

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460729

研究課題名(和文)慢性疼痛発生維持を担う新規神経障害性疼痛関連分子の解析

研究課題名(英文) Analysis of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) as a novel neuropathic pain-related protein in spinal lamina III

研究代表者

片野 泰代 (KATANO, Tayo)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60469244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経損傷に伴う病的な痛み(アロディニア)が、GluN2Bの1472番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したマウス(Y1472F-KI)では抑制されることから、我々は本マウス脊髄後角を用いたプロテオミクス解析を行い、Brain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN)を同定した。

本課題内でBEGAIN抗体を作製し、局在が脊髄後角III層に限局していること、またノックアウトマウス作出し、アロディニアが抑制されることを確認した。これらの結果から、BEGAINは脊髄後角で病的な痛みの発症調節を担う分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Maintenance of neuropathic pain caused by peripheral nerve injury critically depends on the phosphorylation of GluN2B, a subunit of NMDA receptor, at Tyr1472 (Y1472). Here we took an advantage of comparative proteomic analysis between wild-type and knockin mice with a mutation of Y1472 to Phe of GluN2B (Y1472F-KI) to search for PSD proteins in the spinal dorsal horn that mediate signaling of neuropathic pain downstream of phosphorylated Y1472 GluN2B. We identified brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) as increased protein in wild-type, but not in Y1472F-KI mouse after peripheral nerve injury by proteomic analysis.

BEGAIN was localized in spinal lamina III. Moreover, neuropathic pain, but not physiological pain was significantly attenuated in the knockout mice of BEGAIN. These results indicate that BEGAIN was involved in pathological pain transmission through NMDAR activation following the phosphorylation of GluN2B at Y1472 in spinal lamina III.

研究分野：疼痛学、神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 BEGAIN プロテオミクス 脊髄後角 III層

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛では、起因となる末梢組織病変の治癒後も痛みが持続、あるいは増悪する。この機序について、これまでに申請者を含む多くの研究者によって受容体、キナーゼやアダプター蛋白質などの機能分子とカスケードが明らかにされている。しかしながら、現在報告される分子だけでは、観察される現象を矛盾なく説明できない。よって、慢性疼痛機序の解明には、既存のカスケード解析に留まらない関連分子と経路の探索が必要である。

脊髄後角は痛みなど一次求心性線維を介した感覚に特異的な領域であり、重要な部位である。これまでに申請者らは、脊髄後角に焦点を当てた解析から、神経障害性疼痛モデルマウスで、NMDA 受容体サブユニットの一つ GluN2B が疼痛の発生と維持に重要であり、その 1472 番目のチロシン (Y1472) リン酸化が神経障害性疼痛で亢進することを明らかにした (Abe *et al.*, *EJN*, 2005)。そして、Y1472 をフェニルアラニンに置換したノックイン (Y1472F-KI) マウス (Nakazawa *et al.*, *EMBO J*, 2007) では、神経障害性疼痛で生じる痛覚過敏やアロディニアが、野生型マウスに比べ有意に抑制されることを突き止め (Matsumura *et al.*, *EJN*, 2010, Katano *et al.*, *Neuropharmacology*, 2011)、GluN2B Y1472 のリン酸化を神経障害性疼痛の発生・維持に重要なシグナルであると証明した。この下流ではカルシウム流入に伴う CaMKII の活性化および CaMKII による AMPA 受容体サブユニット GluA1 の 831 番目のセリンのリン酸化亢進が生じることを報告した (Katano *et al.*, *Neuropharmacology*, 2011)。カルシウムの流入は GluN2B-NMDA 受容体だけではなく、GluA2 欠損型 AMPA 受容体や GluN2A-NMDA 受容体の活性化によっても生じることから、Y1472 GluN2B リン酸化の下流には細胞内カルシウム以外にも、リン酸化に依存して生じる複合体の構成変化などによる別のカスケードが存在すると予想した。そして Y1472F-KI マウスを使用し神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、プロテオミクス解析を実施、野生型神経障害性疼痛モデル群でのみ増加する 2 分子を同定した。これら野生型神経障害性疼痛で増加あるいは、減少する分子は、末梢神経障害によって増加する GluN2B のリン酸化に依存する疼痛関連分子であると考えられる。また PSD 画分から同定された分子であることから、シナプス伝達や可塑性に関与する可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究期間では、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角後シナプス肥厚部 (postsynaptic density; PSD) 画分のプロテオミクス解析によって得られた成果の発展として、本神経課題内では同定した 2 分子の一つである Brain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN) の神経障害性疼痛における役割を明らかにし、慢性疼痛機序の解明を目指した。神経障害性疼痛を含む慢性疼痛疾患では末梢組織、脊髄後角、脳といった疼痛の伝達経路におけるシナプス可塑性が生じていると考えられる。これまでに我々は脊髄後角での変化に注目し解析をおこなってきており、神経障害性疼痛に関与する分子の発現量の増加及び活性の亢進が、脊髄後角で特異的に生じることを明らかにしてきている。そのことから、BEGAIN は脊髄における疼痛の伝達あるいは、その調節に関与する可能性が高い。しかしながら BEGAIN の分子機構、および *in vivo* における疼痛への関与を示す報告はなく、疼痛における BEGAIN の解析は世界で初めてのものである。

