

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 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21600016

研究課題名（和文）GDNF の神経因性疼痛に対する鎮痛メカニズムの解明；Nav, Kv との関連

研究課題名（英文）GDNF reverses neuropathic pain through mitigation of nerve injury-induced changes in expression of voltage-gated sodium and potassium channels.

研究代表者

福岡 哲男（FUKUOKA TETSUO）

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90399147

研究成果の概要（和文）：L5 脊髄神経結紮（SNL）3 日後から 7 日間グリア由来神経成長因子（GDNF）をくも膜下投与すると、L5 後根神経節（DRG）におけるカリウム電流の A タイプ（ I_A ）の減少がリバーサされ、同時に I_A をコードしているとされる電位依存型カリウムチャンネル Kv4.1 mRNA の減少もリバーサされた。GDNF 脊髄投与は主として Kv4.1 の発現正常化する事によって I_A を元に戻すことで軸索障害を受けた有髄知覚繊維の活動亢進を抑えることで神経因性疼痛に対する鎮痛作用を及ぼすのであろう。

研究成果の概要（英文）：Abnormal spontaneous activities of the injured primary afferents have been proposed as one of the pathomechanisms of neuropathic pain following nerve injury. Whereas spinal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) reduces these activities in A-fiber afferents as well as pain behaviors, the molecular mechanism is controversial. The transient A-type potassium current (I_A) controls membrane excitability, and all three members of Kv4 subfamily of voltage-gated potassium channels, Kv4.1-Kv4.3, encode A-type channels. We examined the effect of spinal GDNF infusion on I_A as well as expression of Kv4.1-Kv4.3 mRNAs in the injured primary afferent neurons using *in situ* hybridization histochemistry and *in vitro* patch clamp technique. Axonal injury by L5 spinal nerve ligation (SNL) significantly reduced I_A amplitude of the large neurons in the ipsilateral L5 dorsal root ganglion (DRG) 3 days after surgery. Seven-days long spinal GDNF infusion started at day 3 reversed the I_A reduction. In normal L5 DRG, actually all neurons expressed Kv4.1 mRNA, a limited number of TrkA-negative neurons exclusively had Kv4.2, and small neurons that bound *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 (IB4+) exclusively expressed Kv4.3. L5 SNL decreased all these mRNAs, and delayed spinal infusion of GDNF reversed the down-regulation of Kv4.1 and Kv4.2, but not Kv4.3. Our data suggest that spinal GDNF treatment should reduce the hyperexcitability of the injured A-fiber afferents by I_A recurrence mainly through normalization of Kv4.1 expression. We propose that this is one of the analgesic mechanisms of GDNF on the animal neuropathic pain model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：疼痛学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：GDNF, Nav, Kv, DRG, neuropathic pain

1. 研究開始当初の背景

軸索を障害された一次知覚神経繊維の異常発火は神経障害後の神経因性疼痛の病因の一つと考えられている。脊髄くも膜下にグリア由来神経栄養因子(GDNF)を投与すると、有髄繊維の異常興奮を抑えるとともに疼痛行動も減弱させることが知られているが、その分子メカニズムについては論争がある。GDNFをL5脊髄神経結紮(L5 SNL)モデルにくも膜下投与すると、L5後根神経節(DRG)における電位依存性ナトリウムチャンネルNav1.3の発現増加、Nav1.8と1.9の発現減少がリバースされるとともに、L5DRGでの自発発火が減少し、疼痛行動が抑制されることは報告されているが(Boucher, 2000, Science)、その後の研究でNav1.3をアンチセンスオリゴヌクレオチドにより発現を抑制したり、Nav1.3遺伝子自体をノックアウトしても、神経障害後の一次知覚神経繊維の自発発火や、アロディニアは生じることから、Nav1.3と自発発火の因果関係は疑問視されるようになってきている。従ってNavの変化と自発発火の直接的関係および、自発発火がなぜ神経因性疼痛を引き起こすのかについては未だに解明されていなかった。一過性カリウム電流の一つA電流(I_A)は細胞膜の興奮性をコントロールしており、電位依存性カリウムチャンネル(Kv)のサブタイプの内、Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3が I_A をコードしていることが分かっている。

2. 研究の目的

GDNFくも膜下投与によるL5 SNLモデルにおける神経因性疼痛の抑制効果を分子生物学的に調べる。対象として、後根神経節に発現している電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav)、カリウムチャンネル(Kv)の他、それに附随する他の遺伝子を選び、神経障害によるそれらの発現の変化をGDNFがリバースしているかどうかを調べる。

