

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460709

研究課題名(和文) NIPSNAP1によるミトコンドリアの品質管理制御と疼痛慢性化との関連

研究課題名(英文) Association between mitochondria quality control and chronic pain by NIPSNAP1

## 研究代表者

芦高 恵美子 (ASHITAKA, Emiko)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：50291802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：4-Nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog (NIPSNAP1)は、シナプス膜とミトコンドリアに存在している。シナプス膜のNIPSNAP1は、神経ペプチドのノシスタチンと結合し、触覚刺激が痛みとなるアロディニアの抑制に関与している。本研究では、後根神経節の神経細胞において、NIPSNAP1が活性酸素種の産生とミトコンドリアのオートファジー(マイトファジー)の制御に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：4-Nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog (NIPSNAP) 1 is expressed in the synaptic membrane and the mitochondria. Synaptic NIPSNAP1, which interacts with the neuropeptide nocistatin, has been implicated in the inhibition of tactile pain allodynia. Here, we investigated the involvement of NIPSNAP1 in the mitochondrial functions in the dorsal root ganglion neurons prepared from NIPSNAP1-deficient mice. We revealed that NIPSNAP1 is involved in the regulation of reactive oxygen species production and the autophagy of the mitochondria in dorsal root ganglion neurons.

研究分野：疼痛学、生化学

キーワード：NIPSNAP1 ミトコンドリア マイトファジー 炎症性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷、がん、糖尿病に伴う慢性痛では、本来痛みを感じない触覚刺激までもが痛みとなるアロディニアや痛覚過敏反応が見られる。これらの痛みは、非ステロイド性抗炎症薬やモルヒネなどの鎮痛薬が有効ではなく、難治性となっている。本研究代表者らは、アロディニアや痛覚過敏反応を抑制するペプチドとしてノシスタチンを発見した (Okuda-Ashitaka E et al. *Nature*, 1998)。さらに、ノシスタチン結合分子として、4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 (NIPSNAP1) をマウス脊髄シナプス膜画分より単離・同定した (Okuda-Ashitaka E et al. *J Biol Chem*, 2012)。NIPSNAP1 遺伝子欠損マウスでは、ノシスタチンによるアロディニアの抑制作用が消失することを見いだした。

さらに、NIPSNAP1 遺伝子欠損マウスでは、炎症性疼痛の増悪や長期持続という疼痛の慢性化が認められた。しかし、ノシスタチンによる炎症性疼痛の抑制作用は NIPSNAP1 遺伝子欠損マウスにより消失しなかったことより、シスタチン非依存的な効果と考えられた。また、(1)NIPSNAP1 は、細胞膜とミトコンドリアに局在している、(2)Cos7 細胞に NIPSNAP1 を高発現すると、ミトコンドリアが核近傍に凝集する、(3)アルツハイマー病の病因とされるアミロイド前駆体タンパク質と NIPSNAP1 が結合することにより、NIPSNAP1 のミトコンドリアへの移行やタンパク質のフォールディングが抑制される (Nautiyal M et al. *Eur J Neurosci*, 2010) (4)NIPSNAP1 は MAP1LC3 や GABARAP などオートファジー関連分子との会合する (Behrends C et al. *Nature*, 2010) ことが明らかになっている。しかし、NIPSNAP1 によるミトコンドリア動態や機能への影響、オートファジーにおける役割について詳細は不明である。

そこで、疼痛の慢性化制御機構の一つとして、「NIPSNAP1 が、(1)炎症によってもたらされた損傷ミトコンドリアを、(2)オートファジー分子との相互作用によるミトコンドリアの処理(マイトファジー)を介して、(3)疼痛の慢性化を抑制している」というミトコンドリアの品質管理に基づく疼痛制御の仮説を提唱するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、NIPSNAP1 による(1)ミトコンドリアの機能制御、(2)ミトコンドリアのオートファジー(マイトファジー)制御、(3)疼痛の慢性化に焦点をあて、ミトコンドリアの品質管理に基づく疼痛慢性化の制御機構を解明する。