今回我々は *in vivo* における BEGAIN の疼痛への関与を神経障害性疼痛モデルを用いて明らかにするために、BEGAIN のノックアウト (KO) マウスを作成し解析を行う。さらに既知の神経障害性疼痛への関与が報告される分子との機能的相互作用を含む解析から、痛みの慢性化機序の解明を目指し、これまでの成果を発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) BEGAIN-KO マウスの作出

BEGAIN は脳に多く発現することが知られているが、発生における影響などの情報は全く無く、KO マウスが耐性致死となるかどうかもわからない。よって、C57B6/N の ES 細胞株である RENKA を用いて BEGAIN の flox マウスを作成し、Cre recombinase を発現するドライバーマウスとの交配により KO マウスを作成した (図 1)。

(2) 抗 BEGAIN 抗体の作製

市販の抗 BEGAIN 抗体では、BEGAIN-KO マウスを陰性対照として検証すると Western blot では使用可能であるが、免疫染色では、野生型と BEGAIN-KO の間でシグナル強度に差が認められなかった。よって、本解析では BEGAIN の抗体を複数の抗原部位にて作製し、もっとも特異性の高い抗体をスクリーニングした。

複数の抗体は、BEGAIN-KO マウスを使用した Western blot および免疫染色の両方で検証した。いずれの抗体でも、Western blot において BEGAIN のバンドを検出したが、免疫染色で使用できたのは、C 末端 17 ペプチドによる抗体(C17)のみであり、C17 では Western blot で検出される非特異的なバンドも殆ど検出されなかった。

(3) SNI モデルマウスの作製と行動解析

神経障害性疼痛モデルには、Woolf らのグループによって 2000 年に報告された SNI(spared nerve injury)モデルを改変したもので、総腓骨神経と脛骨神経を完全に結紮し、遠位側の切断は伴わないものとした。SNI モデルでは熱刺激に対する疼痛閾値の変化が認められないことから、SNI モデル作製後は、機械的刺激のみを評価した。結紮一日目から 42 日目まで、機械的刺激に対する疼痛閾値を評価し、野生型マウスで認められる機械的アロディニアの発症を解析した。無処置群では熱および機械的刺激の両方に対する反応性を評価し、生理的な痛みに対する閾値についても評価した。

(4) BEGAIN の局在解析

BEGAIN の組織および細胞内局在は、本解析内で作製した抗 BEGAIN 抗体を用いておこなった。Western blot では脊髄前および後角の組織破砕液、および細胞内分画試料を用いて実施した。シナプス画分のマーカーとして抗 GluN2B および抗 PSD-95 抗体を使用した。

