

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860385

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における糖脂質ガングリオシド組成の変化と疼痛への影響についての研究

研究課題名(英文) The roles of glycosphingolipids in neuropathic pain.

## 研究代表者

渡辺 俊 (Watanabe, Shun)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：50415337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ糖脂質は脂質二重層を構成する脂質の一種である。特にシアル酸を持つスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは神経組織に多く存在し、重要な機能を担っている。しかし、疼痛との関わりは不明な点が多い。申請者らは以前にガングリオシドが皮膚においてグルタミン酸シグナルを介して痛覚過敏を引き起こすことを報告した。本研究では神経障害性疼痛や炎症性疼痛においてガングリオシドがどのように変化するか検討を行い、炎症性疼痛の皮膚においてガングリオシドが増加することを示した。さらに、シアル酸分解酵素により炎症性疼痛を緩和されることを見出した。以上から、痛覚異常時にガングリオシドが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gangliosides that are sialic acid containing-glycosphingolipids are abundant in neural tissues and previous studies revealed important roles in neuronal functions. However, the roles of gangliosides in pain sensing remain unclear. We reported that gangliosides induced hyperalgesia via glutamate signaling in skin tissues. Thus, we investigated gangliosides composition in neuropathic pain and inflammatory pain models. Complex gangliosides were increased in skin tissues from inflammatory pain model mice. Furthermore, intraplantar injection of sialidase which cleave sialyl residues of glycoconjugates including gangliosides reduced mechanical allodynia caused by inflammation. These findings suggested that gangliosides are involved in mechanical allodynia in inflammatory pain.

研究分野：脂質生化学、疼痛学

キーワード：スフィンゴ脂質 ガングリオシド 疼痛 鎮痛

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜は脂質二重層からなり、リン脂質、コレステロール、糖脂質（ほ乳類においては大部分がスフィンゴ糖脂質である）など、多様な脂質から構成される。グリセロール骨格を持つリン脂質とは異なり、スフィンゴ糖脂質はセラミドを脂質部分として有するスフィンゴ脂質の一種であり、頭部に糖鎖を持つことで多様な構造をとることが特徴である。特に、ガングリオシドと呼ばれる糖脂質は負電荷を持つ糖であるシアル酸を持つ（図1、ここではガングリオ系列のガングリオシドを示した）。

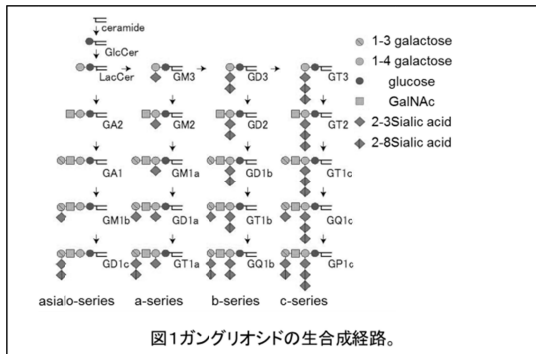


図1 ガングリオシドの生合成経路。

このようなガングリオシドは神経系組織に多く発現し、神経機能に影響を及ぼしていると考えられている。その分子機序のひとつに、近年よく研究されてきている脂質ラフト形成能が挙げられる。脂質ラフトは生体膜上に形成される、周囲とは異なる脂質組成を持つ微小領域である。脂質ラフトに集積する脂質として、ガングリオシドをはじめとしたスフィンゴ糖脂質やセラミドやスフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質、コレステロールが挙げられる。これらの特異な脂質組成により、膜タンパク質の活性や、局在を制御すると考えられている。

以上のような機能を持つガングリオシドであるが、どのように神経機能のひとつである疼痛の惹起や伝達に関与しているのかほとんど知られていない。

申請者らのこれまでの研究からマウスの足底にb-シリーズガングリオシドGT1b（図1参照）を投与したところ、疼痛関連行動である足なめ行動(licking)を引き起こしたが、a-シリーズガングリオシドGM1では有意な変化は認められなかった。さらに、各種ガングリオシドを投与した後、低濃度のホルマリンを投与して惹起される疼痛がどのように影響を受けるか検討したところ、a-シリーズガングリオシドではほとんど効果が無く、b-シリーズガングリオシドであるGD1b、GT1b、GQ1bにより疼痛が増強された(図2A)。さらに、足底部皮下におけるマイクロダイアリシスや発痛物質に対するアンタゴニストを用いた検討により、この作用はグルタミン酸が皮下において蓄積することでNMDA受容体やmGluR1を活性化するためであることが示唆された。さらに、ホルマリン以外の疼痛刺激に対してどのような効果が認められる

