

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500418

研究課題名(和文)末梢神経損傷時の痛覚伝達経路でのL1-CAMのリン酸化と可塑的变化に対する影響

研究課題名(英文) Involvement of phosphorylated L1-CAM in the plastic changes of nociceptive circuit following peripheral nerve injury

研究代表者

山中 博樹 (Yamanaka, Hiroki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20340995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：坐骨神経損傷後の後根神経節と脊髄において細胞間接着因子であるL1-CAMの発現変化を検出した。末梢神経損傷後では後根神経節では非リン酸化L1-CAMは神経細胞周囲に集積する事を見いだした。これに対し、1181番目のセリン残基のリン酸化を受けたL1-CAMは後根神経節ニューロンから消失していた。脊髄後角では非リン酸化L1-CAMとリン酸化L1-CAM共に増加を認めた。リン酸化L1-CAM陽性はC線維の損傷軸索終末のVaricosity様構造に特異的に集積している事を見いだした。これらはCasein kinas 2の阻害で低下を認め、疼痛関連行動の抑制も認める結果を一部に得た。

研究成果の概要(英文)：We examined whether peripheral nerve injury affects on the phosphorylation of L1-CAM in the rat DRG and spinal cord using a phospho-specific L1-CAM (Ser1181) antibody. Expression of phosphorylated L1-CAM was examined in rats (Sprague-Dawley, 250 g) that received tibial and common peroneal nerve ligation. Total and phosphorylated L1-CAM immunoreactivity (ir) were constitutively expressed in small un-myelinated DRG neurons. Nerve injury decreased total L1-CAM ir in the cytoplasm of somata in small neurons and increased it in cell membrane resulting to the formation of L1-CAM ir ring-like structures of in the injured small DRG neurons. Phosphorylated L1-CAM ir showed a dramatic decrease in the injured DRG. In dorsal horn, total L1-CAM showed the increase in the terminal of primary afferents horn. In contrast to the DRG, nerve injury increased the phosphorylated L1-CAM in the terminal of primary afferent in the dorsal horn.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経傷害性疼痛 脊髄後角 可塑性 細胞間接着因子

1. 研究開始当初の背景

L1-CAM はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着因子で、ニューロンの軸索伸張や束化に関与している。成体脳では海馬シナプスの神経可塑性関連因子であり、これらの機能は細胞膜上の L1-CAM の細胞外接着から FGF や EGF 受容体の活性化、または細胞内での Ankyrin・細胞内骨格との会合という二つの経路を活性化することによりそれぞれ異なったイベントを下流に持つ。特に L1-CAM の細胞内ドメイン 1181 番目のセリン残基のリン酸化は樹状突起の形成やシナプスの形成に関与することが報告されており、この L1-CAM の細胞内ドメインのリン酸化は L1-CAM の細胞内から細胞外への (Inside-out) 方向の活性調節を示唆している (Nakata and Kamiguchi 2007 J Neurosci Res. 85:723-34, Hortsch et al., 2009 Cell Mol Biol Lett. 14:57-69.)。これらの調節機構は単に細胞外に存在する基質・結合蛋白との接合のみによって接着活性が調節されているという考え方ではなく、細胞側から積極的に接着活性を変調しうるメカニズムが神経の可塑的変化の形態的基盤をなし得るという新しい観点として着目されている。一方、末梢神経傷害後の脊髄後角における損傷を受けた一次求心性神経の軸索末端の形態変化については過去 40 年ほどの研究にも関わらず定見はない。1970 年代から微細形態と組織化学方を元に報告されたのは軸索の退縮・シナプスの減少という入力減少であり、傷害された軸索から脊髄後角ニューロンへの入力は減少する事が考えられていた。これに対して、1990 年代からトレーサーを用いた実験では有髄線維の伸張が報告され、損傷神経からの疼痛経路への可塑的入力が増加する可能性が示された。これ以降分子レベルで、再生・軸索伸張因子の発現を元に検討した研究では、トレーサー実験の結果に相反して、Reg-2, Growth associated protein 43, tissue type plasminogen activator, 等の再生関連因子は主に無髄軸索における発現上昇が認められており、先行研究において示された軸索の退縮と有髄線維の伸張、無髄線維における再生関連因子の脊髄終末での挙動を併せて検討した結果は報告されておらず、所謂退縮と伸張の「差し引き」を行った状態での形態変化の本態は明らかとなっていない。損傷軸索はその自発発火が神経傷害性疼痛のトリガー・または増悪因子として働いていると考えられており、このイレギュラーな入力が脊髄後角サーキットにおいて痛みを伝達経路を過剰興奮させているという神経傷害性疼痛の病態としての理解がなされている。これを踏まえると、損傷した一次求心性線維の形態変化が起きている場合、異常な興奮性の入力が形態的に異常な伝達系に入る事になり、ゲートコントロールセオリーで知られるような抑制系の働きによる正しい発火調節から逸脱する事