3. 研究の方法

80g(電気生理学的実験用)若しくは210-240g(組織学的、行動学的実験用)のSD系ラットを用いた。全ての実験手技は兵庫医科大学動物実験委員会の承諾を得た。

L5脊髄神経結紮とGDNF投与

全ての手術操作はペントバルビタール深麻酔下で行った。腰部の毛をバリカンで剃り皮膚はクロルヘキシジンで消毒した。薬物の持続的くも膜下投与のため、仙骨S1/2レベルで椎弓切除し、硬膜くも膜に切開を加えて外径0.64mmのポリエチレンチューブを頭側に約1.5cm挿入した(先端はL5DRGのレベル)。チューブの反対側は一旦接着剤で蓋をし、皮下に留置した。3日後、行動学的に熱刺激お

よび機械的刺激に対する反応性を確かめ、術前コントロールとした。その際、明らかに知覚低下や麻痺が生じた個体(24匹中3匹)は排除した。残る21匹を7匹ずつL5 SNL + GDNF投与、L5 SNL + 生食投与、シャム手術 + 生食投与に分けて手術を行った。

L5 SNL又はシャム手術は腰部正中に約2cmの皮膚切開を加え、筋肉を脊椎から剥離してL6横突起を同定し、これを電気ドリルを使って慎重に除去した。視野直下に見えるL5脊髄神経を同定し、L5 SNLでは4-0絹糸で強く結紮した。シャム手術では神経の同定のみを行った。その後筋層と皮膚を絹糸で縫合した。更に3日後、術後初めての行動学的評価を行った後、皮下に埋め込んでおいたチューブを同定し、これにGDNF(0.5mg/mlを約0.2ml)又は生理食塩水を充填したミニ浸透圧ポンプ(1microl/h, 7day)を連結した。このGDNF量はこれ迄の報告でL5 SNLモデルにおいて疼痛行動の発生を予防したり、L5 DRGにおけるいくつかの遺伝子発現の変化をリバースすることが確かめられている。

行動学的評価

両側足底に対する熱若しくは機械的行動評価はSNL手術の直前および4, 6, 8, 10日後に行った。熱刺激に対する足の引っ込め潜時(秒)はプランターテストを用いて自動的に行った。機械的刺激に対する足引っ込めの閾値(g)はダイナミックプランターエスレンジオメーターを用いて行った。各々の足について3回測定し平均値を計算した。データは平均±標準誤差で表し、分散分析を用いて統計処理した。

組織学的実験

最終の行動学的評価が終わってから、ラットをペントバルビタールで深麻酔し、断頭した。L5 DRGを取り出し、直ぐにドライアイスで凍結させ、クライオスタットを用いて12micromの新鮮凍結切片を作成し、スライドガラスに貼付けた。

In situ hybridization histochemistry

ラットの8種類のNav(Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9)および15種類のKv(Kv1.1-Kv1.6, Kv2.1, Kv2.2, Kv3.1-Kv3.4, Kv4.1-Kv4.3)のcDNAの内、特異性の高い配列部分(約400-650 base)をDRG由来のtotal RNAからRT-PCR法を用いて増幅し、p-GEM T-easy Vectorにクローニングした。これらのベクターを制限酵素SpeI若しくはNcoIで切断し、35S UTPでラベルされたcRNA probeを作成し、上述の凍結切片にhybridizeし、適切な条件で洗浄した後、乳剤をコーティングして暗箱で保存し、

1-4 週後に現像した。ヘマトキシリンエオジンで染色した後、エタノール系列で脱水し、キシレンで洗ってカバーガラスをかけた。

イメージ分析

組織のイメージはコンピュータに接続した CCD カメラで TIFF ファイルとして取り込み、NIH image を用いて神経細胞上に見られる乳剤が感光して生じる銀粒子の密度を測定し、バックグラウンドの 10 倍を陽性と判断して定量化した。

電気生理学的実験

80gのSDラットに前述と同様にくも膜下カテーテルを留置後、SNL又はシャム手術を施し、更にGDNF(0.5mg/mlを約0.1ml)又は生理食塩水を充填したミニ浸透圧ポンプ(0.5microl/h, 7day)を連結した。手術後3-4日目に日本大学歯学部生理学教室に運び、GDNF開始から7日目の時点で深麻酔下に断頭し、L5DRGからニューロンを取り出してシャーレ上で一晩培養後、標準的手法でボルテジクランプ条件下でホールセルパッチクランプを行い、薬理的にカリウム電流を分離し、更に薬物による反応により I_A 成分を同定し、その電流の大きさをL5 SNL + GDNF投与、L5 SNL + 生食投与、シャム手術 + 生食投与の各群間で比較した。