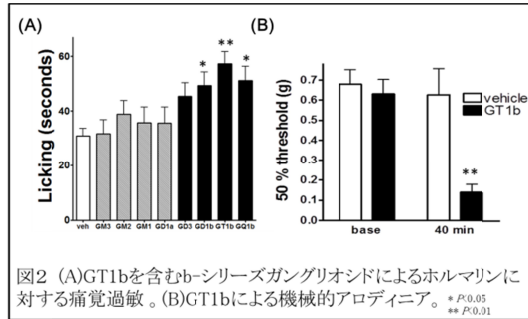


図2 (A)GT1bを含むb-シリーズガングリオシドによるホルマリンに対する痛覚過敏。(B)GT1bによる機械的アロディニア。\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

か検討を行ったところ、GT1bを投与するとvon Frey filamentによる機械的刺激に対して過敏化することが認められた(図2B)。この際の反応閾値は通常疼痛反応を引き起こさない刺激であり、機械的アロディニア(触刺激など別の感覚を痛みとして認識する疼痛異常)であると考えられる。以上のように、ガングリオシド投与により疼痛を増強する、或いはアロディニアを引き起こす現象が認められ、末梢組織中のガングリオシドが疼痛に関与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果から、ガングリオシドが疼痛に関与する可能性が示されたが、生体において痛みの異常が生じる際、どのようにガングリオシドが変化するか明らかでない。また、疼痛のシグナルは末梢で生じた信号を感覚神経により伝え、脊髄を介して上位中枢に伝えることで痛みとして認識される。そのため、末梢だけでなく脊髄におけるガングリオシドも解析する必要がある。そこで、本研究ではまず神経障害性疼痛におけるガングリオシドの変化について解析を行った。神経障害性疼痛とは、疼痛の伝達経路である神経細胞が障害を受けることで、末梢組織の損傷が治癒した後、あるいは損傷自体を受けていないにも関わらず痛覚過敏やアロディニアを生じる現象である。また、この他にもこのような疼痛異常が生じる痛みのモデルとして炎症性疼痛が挙げられる。そこで、これらの疼痛モデルをICRマウスにおいて作製し、脊髄や皮膚を採取しその糖脂質組成を検討することとした。さらに、増加する場合はガングリオシドがシアル酸を持つことから、シアル酸分解酵素を投与することで疼痛が緩和しうるか検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

日本クレアより購入したICRマウス(オス、5-7週齢)を用い、坐骨神経部分結紮により神経障害性疼痛モデルを作製し、6-7日後von Frey filamentを用い、アロディニアを評価し、アロディニアを起こしているマウスからのみ脊髄や足底皮膚などの組織を採取した。対照として偽手術群を用意した。また、炎症性疼痛も合わせて解析を行うため、complete Freund's adjuvant (CFA)を足底部皮下に投与し、一日後炎症が生じていることを確認し、

同様に組織を採取した。得られた組織より総脂質を抽出し、陰イオン交換カラムを用いて酸性糖脂質を分離し脱塩後 TLC により糖脂質を染色し、解析を行った。必要な場合はシリカゲルカラムにより ganglioside を分離し、同様に解析を行った。

シアル酸分解酵素による鎮痛効果は、アロディニアを確認後、足底皮下に酵素を投与し、一定時間後に von Frey Filament を用い、機械的刺激に対する疼痛閾値を測定することで鎮痛効果を検討した。

#### 4. 研究成果

まず、内在性の ganglioside などの糖脂質が疼痛に関与していることを解析するべく、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄より脂質を抽出し、ganglioside を含む画分を調整後、TLC により糖脂質を染色することで解析を行った。その結果、坐骨神経結紮後 6-7 日の脊髄や皮膚では ganglioside の顕著な変化は認められなかった。しかしながら、神経障害性疼痛は神経障害後まもなくの時期、さらに 2 週間程度の後の疼痛異常の維持期間においても分子機構が異なる可能性が考えられるため、今後このような時点においても検討を行っていく必要がある。また、一方で ganglioside とは別種のカテゴリーの糖脂質が増加する例が認められた。今後、例数を増やしていくことでこの結果が妥当であるか検討を行う。また、この脂質は疼痛に関与していることが知られておらず、神経障害性疼痛の発症機序の一つとなり得るか検討を行う予定である。

一方、炎症性疼痛においては、皮膚においてシアル酸を持つ糖脂質が増加した。皮膚においては TLC 上で移動度の低い、長い糖鎖を持つ糖脂質はほとんど認められないが、CFA 投与後、いくつかの糖脂質が出現した (図 3 A, CFA のレーン参照)。これらの糖脂質はシアル酸分解酵素を試験管内で処理したところバンドが消失し、移動度の高い糖脂質が増加したことから、シアル酸を有すると考えられる (図 3 B)。さらに、CFA 投与後、炎症を生じた足底皮膚にシアル酸分解酵素を投与したところ、炎症により生じた機械的アロディニアが緩和された。さらに、熱処理することで失活させたシアル酸分解酵素は鎮痛効果を示さなかった。なお、無処理のマウスに

