

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20602013

研究課題名（和文）蛍光発色マウスを用いる神経因性疼痛モデルにおける神経再生機構の解明

研究課題名（英文）Study of the nerve regeneration in neuropathic pain models by using fluorescent protein-expressing mice

研究代表者

畝崎 佐和子（UNEZAKI SAWAKO）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50257911

研究成果の概要（和文）：神経特異的に YFP 蛍光タンパクを発現するマウスを用いて、座骨神経切断後再生モデルを作製し、蛍光実体顕微鏡下マウス後肢足背部における神経再生の過程を経時的かつ非侵襲的に評価する方法を確立した。この方法を用いて新規の神経再生に關与する因子の探索を行ったところ、ナトリウムチャンネルの一つである Nax がエンドセリン及び乳酸経路を介して神経再生に關与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We created a peripheral nerve regeneration model by using a thyl-YFP transgenic mice, which express a fluorescent protein (YFP) in their sensory/motor neurons. By monitoring sequentially and noninvasively the foot dorsal cutaneous innervation by in vivo fluorescence imaging, we could evaluate the effect of various factors in nerve regeneration. In these factors, we found that Nax, a sodium channel, is functionally coupled to endothelin for lactate release and involves peripheral nerve regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経再生、イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛とは、侵害刺激を起こす組織損傷がなくても末梢神経や中枢神経の器質的あるいは機能異常の結果として生じる難治性疼痛であり、臨床的には帯状疱疹後神経痛、三叉神経痛、幻肢痛などがよく知られている。末梢神経が切断されると、細胞体より切り離された軸索は速やかに分解され、神経再生のための環境を整えている。次に神経傷害近位端からの発芽（sprouting）、伸長した新しい

神経線維と末梢側にある元の神経回路との再結合および不要な再生神経の除去（pruning）が起こり、ミエリン鞘の形成、運動神経末端の筋受容体との接合によって支配下にある筋肉の機能回復が起こる。これらは軸索、シュワン細胞、そしてそれらを取り巻く細胞外マトリクスによって行われ、その組織環境を維持する神経内膜や、神経周膜、またそれと同時に末梢標的組織の機能維持が重要である。神経損傷から再生が始まるま

での期間が長くなる程これらの組織環境の維持が困難になり、神経因性疼痛の発症につながる傾向にあると考えられている。これまで動物モデルを用いた疼痛の発症および維持は主に生体動物の行動試験を用いて評価されており、神経再生の評価については運動機能回復試験と再生神経の組織学的な解析が用いられてきたが、各試験での結果が一致しないこともしばしば報告されており、これは組織サンプリングの時期が適当でないことや、個体差が原因とされていた。同一個体から神経再生の経時的な変化を評価する方法の確立は、神経再生のより正確なモニタリングを可能にし、神経再生機構の解明につながると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 神経特異的に蛍光タンパクを発現するマウスを用いて人工チューブによる再生モデルを作製し、神経再生の過程を *in vivo* イメージング法を用いて観察する方法を確立する。同時に運動機能の回復および神経因性疼痛の状態も経時的に観察し、総合的に神経再生の状態を評価する。

(2) 前項で確立したモデルに、神経損傷時に産生放出される痛みの発生と調節に関与する物質の阻害剤を投与し、その効果を明らかにする。また、遺伝子改変マウスを用いても同様の解析を行う。

(3) 神経再生に関与することが新たに示唆された、Nax ナトリウムチャンネルの神経再生における役割の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 蛍光イメージングによる神経再生評価法の確立

① 軸索特異的に YFP 蛍光タンパクを発現する Thy1-YFP トランスジェニックマウスを用いて、麻酔下座骨神経を切断し、神経両端をシリコンチューブに縫合し、チューブ内に浸透圧ポンプを用いて持続的に試薬を投与できる神経切断再生モデルを作製した (図 1A, B)。麻酔下マウスの後肢を足背部を上にして固定し、蛍光実体顕微鏡にて神経由来の蛍光を観察した。術後毎週測定を行った。

② 後肢の知覚および運動機能の回復評価として、後肢足底を von Frey フィラメントで刺激し、足を引き上げる回避行動を測定して評価した。術後毎週測定を行った。