4. 研究成果

(1) 各種 Nav mRNA が、DRG の一次知覚神経細胞のどのようなポピュレーションに発現しているのかを詳細に調べたところ、Nav1.7 は非侵害性有髄神経細胞の約半分のみが正常では Nav1.7 を発現していないことを見いだした。これは、これまで知られていた全ての一次知覚神経細胞に Nav1.7 が発現しているという知見に一石を投じる結果である。又、侵害受容に重要とされる Nav1.8 は全ての無髄神経細胞に加え、TrkA を持つ有髄神経細胞にも同程度に発現していることが判明した。これは逆に TrkA を持つ有髄神経細胞が侵害受容細胞であることを示唆しており、これまでの我々のデータから、この細胞は冷覚受容体とされる TRPM8 を持つことと、A δ 繊維が冷覚刺激に反応することから、このポピュレーションが A δ 繊維細胞の候補であることが分かった。一方 Nav1.9 はこれまでの報告どおり、無髄神経細胞に特異的に発現していた。この成果は英文雑誌に掲載された (Neuroscience Research 2011)。

(2) 一方、L5 SNL 後の L5 DRG では全体としては Nav1.7 の発現は低下するが、先に述べた元々 Nav1.7 を発現していない大型細胞では逆に新たに Nav1.7 を発現することを発見した。各種マーカーとの共存から、このよう

な細胞は全て TrkC を発現していることから、筋肉を支配している神経細胞であることが分かった。更に、触覚や固有感覚を伝える一次知覚神経繊維が終止する延髄後索核において、Nav1.7 免疫陽性繊維の終末が増加していることを見いだした。このことは、神経因性疼痛における機械的アロディニアの新しいメカニズムの可能性がある。英文論文を作成し、2本の雑誌に投稿したが却下され、現在3つめの雑誌への投稿を準備中である。

(3) L5 SNL 後、直接障害を受けていない L4 DRG において、痛み伝達に重要とされる Nav1.8 の発現が増加するかどうかについては論争があった。すなわち、RT-PCR 法では約 20% の mRNA 量の増加が報告されているのに、免疫組織学的手法では変化が捉えられていなかった。我々はこの問題に初めて in situ hybridization 法を用いて解析し、詳細なデータを用いて、L4 DRG においては全ての Nav mRNA の発現は有意な変化を起ささないことを証明した。更に L5 SNL モデルの L4 DRG では 11-20% のニューロンが障害されており、必ずしも L4 DRG ニューロンの全てが障害を免れているのではないという2つの論文での主張に対し、それは単に手術操作によるものであり、適切に手術されたモデルでは L4 DRG で障害を受けているニューロンは 6% を超えないことを証明した。これらの結果は、英文雑誌に掲載した (Pain 2012)。

(4) 軸索を障害された有髄の一次知覚神経細胞は電氣的に興奮性が亢進していることが知られている。その電気生理学的メカニズムの一つがカリウム電流の一種 A 電流である。A 電流を司るとされる電位依存性カリウムチャンネルのサブユニットは Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3 が知られている。我々は in situ hybridization 法を用いた共存実験で、DRG においては、Kv4.1 は殆ど全ての神経細胞に、Kv4.2 はほとんど発現しておらず、Kv4.3 は IB4 と結合する non-peptidergic ニューロンに選択的に発現しており、L5 SNL によってこれらの発現は低下し、GDNF のくも膜下投与によって Kv4.1 の発現低下ははっきりとリバースされるのに対し、Kv4.3 はほとんどリバースされないことが判明した。このリバース効果を日本大学歯学部生理学教室において電気生理学的に解析したところ、軸索を障害された大型細胞において、A 電流は低下しており、GDNF 投与によってリバースされることが分かった。以上のデータは近日中に英文論文にまとめ、雑誌に投稿する予定である。

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 3 件）

1. Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K,
Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K.
Re-evaluation of the phenotypic
changes in L4 dorsal root ganglion
neurons after L5 spinal nerve ligation.
Pain 2012;153:68-79. 査読有
DOI:10.1016/j.pain.2011.09.009
2. Fukuoka T, Noguchi K. Comparative
study of voltage-gated sodium channel
alpha-subunits in non-overlapping
four neuronal populations in the rat
dorsal root ganglion. Neuroscience
Research 2011;70:164-171. 査読有
DOI:10.1016/j.neures.2011.01.020
3. Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo
M, Fukuoka T, Noguchi K. Increase of
close homolog of cell adhesion molecule
L1 in primary afferent by nerve injury
and the contribution to neuropathic
pain. Journal of Comparative Neurology
2011;519:1597-615. 査読有
DOI:10.1002/cne.22588.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Fukuoka T, Noguchi K. De novo expression
of Nav1.7 in TRKC-Positive neurons
following axotomy. 13th World Congress
on Pain (IASP) 2010. 8. 30 Montreal
2. 福岡哲男, 小林希実子, 山中博樹, 野口
光一. 腰部交感神経節ニューロンにおける
電位依存性ナトリウムチャネルの発現と軸
索切断後の変化. 第 31 回日本疼痛学会
2009. 7. 20 名古屋

〔図書〕（計 2 件）

1. 真下節 編、克誠堂出版、神経障害性疼痛、2011、pp.11-23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 哲男 (FUKUOKA TETSUO)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90399147

(2) 研究分担者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：70418961

(3) 連携研究者

なし