

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19603010  
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛における脊髄グルタミン酸トランスポーター機能可塑的変化の役割  
 研究課題名（英文） Roles of plastic changes in glutamate transporter function within the spinal cord in neuropathic pain  
 研究代表者  
 山内 正憲（YAMAUCHI MASANORI）  
 札幌医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：00404723

研究成果の概要：グルタミン酸トランスポーター酸化修飾の神経因性疼痛への関与を明らかにすることを目的として研究を行った。グルタミン酸トランスポーター阻害薬のラット髄腔内投与は、熱性痛覚過敏および機械的アロディニアを惹起した。グルタミン酸トランスポーターの酸化修飾による活性変化を検討したところ、グルタミン酸トランスポーターGLT-1が酸化修飾されることが示されたが、酸化修飾による取り込み活性変化は認められなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：グルタミン酸トランスポーター、一酸化窒素、神経因性疼痛、酸化ストレス、GLT-1、GLAST、アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

「痛み」は、その発症機序によって組織の傷害による痛みである侵害受容性疼痛（組織傷害性疼痛）と、神経の障害による痛みである神経因性疼痛に分類される。このうち神経因性疼痛には麻薬性鎮痛薬や抗炎症薬が効きにくい場合が多く、現在でも有効な治療薬・治療法が少ないため、その発症機序の解明と治療薬の開発が希求されている。一方、近年の国内外の研究により、神経因性疼痛発症あるいはその慢性化に脊髄内グリア細胞の関与が明らかになりつつある。Tsudaらは、グリア

細胞の中でも特にミクログリアの役割に着目し、ミクログリアにおけるATP受容体P2X4サブタイプの発現亢進が神経因性疼痛発症に重要であることを報告している（Nature, 424, 778-783 (2003)）。一方、アストロサイトの役割に関しては、その細胞膜上に発現する神経伝達物質受容体や輸送体と神経因性疼痛発症との関連には不明な点が多い。

研究代表者はこれまでに、麻酔薬であるハロタンがインビボにおいて脊髄後角侵害受容性神経の活動を抑制すること、さらには、この神経活動抑制にGABA<sub>A</sub>およびグリシン受容

体が関与していることを明らかにしており (Anesthesiology, 97, 412-417 (2002))、神経性アミノ酸による脊髄内情報伝達機構のさらなる理解が、新しい疼痛制御法の獲得につながることを期待された。そこで本研究では、神経性アミノ酸による情報伝達において重要な役割を果たしている神経伝達物質輸送体、特にアストロサイトが有するグルタミン酸トランスポーターの活性変化に着目し、神経因性疼痛におけるその役割を明らかにしようと考えた。

Sung らは、坐骨神経結紮による痛覚過敏モデル (CCI モデル) において、神経因性疼痛発症初期 (術後 5 日後) ではグリア型グルタミン酸トランスポーター (GLT-1 および GLAST) 発現量は正常時に比較し増加もしくは同程度であるにもかかわらずその活性は低下していること、グルタミン酸トランスポーター活性化薬 riluzole が神経因性疼痛を軽減することを報告している (J. Neurosci., 23, 2899-2910 (2003))。これらの知見は、神経因性疼痛発症にグルタミン酸トランスポーター活性の抑制機構が関与している可能性を示唆している。1) グルタミン酸トランスポーターをはじめとする神経伝達物質輸送体ではシステイン残基が活性発現に重要な役割を果たしていること、2) 神経因性疼痛発症に NMDA 受容体活性化および一酸化窒素 (NO) 産生が関与しているとの報告があることから、神経因性疼痛時に脊髄内で産生された NO が、グルタミン酸トランスポーターのシステイン残基の S-ニトロシル化やチロシン残基のニトロ化によって、輸送体タンパク質を酸化的に修飾し、それによるトランスポーター活性低下が神経因性疼痛発症の原因となっている可能性を考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、NO によるシステイン残基のニトロシル化 (S-ニトロシル化) やチロシン残基のニトロ化などの酸化ストレスによるタンパク質分子機能修飾に着目し、神経因性疼痛発症におけるグルタミン酸トランスポーター酸化的修飾の役割を明らかにすることを目的として、研究期間内に以下の(1)~(3)の研究を行った。

(1) 脊髄局所へのグルタミン酸トランスポーター阻害薬の投与が、痛覚過敏やアロディニアを惹起するか否かを、ラットを用いて行動薬理的に解析した。

(2) グルタミン酸トランスポーター発現細胞を用いたインビトロでの解析により、NO ドナーによってトランスポーターの酸化的修飾が惹起されるか否かを、生化学的手法によ