になる。また、損傷した一次求心性線維では新たにニューロモジュレーターのカテゴリーである分子、例えば galanin や neuropeptide Y などの発現上昇が起きることが知られており、これらのニューロモジュレーターが、どのような脊髄ニューロンに対して放出されているかは、形態的な変化を踏まえて結論されるべきものである。したがって、再生・形態変化関連因子・またはシナプスの形態変化に関与する分子の挙動を神経傷害性疼痛モデル動物の後根神経節・脊髄後角において検討する事は神経傷害性疼痛の重要な病態理解となる可能性が大きいと考えられる。

この研究意義に対して我々は L1-CAM の翻訳後調節メカニズムが末梢神経損傷で変調し、それにより L1-CAM が後根神経節 (DRG) や脊髄後角において局在変化をおこしている事を示した (Yamanaka et al., 2007 Eur J Neurosci. 25: 1097-1111)。また、L1-CAM の family である Close homologue of L1 (CHL1) も末梢神経損傷後に発現上昇を示し、脊髄後角の一次求心性線維の終末に集積をする事も報告した (Yamanaka et al., 2011 J Comp Neurol. 519:1597-615)。他のグループからは末梢神経損傷後の脊髄後角では細胞間接着因子である E-cadherin の著明な減少が報告されており (Brock et al., J Neurosci. 2004 24:8806-17)、我々の先行研究と併せて見ると、脊髄後角の接着構造の「破棄と再構築」が行われている構図が接着因子の挙動からも考察されている。

しかしながら、最終的に新規に痛みの原因となるようなサーキット形成に関与し、病態形成に主導的に関わる細胞間接着因子の同定やその役割は不明である。このような背景の元、前述の生理機能を有す L1-CAM は後根神経節ニューロンの発生・発達段階での発現も知られており、特に脊髄への投射については発達段階において重要な役割を果たしていると考えられている。したがって、L1-CAM はこのニューロンの系譜の中では損傷応答を示して、新たな発現変化を示す可能性が高いと考えられる。更に、この L1-CAM が形態形成に関与する際の輸送・局在化には細胞内ドメインのリン酸化が必須な行程であることが *in vitro* の実験よりわかっている。以上の先行研究に基づく、本研究は神経傷害後の損傷ニューロンの脊髄後角での形態変化を接着因子の観点から明らかにする事の端緒を開くことが期待できる。そしてその見いだした形態変化を評価することができれば一次求心性線維そのものが神経傷害性疼痛発現にどのように結びつくかを検討する事ができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢神経損傷に伴う細胞間接着因子 L1-CAM の細胞内局在変化のメカニズムを解明し、L1-CAM によって引き起こされ

るシナプスを含めた細胞間接着構造の変化と神経因性疼痛の関連を明らかにすることである。具体的には L1-CAMの蛋白の局在変化を一次求心性線維と脊髄後角において明らかにし、特異的なリン酸化を受けた L1-CAMの挙動と、リン酸化が L1-CAM の局在変化に対してどのような調節条件となっているかを明らかにする事を目指している。さらに、L1-CAM のリン酸化を起こさせる因子と神経傷害との関連を明らかにして、傷害によって活性化されるどのような因子が L1-CAM の輸送・局在化を制御しているかを検討しようとした。本研究はこのような背景・目的のもとに新たに細胞間の接着を構築しうる分子の発現変化とそのメカニズムに着目して、神経傷害性疼痛の治療戦略に寄与する事を指向したものである。