### (1)NIPSNAP1 によるミトコンドリア機能制御

NIPSNAP1 によるミトコンドリア動態、ATP 産生、アポトーシス、活性酸素種(ROS)などのミトコンドリア機能への影響を検討する。

### (2)NIPSNAP1 によるマイトファジー制御

ミトコンドリア脱共役剤 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) の添加によりマイトファジーを誘導し、NIPSNAP1 によるオートファジー関連分子の細胞内動態について明らかにする。また、オートファジーの最終段階のオートリソソーム内が酸性であることから、pH 感受性蛍光タンパク質 Keima-Red とミトコンドリア局在化シグナル融合タンパク質と、損傷ミトコンドリアにユビキチンを付加する Parkin の発現プローブを用いマイトファジーの定量解析を行う。

### (3)マイトファジーと疼痛慢性化との関連

疼痛モデルにおける NIPSNAP1 やオートファジー関連分子の発現変化を明らかにする。また、NIPSNAP1 の炎症性疼痛の慢性化機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞培養と遺伝子導入

マウス NIPSNAP1 遺伝子を HEK293 細胞に導入し、安定発現細胞 (HEK-NIPSNAP1) を樹立した。30  $\mu$ M CCCP を 24 時間添加した。また、5-12 週齢の野生型 (C57BL6/J) と NIPSNAP1 遺伝子欠損マウスから後根神経節 (DRG) を採取し、コラゲナーゼ処理により得られた神経細胞を用いた。

### (2)ミトコンドリア機能解析

ATP 測定ではホタルルシフェラーゼ発光法、ROS ではジヒドロエチジウム (DHE) 染色、一酸化窒素では NADPH ジアホラーゼ活性の測定法を用いた。アポトーシスの検出は、切断型カスパーゼ 3 抗体を用いた。

### (3)マイトファジーの解析

p62、LC3 の発現と局在は、immunoblotting と免疫染色により行った。また、ミトコンドリア局在化シグナルを付加した Keima-Red と Parkin 発現プラスミドをリポフェクトアミンにより細胞導入し、36 時間培養した。その後、CCCP を添加し 24 時間処理した。2 励起波長 (550 nm, 440 nm)、蛍光波長 (610 nm) の条件で共焦点顕微鏡により撮影した。中性では 440 nm、酸性では 550 nm の励起による蛍光強度が高い。励起波長比 (550 nm/440 nm) による蛍光強度を定量した。

### (4)疼痛モデル

カラゲニンやホルマリン後脚皮下投与による炎症性疼痛モデル、ストレプトゾトシン腹腔内投与による 1 型糖尿病モデルを作製した。von Frey 試験による機械刺激に対する疼痛反応を測定した。また、パラホルムアルデヒド緩衝液で固定した組織切片は、免疫組織染色を行い、共焦点顕微鏡で観察し、Image J を用いて蛍光強度を定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) NIPSNAP1 によるミトコンドリア機能制御

HEK-NIPSNAP1 細胞では、NIPSNAP1 はミトコンドリアに局在していた。ミトコンドリア局在チャンネル VDAC の発現量や、融合型や分裂型のミトコンドリア数には影響を及ぼさなかった。また、NIPSNAP1 欠損マウスの脳、脊髄、DRG では、VDAC や HSP60 の発現量にも変化は見られなかった。

NIPSNAP1 欠損 DRG 細胞では、ATP 量は僅かな (1.3 倍) の上昇を示した。一方、DHE 染色では、酸化型の陽性細胞が 4 倍に増加し、ROS 産生が亢進していることが明らかになった。

NIPSNAP1 欠損 DRG 細胞では、カスパーゼ 3 活性が 40% 抑制され、アポトーシスが抑制されていることが示唆された。

##### (2) NIPSNAP1 によるマイトファジー制御

###### LC3

LC3 にフォスファチジルエタノールアミンと結合した LC3-II は、隔離膜に結合し、オートファゴソームを形成する。NIPSNAP1 欠損 DRG 細胞では、隔離膜に結合する LC3-II の割合が上昇した。

