

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22962

研究課題名(和文) Cytohesin-2-Arf6経路が担う疼痛制御機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Clarification of the chronic pain control mechanism of the Cytohesin-2-Arf6 pathway.

研究代表者

伊藤 諭子 (Ito, Akiko)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60623105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内小胞輸送を制御するCytohesin-2-Arf6経路による代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)を介した慢性疼痛の分子制御機構の解明を目的としたものである。Cytohesin-2遺伝子欠損マウスを用いた疼痛モデル、グループI mGluRアゴニスト(DHPG)やCytohesin選択的阻害剤(SecinH3)を髄腔内投与したモデルを用いて疼痛感受性の変化や免疫学的変化の解析を行った。Cytohesin-2はArf6活性化を介して慢性疼痛制御に関与しており、さらにCytohesin-2-Arf6経路はmGluRの発現や下流シグナル伝達の調節により疼痛制御を行う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛は患者のQOLや治療効果の向上に大きく影響するため、その分子機序に基づいた新規治療法の開発に対する社会的要望は高い。本研究は、従来想定外であったCytohesin2-Arf6経路が慢性疼痛制御に関与していることを明らかにし、さらにCytohesin-2-Arf6経路が、先行研究で疼痛制御への関連が知られていた代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の発現調節や下流シグナル伝達制御に関与することで疼痛制御を行っている可能性を見出した。新たな疼痛制御機構が明らかになったことで、慢性疼痛に対する新規治療法や新薬の開発の可能性が高まり、本研究成果は学術的・社会的意義が非常に高いものであると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the molecular control mechanism of chronic pain through metabotropic glutamate receptors (mGluR) by the Cytohesin-2-Arf6 pathway that regulates intracellular vesicle transport.

We analyzed changes in pain sensitivity and immunochemistry using a pain model in Cytohesin-2 conditional knockout mice and a model in which group I mGluR agonist (DHPG) and Cytohesin selective inhibitor (SecinH3) were intrathecally administered. It is suggested that Cytohesin-2 is involved in chronic pain control through Arf6 activation, and the Cytohesin-2-Arf6 pathway may control pain by regulating mGluR expression and downstream signal transduction.

研究分野：疼痛制御機構

キーワード：慢性疼痛 ADPリボシル化因子6(Arf6) Arf6活性化制御因子 Cytohesin-2 代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)

1. 研究開始当初の背景

疼痛は、炎症や傷害などの重要な生体シグナルである一方、慢性化により QOL の著しい低下や身体機能の回復遅延を招くことから、疼痛メカニズムの解明や治療法の開発は非常に重要である。

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は、G タンパク質共役型の興奮性伝達物質受容体として、脊髄後角二次ニューロンのシナプス後膜において痛覚シグナルの伝達効率を調節する主要なシグナル経路である。近年、mGluR シグナル経路が、神経障害後の慢性疼痛や痛覚過敏などの病態に深く関与することが明らかになり、重要な治療標的分子として注目されている。しかし、mGluR の脊髄後角におけるシナプス発現制御機構や分子ネットワークに関して解明すべき課題が多く残されている。

ADP リボシル化因子(Arf6)は、細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送を制御する低分子量 GTP 結合タンパク質として、グルタミン酸受容体のシナプス発現量を調節し、シナプス可塑性に深く関与することが知られている (Scholz *et al.*, Neuron 2010; Brown *et al.*, Nat. Commun 2015)。また、Arf6 活性化制御因子が、X 連鎖性精神遅滞症候群の原因遺伝子として同定され、Arf6 経路の高次神経機能における重要性が注目されている(Shoubridge *et al.*, Nat. Genet. 2010)。さらに、Arf6 活性化制御因子である Cytohesin-2 が、mGluR の細胞表面発現量を調節することも報告されている(Kitano *et al.*, J Neurosci. 2002)。

申請者は、予備実験で Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いて疼痛感受性の行動実験を行い、Cytohesin-2-Arf6 経路が慢性疼痛の新規制御機構である可能性を見出した。これらの先行研究をもとに、『Cytohesin-2-Arf6 小胞輸送経路が脊髄後角ニューロンにおける mGluR5 依存性の慢性疼痛制御に関与している』という実験仮説を立て、研究を開始した。

2. 研究の目的

申請者は、神経機能における細胞内小胞輸送の役割、特に細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送を制御する低分子量 GTP 結合タンパク質である Arf6 経路に着目し、脊髄での慢性疼痛における Arf6 小胞輸送経路の機能関与の可能性を検証する過程で、Arf6 とその活性化制御因子 Cytohesin-2 の慢性疼痛における重要性を示す以下の結果を得た。

Arf6 活性化制御因子 Cytohesin-2 は、脊髄後角のシナプス後膜に豊富に局在する (図 1)。

マウスの足底に完全フロイトアジュバント(CFA)を投与した炎症性疼痛モデルにおいて、脊髄後角での Arf6 活性が増大する (図 2)。

Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスは、慢性疼痛に対する感受性が減弱している (図 3)。

これまでの先行文献や今回の予備実験の結果をもとに、『Cytohesin-2-Arf6 小胞輸送経路が、脊髄後角ニューロンにおける代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)依存性の慢性疼痛の新たな

図 1. 脊髄後角での Cytohesin-2 の発現局在

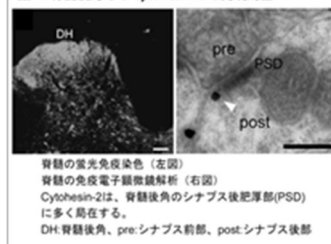


図 2. 炎症性疼痛 (CFA) 刺激による Arf6 活性の増大

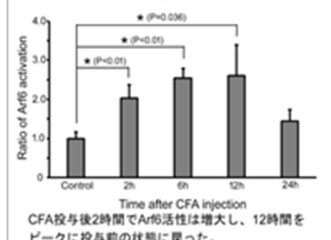
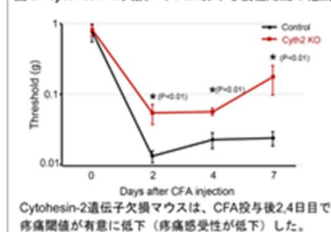


図 3. Cytohesin-2 欠損マウスにおける慢性疼痛の軽減



制御機構である』という実験仮説を構築し、Cytohesin-2-Arf6 経路による

(1)代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)を介した慢性疼痛の分子制御機構

(2)治療標的とした慢性疼痛制御の可能性

について、Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いて分子解剖学的、薬理的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いた mGluR を介する慢性疼痛制御機構の解明

脊髄における Cytohesin-2 と関連タンパクの局在解析

野生型マウスの脊髄における Cytohesin-2 の局在解析や、Cytohesin-2 と Arf6、mGluR1/5 などの関連タンパクとの局在関係について、免疫染色法や免疫電子顕微鏡法を用いて検討する。

Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いた疼痛感受性変化と Arf6 活性変化についての解析

野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いて炎症性疼痛モデル(CFA 投与モデル)と神経障害性疼痛モデル(坐骨神経部分結紮モデル:CCI モデル)を作成し、von Frey 試験で疼痛感受性の変化を評価する。さらに慢性疼痛時における脊髄後角の Arf6 活性変化をウエスタンブロット法で定量する。

グループ mGluR アゴニスト(DHPG)の髄腔内投与による慢性疼痛に対する効果の検討

mGluR の活性化により生じる疼痛感受性の変化について行動学的、免疫組織学的に検討する。野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスに DHPG の髄腔内投与を行い、von Frey 試験で疼痛感受性の変化を評価し、さらに DHPG 投与による mGluR5 や下流タンパク ERK のリン酸化に及ぼす影響についてウエスタンブロット法を用いて検討する。

Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスの脊髄における mGluR と下流タンパク G_q の局在解析

野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスの脊髄後角ニューロンにおける mGluR5 と下流タンパク G_q の局在について、免疫電子顕微鏡法を用いて解析し、Cytohesin-2-Arf6 経路の mGluR を介する慢性疼痛制御機構について形態学的に検討する。

