

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592326

研究課題名(和文)慢性疼痛治療の新規分子標的候補であるグリシン受容体 3サブユニットの役割の解明

研究課題名(英文)The role of glycine receptor alpha3 subunit as a candidate of novel treating target for chronic pain

研究代表者

高澤 知規 (Takazawa, Tomonori)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30400766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では疼痛の伝達経路である脊髄においてグリシン受容体がどのような働きをしているのかを、行動実験によって明らかにした。グリシン受容体 3サブユニットの発現を抑制するため、siRNAをラットの脊髄腔内に投与したが、熱刺激に対する反応はsiRNAの投与前後で変化しなかった。この結果より、グリシン受容体のサブユニットのひとつである 3サブユニットは、疼痛伝達において平常時はそれほど大きな役割を果たしていないことが示唆された。今後は、この成果を基にして、炎症性疼痛モデル動物においてグリシン受容体の 3サブユニットがどのような役割を果たしているかを明らかにすることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have demonstrated the role of glycine receptors in the spinal cord that is involved in a pain sensation pathway. To inhibit the expression of glycine receptor 3 subunits in the rat spinal cord, siRNA was injected to the subarachnoid space. However, the responses to heat stimulus was not changed even after the injection of siRNA. This result suggested that glycine receptor 3 subunits did not have an essential role for the transmission of pain sensation under normal condition. I expect that this result would facilitate the study to uncover the role of glycine receptor 3 subunits in inflammatory pain.

研究分野：麻酔科学

キーワード：慢性疼痛

1. 研究開始当初の背景

世界では 15 億人もの人々が深刻な慢性疼痛に悩まされている。これまでの研究により様々な慢性疼痛のメカニズムが報告され、治療薬の開発が進んできた。しかし治療に難渋するケースも多く、新規治療薬の開発が望まれている。これまで申請者らはグリシン・GABA_(A) 受容体が脊髄後角における感覚情報の伝達に果たす役割についての研究を行い、新規治療薬のターゲットとしての可能性を探ってきた。

Tonic inhibition はシナプス活動とは関係なく断続的にチャンネルが開くことによって見られる抑制の形式である。グリシン受容体 $\alpha 3$ サブユニットの一つである

$\alpha 3$ は、転写後 RNA 編集によりグリシンへの親和性が変化し、tonic inhibition に適した機能を獲得することが報告された。したがってグリシン受容体による tonic inhibition を担う分子の候補として $\alpha 3$ サブユニットが挙げられるようになった。このような背景のもと、我々はグリシン受容体 $\alpha 3$ サブユニットが慢性疼痛の治療のターゲットとして重要であるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

炎症性疼痛時に $\alpha 3$ サブユニットが量的に変化するのか、 $\alpha 3$ サブユニットの転写後 RNA 編集が起きるのかどうかを調べる。

慢性疼痛時の痛みの閾値が $\alpha 3$ サブユニットの機能の抑制により変化するか調べる。

$\alpha 3$ サブユニットが tonic inhibition

の分子基盤であるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

グリシン受容体 $\alpha 3$ サブユニットの機能解析ツールを作成する。

$\alpha 3$ サブユニットを含むグリシン受容体の機能を抑制するための siRNA を作成する。siRNA としての機能が無い mutant siRNA も同時に作成し、mutant siRNA を投与した群をコントロール群とする。作成した siRNA の有効性を確認するため、マウスのくも膜下腔 (腰部) に siRNA を注入し免疫染色およびウエスタンブロットティングによって $\alpha 3$ サブユニットの発現量の計時的変化を調べる。

