

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09047

研究課題名(和文)可塑性関連プロテアーゼ・ニューロトリプシンによる痛覚・痒み感覚の修飾

研究課題名(英文) Expression of neurotrypsin in dorsal root ganglia and dorsal horn following peripheral nerve injury

研究代表者

山中 博樹 (Hiroki, Yamanaka)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄の運動ニューロンや海馬などで神経筋接合部の形成やシナプスの形態的可塑性に関与する分泌型セリンプロテアーゼであるニューロトリプシンの発現について検討した。その結果ニューロトリプシンが成体ラットの後根神経節と脊髄後角において定常的な発現を示している事が明となった。後根神経節では約30%程度のニューロンに発現を認めた。脊髄後角では痛覚伝達に関与するI-II層のニューロンに局限して発現する事がわかり、後根神経節のニューロンでは末梢神経そんそうに反応して増加する事から、ニューロトリプシンが痛覚応答ニューロンで働き、またその可塑的な変化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は痛覚伝導路において細胞外環境を改変し、シナプス可塑性に関わるニューロトリプシンの特異的な発現を明らかにできる。痛覚過敏を主症状とする神経傷害性疼痛が難治性であるメカニズムの1つが神経回路網の形態的な変化である。このため、形態変化を可能にする細胞外環境改変因子は難治性疼痛に対する責任分子の1つである事が考えられる。従って痛覚伝導路の特異的に発現し、損傷応答して発現増加をしめしているニューロトリプシンは、神経傷害性疼痛をはじめとした疼痛の治療ターゲット分子となる可能性が高いと考えられる。今後は特異的な活性阻害剤の開発が今後の課題であると思われる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that Neurotrypsin (NP) plays an important role in the formation of neuromuscular junction and in the synaptic plasticity in nervous system. In this study we elucidated the expression of NP mRNA in the rat dorsal root ganglia (DRG) and dorsal horn (DH). In the rat DRG, 30% of total neuron expressed NP mRNA. And in DH, neuronal cell in laminae I-II expressed NP mRNA but not in deep layer of DH. Peripheral nerve injury dramatically increased the NP mRNA expression in DRG but not in DH. Agrin is specific substrate of NP and the fragment of agrin act as a specific ligand of cell surface tyrosin kinase Muscle specific kinase (MuSK). We found the phosphorylation of MuSK in the activated microglia of the neuropathic pain model rats. These results indicate the possible involvement of NP in neuro-microglia interaction following peripheral nerve injury.

研究分野：疼痛学

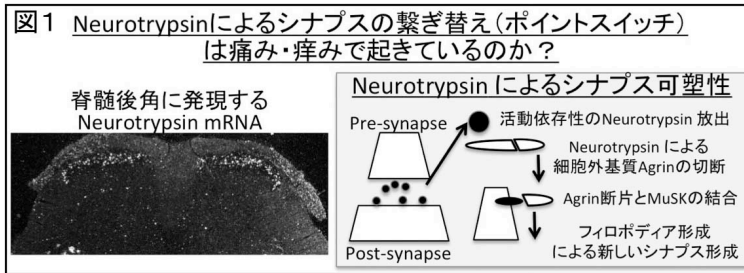
キーワード：セリンプロテアーゼ 細胞外環境改変 シナプス可塑性 脊髄後角 後根神経節 神経傷害性疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 先行研究と Preliminary なデータ

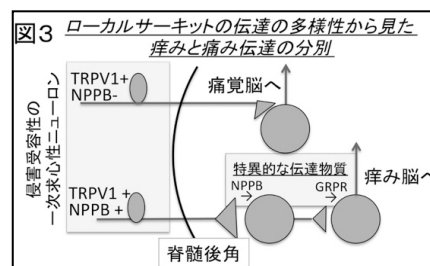
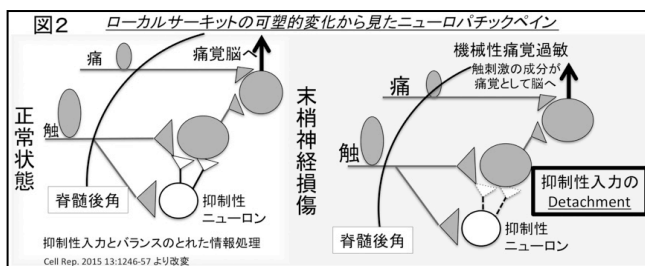
本研究は我々が左図に示した、可塑性関連プロテアーゼのニューロトリプシンのニューロトリプシンが脊髄後角に特異的に発現していることを見いだした事と、昨今明らかになりはじめた脊髄介在ニューロンの末梢感覚情報処理への関与から着想した。



