

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21600002
 研究課題名（和文） 損傷神経に誘導される新規蛋白がイオンチャネル活動調節・痛み情報伝達に果たす役割
 研究課題名（英文） Identification of novel nerve injury-induced proteins and their roles in ion channel modulation and pain transduction
 研究代表者
 横山 茂（YOKOYAMA SHIGERU）
 金沢大学・医学系・准教授
 研究者番号：00210633

研究成果の概要（和文）：ラット坐骨神経切断時に細胞外に放出されることが推測される分子を探索し、その候補として糖タンパク nmb (Glycoprotein non-metastatic melanoma B: Gpnmb) を同定した。Gpnmb は坐骨神経切断端に浸潤するマクロファージに検出された。さらに、正常ラットの脊髄後角 I、II 層のミクログリア細胞にも存在した。これらの結果から、Gpnmb は痛み情報伝達の調節に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We explored genes whose protein products were assumed to be released into the extracellular space after axotomy of rat sciatic nerve, and identified glycoprotein non-metastatic melanoma B (Gpnmb) as a candidate. Gpnmb expression was detected in infiltrating macrophages in the nerve ends. Also, Gpnmb was expressed in microglia in the layers I and II of the spinal dorsal horn of normal rats. These results suggest that Gpnmb might be involved in the modulation of pain transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経損傷、イオンチャネル、痛み

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

神経障害性疼痛発生時には、一次感覚神経線維および交感神経線維の異常な発芽が認められる。さらに、障害部位及び感覚神経節の神経細胞体では、異常な自発性放電と刺激に対する反応過敏も観察される。このような膜興奮異常は膜電位依存性ナトリウム(Na⁺)チャンネルとカリウム(K⁺)チャンネルの活動状態、発現量の相対的变化のために生じると推測され、自発痛、痛覚過敏、アロディニアの要因と考えられてきた。

(2) 国内外の研究動向及び位置づけ

神経障害性疼痛に関与する Na⁺チャンネルのサブタイプとして、Nav1.3、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 が重要視されつつあった。(総説: Cummins, T. R. et al. *Pain* 131, 243-257, 2007) 一方、K⁺チャンネルでは、Kv1.1、Kv1.2、Kv1.4 (Rasband, M. N. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13373-13378, 2001)、KCNQ2、KCNQ3、KCNQ5 (Passmore, G. M. et al. *J. Neurosci.* 23, 7227-7236, 2003)、Kv3.4、Kv4.3 (Chien, L.-Y. et al. *J. Neurosci.* 12, 9855-9865, 2007) の関与が既に報告されていた。

しかしながら、これらのイオンチャンネルの活動、発現量を変化させる分子機構に関しては、ほとんど不明であった。ブラディキニン等の確立した発痛物質によるチャンネル活動調節は詳細に解明されていたが、その過程で惹起されるのはチャンネル蛋白のリン酸化、リン脂質の分解等の短期的な反応であった。神経成長・栄養因子(NGF: nerve growth factor; GDNF: glial cell-line derived neurotrophic factor 等) がチャンネルの発現量を変化させ、発芽を促進することも報告さ

れていたが(Boucher, T. J. et al. *Science* 290, 124-127, 2000 など)、受容体とチャンネルの局在が一致しないなど(Fukuoka, T. et al. *J. Comp. Neurol.* 510, 188-206, 2008 など)、疼痛の成立機序を完全に説明することは困難であった。