###### p62

p62 はユビキチン化タンパク質凝集体に結合し、オートファゴソームへの誘導を担うアダプター分子である。NIPSNAP1 欠損 DRG 細胞では、p62 の発現レベルの変化はないが、ドット状の凝集体が見られ、その数は 1.8 倍に上昇した。また、ミトコンドリアと p62 の共局在も 2.0 倍に増加していた。これらの上昇は、CCCP 処理を行った野生型細胞でも見られた。

###### リソソーム融合

リソソームタンパク質の LAMP2 や LysoTracker とミトコンドリアの共局在を検討したところ、未処理の NIPSNAP1 欠損 DRG 細胞には差は認められなかった。野生型 DRG 細胞への CCCP 添加により、リソソームとミトコンドリアの共局在は、6 時間で 7 倍、24 時間で 2 倍に上昇した。その上昇は NIPSNAP1 欠損により抑制された。

###### マイトファジー検出プローブ

Keima-Red 蛍光タンパク質は励起スペクトルが pH により変化し、Parkin は損傷ミトコンドリアにユビキチンを付加することでマイトファジーが実行される。ミトコンドリア局在化シグナルを付加した Keima-Red と Parkin 発現プラスミドを HEK-NIPSNAP1 細胞に導入したところ、励起波長比 (550 nm/440 nm) の蛍光強度値が 1.6 倍上昇し、酸性状態での局在が上昇していた。その上昇率は、CCCP 処理細胞と同程度であった。この結果より、NIPSNAP1 は、マイトファジーを促進することが示唆された。

NIPSNAP1 欠損細胞において、LC3-II、p62 凝集体、p62 とミトコンドリアの共局在が上昇したことより、オートファゴソームは形成していると考えられる。しかし、CCCP 処理による損傷ミトコンドリアは、リソソームの共局在が NIPSNAP1 欠損細胞で抑制されたことより、リソソームとの融合が阻害されたと考えられる。

##### (3) マイトファジーと疼痛慢性化との関連

NIPSNAP1 欠損マウスでは炎症性疼痛の増強が認められたが、末梢組織の浮腫、ケモカイン産生、マクロファージの浸潤には差がなく、脊髄後角の ERK のリン酸化が上昇した。NIPSNAP1 は末梢組織の炎症反応の亢進ではなく中枢性制御に関与することが示唆された。

そこで、NIPSNAP1 欠損マウスの脊髄後角に焦点を絞り解析したところ、オートファジー関連分子の LC3、LAMP2、Hsc70 には変化がなかったが、p62 の発現が有意に上昇した。p62 の発現上昇と疼痛慢性化の解明は今後の課題である。

他方、オートファジーと糖尿病との関連が報告されていることから、NIPSNAP1 欠損マウスの 1 型糖尿病モデルを作製した。糖尿病に伴う機械刺激に対する疼痛閾値は、NIPSNAP1 欠損マウスと野生型ではいずれも低下を示し、有意な差は認められなかった。1 型糖尿病モデルの脊髄後角では、ROS 産生抑制、NO の産生上昇が見られたが、p62 の発現変動は見られなかった。

NIPSNAP1 がアロディニア抑制に関与することから、脊髄後角におけるアロディニア発症機構として JNK と MCP-1 による経路を解明した。この経路は NIPSNAP1 欠損マウスにおいても認められたことより、NIPSNAP1 を介さないアロディニア発症経路と考えられた。

以上のことより、NIPSNAP1 は、ROS 産生、アポトーシス抑制、ミトコンドリアの品質管理を担うマイトファジーのオートリソソーム形成の制御に関与することが示唆された。

#### 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)

芦高恵美子

糖尿病性神経因性疼痛の分子メカニズム  
BIO Clinica vol.32, pp.75-77, 2017.

査読無

[http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/01bio/bio2017\\_03.html](http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/01bio/bio2017_03.html)

Kawabata, K., Nishimura, I., Fujiwara, T., Terauchi, S., Minami, T., Ito, S., and Okuda-Ashitaka, E.

Intrathecal administration of low-dose nociceptin/orphanin FQ induces

allodynia via c-Jun N-terminal kinase and monocyte chemoattractant protein-1.

