

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659688

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における DRG 遺伝子発現の新規制御因子

研究課題名(英文) Novel regulator of gene expression in DRG in a neuropathic pain

研究代表者

野口 光一 (Noguchi, Koichi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10212127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：GDNFファミリーのArteminが神経障害性疼痛メカニズムとしてTRPV1/A1の重要な制御因子であることを以下の結果より証明できた。1. ラット皮膚において炎症惹起後長期間Artemin mRNAが増加。2. 末梢神経障害後の末梢部位でArtemin mRNAの有意な増加。3. 繰り返しArtemin注射によりDRGでのTRPV1/A1 mRNA発現増加。4. DRGにてTRPV1/A1とGFRalpha3と高い共存率。5. Artemin投与による機械的及び熱的痛覚過敏。6. DRGの培養系でのArtemin添加によるTRPV1/A1発現増加とCa²⁺の増加。7. 上記の発現のp38阻害剤による抑制。

研究成果の概要(英文)：We found the following findings. 1. Artemin increases locally in skin over long periods of time, whereas NGF shows transient increases after peripheral inflammation. 2. Artemin increases in peripheral sciatic nerve following to the Wallerian degeneration after nerve injury. 3. Repeated artemin injections changed the gene expressions of TRPV1 and TRPA1 in DRG neurons. 4. The co-localization between TRPV1/A1 and GFRalpha3 was higher than that between TRPV1/A1 and TrkA. 5. Continuous artemin injection in to the plantar surface caused mechanical and heat hyperalgesia. 6. Artemin increases TRPV1/A1 expression and Ca activity in primary cultured DRG neurons. 7. TRPV1/A1 expression was regulated by artemin through p38 phosphorylation in primary afferent.

We conclude that peripheral tissue-derived artemin synthesis is important regulator of TRPV1/A1 expression in DRG neurons following peripheral inflammation and nerve injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：脊髄神経節 遺伝子発現 Artemin TRPV1 TRPA1

1. 研究開始当初の背景

整形外科臨床において、神経障害性疼痛に対する薬剤が導入された結果、その病態の解明に対する期待も高まっている。末梢神経の絞扼性神経障害、外傷や手術に伴う末梢神経障害、引き抜き損傷、他種々のニューロパチーなどの神経障害性疼痛において、多くのメカニズムが報告されている。私の教室においては整形外科臨床における問題認識からスタートした疼痛基礎研究を推進してきており、20年以上にわたる疼痛研究の結果140報以上の英文雑誌に論文を発表してきた。その中で一次知覚ニューロンの細胞体が存在する後根神経節 (DRG) の遺伝子発現の変化については、世界において最も詳細に多くの論文を発表してきた教室の一つである。

このDRGの遺伝子発現の制御因子としては、神経成長因子 (NGF) 及びグリア由来神経栄養因子 (GDNF) が良く知られており、多くの発表がある。しかし、最近ペインセンサーとして注目を特に集めるTRPV1やTRPA1の制御因子としては、この両者では説明出来ない大きな点があり、新しい制御因子の発見が待たれている。我々の教室では分子組織化学的手法を用いてDRGに存在する疼痛関連因子の詳細な発現を調べてきた。その中でTRPV1やTRPA1と極めて高い共存率を示す神経成長因子ファミリー分子として、GDRa3を発見してそのリガンドである神経成長因子Arteminの機能を調べてきた。その結果神経終末のTRPA1に対するArteminの短期的な効果は、むしろ抑制的であることを発見し、今年の英文誌Molecular Painに発表し、大きな反響を得た (highly cited article)。

神経障害性疼痛に関わる DRG 遺伝子発現の新規の制御因子を発見するところに、大きな斬新性及びチャレンジ性が存在する。30年以上前から知られている NGF 及び 10 数年以上前から知られている GDNF 以外には、疼痛関連因子の制御因子は知られていない。一方、1997年のTRPV1の発見以来、疼痛刺激の受容体としてTRPファミリー分子が注目され、その中でTRPV1及びTRPA1が重要なペインセンサーであることは確立されてきた (特にTRPA1の生体内での動態、疼痛メカニズムにおける意義の確立に関しては我々の教室からの10報以上の英文論文が大きな貢献をしている)。ところが、TRPV1及びTRPA1の発現と、NGFの受容体TrkA及びGDNFの受容体GFRa1の発現は最大でも半分以下程度しか共存していない。これはより重要な制御因子が存在している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

この2年間でArteminが神経障害性疼痛のメカニズムにおいて、

- (1) ArteminがDRGのペインセンサー分子の発現を制御するmajorな因子であることを証明
- (2) Arteminが神経障害時に損傷神経で実際に増加していることを確認
- (3) Artemin投与で疼痛行動を惹起し、同時にペインセンサー分子の発現誘導の証明

(4) ArteminがDRGの遺伝子発現を調節する分子メカニズム (シグナル伝達系) の解明

(5) 既知の制御因子であるNGFやGDNFとの相違点、重要性の証明を行う。

DRGの遺伝子発現の調節因子としては、1950年代に発見されたNGF、及び1980年代に発見され90年代に入り機能がわかってきたGDNFの2つが代表的である。特に痛みを伝達する神経線維、及び痛みのdetectionに関わるチャンネルの調節に関わるのは、この2つ以外には報告はほとんど無い。BDNFも疼痛関連因子として報告は多いが、調節因子というよりそれ自身が痛み情報を伝える neurotransmitter もしくは neuromodulator として働く可能性が高い。上に記したようにこの2つの神経栄養因子のみでは説明しきれない大きな部分があり、本研究の仮説が証明された際には大きなブレイクスルーとなるであろう。整形外科においてはこの10年間痛みの研究が進んでおりこれはほとんどの患者が痛みを訴える診療科としてごく当然の流れと考えられる。一次知覚ニューロンでのペインセンサーTRPV1/TRPA1の新しい制御因子が解明されることは、これを制御する方法を開発する事で、新規鎮痛剤開発の大きな1ステップとなるであろう。すでにNGF抗体が整形外科疾患での治療薬として導入されつつある状況で、本仮説によりArtemin受容体拮抗薬もしくはArtemin中和抗体が、より効果的な治療効果を持つ可能性があり (NGF以上の共存率)、整形外科関係の疼痛疾患への応用など、大きな発展が期待される。

3. 研究の方法

実験は代表者の野口光一の指導のもと、教室のスタッフ及び大学院生が実験を行い、週1回のミーティングにて進捗状況を検討しながら研究計画の順調な遂行を図る。データ解析はスタッフと大学院生が、論文作成の指導は野口が行う。

平成24年度

ラット神経障害性疼痛モデルにおけるArteminの動態

(1) L5脊髄神経選択的結紮モデルを作成し機械的刺激に対する疼痛行動の確認 (Anesthesiometer)

(2) 熱刺激に対する疼痛閾値測定 (Plantar test)

(3) Arteminの発現解析

a. L5 脊髄神経を結紮・切断し、それより末梢の脊髄神経、L4脊髄神経が合流してからの坐骨神経の一定量を採取。RT-PCRによるArtemin mRNAの増加を確認する。

b. aと同じ組織を取り出し、in situ ハイブリダイゼーション法用に組織を処理、ラベルしたArteminプローブを用いて、脊髄神経・坐骨神経上のArtemin mRNA発現を確認する。

c. Artemin抗体を用いて、aと同じ組織を採取しWestern blottingを行い、蛋白質としての

増減を確認する。さらにbandの位置を確認することで抗体としての特異性を押さえる。

d. Artemin mRNAのin situ ハイブリダイゼーション法と種々の細胞マーカーの免疫組織科学との二重染色法を用いて、Artemin mRNAを発現している細胞の種類を確定する。

e. cの切片を用いて免疫組織化学で末梢神経上の蛋白質発現を確認する。種々の細胞マーカーとの二重染色によりcの結果の裏付けを取る。

平成24～25年度

末梢組織/神経由来のArteminとDRG遺伝子発現の因果関係の証明

(1)末梢組織(ラット足底)もしくは坐骨神経自身にArteminをinjectionし、逆行性に運ばれたArteminが疼痛行動、DRGの遺伝子発現、シグナル伝達系を変化させるか否かを検討する。

a. まず、Arteminの至適用量を検討するため、疼痛行動を測定する。まず足底皮下注射において3-4種類のdoseを設定し、疼痛行動の変化を観察する。また、坐骨神経自身へのinjectionも試みる。疼痛行動を測定し、もし変化があればそのdoseを後の実験に用いる。準備の実験においては、Arteminの足底投与によりmechanical hyperalgesiaが観察された。この結果は、本実験の証明すべき仮説の実現可能性が高いことを示唆している。

b. aで確定した用量のArteminを投与した動物のDRGを採取し、in situ ハイブリダイゼーション法を用いてTRPV1及びTRPA1 mRNA発現の変化を観察する。効果を見るために5日間もしくは1週間連続投与後の翌日に組織を採取する。

c. bと同様の実験系で、TRPV1及びTRPA1の蛋白質の変化を、抗体を用いた免疫組織化学法で検討する。両者の抗体は私の実験室で通常より使用しており、特にTRPA1の抗体は自身で作成し、世界中で現存するTRPA1抗体の中で最も信頼性が高いと評価されている。

d. bと同様の実験系で、DRGニューロンにおけるリン酸化p38の変化を検討し、さらにp38阻害剤を用いてTRPV1及びTRPA1の変化を検討する。

4. 研究成果

2年間にわたる研究により以下の成果を得た。

(1)末梢炎症時においてNGFに比較して長期間継続するArteminの皮下組織における発現

CFAをラット足底皮下に注射したモデルにおいてNGFとArteminの発現変化を比較すると、NGFは12時間までしか増加が観察されないが、Arteminは7日間有意な増加が継続した。皮膚組織のIn situ ハイブリダイゼーション法による検索によりArteminを発現しているのは皮膚の表皮内で、発現している細胞はケラチノサイトであると考えられた。

(2)ワーラー変性による末梢神経によるArtemin発現の増加

末梢神経の障害の末梢部位でArteminとNGF発現の変化を検討した。その結果、NGFに比べてArteminは非常に大きく14日まで長く継続する増加を示した。以上の結果は、神経障害及び末梢炎症の両者でArteminは長期継続する発現増加を示すことが明らかとなった。

(3)Arteminの皮下への繰り返し注射によるTRPV1/A1発現の増加

ラット足底皮下にArteminを複数回投与し、DRGニューロンにおけるTRPV1/A1 mRNA発現の変化をRT-PCR及びin situ ハイブリダイゼーション法にて検討した。その結果、両者のmRNAが有意に増加し、Arteminの受容体であるGFR 3は変化しないことがわかった。

(4)TRPV1/A1とGFR 3との高い共存関係

in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、TRPV1/A1とGFR 3との共存関係と、TRPV1/A1とTrkAとの共存関係を比較した。その結果、前者の方が明らかに高い共存関係を示し、TRPV1/A1のArteminによる制御の可能性を示唆した。

(5)Artemin投与による疼痛行動

ラット足底に1回のみArteminを投与すると、疼痛行動の変化は観察されなかった。そこで5日間1日1回連続投与すると有意な熱性疼痛閾値及び機械的疼痛閾値の低下が観察された。

(6)培養DRGニューロンにおけるArteminによるTRPV1/A1発現の増加とCa²⁺活動の増加

培養DRGニューロンを用いてTRPV1/A1発現を検討すると、Artemin投与によりRT-PCRによってTRPV1/A mRNAの有意な増加が確認された。またCa²⁺イメージングを用いた検討では、Artemin投与によりCapsaicin反応ニューロン増加、及びAITC反応ニューロンの増加が観察された。

(7)p38 MAPKを介したArteminのTRPV1/A1発現調節

過去の報告よりp38 MAPKがDRGのTRPファミリーの遺伝子発現に関与していることが明らかとなっている。まず、リン酸化p38 t TRPV1/A1が高率で共存することをin situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織科学法の二重染色法で証明した。次にp38 MAPKの阻害剤を用いて、Arteminによる調節機構を検討した。その結果、有意にp38阻害剤によりArteminによるTRPV1/A1の発現増加が有意に抑制されることがわかった。

以上の結果をまとめて、現在英文雑誌に投稿中である。

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 13 件)