(3) 研究開始時までの成果と着想に至った経緯

我々は膜電位依存性 Na⁺および K⁺チャンネルの脊髄後根神経節における発現局在をメッセンジャーRNA (mRNA)あるいは蛋白レベルで明らかにしていた。(Yokoyama, S., Takeda, H., & Higashida, H. *Ann. NY Acad. Sci.*, 868, 454-457, 1999; Felts, P. A., Yokoyama, S., Dib-Hajj, S., Black, J. A., & Waxman, S. G. *Mol. Brain Res.*, 45, 71-82, 1997 など) さらに、予備的実験から、坐骨神経切断ラットの後根神経節で膜電位依存性 K⁺チャンネル(Kv1.2)の mRNA と蛋白が減少することを見出していた。これら研究を通じて、損傷を受けた神経組織で産生される未知の分子が、神経線維の異常発芽に加えて膜電位依存性 Na⁺チャンネルの発現増加並びに K⁺チャンネルの発現低下をもたらすという仮説を持った。既に良く知られていた主要なサイトカインを調べたが、IL-1 β 、IL-6、TNF α などのサイトカインは、疼痛を発生しない坐骨神経伸張刺激によっても誘導されることから、本質的なものではないと考えた。(Osamura, N., Ikeda, K., Ito T., Higashida, H., Tomita, K., & Yokoyama, S. (*Exp. Neurol.* 195, 61-70, 2005; Hagiwara, N., Ikeda, K., Higashida, H., Tomita, K., & Yokoyama, S. *J. Orthop. Sci.* 10, 614-621, 2005)

2. 研究の目的

神経障害性疼痛発生に関与する新規分子を発見することを目的とした。損傷により末梢神経組織で誘導される分子群を包括的に同定し、その中に以下の性質を持つ蛋白が存在するか調べることにした。

(i) 細胞外に分泌、放出されうる分子構造を持つこと。

(ii) 一次感覚ニューロンの膜電位依存性ナトリウム(Na^+)あるいはカリウム(K^+)チャネルの発現量を持続的に変化させること。

(iii) 一次感覚ニューロンあるいは交感神経ニューロンの発芽を誘導すること。

3. 研究の方法

以下の5つの実験を計画した。

- (1) cDNA クローニングと蛋白発現系の確立
- (2) 培養細胞における電気生理学的測定
- (3) 神経突起伸展活性の測定
- (4) 個体レベルでの疼痛の評価
- (5) 免疫化学手法による発現部位の決定

4. 研究成果

(1) cDNA クローニング

成体ラットの左坐骨神経を切断し、近位側断端および健常な右坐骨神経幹から mRNA を抽出した。さらに、cDNA 合成、サブトラクシオン・ハイブリダイゼーション法を行い、cDNA クローン約150個を得て部分塩基配列を決定した。この中で、ホルモン等の液性因子と細胞外マトリックス蛋白が分泌蛋白の構造を備えているので、今後の解析の対象に選んだ。神経障害性疼痛では、傷害されたニューロンだけではなく、非傷害ニューロンでも変化が観察されるので、細胞外に分泌される蛋白が最も有力な候補と考えるからである。本研究では、糖タンパク nmb (glycoprotein

non-metastatic melanoma B、以下 Gpnmb) をさらに解析した。

Gpnmb はI型膜タンパクの構造をもち、細胞分化、免疫・炎症反応、組織再生、腫瘍進展など多様な生物学的過程に関与することが推測されている。また最近、膜型プロテアーゼによって切断されて細胞外スペースに放出されるという報告もある。Gpnmb は神経膠腫で高レベルの発現をすることがあるため、神経系では専ら腫瘍細胞の浸潤・転移の促進因子という観点から研究されてきた。しかしながら、正常神経組織あるいは非腫瘍性神経病変で Gpnmb が発現しているか否かに関してはほとんど不明であり、その細胞局在と機能的役割について全く調べられていなかった。

(2) Gpnmb の神経組織における発現と分布

そこでまず正常ラット並びに炎症モデルラットの中枢神経系における Gpnmb の発現・局在を調べた。まず正常成体ラットの脳内各部位から RNA を抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行った。Gpnmb の mRNA から予測される長さの増幅産物が脳、小脳、脳幹、脊髄の全てにおいて検出され、サザンブロット解析にて Gpnmb に特異的なプローブとハイブリダイズすることが確認された。

次に、ラット Gpnmb カルボキシ末端の15アミノ酸に相当する合成ペプチドをウサギに免疫し特異的な抗体を作製し、免疫ペルオキシダーゼ染色を行った。Gpnmb 様免疫反応陽性（以下 Gpnmb 陽性）細胞は脳実質に広汎に観察され、特に海馬歯状回、小脳皮質、脳室脈絡叢、脳室上衣、脳室近傍周囲で高頻度に認められた。脊髄では、Gpnmb 陽性細胞は広範囲で認められた。特に、後角浅層（I、II 層）で強い Gpnmb 反応性が検出された。（図1）

蛍光二重染色を行ったところ、これらの Gpnmb 陽性細胞の大部分はミクログリアとマクロファージのマーカーである OX42 あるいはイソレクチン B4 陽性であった。これらの結果から、Gpnmb は正常神経組織にも発現しており、中枢神経系の炎症・免疫反応の調節因子として機能することが示唆された。

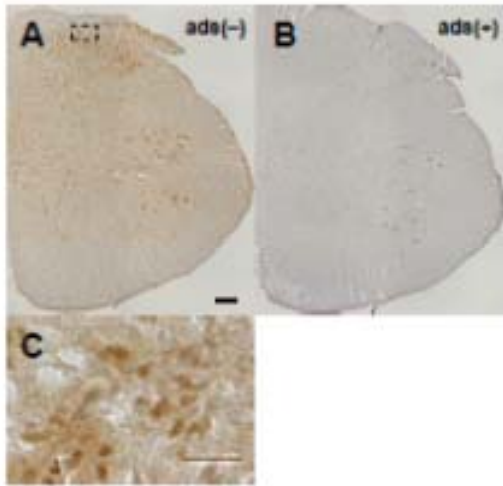


図1 Gpnmb の脊髄における発現。抗 Gpnmb 抗体を用いた正常成体ラットの脊髄の免疫ペルオキシダーゼ染色。一次抗体作製時の免疫原である合成ペプチドで吸収前 (A, *ads* (-)) と吸収後 (B, *ads* (+)) の写真を示す。後角の Gpnmb 様免疫反応性強陽性部分 (A, 点線) の強拡大が C である。(Huang et al., Brain and Behavior 2, 85-96, 2012)

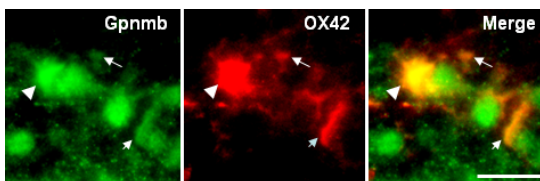


図2 Gpnmb の脊髄後角ミクログリアでの発現。正常成体ラットの脊髄切片を抗 Gpnmb 抗体 (左、緑) とミクログリアのマーカーである OX42 抗体 (中央、赤) で二重染色した。同時に染色される細胞が矢頭、矢印で指示してある (右、黄)。(Huang et al., Brain and Behavior 2, 85-96, 2012)

(3) 損傷坐骨神経における発現上昇

成体ラットの左坐骨神経を切断し、切断端および健常な右坐骨神経幹から total RNA を抽出し、RNA ブロットハイブリダイゼーション解析を行ったところ、近位および遠位切断端で Gpnmb の mRNA レベルの上昇を示す所見が得られた。免疫組織染色では、マクロファージのマーカーである OX42、ED1、OX6 と同時陽性になる Gpnmb 陽性細胞の損傷部位への浸潤が認められた。(Yokoyama and Yanagida, The 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience 演題投稿中、論文投稿準備中)

以上の結果から、Gpnmb が細胞表面膜から未知の膜型プロテアーゼによって遊離、放出され、一次感覚神経遠位枝、脊髄後角のシナプス前・後膜のイオンチャネルの活動に影響を与えるという作業仮説を持つに至った。

(4) 今後の課題

Gpnmb が細胞表面膜から脊髄後角のシナプス前・後膜のイオンチャネルの活動に影響を与える当初の計画のうち、培養細胞における電気生理学的測定と個体レベルでの疼痛の評価に至らなかった。その主な理由は、Gpnmb 蛋白の大量発現と精製ができなかったことにある。Gpnmb の全長を組換え型融合蛋白として大腸菌に発現させるところまで進めたが、菌体から可溶化できない状況にある。現在疎水性の高い膜貫通領域を欠いた、細胞外領域のみの蛋白を作製、Gpnmb の cDNA を組込んだウイルスを直接実験動物に感染させることなどが解決策になるかも知れない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Huang, J.-J., Ma, W.-J., and Yokoyama,