### ニューロトリプシン による神経可塑性調節

ニューロトリプシンは海馬からクローニングされた分泌型のセリンプロテアーゼであり、神経活動に依存して分泌され、ニューロトリプシンによるアグリン切断は、海馬や大脳皮質などにおいて可塑性誘導刺激に応じて樹状突起フィロポディアを新生する動的可塑性因子として同定されている (Cell. 2009 136(6):1161-71) (参考 図 1 右)。このような神経の形態的变化は伝達効率を増大させる生理的調節の一つであり、脊髄後角でのニューロトリプシンの役割として形態変化のような動的可塑性への関与が考えられる。特に介在ニューロンに発現している場合、下記 2) に述べるような痛み・痒みへの調節系である可能性も考えられる。

2) 介在ニューロンの多様性と可変性は痛み・痒みを増悪させ得る痛みをはじめとした体性感覚は特殊な末梢受容ニューロンとそれに対応した特異的な伝達経路を持つと考えられてきた。しかし、機械的痛覚過敏において抑制性介在ニューロンの動的可塑性が機械的痛覚過敏に関与していること (Cell Rep. 2015 13:1246-57) (図 2 参照) や痛覚受容伝達経路に含まれた痒み経路が脊髄後角で介在ニューロンによって弁別的に伝達する事 (J Neurosci. 2015 35:648-57) (図 3 参照) など、脊髄の介在ニューロンが脳への侵害情報・搔痒感のゲート機能として機能していることが明らかとなってきた。この介在ニューロン群は多様性を持ち、単に興奮性・抑制性の分類以外にも神経伝達物質やオピオイド系の受容体で分類が可能であり、一次求心性線維への軸索-軸索終末への抑制や、興奮性ニューロンへの終末など、一部のパタ



ーンが解明されつつある。この部位にシナプスの繋ぎ方の変化=ポイントスイッチがあれば、介在ニューロンに入力した刺激は、例えば機械的な刺激であっても痛みや痒みの伝達系に入力しうる事を意味している。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで、神経傷害性疼痛における形態的可塑性関連分子としてプロテアーゼと細胞間接着因子について計 5 報の報告 (Eur J Neurosci. 2004, 19, 93-102、 Eur J Neurosci. 2007, 25, 1097-111、 Glia. 2007, 55 595-603、 J Comp Neurol. 2011, 519 1597-615、 Neuroscience. 2016, 314, 189-99) をし、脊髄後角において形態変化を起こしうる分子が疼

痛に関与する事を示してきた。本申請はこれらの研究を発展させ、形態変化の分子基盤が生理条件でも機能している可能性に着目し、様々な感覚入力のプロセッシングにプロテアーゼが関与しているという「後角シナプスの細胞外環境修飾は疼痛調節機能である」という概念を補強するものである。