炎症性疼痛時のグリシン受容体 $\alpha 3$ サブユニットの質的・量的変化について明らかにする。

a. 足底に CFA (Complete Freund's Adjuvant) を注入した炎症性疼痛モデルマウスを用いて、 $\alpha 3$ サブユニットを含むグリシン受容体の発現が変化するかどうかをウエスタンブロットティングにて定量的に評価する。炎症性疼痛の各フェーズで発現量が異なる可能性があるため、CFA 注入 1 日目から 2 週間後まで経時的な変化を調べる。これ以降の実験では、生食と CFA を投与した群を siRNA と mutant siRNA を投与した動物でそれぞれ作成し、4 つの群で結果を比較検討する。

b. 炎症性疼痛モデルマウスで $\alpha 3$ サブユニットの転写後 RNA 編集のレベルに変化があるかを調べる。グリシン受容体の $\alpha 3$ サブユニットをコードする遺伝子から転写された mRNA において、554 番目のヌク

レオチドであるシチジンがウラシルに変換されると、3サブユニットのN末端から185番目のアミノ酸がプロリンからロイシンへと変化する。この変化により受容体はグリシンに対して高い親和性を獲得する(10倍以上低いグリシンの濃度でチャンネルが開く)。モデル動物においてRNA編集が起きているかを、特異的な制限酵素とPCR法を用いて調べる(Meier et al, 2005)。ウエスタンブロッティング同様、CFA投与後にRNA編集の程度が経時的に変化するか調べる。

4. 研究成果

本研究では疼痛の伝達経路である脊髄においてグリシン受容体がどのような働きをしているのかを、行動実験によって明らかにした。グリシン受容体3サブユニットの発現を抑制するため、siRNAをラットの脊髄腔内に投与した。熱刺激に対する反応を、siRNAの投与前、投与後1-7日、14日目でPlantar testにより測定して比較した。しかし、siRNA投与による変化はいずれのタイミングでも認められなかった。この結果より、グリシン受容体のサブユニットのひとつである3サブユニットは、疼痛伝達において平常時はそれほど大きな役割を果たしていないことが示唆された。今後は、この成果を基にして、炎症性疼痛モデル動物においてグリシン受容体の3サブユニットがどのような役割を果たしているかを明らかにすることができるかと期待される。

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 5件)

Aso C, Takazawa T, Horiuchi T, Saito S. The endocannabinoid, 2-arachidonyl glycerol, induces growth cone collapse and neurite retraction in growing peripheral sensory neurons. World Journal of Neuroscience 5: 1-6, 2015. 査読あり
DOI: 10.4236/wjns.2015.51001

高澤 知規、抑制性神経伝達物質と鎮静 -GABA とグリシン-、臨床麻酔、38:1669-1676, 2014. 査読なし

Bardoni R, Takazawa T, Tong CK, Coudhury P, Scherrer G, MacDermott AB. Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn, Ann N Y Acad Sci 1279: 90-96, 2013. 査読あり
doi: 10.1111/nyas.12056.

高澤 知規、慢性疼痛に対する分子標的治療戦略、麻酔、62:275-282, 2013. 査読なし
PubMed PMID: 23544328.

高澤知規、脊髄内で痛みはどのように修飾・伝達されるのか. Lisa 19:472-476, 2012. 査読なし

〔学会発表〕(計 4件)

高澤 知規 グリシンによる脊髄疼痛受容修飾、北関東・甲信越ペインクリニック学会第3回学術集会、2014年3月9日、大宮

Takazawa T, MacDermott AB.

Disinhibition in mouse superficial dorsal horn after peripheral inflammation, Annual Meeting of Society for Neuroscience 2012, 10/14/2012, New Orleans

高澤 知規、Amy B. MacDermott、齋藤 繁、脊髄後角における興奮性ニューロンのグリシン・GABA 受容体を介したシナプス抑制、第 34 回日本疼痛学会、2012 年 7 月 21 日、熊本

高澤 知規、Amy B. MacDermott、齋藤 繁、症性疼痛モデルマウスで観察された脊髄後角ニューロンにおけるシナプス入力の変化について - 脊髄シナプス標本からのパッチクランプ記録による電気関理的解析、日本麻酔科学会第 59 回学術集会、2012 年 6 月 7 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高澤 知規 (TAKAZAWA, Tomonori)

群馬大学医学部附属病院・講師

研究者番号 : 30400766

2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし