

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790170

研究課題名（和文） 神経因性疼痛における新規細胞間接着因子 CHL1 の役割

研究課題名（英文） A cell adhesion molecule close homologue of L1 increased in primary afferent terminal contributes to the development and maintenance of neuropathic pain

研究代表者

山中 博樹 (YAMANAKA HIROKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20340995

研究成果の概要（和文）：

イムノグロブリンスーパーファミリーの接着因子である L1-CAM のファミリーで、L1-CAM にホモロジーの高い close homologue of L1 (CHL1) の神経因性疼痛モデルラットにおける挙動を検討した。L1-CAM 同様、CHL1 は神経の動的な変化・発達に関与する分子であり、我々はすでに L1-CAM の変化と神経因性疼痛における関与を報告した (Yamanaka et al., Eur J Neurosci. 2007 February 1; 25(4): 1097-1111.)。今回、我々は神経因性疼痛モデルである spared nerve injury model (SNI model) を使用し、CHL1 mRNA とタンパクの挙動を後根神経節 (DRG) と脊髄後角において検討した。CHL1 は L1-CAM と異なり、末梢神経損傷後に発現上昇する事を見いだした。この発現上昇は小型の DRG ニューロンを中心において起こり、脊髄後角へ輸送され、独特の染色パターンを脊髄後角 I-II 層で示す事を確認した。L-CAM は末梢神経損傷後にシナプスへ集積するが、CHL1 はシナプス外の神経終末部分に集積を認めた。

電子顕微鏡による CHL1 タンパクの陽性を特定した結果、CHL1 は軸索-軸索間、軸索-樹状突起間、軸索-グリア間に集積を認めた。CHL1 の細胞外ドメインに対する抗体を髄腔内投与して疼痛行動を検討した結果、CHL1 抗体投与は濃度依存的に SNI モデル動物における疼痛行動を抑制する事がわかった。CHL1 の脊髄後角における接着活性の変化が疼痛行動をもたらす可塑的な変化、または脊髄後角の神経の興奮性の変化に関与していることを本研究は明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The L1 family of cell adhesion molecules (L1-CAMs) is known to regulate various neural functions that are pivotal to nervous system, including cell adhesion, axon guidance and synaptic plasticity. We investigated the involvement of a close homologue of the L1 cell adhesion molecule (CHL1) on neuropathic pain produced in the rat spared nerve injury (SNI) model. SNI induced the expression of CHL1 in L4/5 DRG neurons, particularly in small size injured neurons and in satellite cells. In the spinal cord, CHL1-immunoreactivity increased in laminae I-II of the dorsal horn ipsilateral to the injury. Ultrastructural study clarified the localization of CHL1 in the axon of primary afferents in the ipsilateral dorsal horn. CHL1 immunoreactivities were localized in the adherence such as axon-axon, axon-dorsal horn neurons (dendrite, soma) and axon-glia (astrocyte and microglia). Experimental inhibition of CHL1 adhesion by chronic intrathecal administration of the anti-CHL1 extracellular domain significantly prevented and

reversed SNI-induced mechanical allodynia. Thus, alterations of CHL1 may be involved in the structural plasticity that is associated with neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経解剖学 ペインリサーチ

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：神経因性疼痛、細胞間接着、脊髄後角、シナプス、形態変化

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷後の脊髄後角の可塑性が神経の形態的可塑性を伴う可能性が示唆されており、我々はその関連因子として細胞外環境の修飾と細胞間、または細胞-細胞外環境の間を結びつける因子の存在を提唱してきた。これまでに我々は細胞外環境修飾因子としてのプロテアーゼである tissue type plasminogen activator (tPA) の分泌に伴う脊髄後角ニューロンの興奮性の増加と、神経因性疼痛への関与を明らかにした。一方、一次救心性線維の終末が新たに接着因子 L1-CAM の集積をはじめることによって一次救心性線維-二次ニューロン間の際にあらたに接着構造が生まれることも示した。我々のこれらの研究テーマは本邦のみならず、世界的に全く他の追随を許さない、オリジナルの研究である。本研究もその一環として、よりダイナミックな変化を示す CHL1 を対象としてその挙動と疼痛への関与を検討したものである。

2. 研究の目的

神経因性疼痛モデルラットの DRG と脊髄後角において CHL1 の発現動態を明らかにし、(1) 発現変化とその形態的な解析、(2) 疼痛行動への関与を検討すること。

3. 研究の方法

CHL1 特異的な cRNA probe を用いた in situ hybridization を行い、神経因性疼痛モデルラットにおいて発現の定量をおこなう。CHL1 特異的抗体を用いて脊髄後角における CHL1 の発現している構造をあきらかにする。核種マーカー抗体との二重標識を行い、同じモデル動物のサンプルを用いて免疫電顕を

行う事で微細構造をあきらかにする。CHL1 の細胞外ドメインを認識する抗体の髄腔内への投与を行い、疼痛関連行動と CHL1 の関連を検討する。

4. 研究成果

CHL1 は末梢神経損傷後に発現上昇する事を見いだした。この発現上昇は小型の DRG ニューロンを中心において起こり、脊髄後角へ輸送され、独特の染色パターンを脊髄後角 I-II 層で示す事を確認した。L-CAM は末梢神経損傷後にシナプスへ集積するが、CHL1 はシナプス外の神経終末部分に集積を認めた。