(2)Cytohesin-2-Arf6 経路を治療標的とした慢性疼痛に対する効果の検討

Cytohesin 選択的阻害薬(SecinH3)による慢性疼痛の抑制効果について解析し、治療薬の可能性について検討する。SecinH3 を髄腔内に投与した後、慢性疼痛モデルを作成して疼痛感受性の変化を評価し、さらに Arf6 活性の変化についても解析する

4. 研究成果

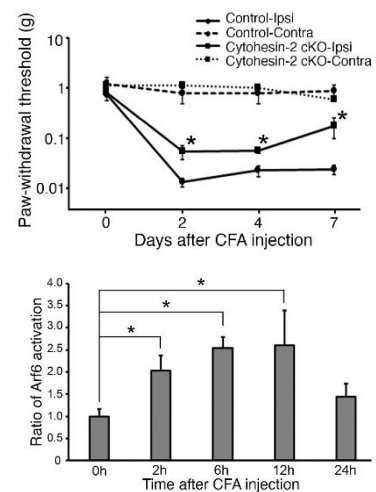
脊髄における Cytohesin-2 と関連タンパクの局在解析

野生型マウスの脊髄腰膨大部において、Cytohesin-2 は脊髄後角 / 層に局在しており、興奮性の介在ニューロンや投射ニューロンに多く存在していた。免疫電子顕微鏡法を用いて詳細な構造解析を行うと、Cytohesin-2 は樹状突起のシナプスに多く存在し、さらにシナプス後膜の肥厚部(PSD)の近傍に多く局在していた。

脊髄後角における Arf6 や mGluR5 の局在を調べると、どちらも Cytohesin-2 と共局在していることが分かった。さらに Cytohesin-2 と mGluR5 については免疫沈降法でも複合体を形成していることを明らかにした。

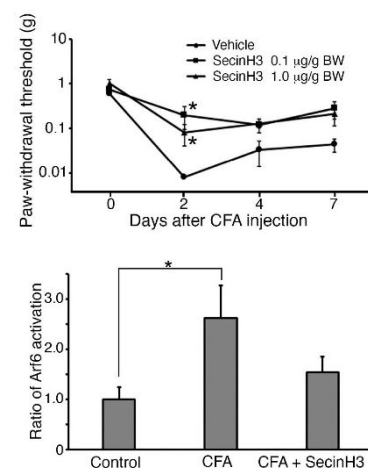
Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いた疼痛感受性変化と Arf6 活性変化についての解析

野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いて慢性疼痛モデルを作成し疼痛感受性の変化を調べた。野生型マウス、Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスいずれも CFA モデル、CCI モデルともに処置後 2 日目で最も疼痛閾値は低下し 7 日目まで反応は持続していたが、両モデルとも Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスの方が疼痛閾値は高かった。さらに野生型の慢性疼痛モデルにおける Arf6 活性の変化を見ると、どちらのモデルも処置後 2 時間で活性化の増大が始まり、処置後 12 時間で Arf6 活性が最も高くなっていた。これらの結果は、Cytohesin-2-Arf6 経路が疼痛感受性の調節に関与している可能性を示していると考えられる。



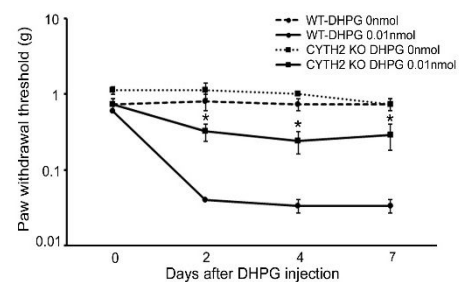
Cytohesin 選択的阻害薬(SecinH3)による慢性疼痛に対する効果の検討

野生型マウスに SecinH3 を髄腔内投与し、疼痛モデルを作成して von Frey 試験で疼痛感受性の変化を調べた。SecinH3 非投与群、投与群いずれも疼痛モデル作成後 2 日目で疼痛閾値は低下したが、SecinH3 投与群のほうが疼痛閾値は有意に高かった。この時の Arf6 活性についても調べているが、SecinH3 非投与群では疼痛モデル作成後 12 時間で Arf6 活性が著しく増大したが、非投与群では Arf6 活性の有意な増大は認められなかった。以上の結果は、SecinH3 による Cytohesin-2 の障害が疼痛閾値の変化に影響することを示しており、Cytohesin-2 は Arf6 活性化を介して疼痛感受性の調整に関与していると考えられる。