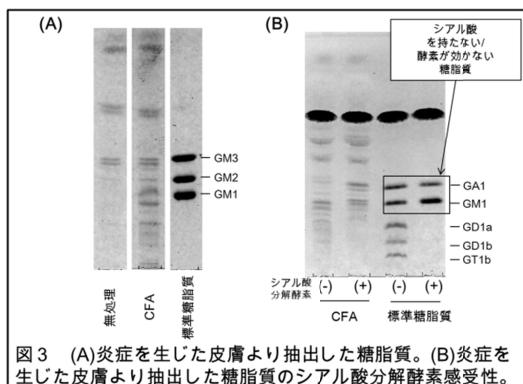


図3 (A)炎症を生じた皮膚より抽出した糖脂質。(B)炎症を生じた皮膚より抽出した糖脂質のシアル酸分解酵素感受性。

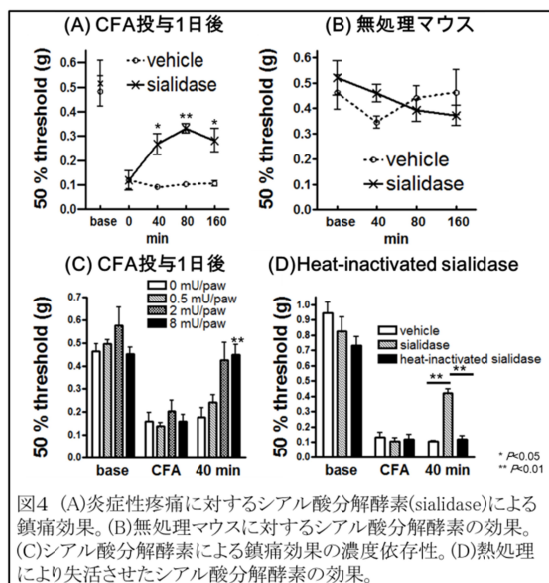


図4 (A)炎症性疼痛に対するシアル酸分解酵素(sialidase)による鎮痛効果。(B)無処理マウスに対するシアル酸分解酵素の効果。(C)シアル酸分解酵素による鎮痛効果の濃度依存性。(D)熱処理により失活させたシアル酸分解酵素の効果。

おいてはシアル酸分解酵素の効果は認められなかった (図 4)。以前の成果である GT1b により機械的アロディニアが生じるという結果と、今回のシアル酸分解酵素により機械的アロディニアが緩和されるということから、皮膚においては炎症後、ganglioside の増加が生じ、そのことが機械的アロディニアの一因となる可能性が示唆された。今後は、炎症により増加した糖脂質がどのように痛みに関与しているのか明らかにすることが必要である。また、シアル酸分解酵素がどのような細胞や分子に影響を与えるか検討することで、疼痛における ganglioside の機能をより詳細に明らかにしていくことを予定している。

#### 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 2 件)

渡辺 俊、田辺 光男 ganglioside の機能と疼痛 日本薬理学雑誌 145 巻 4 号 2015、216-218

査読有り

DOI:10.1254/fpj.145.216

Watanabe S, Higashi H Pain signaling and Gangliosides. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 27(154), 2015, 37-45.

査読有り

DOI:10.4052/tigg.1311.1

〔学会発表〕(計 5 件)

渡辺 俊、高野 香奈子、岩井 孝志、松尾(池田) 由理、内藤 康仁、田辺 光男、炎症性疼痛におけるスフィンゴ糖脂質の変化 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9 日 ~ 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

渡辺 俊、田辺 光男 疼痛における糖脂質

の関与 痛み研究会 2015 痛みの理解を目指した先端的アプローチ 2015 年 12 月 17 日～18 日 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

渡辺 俊, 高野 香奈子, 岩井 孝志, 松尾(池田) 由理, 内藤 康仁, 田辺 光男 炎症性疼痛におけるシアリダーゼによる鎮痛効果 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日～4 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

渡辺 俊, 田辺 光男 疼痛に關与する糖脂質 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日～20 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

渡辺 俊, 東 秀好, 田辺 光男 糖脂質ガングリオシドによる痛覚過敏の惹起 第 36 回日本疼痛学会 2014 年 6 月 20 日～21 日 KKR ホテル大阪(大阪府大阪市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 俊 (WATANABE, Shun)

北里大学・薬学部 助教

研究者番号: 50415337