S. (2012). Expression and immunolocalization of Gpnmb, a glioma-associated glycoprotein, in normal and inflamed central nervous systems of rats. *Brain and Behavior* 2, 85-96. DOI: 10.1002/brb3.39 査読有

- ② Ito, T., Ikeda, K., Tomita, K., and Yokoyama, S. (2010). Interleukin-6 upregulates the expression of PMP22 in cultured rat Schwann cells via a JAK2-dependent pathway. *Neurosci. Lett.* 472, 104-108. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.01.061 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Huang, J.-J., and Yokoyama, S. Expression and Immunolocalization of Gpnmb, a Glioma-Associated Glycoprotein, in Normal and Inflamed Central Nervous Systems of Adult Rats. 第2回金沢大学子どもこころサミット 2012年3月17日 金沢大学附属病院 宝ホール 石川県金沢市
- ② Yokoyama, S., and Huang, J.-J. Cellular distribution of glycoprotein non-metastatic melanoma B in the rat central nervous system. The 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 15 (November 12-16), 2011, Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, MD, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr., 438.21.)
- ③ Huang, J.-J., Ma, W.-J., and Yokoyama, S. Expression of Gpnmb, a tumor

metastasis-associated glycoprotein, in the rat central nervous system. 第54回日本神経化学会大会 2011年9月27日 ホテル瑠璃光、石川県加賀市 (Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry 50: 194, 2011)

- ④ Huang, J.-J., Ma, W.-J., and Yokoyama, S. Expression of glycoprotein non-metastatic melanoma B in the rat central nervous system. The 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 15 (November 13-17), 2010, San Diego Convention Center, San Diego, CA, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr., 438.21.)
- ⑤ 横山 茂 神経伝達物質受容体・イオンチャネルの疼痛発生への関与 第23回がん診療拠点病院研修会「緩和ケア講習会」特別講演 2010年6月7日 金沢医科大学 石川県河北郡内灘町
- ⑥ Huang, J.-J., Ma, W.-J., Higashida, H., and Yokoyama, S. Expression of Gpnmb, a tumor metastasis-associated glycoprotein, in the rat central nervous system. 第56回中部日本生理学会 2009年12月4日 石川県立音楽堂交流ホール 石川県金沢市
- ⑦ Huang, J.-J., Ma, W.-J., Higashida, H., and Yokoyama, S. Expression of Gpnmb, a tumor metastasis-associated glycoprotein, in the rat central nervous system. 金沢大学創基150周年記念「講演会・シンポジウム」シリーズ第2回「社会認識」学際脳科学シンポ

ジウム 2009年11月5日(11月5-7日)
金沢大学医学部記念館 石川県金沢市

- ⑧ Yoshikawa, K., Yoshikawa, H., and Yokoyama, S. (2009) Identification and characterization of a novel agrin variant with an alternative carboxyl terminus. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. October 21 (October 17-21), 2009, The McCormick Place Convention Center, Chicago, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr., 861.10.)

- ⑨ 横山 茂 Collagen type VI: a potential nerve regenerating factor. カザン国立大学物理学部と金沢大学医薬保健研究域との共同研究に関する包括的情報交換会 2009年9月1日 金沢大学医薬保健研究域医学類B棟1階小会議室 石川県金沢市

[図書] (計1件)

- ① Yokoyama, S. (2011). Inflammatory cytokines in degeneration, regeneration, and maintenance of sciatic nerve. In: The Sciatic Nerve: Blocks, Injuries and Regeneration. Fonseca, D. J., and Martins, J. L. ed. (Nova Science Publishers Inc., New York), Chapter 9, pp.185-208.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 茂 (YOKOYAMA SHIGERU)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：00210633

(2) 研究分担者

吉川 弘明 (YOSHIKAWA HIROAKI)
金沢大学・保健管理センター・教授
研究者番号：10272981

(3) 連携研究者

東田 陽博 (HIGASHIDA HARUHIRO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：30093066