3. 研究の方法

SD系雄性ラット(250g)を使用した。ペントバルビタール麻酔下のラットの坐骨神経を剖出し、膝窩部にて腓腹神経を除いて結紮後切断した(spared nerve injury model; SNI model)。術後1, 3, 7, 14, 28日後にラットの後根神経節と脊髄を摘出した。組織学的検討のためには、ラットの心臓より4%パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行った。取り出したサンプルは同固定液中に24時間浸漬固定した後20%Sucrose 0.1Mリン酸緩衝液に48時間浸漬した。これらのサンプルは粉末状ドライアイスにて急速凍結し、クリオスタットで薄切した。薄切の条件は後根神経節は5マイクロメートル、脊髄は25マイクロメートルとした。新鮮サンプルはペントバルビタール麻酔下のラットを0.1Mリン酸緩衝液にて環流脱血処理した後、摘出後ドライアイスにて急速凍結し、ISOGEN(Nippon gene社)にてtotal RNAと蛋白を抽出した。薄切した切片は以下の抗体と希釈倍率にて免疫組織化学法にて染色した。Anti L1-CAM (Santacruz社)1/10000, Anti phospho(Ser 1181)-L1-CAM (abcam社)1/5000, Anti Growth associated protein 43 (Sigma社)1/10000, Anti Neurofilament 200 (NF200) (Sigma社)1/20000, Calcium channel alpha 2 delta subunit (Sigma社)1/500. L1-CAMとphospho L1-CAMについては画像定量のため二次抗体にビオチン化された抗ウサギ、またはヤギ血清を使用してABCキット(ナカライテスク社)を用いてジアミノベンジジン(DAB)による発色を行った。その他の抗体はL1-CAM, phospho L1-CAMとの二重染色に供するため、蛍光抗体(Alexa 488または594)を用いて染色した。免疫組織化学に供した切片は抗体反応前に50%エタノールにて10分、70%エタノールにて10分、さらに50%エタノールにて10分の膜透過処理を行った。その後の溶液系はTris buffered saline (pH7.5)を全て用いて行い、Detergent類は使用しなかった。エタノールによる処置

の後、切片は二次抗体で使用する種類の動物の標準血清(5%)を使用し、非特異的な抗体の結合へのBlocking処置とした。一次抗体はこのBlocking溶液中に希釈し切片に添加し、4に保ち48時間反応した。反応後はTris buffered saline (pH7.5)で洗浄後二次抗体反応を4で24時間行った。新鮮サンプルからは抽出した蛋白を用いてWestern blotを行った。Western blotは5マイクログラムの蛋白をアクリルアミドゲルに展開し、PVDFメンブレンに転写後、抗L1-CAMを1/2000、抗phosphoL1-CAMを1/5000にて24時間反応させた。一次抗体のホストに特異的なアルカリフォスファターゼを結合させた二次抗体を室温で1時間反応させた後、洗浄し、CDP-Starにて発光させ、フィルムへ露光した。動物への薬剤の投与は髄腔内へ投与した。ペントバルビタール麻酔下のラットのL4の椎弓を部分切除し、硬膜・くも膜を切開後、Alzet社の浸透圧ポンプ(model 2001)を接続したカテーテルをくも膜下腔に留置した。髄腔内投与に使用した薬剤はCasein kinase 2阻害剤であるE)-3-(2,3,4,5-Tetrabromophenyl)acrylic acid (TBCA)(Merk Millipore社)を使用した。薬剤の投与はSNI model作製後7日より行い、7日間の連続投与を行った。その後ペントバルビタール麻酔下で上述の環流固定を行い、凍結切片を作製後に免疫組織化学に供した。組織データの解析はNIH image version 1.6を使用し、染色強度に基づいて陽性反応を面積として、或いは後根神経節の陽性ニューロンの数として定量した。疼痛行動の確認はDynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo basile社)を使用し、足底部の逃避閾値を計測した。5分以上の間隔を空けて測定した3回の逃避閾値の値の平均を当該動物の逃避閾値として記録した。