グループ mGluR アゴニスト(DHPG)の髄腔内投与による慢性疼痛に対する効果の検討

野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスに DHPG を髄腔内投与し、疼痛感受性の変化を調べた。DHPG を投与すると、両者とも投与 2 日目から 7 日目にかけて疼痛閾値は明らかに低下したが、野生型マウスと比べ Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスの方が疼痛閾値は有意に高かった。さらに DHPG 投与後の脊髄における mGluR5 の量と mGluR 下流タンパク ERK のリン酸化の変化について定量を行った。DHPG 投与による mGluR5 の量は野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスで差は認められなかった。ERK のリン酸化については、野生型マウスでは DHPG 投与によりリン酸化の割合が増大したが、Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスでは ERK のリン酸化は増大しなかった。これらの実験結果から、Cytohesin-2 は mGluR を介した下流タンパクへの疼痛シグナル伝達制御に関与している可能性が考えられた。



Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスの脊髄における mGluR と下流タンパク Gαq の局在解析
野生型マウスと Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスの脊髄後角における mGluR5 と下流シグナル Gαq について免疫電子顕微鏡法を用いて局在解析を行った。野生型マウスの脊髄後角での

mGluR5 は、シナプス後肥厚部(PSD)の近傍に多く局在しており、mGluR5 の下流シグナル G_q も同様に PSD 近傍に多く存在していた。一方で Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスでは、mGluR5 は PSD 内部に多く局在してしたが、G_q は野生型マウスと同様 PSD 近傍に多く存在していた。この結果から、Cytohesin-2-Arf6 経路は mGluR5 の局在に影響する可能性が示唆された。

本研究では、細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送を制御する低分子量 GTP 結合タンパク質である Arf6 の活性化制御因子 Cytohesin-2 に着目し、Cytohesin-2-Arf6 経路がこれまで慢性疼痛の調節に関わることで知られていた mGluR5 を介して慢性疼痛制御に関連する可能性について検討した。Cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いた実験や、Cytohesin 選択的阻害薬を用いた実験から、Cytohesin-2 は Arf6 活性を介して疼痛制御を行っている可能性が示唆された。さらにグループ mGluR アンタゴニストを用いた実験から、Cytohesin-2-Arf6 経路が mGluR5 を介して疼痛制御を行っている可能性が考えられる。さらに Cytohesin-2-Arf6 経路が mGluR5 の局在に関与することで下流タンパクへの疼痛シグナルを調節し疼痛制御を行っている可能性があるが、この詳細なメカニズムについては Arf6 阻害などのさらなる実験により解明していく必要があると考える。

今回の実験で、Cytohesin 選択的阻害薬(SecinH3)は疼痛感受性を減弱することが明らかとなった。この結果は、SecinH3 をもとにした疼痛治療の可能性を見出したが、SecinH3 は 2 型糖尿病様のインスリン抵抗性を示す病態に陥ることが報告されており、現時点では治療薬の開発に結び付けることは困難である。本研究で、初めて Cytohesin-2-Arf6 経路が mGluR5 を介して疼痛制御を調節していることを明らかにした。この発見が今後の新たな疼痛治療開発の一助となることを期待する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Akiko Ito, Masahiro Fukaya, Takeyuki Sugawara, Yoshinobu Hara, Hirotugu Okamoto, Junji Yamauchi, Hiroyuki Sakagami	4. 巻 159
2. 論文標題 Cytohesin-2 mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent mechanical allodynia through the activation of ADP ribosylation factor 6 in the spinal cord.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2021.105466	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷昌弘, 伊藤諭子, 岡本浩嗣, 山内淳司, 阪上洋行
2. 発表標題 The cytohesin-2-Arf6 signaling pathway mediates group I mGluR-dependent mechanical allodynia in the mouse spinal cord.
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷昌弘, 伊藤諭子, 岡本浩嗣, 山内淳司, 阪上洋行
2. 発表標題 マウス脊髄でのサイトヘジン2-Arf6シグナル経路による代謝型グルタミン酸受容体の局在制御と慢性疼痛における役割
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会全国学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------