り検討した。

(3) グルタミン酸トランスポーター発現細胞を用いたインビトロでの解析により、酸化ストレスを誘導する NO ドナーや、脂質過酸化生成物、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などが、トランスポーター活性に及ぼす影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 倫理面への配慮

動物を使用する全ての実験は、国際的な動物実験指針を遵守し、札幌医科大学および北海道大学それぞれの動物実験委員会の承認のもとで行った。

### (2) 薬物髄腔内投与

ラットの第 5/6 腰椎間に薬物髄腔内投与用カテーテルを留置し、1 週間後に行動学的異常のないこと、2%キシロカイン  $10 \mu l$  により下肢の運動麻痺が生ずることを確認できた動物のみを実験に用いた。薬物はクモ膜下腔内に投与した。

### (3) 痛覚過敏およびアロディニアの評価

行動解析は、薬物投与 30 分後に行った。雄性 SD ラット (体重 250 g) を用いた熱性痛覚過敏の評価は、足底への侵害熱刺激からの逃避潜時を測定することで評価した。また、機械的アロディニアは、von Frey filament による足底への機械刺激に対する逃避閾値を調べることで評価した。

### (4) 細胞培養

GLT-1 発現細胞は、GLT-1 発現プラスミドをトランスフェクションし一過性に発現させた COS-7 細胞を用いた。また、アストロサイトの初代培養細胞は、生後 1-2 日齢のラットの大脳皮質領域から調製したものをを用いた。培養アストロサイトは、95%以上が GFAP 陽性細胞であった。

### (5) ビオチンスイッチアッセイ

酸化ストレスによるグルタミン酸トランスポーターの酸化的修飾は、S-ニトロシル化タンパクの定量的検出法であるビオチンスイッチアッセイによって評価した。

### (6) グルタミン酸取り込み実験

細胞外グルタミン酸取り込み活性の評価は、細胞を 24 穴プレートに播種し、細胞外に非標識グルタミン酸とともに添加した [ $^3H$ ] 標識グルタミン酸の一定時間における取り込み量を測定することにより行った。

#### 4. 研究成果

(1) グルタミン酸トランスポーターの機能抑制の神経因性疼痛発症への関与を明らかにするため、ラットを用い、グルタミン酸トランスポーター阻害薬 L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC) の髄腔内投与(100  $\mu$ M 溶液を 10  $\mu$ l)が、熱および機械刺激に対する逃避反応に及ぼす影響について検討を行った。PDC の髄腔内投与により、足底に与えられた侵害熱刺激に対する逃避潜時は有意に短縮し、熱性痛覚過敏が認められた。また、von Frey filament による足底への機械刺激に対する逃避閾値も PDC の髄腔内投与によって有意に低下し、機械的アロディニアが認められた。以上より、脊髄グルタミン酸トランスポーター活性の低下によって痛覚過敏およびアロディニアが惹起されることが明らかとなった。

(2) GLT-1 を一過性に発現させた COS-7 細胞を用い、NO ドナー S-nitrosocysteine (SNOC) 処置による GLT-1 の酸化修飾をバイオインジケータによって検討した。その結果、SNOC 処置群では対照群と比較して、S-ニトロシル化された GLT-1 量が増加することが示された。

(3) 培養細胞を用いたインビトロ実験系において、種々の酸化ストレスがグルタミン酸トランスポーターの取り込み活性に影響を与えるか否かを検討した。

GLT-1 発現 COS-7 細胞における細胞外グルタミン酸取り込みは、アッセイ開始 10 分までは直線的に増加した。そこで、NO ドナーがトランスポーター活性に及ぼす影響は 5 分間におけるグルタミン酸取り込み量を指標として検討した。その結果、SNOC (200  $\mu$ M) の 10 分間前処置は、グルタミン酸取り込み

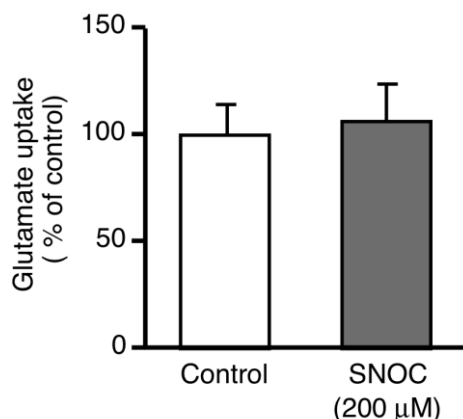


図1 SNOC 処置が GLT-1 のトランスポーター活性に及ぼす影響

グラフは、対照群における取り込み活性を 100%として表している。n = 4

活性に有意な影響を与えなかった (図1)。

次に、アストロサイトの初代培養細胞を用いて、酸化ストレスや、酸化ストレスを受けて生成する酸化二次生成物が、細胞外グルタミン酸取り込み活性に及ぼす影響を検討した。大脳皮質由来の培養アストロサイトでは、GLT-1 はほとんど発現しておらず、細胞外グルタミン酸取り込みは主として GLAST によって調節されていることが知られている。本研究で用いた培養アストロサイトにおいても、GLT-1 がほとんど発現していないことを mRNA レベルおよびタンパクレベルで確認した。細胞外グルタミン酸の取り込みは、10分

