の欠損した 29 kDa の NSP と結合した。NSP 遺伝子欠損マウスでは、野生型で認められたノシスタチンによる触覚刺激によるアロディニアの抑制効果の消失に加え、炎症性疼痛の増強も認められた。

研究成果の概要 (英文)：The neuropeptide nocistatin has inhibitory effects on chronic pain after nerve injury and inflammation. We identified a protein (Nocistatin binding protein, NSP) that interacted with nocistatin from synaptosomal membranes of mouse spinal cord. Nocistatin interacted with the N-terminal truncated form of 29-kDa NSP that was ubiquitously expressed in neural tissues. The inhibition of tactile allodynia by nocistatin seen in wild-type mice was completely lacking in NSP-deficient mice, and the inflammatory pain was prolonged in the deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病態医化学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経因性疼痛、アロディニア、炎症性疼痛、遺伝子欠損マウス、ノシスタチン、ノシスタチン結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

末梢組織から脊髄に痛みの伝達を担う一次求心性線維が損傷されると、末梢組織、後根神経節、脊髄において、神経化学的、構造的な可塑的な変化がもたらされ、熱や機械刺激に対する痛覚過敏反応や接触や圧などの非侵害性刺激にまでも痛みを感じるアロディニアが誘発される。我々は、アロディニ

ア発症に、プロスタグランジン (PG)E₂ やノシセプチン/オーファニン FQ (以下、ノシセプチン) が関与すること (Minami, T. et al., *Neurosci. Lett.* 201:239-242, 1995; Okuda-Ashitaka, E. et al., *Mol. Brain Res.* 43:96-104, 1996)、ノシセプチンと同一前駆体タンパク質に存在するノシスタチンが、ノシセプチンや PGE₂ によるアロディニアを抑

制すること (Okuda-Ashitaka, E., *Nature* 392:286-289, 1998.) を明らかにし、神経因性疼痛の制御分子の解明を行ってきた。また、PGE₂ は、EP4 受容体を介したノシセプチンの遊離によりアロディニアを惹起することより、疼痛発症における神経回路網も明らかにした (Okuda-Ashitaka, E. et al., *Eur. J. Neurosci.* 23:955-1004, 2006)。

ノシスタチンは、脊髄後角において、抑制性伝達物質であるグリシンの遊離を抑制すること (Zeilhofer, H.U. et al., *J. Neurosci.* 20:4922-4929, 2000) のほか、グリシンによるグルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体の活性化を抑制すること (Ahmadi, S. et al., *Science* 300:2094-2097, 2003) が報告され、シナプスにおいて抑制性と興奮性の両方の神経伝達を制御していることが示唆された。これらの結果は、ノシスタチンが前シナプスにおける神経伝達物質放出機構の制御に関与していることを示唆するものである。一方、脊髄摘出標本と NADPH ジアホラーゼ活性を組み合わせた *ex vivo* における神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 活性の測定により、ノシセプチンによる NMDA 受容体を介した nNOS の活性化を、ノシスタチンが抑制するのみならず、NMDA による nNOS の活性化をも抑制することを明らかにした (Xu, L. et al., *Neuropharmacology* 52:1318-1325, 2007)。この結果は、ノシスタチンによる作用部位が、後シナプスにも存在している可能性を示唆するものである。

我々は、ノシスタチンによる疼痛制御の分子機構を明らかにするため、ノシスタチンのアフィニティピーズを用い、マウス脊髄シナプス膜画分よりノシスタチン結合タンパク質 (Nocistatin binding protein, NSP) を同定した。ノシスタチン結合タンパク質は、脳、脊髄においても発現し、後シナプス肥厚部 (PSD) に存在することが報告されているが、機能不明のタンパク質である。そこで、このタンパク質の遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型からその機能に迫るといった戦略をとった。この遺伝子欠損マウスでは、ノシスタチンによるアロディニアの抑制効果が消失したことより、ノシスタチンによる痛覚伝達に関与する分子であるが、その詳細な機序は明らかではない。そこで、NSP の遺伝子欠損マウスを用い、ノシスタチンによる疼痛制御機構を明らかにするという研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) NSP の発現細胞系や組織における生化学的解析により、生体に存在する NSP 分子の特性を明らかにする。

(2) NSP 遺伝子欠損マウスを用いて、疼痛モデルマウスを作製し、疼痛閾値に対する効果やリン酸化等の修飾、NSP の痛覚伝達系における発現を検討し、NSP の疼痛制御における位置づけを解明する。

(3) ノシスタチンと NSP との情報伝達系の関連、NSP と会合する分子や、NSP 遺伝子欠損により変化するシナプス分子を同定し、分子間の相互作用やシナプス制御に基づく情報伝達疼痛制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) NSP を Cos7 細胞に導入した細胞発現系を作製し、NSP の部位特異的な抗体による Immunoblotting を行い、NSP のタンパク質性を検討した。また、組織や細胞内局在についても解析した。

(2) カラゲニンやホルマリンの後脚への投与による炎症性疼痛モデルマウスを NSP 遺伝子欠損マウスに適応し、疼痛反応を測定した。さらに、疼痛発症に伴うシグナル伝達系に関与する分子のリン酸化の変化を検討した。

(3) ノシスタチンと NSP との情報伝達系の関連を明らかにするため、NSP 発現細胞における細胞内 Ca²⁺濃度の変化を測定した。

(4) NSP と会合する分子を、免疫沈降法、Yeast two hybrid法および、タンパク質相互作用データベースの検索により同定した。

(5) NSP の生理的役割を明らかにするため、NSP 遺伝子欠損マウスの全身の組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 成熟型 NSP

NSP は、アミノ酸配列の解析から 33 kDa の膜一回貫通型タンパク質であると推定された。NSP 細胞発現系を作製したところ、N 末端がプロセッシングされた 29 kDa の NSP が発現していた (図 1)。

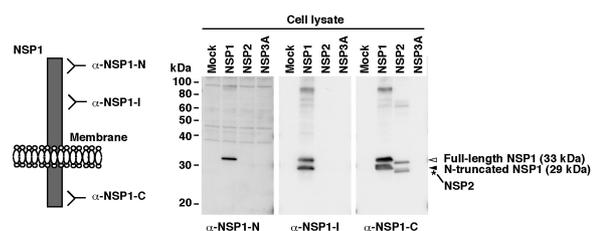


図 1 Cos7 細胞発現系における NSP

NSPの部位特異的抗体を用いた非透過性細胞の蛍光免疫染色(図2)やSulfo-NHM-LC-Biotin標識法による解析により、NSPは細胞膜表面に発現するC末端側を細胞内ドメインとする膜タンパク質であることが明らかになった。

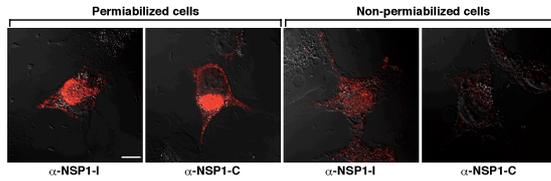


図2 NSPの細胞表面への発現

成熟型29 kDaのタンパク質は、脳、脊髄、肝臓および腎臓に発現しており(図3)、神経系においてはシナプス膜画分とミトコンドリアに局在していた。

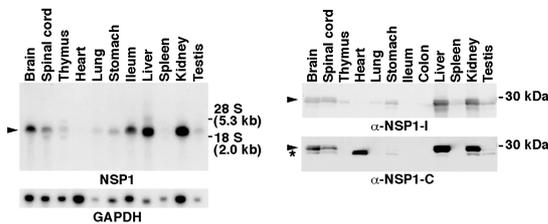


図3 NSP1のmRNA(A)とタンパク質(B)の局在

(2) NSP欠損マウスにおける疼痛制御

ノシスタチンは、アロディニアを抑制するのみならず、ホルマリンやカラゲニン投与による炎症性疼痛にも抑制効果を示した。NSP遺伝子欠損マウスでは、カラゲニン投与1日後における熱刺激に対する痛覚過敏反応の増強が認められた。また、ホルマリン試験においては、化学的な末梢神経終末刺激による第I層(0-10分)の疼痛反応には野生型と欠損型で差は認められないが、脊髄後角における感作であるII層の後半部(25-50分)の痛覚反応の亢進が認められた(図4)。

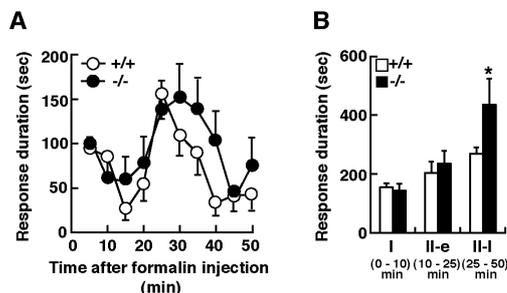


図4 NSP遺伝子欠損による炎症性疼痛増強(A.経時, B.層, +/+ :野生型, -/- :欠損型)

さらに、ホルマリン投与後30分に脊髄後角における Extracellular signal-regulated

kinase (ERK)のリン酸化の増強が認められた(図5)。NSPは、脊髄後角における疼痛の中樞性感作の制御機構に関与する分子であることが示唆された。

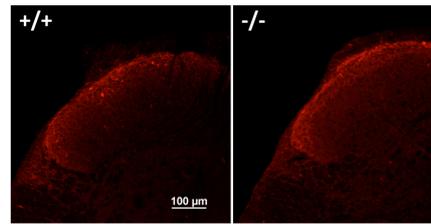


図5 NSP遺伝子欠損による脊髄後角のERKのリン酸化(+/+ :野生型, -/- :欠損型)

これまで、我々は、神経損傷に伴う神経因性疼痛の維持にnNOSの活性化が関与することを明らかにしてきた。nNOSの活性化には、NMDA受容体のNR2BサブユニットのTyr1472のリン酸化や Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)やATPによるnNOSの細胞膜への移行が関与していた。産生されたNOは、逆行性メッセンジャーとして前シナプスからの神経伝達物質の遊離を抑制した。また、神経因性疼痛には、ニューロンによる制御のみならず、活性化マイクログリアの遊走が関与していた。NSP遺伝子欠損マウスではNMDA受容体のNR1, NR2B, nNOSや、ニューロンとグリア細胞のマーカータンパク質の発現には、顕著な量的な変化は認められなかった。また、脊髄後角のノシスタチンの量的な変化も認められなかった。今後、NSP遺伝子欠損マウスにおいて神経因性疼痛制御分子の基質的な変化や活性化の解析を行うことにより、NSPの神経因性疼痛への関与を明らかにする。

(3) NSPの分子制御機構

ノシスタチンは、初代脊髄神経培養細胞において細胞内Ca²⁺濃度を上昇させたが、NSP発現Cos7細胞においてはその上昇は認められなかった。このことより、NSPはノシスタチンと結合するものの、単独でノシスタチンのシグナル伝達を制御するものではなく、会合分子による制御が必要であることが考えられた。そこで、tag付加NSPや抗体を用いた免疫沈降法、Yeast two hybrid法、相互作用データベースの検索によりNSPに会合する分子の同定を試みた。Tag付加NSP発現細胞や、脳と脊髄の抽出物に対する抗体を用いた免疫沈降法では、少なくとも3つのタンパク質を単離し同定した。また、タンパク質相互作用データベースの検索により20種類のタンパク質を推定される相互作用分子として確認した。

NSPと相互作用を示す分子の中で、受容体やチャネル分子として、Transient receptor

potential V(TRPV) 6 を得た。TRPV6 は、腎臓や小腸の Ca^{2+} 吸収に関与し、生体のカルシウム恒常性維持に重要な役割を果たしている。RT-PCR により TRPV6 が脳や脊髄においても発現していることを確認した。NSP は TRPV6 と結合し、その Ca^{2+} 流入を抑制した。一方、NSP は G タンパク質シグナル伝達調節因子 RGS2 とも相互作用を示した。RGS2 は TRPV6 とも会合し、TRPV6 の Ca^{2+} 流入を抑制する。NSP 遺伝子欠損マウスより調製した脳シナプトゾーム画分において、TRPV6 と RGS2 の相互作用は消失したことより、NSP は TRPV6 と RGS2 と複合体を形成することにより、TRPV6 のチャネル活性を調節していることが明らかになった。ノシスタチンの TRPV6 や RGS2 とのシグナル制御への関与は今後の課題である。