③ 術後 8 週目にシリコンチューブ内に再生された神経を回収し、電子顕微鏡による軸索数およびミエリン鞘の厚さの測定を行った。また、免疫組織学的手法を用いて軸索、ミエリン鞘および血管の形態の観察を行った。

(2) 神経損傷時に産生放出される痛みの発生と調節に関与する物質の神経再生への効果の検討

座骨神経切断後再生モデルマウスに、ATP 受容体の広範囲な阻害剤である Suramin、Protein kinase C の阻害剤である R0318220、エンドセリン受容体の阻害剤 (BQ123, BQ788)、プロスタグランジンの産生を阻害する Indomethacin、NO 合成酵素の阻害剤である L-NAME (L-NG-Nitroarginine methyl ester) を投与して、神経再生への効果を検討した。また、膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) のノックアウトマウスおよび Na 濃度依存性のチャンネルである Nax のノックアウトマウスを用いて同様の検討を行った。

(3) 神経再生過程における Nax ナトリウムチャンネルの役割の解明

① Nax ナトリウムチャンネルと乳酸シグナルの関連性の解明: wild および Nax ノックアウトマウスを用いて神経再生モデルマウスを作製し、乳酸および乳酸トランスポーターの阻害剤の投与による神経再生への影響を試験にて測定した。また、その調節メカニズムを詳細に検討するために、座骨神経よりシュワン細胞を単離培養し、*in vitro* での Nax ナトリウムチャンネルを介した乳酸放出の変化を測定した。

② Nax チャンネルとエンドセリン (ET-1) シグナルの神経再生における関連性の解明: 神経が損傷すると ET-1 およびその受容体が増加し、そのシグナルが増強されることから、培養シュワン細胞における ET-1 のナトリウムイオンの取り込みへの影響を検討し、Nax ナトリウムチャンネルおよび乳酸シグナルを経由しておこる神経再生機構の構築を行った。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 蛍光イメージングによる神経再生評価法の確立

① 軸索特異的に YFP 蛍光タンパクを発現する Thy1-YFP トランスジェニックマウスを用いて座骨神経切断再生モデルを作製した (図 1A, B)。術後 2 週および 4 週 (図 1D, E) にシリコンチューブを露出させて再生神経を撮影すると、2 週でチューブの 2/3 程度 (矢印)、4 週では末梢断端まで伸長しているのが確認できる。術後 8 週には指先まで到達する様子が確認できた。(図 1G, H)、この蛍光は足背の皮膚を透過して確認できた (図 1I)。図 2 に測定に用いた神経像を示した。未処置側

(A) と比較して 2 週間には外側 (3-5 指) の神経が消失していたが (B)、6 週間には指まで伸長している神経 (矢印) が確認できた (C)。神経栄養因子である NGF および GDNF