Eur. J. Neurosci., 43:1499-1508, 2016.

査読有, doi: 10.1111/ejn.13247

Okamoto, K., Ohashi, M., Ohno, K., Takeuchi, A., Matsuoka, E., Fujisato, K., Minami, T., Ito, S., and Okuda-Ashitaka, E.

Involvement of NIPSNAP1, a neuropeptide nocistatin-interacting protein, in inflammatory pain.

Mol. Pain, 12:1-11, 2016. 査読有

doi: 10.1177/1744806916637699

[学会発表](計 10 件)

松岡悦子, 矢野裕士, 大津出, 鍵本真人, 安永俊之, 松井凌介, 坂元秀幸, 芦高恵美子

マウス脊髄と後根神経節におけるノシスタチン結合分子 NIPSNAP1 によるミトコンドリアの機能解析

日本分子生物学会, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Okuda-Ashitaka, E., Kawabata, K.,

Nishimura, I., Fujiwara, T., Terauchi, S., Minami, T., and Ito, S.

Nociceptin/Orphanin FQ-induced allodynia via c-Jun N-terminal kinase and monocyte chemoattractant protein-1 in the spinal cord.

International Association for the Study of Pain, 16th World Congress on Pain, 2016 年 9 月 28 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大野華奈, 安永俊之, 芦高恵美子

一酸化窒素を介した糖尿病性神経因性疼痛の中樞性感作

日本生化学会, 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

川端健太, 藤原武史, 西村勇武, 寺内祥子, 南敏明, 伊藤誠二, 芦高恵美子

JNK の活性化による MCP-1 遊離を介したノシセプチンのアロディニア発症

日本生化学会, 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Okuda-Ashitaka, E., Okamoto, K., Ohashi, M., Ohno, K., Minami, T., and Ito, S.

Expression change of NIPSNAP1, a neuropeptide nocistatin-interacting protein, following inflammatory pain.

Society for Neuroscience, The 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 20 日, シカゴ(米国)

Ohno, K., Yasunaga, T., Sakamoto, H., and Okuda-Ashitaka, E.

Nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist JTC-801 inhibits spinal nitric oxide production and neuropathic pain in diabetic mice

Society for Neuroscience, The 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 18 日, シカゴ(米国)

大野華奈, 安永俊之, 芦高恵美子

ノシセプチン受容体拮抗薬による糖尿病性神経因性疼痛への効果

日本生物高分子学会, 日本生物高分子学会 2015 年度大会, 2015 年 9 月 19 日, 香川大学幸町キャンパス(香川県・高松市)

蒔田紗英, 芦高恵美子

ノシスタチン結合分子 NIPSNAP1 のスライスバリエーションの細胞内局在と機能解析

日本生物高分子学会, 日本生物高分子学会 2015 年度大会, 2015 年 9 月 19 日, 香川大学幸町キャンパス(香川県・高松市)

松岡悦子, 大野華奈, 鍵本真人, 安永俊之, 松井凌介, 坂元秀幸, 芦高恵美子

糖尿病神経因性疼痛に伴う脊髄におけるミトコンドリアの機能解析

日本生化学会, 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 2015 年 5 月 16 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県・草津市)

大野華奈, 安永俊之, 芦高恵美子

糖尿病性神経因性疼痛に伴う脊髄後角の一酸化窒素産生制御

日本生化学会, 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 2015 年 5 月 16 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県・草津市)

[その他]

ホームページ

<http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~ashitaka/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

芦高 恵美子 (OKUDA-ASHITAKA, Emiko)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号: 50291802

### (2) 研究分担者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80201325

### (3) 連携研究者

近江谷 克裕 (OHMIYA, Yoshihiro)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・部門長

研究者番号: 20223951

(4)研究協力者

岡本 和也 (OKAMOTO, Kazuya)  
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生

大野 華奈 (OHNO, Kana)  
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生

川端 健太 (KAWABATA, Kenta)  
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生

松岡 悦子 (MATSUOKA, Etsuko)  
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生