1. Shenglan Wang, Yi Dai, Yoko Kogure, Satoshi Yamamoto, Wensheng Zhang, Koichi Noguchi, Etodolac activates and desensitizes transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1). *J. Neurosci. Res.*, 91, 1591-98, 2013 査読有
2. Nobumasa Usio, Yi Dai, Shenglan Wang, Tetsuo Fukuoka, Koichi Noguchi, Transient receptor potential channel A1 involved in calcitonin gene-related peptide release in neurons. *Neural Regen Res.*, 8, 3013-3019, 2013 査読有
3. Shiori Murase, Etsuji Terazawa, Kenji Hirate, Hiroki Yamanaka, Hirosato Kanda, Koichi Noguchi, Hiroki Ota, Fernando Queme, Toru Taguchi, Kazue Mizumura, Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats. *J. Physiol.*, 591, 3035-48, 2013. 査読有
4. Kondo T, Sakurai J, Miwa H, Noguchi K. Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distention-induced visceral pain. *Neuroreport* 2013;24:68-72. 査読有
5. Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, Noguchi K. COX-1-dependent prostaglandin D2 in microglia contributes to neuropathic pain via DP2 receptor in spinal neurons. *Glia* 2013;61:943-56. 査読有
6. Yu L, Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K., Dai Y. Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids. *Mol Pain* 2013;9:3 査読有
7. Kashimoto R, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Yagi H, Mimura O, Noguchi K. Phosphorylation of Ezrin/Radixin/Moesin(ERM) protein in spinal microglia following peripheral nerve injury and lysophosphatidic acid administration. *Glia* 2012;61:338-48 査読有
DOI 10.1002/glia.22436
8. Daigo E, Sakuma Y, Miyoshi K, Noguchi K., Kotani J. Increased expression of interleukin-18 in the trigeminal spinal subnucleus caudalis after inferior alveolar nerve injury in the rat. *Neurosci Lett* 2012;529:39-44 査読有
doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.007
9. Lee SM, Cho YS, Kim TH, Jin MU, Ahn DK, Noguchi K., Bae YC. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J Chem Neuroanat* 2012;45:45-9 査読有
DOI 10.1016/j.jchemneu.2012.07.003
10. Kobayashi K, Yamanaka H, Yanamoto F, Okubo M, Noguchi K. Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia* 2012;60:1529-39 査読有
DOI 10.1002/glia.22373
11. Wang S, Dai Y, Kobayashi K, Zhu W, Kogure Y, Yamanaka H, Wan Y, Zhang W, Noguchi K. Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR-2 in rat DRG neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain. *Eur J Neurosci* 2012;36:2293-301 査読有
DOI 10.1111/j.1460-9568.2012.08142.x
12. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Kanda H, Dai Y, Noguchi K. Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2012;8:8 査読有
DOI 10.1186/1744-8069-8-8
13. 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

[学会発表](計 10 件)

1. 野口 光一. 痛みの分子メカニズムと臨床病態.(特別講演・招待講演など) 第6回日本運動器疼痛学会 2013.12.7 神戸
2. 野口 光一. 痛みの分子メカニズムと治療. 西宮労災指定医協会総会 2013.7.25 芦屋
3. 野口 光一. 痛みの分子メカニズム. 第10回神経因性疼痛研究会 2013.4.19 神戸
4. Noguchi K. Molecular Mechanism of Pain.(Special/Invited Lecture) The International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting 2013 2013.5.15 Arizona
5. 野口 光一, 宮川 慈子. 一知覚ニューロンにおける Artemin による炎症時の TRPV1/A1 の発現制御.(シンポジウム・ワークショップ・パネル(指名)) 第90回日本生理学会大会 2013.3.27 横浜
6. 野口 光一. 機能外科のための神経科学.(特別講演・招待講演など) 第52回日本定位・機能神経外科学会 2013.1.19 岡山

7. 野口光二. 神経障害性疼痛の動物モデルと遺伝子発現. (シンポジウム) 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012.10.27 名古屋
8. Noguchi K. Leukotriene synthases and the receptors in nociceptive pathway contribute to the neuropathic and inflammatory pain. 14th World Congress on Pain (IASP 2012) 2012.8. Milan
9. 野口光二. 痛みの科学-神経障害性疼痛のメカニズムと神経可塑性-(共催セミナー) 日本ペインクリニック学会第46回大会 2012.7.5 出雲
10. 野口光二. 痛み研究の目指すところ：今後の研究の方向性について. (シンポジウム) 日本ペインクリニック学会第46回大会 2012.7.6 出雲

(図書)(計 1 件)

1. 宮川慈子, 野口光二. 痛みの Science and Practice. 文光堂 2013;2:67-74

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 光一(NOGUCHI, Koichi)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10212127