を投与したときの効果を術後 2 - 8 週で経時的に測定したところ、NGF および GDNF にて再生を促進する傾向が認められた。

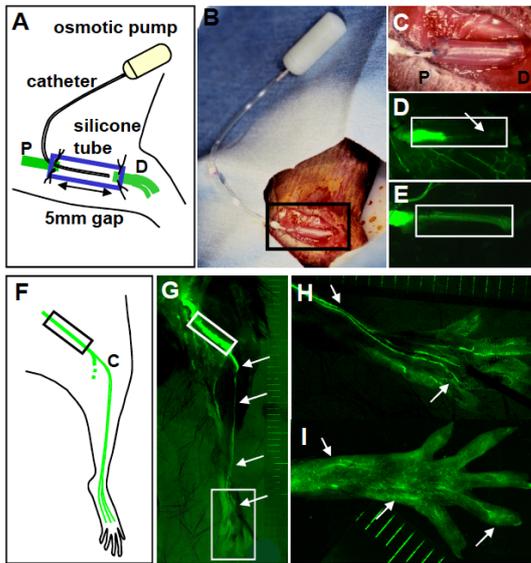


図 1 : 座骨神経切断再生モデルと神経由来蛍光の検出

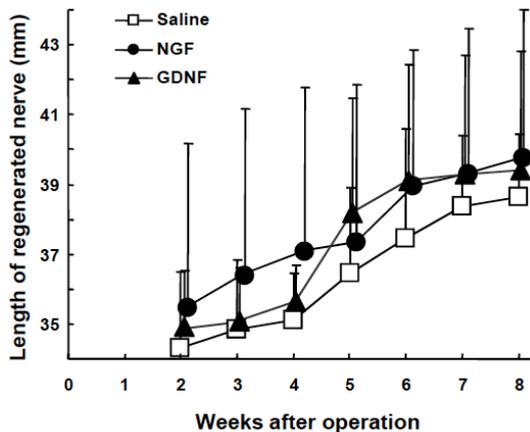
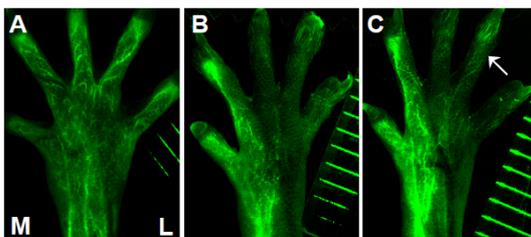


図 2 : 足背部における再生神経伸長の測定

② 後肢足底を von Frey フィラメントで刺激したところ、術後 3 週まではいずれのマウスも回避行動を示さなかったが、4 週には NGF および GDNF 投与群で約 30% のマウスに回避行動がみられた。術後 7 週には全てのマウスで正常な反応が測定された。

③ 術後 8 週に回収した神経を解析したところ、再生神経でも未処理神経同様に (図 3

A-C) 軸索 (YFP ; 図 3D)、ミエリン鞘 (MBP ; 図 3E) および血管 (CD31 ; 図 3F) を確認でき、NGF、GDNF、コントロール群間での違いは見られなかった。電子顕微鏡で観察したところ、3 群に大きな違いは見られなかったが、軸索数およびミエリン鞘の厚さを測定したところ、NGF 投与群において非ミエリン化軸索の数が増加しミエリン鞘が薄くなっていた。

