

機関番号：12602
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791980
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛における新規タキキニン ヘモキニン - 1 の役割
 研究課題名（英文） The role of Hemokinin-1 in neuropathic pain
 研究代表者
 松村 朋香（MATSUMURA TOMOKA）
 東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：40527066

研究成果の概要（和文）：

タキキニンファミリーの一種であるヘモキニン - 1 の神経因性疼痛における役割を調べるために、培養ミクログリア細胞を活性化し、ヘモキニン - 1 をコードする遺伝子である TAC4 mRNA の発現量の変化を定量的 PCR により測定した。その結果、コントロールと比較して活性化ミクログリア細胞では TAC4 mRNA の発現量が増加し、神経傷害により活性化されたミクログリア細胞で産生されたヘモキニン - 1 が神経因性疼痛の発症に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of hemokinin-1 (HK-1), a new member of the tachykinin family, in neuropathic pain. HK-1 is encoded TAC4 gene. In the present study, TAC4 mRNA expression was increased in the cultured microglial cells which were activated by LPS. That suggests a specific contribution of HK-1 to neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯科麻酔学・タキキニン・ヘモキニン-1・ミクログリア・神経因性疼痛

1. 研究開始当初の背景

(1) タキキニンは C 末端に共通した特徴的な構造を有する生理活性ペプチド群の総称であり、中枢および末梢神経系において神経伝達物質として、特に侵害情報の伝

達などに深く関わっていることが知られている。代表的なタキキニンは substance P (SP) であり、これは TAC1 遺伝子にコードされる。

- (2)2002年、pre-B細胞から新たなタキキニンとして hemokinin-1 (HK-1)が発見され、これをコードする遺伝子は TAC4 と名づけられた。HK-1 は SP と同等の効力で NK-1 受容体を活性化し、脊髄髄腔内に投与することによって急性の疼痛様行動を引き起こすことが示されている。
- (3)HK-1 は B リンパ球分化の調節因子として同定され、オートクライン、パラクライン的に作用すると考えられている。SP と異なり、HK-1 は神経系だけでなく、多くの臓器や免疫担当細胞にも発現している。TAC4 と NK1 が培養ミクログリア細胞に発現している。
- (4)ミクログリア細胞は末梢神経の損傷に即座に応答し、細胞体の肥大化、細胞増殖、細胞表面分子の発現増加などに特徴付けられる活性化ミクログリアに変化する。活性化ミクログリアは活発に動き回って死んだ細胞を貪食したり、修復を促進するための因子を遊離したりする。近年、ミクログリアの活性化が神経因性疼痛の発症および維持に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。一方、TAC4 遺伝子はミクログリアにおいて発現することが報告されているが、その生理的意義は明らかではない。
- (5)これまで我々はラット神経因性疼痛モデルを作製し TAC4 mRNA の発現を TAC1 mRNA の発現と比較することで、SP と HK-1 の神経因性疼痛に対する異なる様式での関与を示した。また、神経傷害後のラット脊髄後角での発現はミノサイクリンの脊髄ミクログリアの抑制によって発現増加がみられないことを証明し、これにより神経因性疼痛によって起こる TAC4 mRNA は少なくとも一部分は活性化したミクログリア細胞で増加していることが考えられた。

2. 研究の目的

- (1)これまで我々が行ってきた実験で、組織学的な TAC4 mRNA 発現の同定およびタンパク発現については技術的な問題により行うことができなかった。よって、神経傷害後に脊髄後角のどの細胞で HK-1 が発現増加しているのかという問題も、ミクログリア細胞と仮定されながらも組織学的な手法で示すことが不可能であった。そのため、神経因性疼痛における HK-1 がミクログリア細胞で増加しているということを確定するには、培養ミクログリア細胞を活性化させることで神経傷害後に類似した状態をつくり、TAC4 mRNA の発現を測定することが必要であると思われた。

- (3)SP は侵害受容において主要な役割をもっていることが示されているにも関わらず、NK-1 受容体拮抗薬はヒトにおいては鎮痛作用を示さないことが臨床試験から明らかになっている。HK-固有の受容体に対して従来の NK-1 作動薬及び拮抗薬が交差反応する可能性を考慮すると、HK-1 と SP の役割を比較、検討することがタキキニンシステムを標的としたヒトにおいて有効な新規の鎮痛薬の開発に大きく貢献すると考えられる。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

ラット培養ミクログリア細胞 (DS ファーマバイオメディカル, Cat. No. MB-X0501D) を使用した。

培養液はミクログリア培養液 (DS ファーマバイオメディカル, Cat. No. MB-X0502D) を使用し、5% CO₂ 37 °C の条件下で CO₂ インキュベーター内で培養した。

細胞は購入後 2~3 日間隔で培養液を交換し、9 日間培養した。細胞を剥離後に 2 × 10⁴ cell/cm² の濃度で 24 ウェルプレートに細胞を播種し、一晩、培養した後、実験に使用した。

細胞を実験する際、ウシ血清の含まれていないミクログリア試験液 (DS ファーマバイオメディカル, Cat. No. MB-X0503D) に置換した。

(2)培養ミクログリア細胞の活性化

細胞に LPS (0.1 μg/ml) を投与した。

LPS 投与しなかった細胞をコントロールとした。4 時間後、LPS 投与したミクログリア細胞が活性化状態となったことを形態の変化から確認した。

ミクログリア細胞から抽出した total RNA から cDNA を作製した。

(3)定量的 PCR による TAC4 mRNA の測定

得られた cDNA をテンプレートとして TaqMan プロブを用いた定量的 PCR 法を行った。

PCR 反応は 50 °C 2 分間、95 °C 10 分間の初期変性の後、95 °C 15 秒、60 °C 1 分間を 1 サイクルとし、50 サイクル行った。

測定は各サンプルを 3 重測定した。

使用したプライマーおよび TaqMan プロブの配列は以前の研究で用いたものと同様のものを使用した。

5'-AGGGCTCGATAAAGGAGTTA-3 (フォワードプライマー)

5'-TTCAGCCCTCTACCCAGCAT-3 (リバースプライマー)

5 -TAGGCAGCTTCCTCAGC-3 (TaqMan プローブ)

(3) 培養ミクログリア細胞への HK-1 投与
ミクログリア細胞に HK-1 (10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 0 M) 投与し、4 時間および 18 時間培養した。HK-1 投与しない細胞をコントロールとした。
ミクログリア細胞をミクログリアに特異的な抗体(OX-42)で反応させ、共焦点顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

活性化ミクログリア細胞における TAC4 mRNA の発現上昇

定量的 PCR の結果、コントロールの細胞の TAC4 の発現量が 1.03 ± 1.0 (コピー数/ μg ; mean \pm S.D. n=3) であったのに対して、LPS 投与 4 時間後の活性化されたミクログリア細胞は 122.38 ± 85.8 (コピー数/ μg ; mean \pm S.D. n=3) であった。活性化ミクログリア細胞ではコントロールと比較して TAC4 mRNA の発現の上昇が認められた。

HK-1 投与によるミクログリアへの影響

今回の実験で投与した HK-1 の濃度および投与後の経過時間では、HK-1 投与によりミクログリア細胞の増殖・肥大化等のミクログリア細胞が活性化されたことを示す形態的な所見はみられなかった。

図 1. コントロール (HK-1 0M)

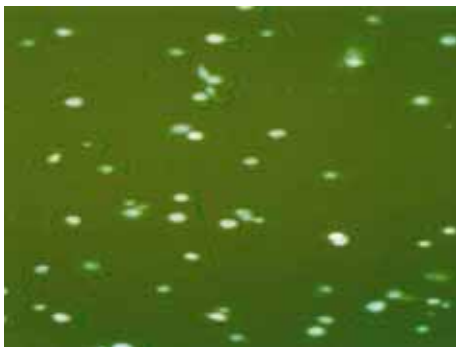


図 2. HK-1 10^{-4}M 、4 時間後

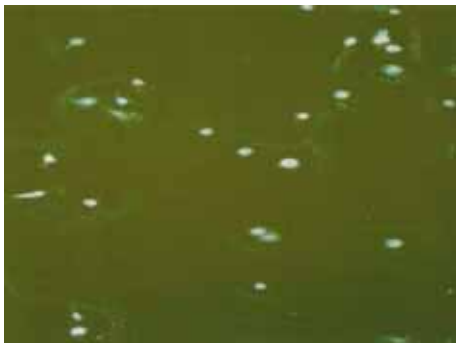


図 3. HK-1 10^{-5}M 、4 時間後

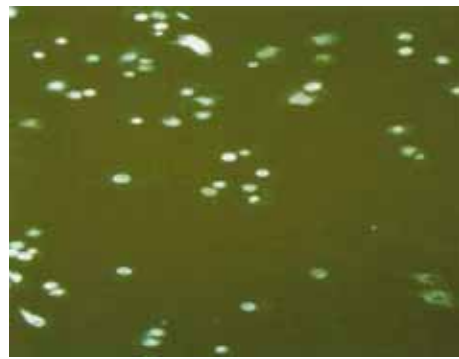
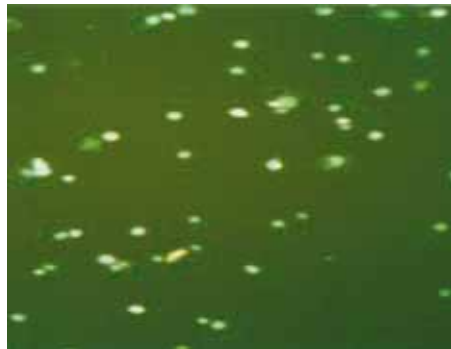


図 4. HK-1 10^{-6}M 、4 時間後



(2) 考察

今回の実験で、活性化ミクログリアで TAC4 mRNA 発現増加が認められた。

過去の研究結果と合わせて、HK-1 は神経傷害後の早期に、主に脊髄後角の活性化ミクログリア細胞で発現が上昇し、神経因性疼痛の発生に関わっていることが示された。

また、HK-1 投与したミクログリア細胞では活性化が認められなかった。

ミクログリア細胞は NK1 受容体を発現する。HK-1 ミクログリア細胞から産生された HK-1 が NK1 受容体に結合しミクログリア自体も活性化することで、神経傷害の影響がさらに広がっていくことを仮定したが、今回の実験条件ではそれが示されなかった。

しかし、今回の結果だけではミクログリアが HK-1 によって活性化されないことを示すには不十分である。より細かい条件で HK-1 をミクログリアに投与する、または活性化によってミクログリア細胞膜表面に発現する分子を定量して変化をみるなど、さらなる実験が必要であると思われた。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

HK-1 は侵害受容に関わりの深い脊髄後角で発現し、我々が以前示したように神経因性疼痛の初期での発現上昇を示す。

国内外において HK-1 の神経因性疼痛での

役割を今までに報告したのは我々のグループだけであり、上述した通りタキキニンシステムを標的とした鎮痛を目指す上で今回の結果が有意義であるものとする。

(3)今後の展望

今回得られた結果は、今後学会等で発表する予定である。

今後は産生された HK-1 がどのような細胞に働きかけ、どのように疼痛の発現・増悪などに関わりを持っているのか、そしてそれが SP と異なるものであるのかなどを調べ、神経因性疼痛に対するタキキニンシステムを標的とした有効な鎮痛薬の開発を目指した研究を進めていく予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

松村 朋香 (MATSUMURA TOMOKA)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40527066