電子顕微鏡による CHL1 タンパクの陽性を特定した結果、CHL1 は軸索-軸索間、軸索-樹状突起間、軸索-グリア間に集積を認めた。CHL1 の細胞外ドメインに対する抗体を髄腔内投与して疼痛行動を検討した結果、CHL1 抗体投与は濃度依存的に SNI モデル動物における疼痛行動を抑制する事がわかった。

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 6 件)

- ①. Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. J. Comp. Neurol., 510, 188-206. 査読有

- ②. Katsura, H., Obata, K., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2008) Transforming growth factor-activated kinase 1 induced in spinal astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *Glia*, 56, 723-733. 査読有
- ③. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K. and Noguchi, K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J. Neurosci.*, 28, 2892-2902. 査読有
- ④. Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*, 131, 1241-1251. 査読有
- ⑤. Sakurai, J., Obata, K., Ozaki, N., Tokunaga, A., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Kondo, T., Miyoshi, K., Sugiura, Y., Matsumoto, T., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in sensory neurons after noxious gastric distention and its involvement in acute visceral pain in rats. *Gastroenterology*, 134, 1094-1103. 査読有
- ⑥. Cui, X.Y., Dai, Y., Wang, S.L., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Chen, J. and Noguchi, K. (2008) Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol. Pain*, 4, 17. 査読有
- [学会発表] (計 16 件)
- ①. 小林希実子, 山中博樹, 野口光一. 末梢神経損傷後に脊髄で増加するP2Y受容体. 第 47 回日本生物物理学会 2009.11.1, 徳島
- ②. Kobayashi K, Yamanaka, H., Okubo M, Dai Y, Noguchi K. Transient expression of TNF alpha in the rat spinal cord following peripheral nerve injury. The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) 2009.10.17-21, Chicago, U.S.A.
- ③. Okubo M, Yamanaka, H., Kobayashi K, Noguchi K. Platelet-activating factor biosynthesis in spinal cord contributes to neuropathic pain following peripheral nerve injury. The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) 2009.10.17-21, Chicago, U.S.A.
- ④. 樫本良亮, 山中博樹, 小林希実子, 大久保正道, 三村治, 野口光一. ラット坐骨神経障害モデルにおけるERMの発現とリン酸化. 第 32 回日本神経科学大会 2009.9.18, 名古屋
- ⑤. 大久保正道, 山中博樹, 小林希実子, 野口光一. 末梢神経損傷後に脊髄で合成が増加した血小板活性化因子は神経因性疼痛に関与する. 第 32 回日本神経科学大会 2009.9.18, 名古屋
- ⑥. 小林希実子, 山中博樹, 大久保正道, 野口光一. 末梢神経損傷後の脊髄後角マイクログリアで増加する P2 受容体. 第 32 回日本神経科学大会 2009.9.18, 名古屋
- ⑦. 大久保正道, 山中博樹, 小林希実子, 野口光一. 末梢神経損傷後に脊髄で増加したロイコトリエンは神経因性疼痛に関与する. 第 31 回日本疼痛学会 2009.7.17-18, 名古屋
- ⑧. 福岡哲男, 小林希実子, 山中博樹, 野口光一. 腰部交感神経節ニューロンにおける電位依存性ナトリウムチャネルの発現と軸索切断後の変化. 第 31 回日本疼痛学会 2009.7.17-18, 名古屋
- ⑨. 小林希実子, 山中博樹, 大久保正道, 野口光一. 末梢神経損傷後に脊髄マイクログリアで増加する P2Y 受容体. 第 31 回日本疼痛学会 2009.7.17-18, 名古屋
- ⑩. Yamanaka, H., Okubo, M., Kobayashi, K. and Noguchi, K. (2008) Induction of annexin A2 in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A.
- ⑪. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2008) Induction of P2Y receptor in the spinal cord following peripheral nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A.
- ⑫. Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2008) Laminae-specific distribution of Nav mRNAs in the rat spinal cord. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A.
- ⑬. Okubo, M., Yamanaka, H., Kobayashi, K.

and Noguchi, K. (2008) Upregulation of leukotriene synthesis in glial cells contributes to neuropathic pain following peripheral nerve injury. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington D.C., U.S.A.

- ⑭. 福岡哲男, 小林希実子, 山中博樹, 戴毅, 小畑浩一, 野口光一 (2008) 一次知覚ニューロンにおける電位依存性ナトリウムチャンネルサブタイプの発現比較. 第30回日本疼痛学会, 7.19-20, 福岡. (Pain Research, 23, 64, 2008)
- ⑮. 大久保正道, 山中博樹, 小林希実子, 野口光一 (2008) 皮膚と後根神経節におけるロイコトリエン合成酵素および受容体の発現. 第31回日本神経科学大会, 7.9-11, 東京. (Neurosci. Res., 61(Suppl. 1), S132, 2008.)
- ⑯. 大久保正道, 山中博樹, 野口光一 (2008) ラット後根神経節におけるロイコトリエン受容体の発現. 第57回(社)全日本鍼灸学会学術大会(京都大会), 5.30-6.1, 京都. (全日本鍼灸学会雑誌, 58, 400, 2008.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中博樹 (YAMANAKA HIROKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20340995