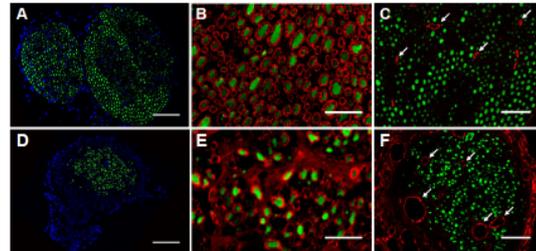


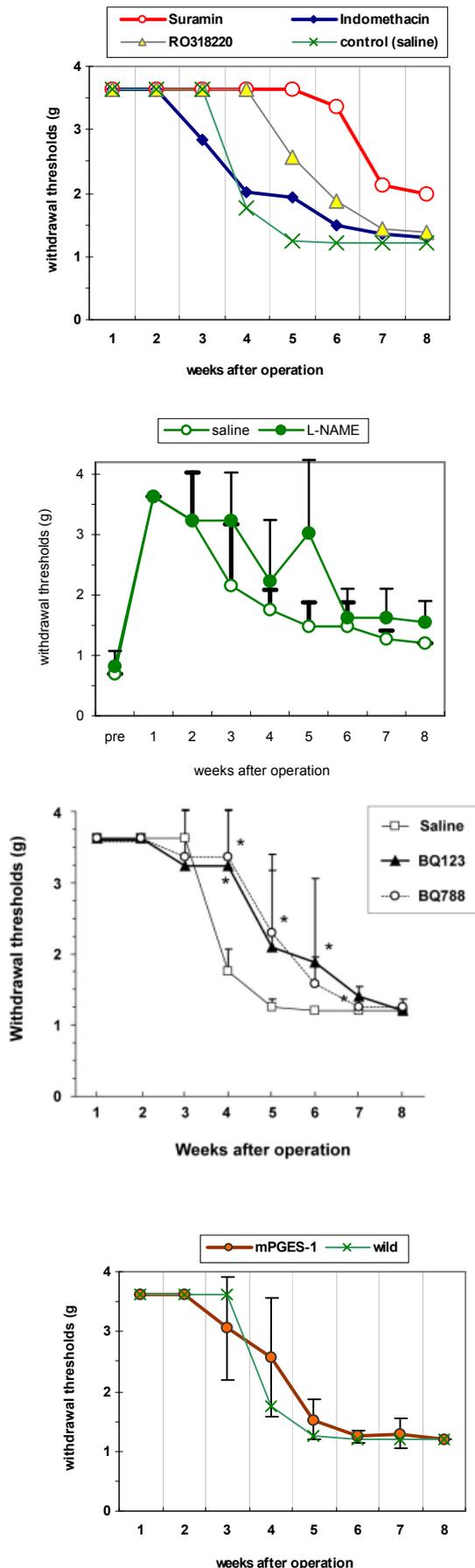
図 3 : 再生神経の組織学的検討

これらの結果より、Thy1-YFP トランスジェニックマウスの足背皮膚での蛍光を *in vivo* イメージング法で測定すると、再生神経の組織学的検討より感度良く、且つ経時的に座骨神経再生を評価できることが明らかとなった。また、von Frey フィラメント刺激に対する回避行動でも *in vivo* イメージング法同様に感度良く再生を評価できることがわかった。この方法を用いることによって他の因子の神経再生効果の評価にも有用であると思われた。

(2) 神経損傷時に産生放出される痛みの発生と調節に関与する物質の神経再生への効果の検討

痛みの発生と調節に関与する物質の神経再生への効果を感じ、運動機能の回復試験を用いて評価した (図 4)。ATP 受容体の阻害剤である Suramin を座骨神経切断再生モデルに投与すると、術後 4 週から 7 週にかけて神経再生の遅れが認められた。NO 合成酵素の阻害剤である L-NAME では術後 3 週から 5 週にかけての遅れが認められた。Protein kinase C の阻害剤である R0318220 およびエンドセリン受容体の阻害剤 (ETRA : BQ123、ETRB : BQ788) では 4 週から 5 週にかけての軽度の遅れが認められた。一方、プロスタグランジン合成阻害剤の Indomethacin は再生阻害効果が認められなかった。また mPGES-1 ノックアウトマウスでは再生阻害効果が認められなかった。Nax のノックアウトマウスでは術後 4 週より再生の阻害が認められ、12 週後でも完全には回復していなかった。

図4：各種因子および遺伝子改変マウスにおける神経再生に伴う運動機能回復の測定



これらの結果より、ATP 受容体は神経再生にも関与することが明らかとなった。Protein kinase C 阻害剤による部分的な再生なく、他のシグナル経路の下流で神経再生に関与していることが示唆される。エンドセリン受容体は ETAR が神経軸索に、ETBR がシュワン細胞に発現することが知られている。エンドセリン受容体阻害剤による部分的な再生の抑制は、これら両者の発現が再生に関与することを示唆している。Indomethacin および mPGES-1 ノックアウトマウスでは再生阻害効果が認められなかったことから、プロスタグランジンは神経再生には関与していないことが示唆された。NMDA 受容体は NR2B サブユニットの Tyr1472 がリン酸化されると活性化し、Ca の流入が起こり、NO 合成酵素が活性化され、疼痛に関与していると報告されている。L-NAME および NR2BY1472F マウスで認められた再生阻害効果は NMDA 受容体の末梢神経再生への関与を示唆するものである。電位依存性 Na チャンネルは発痛に関与することが知られているが、Nax は Na 濃度依存性のチャンネルであり、これまで脳内においては体液の Na 濃度を監視するセンサーとして働くことが知られているが、末梢神経系における生理的な役割については不明であった。今回、Nax ノックアウトマウスで最も強い再生阻害効果が見られたことから、Nax チャンネルを介した新規の神経再生機構の存在が示唆された。

(3) 神経再生過程における Nax ナトリウムチャンネルの役割の解明

① Nax が脳神経系ではグリア系細胞における乳酸放出に関与することが報告されていることから、座骨神経再生における Nax と乳酸の効果を検討した。wild および Nax ノックアウトマウスを用いて座骨神経切断再生モデルマウスを作製し、乳酸および乳酸トランスポーターの阻害剤 (α -cyano-4-hydroxy-cinamic acid, CIN) を投与して神経再生に与える影響を測定した (図 5)。wild マウスに CIN を投与すると、運動機能の回復の遅れが認められた。また Nax ノックアウトマウスに乳酸を投与すると、運動機能の大幅な回復が認められ、この効果は CIN を同時投与することで阻害された。次に、末梢神経でのグリア系細胞であるシュワン細胞における乳酸産生について検討した (図 6)。シュワン細胞培養系において培養液のナトリウム濃度を上げると乳酸の放出が増加した。この効果は Nax ノックアウトマウス由来の細胞ではみられなかった。