(4) NSP の生理的役割

NSP は、脳や脊髄の他に肝臓および腎臓にも発現が認められた(図 3)。末梢組織に関する組織学的な解析を行ったところ、NSP 遺伝子欠損マウスにおいては、脂肪・下肢骨格筋の肥大化、肝細胞の縮小化などが認められた。これらの末梢組織への影響より、NSP が生体のエネルギー代謝の調節をも制御している可能性が示唆された。

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 9 件)

- ① Matsumura, S., Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., Lu, J., Naritsuka, H., Ya maguchi, M., and Ito, S. Characterization of nestin expression in the spinal cord of GFP transgenic mice after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 170:942-953, 2010. 査読有
- ② Matsumura, S., Kunori, S., Mabuchi, T., Katano, T., Nakazawa, T., Abe, T., Watanabe, M., Yamamoto, T., Okuda-Ashitaka, E., and Ito, S. Impairment of CaMKII activation and attenuation of neuropathic pain in mice lacking NR2B phosphorylated at Tyr1472. *Eur. J. Neurosci.*, 32:798-810, 2010. 査読有
- ③ Kunori, S., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Katano, T., Audoly, A.P., Urade, Y., and Ito, S. A novel role of prostaglandin E_2 in neuropathic pain: blockade of microglial migration in the spinal cord. *Glia*, 59:208-218, 2011. 査読有

- ④ Lu, J., Katano, T., Okuda-Ashitaka, E., Oishi, Y., Urade, Y. and Ito, S. Involvement of S-nitrosylation of actin in inhibition of neurotransmitter release by nitric oxide. *Mol. Pain*, 5: 58-70, 2009. 査読有
- ⑤ Moriuchi, H., Koda, N., Okuda-Ashitaka, E., Daiyasu, H., Ogasawara, K., Toh, H., Ito, S., Woodward, D.F. and Watanabe, K. Molecular characterization of a novel type of prostamide/prostaglandin F synthase, belonging to the thioredoxin-like superfamily. *J Biol. Chem.*, 283:792-801, 2008. 査読有
- ⑥ Ohnishi, T., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, S., Katano, T., Nishizawa, M. and Ito, S. Characterization of signaling pathway for the translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by PACAP. *J. Neurochem.*, 105:2271-2285, 2008. 査読有
- ⑦ Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., Mabuchi, T., Katano, T., Ohnishi, T., Matsumura, S., Ohnaka, M., Kaneko, S., Abe, T., Hirata, T., Fujiwara, S., Minami, T. and Ito, S. Involvement of stem cell factor and its receptor tyrosine kinase c-kit in pain regulation. *Neuroscience*, 153:1278-1288, 2008. 査読有
- ⑧ Katano, T., Furue, H., Okuda-Ashitaka, E., Tagaya, M., Watanabe, M., Yoshimura, M. and Ito, S. N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation. *Eur. J. Neurosci.*, 27:3161-3170, 2008. 査読有
- ⑨ 松村伸治、阿部哲也、芦高恵美子、伊藤誠二 痛みのメカニズムとその制御 痛みにおける NO の関与 *BIO Clinica* 23:397-403, 2008. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 芦高恵美子 分子イメージングによる痛みの制御機構の解明 第 57 回バイオメクフォーラム 21 研究会 2010. 6. 19 大阪
- ② 陸景珊、片野泰代、芦高恵美子、大石陽、裏出良博、伊藤誠二 アクチンの S-ニトロシル化(S-NO)を介した神経伝達物質の遊離調節機構 第 82 回日本生化学会大会 2009. 10. 24 神戸
- ③ 大西隆之、芦高恵美子、松村伸治、樋口宗史、伊藤誠二 ATP による nNOS の細胞膜への移動の分子機構の解明 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 2008. 12. 10 神戸

〔図書〕（計1件）

- ① 芦高恵美子 慢性疼痛における薬剤選定と治療薬開発（第3章その他の慢性疼痛のメカニズムとアプローチ 第1節遺伝子的要因による痛み発現メカニズム）
pp. 124-130, 2010, 技術情報協会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦高 恵美子 (OKUDA-ASHITAKA EMIKO)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：50291802

(2) 研究分担者

伊藤 誠二 (ITO SELJI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80201325

(3) 連携研究者

無し