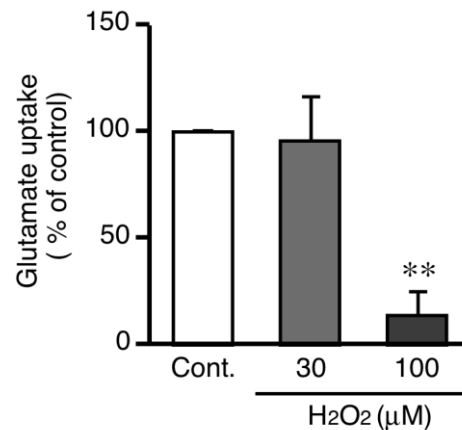


図2 培養アストロサイトのグルタミン酸取り込み活性に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置の効果

グラフは、対照群における取り込み活性を 100%として表している。

P < 0.01 vs control (One-way ANOVA, followed by Dunnett post hoc test)、n = 3

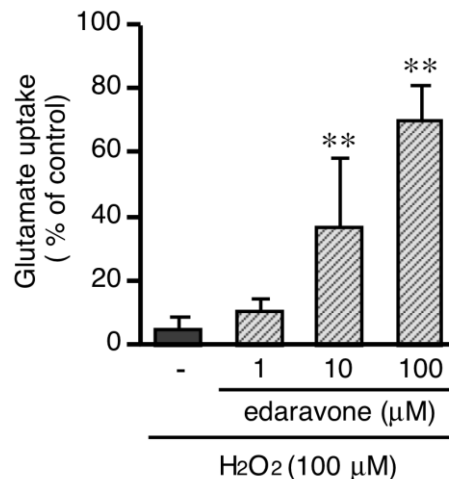


図3 培養アストロサイトでの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるグルタミン酸取り込み活性抑制に対するエダラボンの効果

グラフは、対照群における取り込み活性を 100%として表している。

P < 0.01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (One-way ANOVA, followed by Dunnett post hoc test)、n = 3

間におけるグルタミン酸取り込み量を指標として検討した。パーオキシナイトライト発生剤である SIN-1 (1 mM、1 時間)、あるいは脂質過酸化によって生成する 4-ヒドロキノンネナール (4-HNE ; 30  $\mu$ M、3 時間) でそれぞれ前処置したところ、ともに細胞外グルタミン酸取り込み活性をわずかに減少させる傾向は示したものの、その変化は有意なものではなかった (対照群に対して、SIN-1 処置群は 85.7  $\pm$  6.7%、4-HNE 処置群は 83.8  $\pm$  7.8%)。一方、培養アストロサイトの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) への曝露は、グルタミン酸取り込み活性を減少させた (図 2)。この活性低下は、ラジカルスカベンジャーエダラボン (10 あるいは 100  $\mu$ M) によって有意に抑制された (図 3)。しかしながら、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による取り込み活性低下と同時に、乳酸脱水素酵素遊離や形態変化で示されるような細胞傷害が認められたことから、今後、培養アストロサイトにおいて GLAST の酸化的修飾の有無の検討するとともに、このグルタミン酸取り込み活性の低下がグルタミン酸トランスポーターの酸化的修飾によるものであるのか、あるいは細胞傷害に起因するものであるのかについて明らかにしていく必要がある。

## 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 1 件)

- ① Yamauchi M, Asano M, Watanabe M, Iwasaki S, Furuse S, Namiki A.  
Continuous low-dose ketamine improves the analgesic effects of fentanyl patient-controlled analgesia after cervical spine surgery.  
Anesth Analg, 107, 1041-1044 (2008) (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Seki S, Sugino S, Yamauchi M, Yamakage M, Namiki A.  
Emergency percutaneous dilational tracheostomy with transtracheal jet ventilation.  
The annual meeting of the American society of anesthesiologists.  
2008 年 10 月 18-22 日  
米国・オーランド

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 正憲 (YAMAUCHI MASANORI)  
札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 00404723

(2) 研究分担者  
なし

### (3) 連携研究者

南 雅文 (MINAMI MASABUMI)  
北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号 : 20243040