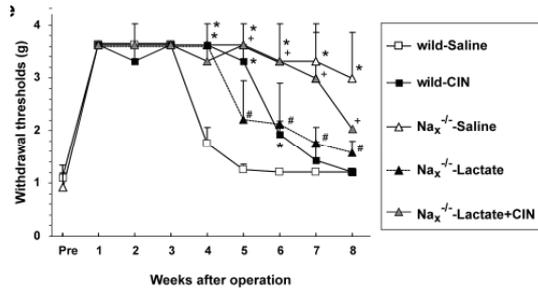


図 5 : Na_x チャンネルおよび乳酸の神経再生に伴う運動機能回復への効果

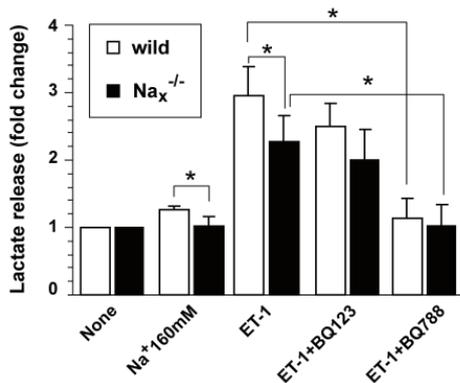


図 6 : 培養シュワン細胞からの乳酸放出

② 神経が損傷すると、ET-1 およびその受容体の発現が増加することが知られている。ET-1 受容体の阻害剤を座骨神経切断再生モデルマウスに投与すると、運動機能の回復が部分的に抑制された (図 4)。シュワン細胞には Na_x チャンネルおよび ETB 受容体が発現しており、培養液中の Na 濃度を上げると、細胞内 Na 濃度の増加が認められた。また、ET-1 を投与しても細胞内 Na 濃度が増加し、これらの効果は Na_x ノックアウトマウス由来の細胞では有意に低かった (図 7)。ET-1 投与によってシュワン細胞からの乳酸放出量も増加し、Na_x ノックアウトマウス由来の細胞では有意に低かった (図 6)。これは ETA 受容体の阻害剤 (BQ123) によっては抑制されず、ETB 受容体の阻害剤 (BQ788) によって抑制された。

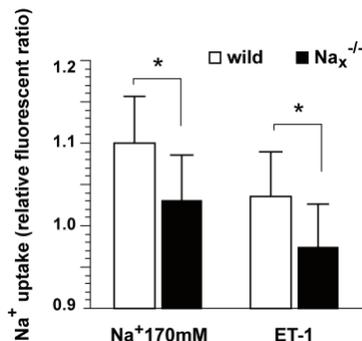


図 7 : 培養シュワン細胞における細胞内 Na 濃度の変化

これらの結果より、生体では Na_x チャンネルを介してシュワン細胞内部の Na 濃度が増加すると、乳酸の再生および放出が増加し、これによって神経再生が促進していることが明らかとなった。Na_x チャンネルを介した Na の流入は細胞外 Na 濃度の増加以外にも ET-1 によっても促進されることから、神経損傷によって増加した ET-1 のシグナルが、Na_x チャンネルを介して神経再生に関与していることが示唆された

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 1 件)

① Sawako Unezaki, Satoru Yoshii, Tamaki Mabuchi, Akira Saito, Seiji Ito: Effects of neurotrophic factors on nerve regeneration monitored by in vivo imaging in thyl-YFP transgenic mice. J. Neurosci. Methods 2009, 178:308-315. 査読有.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畝崎 佐和子 (UNEZAKI SAWAKO)
 関西医科大学・医学部・助教
 研究者番号 : 50257911

(2) 研究分担者

伊藤 誠二 (ITO SEIJI)
 関西医科大学・医学部・教授
 研究者番号 : 80201325