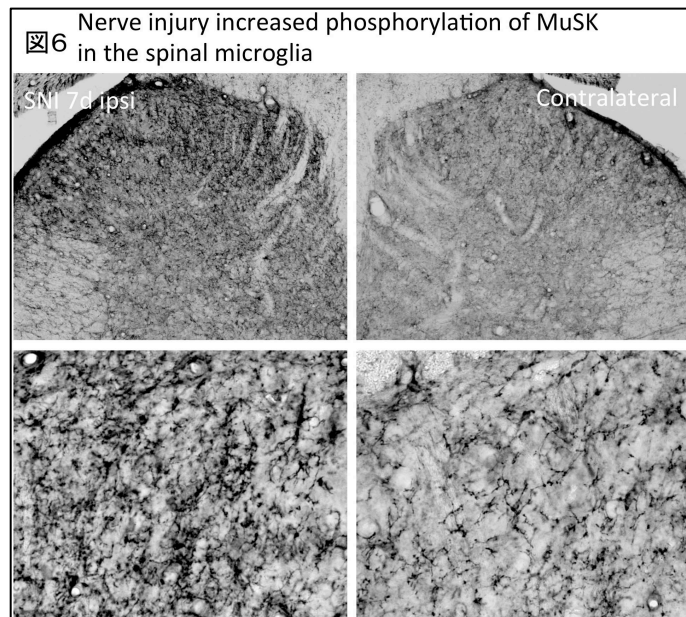
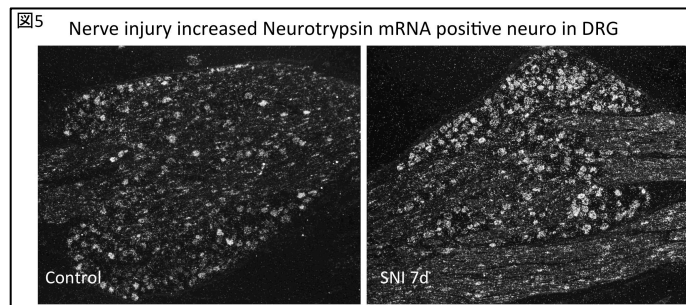
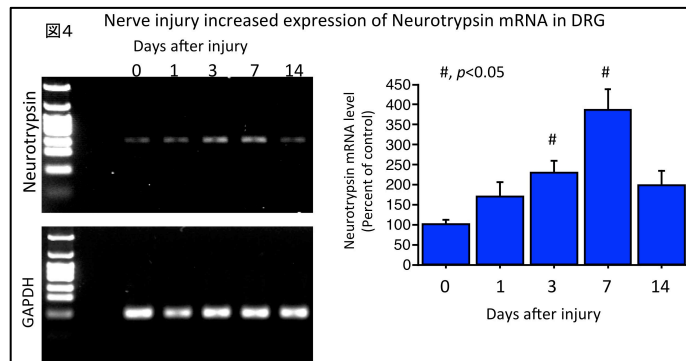
### 3. 研究の方法

本研究はラットまたはマウスを使用し、以下の実験を行った。

- 1) *in situ* hybridization 法とマーカータンパクの免疫染色を使用した脊髄後角でのニューロトリプシン発現細胞の特定。
- 2) 基質タンパク アグリンの切断パターンを確認とその受容体である muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) とリン酸化 MuSK 発現の有無の確認。

### 4. 研究成果

脊髄後角においてニューロトリプシン発現細胞を特定した。また、末梢神経切断モデルと末梢足底炎症モデルにおけるニューロトリプシンの発現変化を確認した(図4)。後根神経節においては末梢神経損傷モデルで中型から小型の発現細胞の増加を確認したが(図5)、炎症モデルでは変化を認めなかった。脊髄後角では両モデルでの発現の変化は認めなかった。従って、痛みのモデルに対して反応を示すニューロトリプシンは後根神経節由来である事が強く示唆された。このため、神経傷害性モデル動物における基質タンパクの Fragment の受容体である muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) の活性化フォームであるリン酸化 MuSK 発現を確認したところ、リン酸化 MuSK がマイクログリアに認められたため(図6)ニューロトリプシンは神経-神経の関連ではなく、神経-グリアの関連に働いている可能性が確認された。現在までに得られた、ニューロトリプシンの発現パターン解析と損傷反応性について、結果をまとめ論文を作成している。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Christopher G. Alvaro, Joao M. Braz, Mollie Bernstein, Katherine A. Hamel, Veronica Craik, Hiroki Yamanaka, Allan I. Basbaum.	4. 巻 15
2. 論文標題 Hippocalcin-like 4, a neural calcium sensor, has a limited contribution to pain and itch processing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0226289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0226289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okubo Masamichi, Yamanaka Hiroki, Kobayashi Kimiko, Noguchi Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Differential expression of mGluRs in rat spinal dorsal horns and their modulatory effects on nociceptive behaviors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1.74481E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919875026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yang Yanjing, Wang Shenglan, Kobayashi Kimiko, Kanda Hirosato, Kogure Yoko, Yamamoto Satoshi, Yamanaka Hiroki, Noguchi Koichi, Dai Yi .
2. 発表標題 TRPA1-expressing lamina propria mesenchymal cells regulate colonic motility through prostaglandin release
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保 正道, 山中 博樹, 小林 希実子, 野口 光一
2. 発表標題 脊髄後角神経回路におけるmGluRの発現解析と炎症性疼痛との関係
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 希実子, 山中 博樹, 大久保 正道, 野口光一
2. 発表標題 末梢神経損傷後の脊髄後角neuronで増加するBDNF
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----