4. 研究成果

後根神経節では末梢神経損傷後3日目よりL1-CAMの細胞質内での陽性が減少し、細胞周囲の膜上に陽性が集積した。これは先行研究に発表したデータと同様であった。この膜上での集積は先行研究ではRing like structures(指輪状の陽性構造)と呼び、術後30日まで続く事を確認している。一方、リン酸化L1-CAMについてはコントロールラットの後根神経節においては陽性細胞はL1-CAMと共存しており、細胞内に貯留したL1-CAMはリン酸化されたフォームであることが推測できた。しかし、末梢神経損傷後に認められたL1-CAM陽性のRing like structures(指輪状の陽性構造)においてはリン酸化L1-CAMは共存せず、後根神経節のニューロンの細胞体陽性は約50%以下に減少したことがわかった。同様のリン酸化L1-CAMの減少はWestern blotでも確認できた。すなわち、細胞体周囲への輸送はL1-CAMの脱リン酸化によって引き起こされることが

示唆された。この反応の約80%は無髄のNF200陰性のニューロンで認められている事が二重染色によって確認できた。また、L1-CAM陽性 ring like structures (指輪状の陽性構造)はcalcium channel alpha 2 delta-1が末梢神経損傷後に増加したニューロンの一群でみとめられており、疼痛への関与が強く考えられる神経の一群での変化であることも部分的に示唆された。

脊髄後角においてはL1-CAM陽性はI-II層に限局していた。末梢神経損傷後には損傷後7日からVaricosity様(結節構造状)の強陽性が増加してくることがわかった。これは先行研究と同様の結果であることが確認され、後根神経節でのL1-CAMの輸送パターンの変化に遅れて脊髄後角ではL1-CAMの変化が認められる事がわかった。この強陽性のみを定量した結果、損傷後7日から約4倍に増加し、14日で8倍まで有意に増加することがわかった。その後術後30日でも6倍までの増加を保っていた。これに対し、リン酸化L1-CAMはコントロール状態の脊髄後角では陽性の終末は明瞭にはみとめられなかった。すなわちコントロールの状態で終末へ輸送されるL1-CAMはリン酸化と無関係に調節されていることが示唆された。末梢神経損傷後は脊髄後角のリン酸化L1-CAMは後根神経節と逆の挙動をしめした。リン酸化L1-CAMの陽性は術後7日からL1-CAM同様にVaricosity状(結節構造状)の強陽性構造として脊髄後角I-II層に限局して増加する事がわかった。このリン酸化L1-CAMの増加パターンはL1-CAMの強陽性像と同調しており、定量的な解析の結果でもリン酸化L1-CAMは損傷後7日からコントロールの値の約3倍程度に増加し、14日後で5倍、30日後で3.5倍の有意な増加を認めた。二重染色をL1-CAM, リン酸化L1-CAM抗体で行った所、脊髄後角のVaricosity様(結節構造状)の構造において完全に共存をしめしていた。すなわちL1-CAMの一次求心性線維の終末への輸送は後根神経節の局在変化とは逆にL1-CAMのセリンの1181番目のリン酸化によって調節されていることが強く示唆された。リン酸化L1-CAMの局在した構造が末梢で損傷した軸索である事を確認する目的でGrowth associate protein 43との二重染色をおこなったところ、リン酸化L1-CAM陽性はほとんど全てGrowth associate protein 43と共存をしめした。また、痛みに関わる軸索である可能性を見る目的で神経傷害性疼痛に有効なGababentinのターゲット分子であるCalcium channel alpha2 delta-1との共存を確認したところ、ほぼ一致している事がわかった。また、L1-CAMのセリン1181残基をリン酸化すると言われているCasein kinase 2阻害剤を髄腔内投与したところ、リン酸化L1-CAM陽性の脊髄後角での数の減少がみとめられた。このCasein kinase 2阻害剤の投与は部分的に神経傷害性疼痛に見

られる、足底への機械刺激への逃避閾値の低下を抑制した。行動実験に関しては現段階で至適な投与量の決定に到達しておらず、有効な数での行動実験にはいたっていない。

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)

[学会発表](計 1 件)

Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K. Phosphorylation of L1-CAM is differentially regulated in somata and central terminal of DRG neuron after nerve injury. The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2012) 2012.10.13 New Orleans

6. 研究組織

(1)研究代表者

山中 博樹 (Yamanaka Hiroki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20340995