免疫染色は、腰部脊髄を用いて実施した。組織はペントバルビタール麻酔下にて灌流固定後、凍結切片を作製した。凍結切片は染色前に、クエン酸緩衝液を用いた抗原賦活化処理を行った。BEGAIN の局在は本研究内で作製した抗 BEGAIN 抗体(C17)を使用した。また、脊髄後角における局在解析には、脊髄後角の層マーカーである IB4-FITC と抗 PKC 抗体を使用した。二次抗体による蛍光標識後、共焦点レーザー顕微鏡にて撮影した。

4. 研究成果

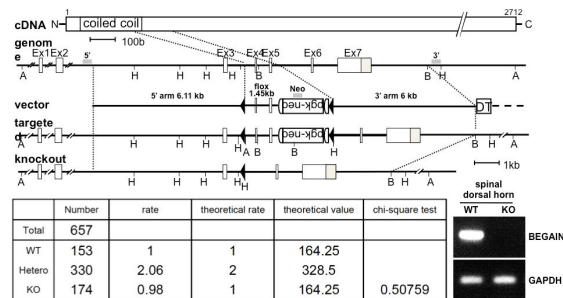
(1) BEGAIN-KO マウスの作出

BEGAIN flox マウスは、発生初期に Cre recombinase を発現するドライバーマウス、TLCN-Cre マウスとの交配によりヘテロ KO マウスを作出した。その後、野生型マウスとの戻し交配により Cre 遺伝子を除去したヘテロ KO マウスを兄妹交配し、KO マウス(null マウス)を作出した。兄妹交配によって得られ

た仔はメンデル比 1:2:1 を示した(図 1)。

BEGAIN-KO マウスの作出は世界で初めてのものである。BEGAIN の分子機能は未だ明らかにされてはいないが、2015 年にメチル化される分子であることが報告されるなど、今後広く多くの研究者にとって重要なツールになることが期待できる。

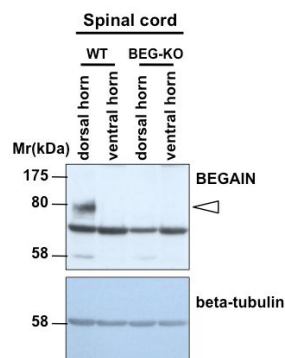
図 1. BEGAIN-KO マウスの作出



(2) BEGAIN は脊髄後角にのみ発現する

BEGAIN は脳に多く認められる分子として同定されているが、同じ中枢神経である脊髄での報告はない。今回我々は、疼痛の関連分子を探索する目的とし、体性感覚の重要な中継地点である脊髄後角を解析対象とし、BEGAIN を同定した。

図 2. BEGAIN は脊髄後角に発現する



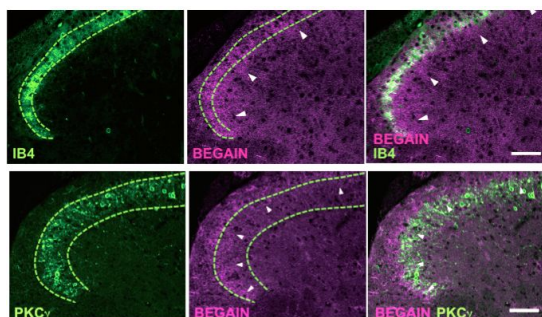
他方、脊髄前角は運動神経の細胞体が存在している。BEGAIN の脊髄における発現を明らかにするために、前角後角を別々に回収し、Western blot を行った。その結果、BEGAIN は脊髄後角にのみ発現することがわかった(図 2)。

さらに、細胞内分画後 Western blot を行うと、BEGAIN は GluN2B および PSD-95 と同じように、シナプス画分に濃縮して存在することがわかった。

(3) BEGAIN は脊髄 III 層に特異的に発現する脊髄後角は I-VI の層構造を持っており、I-II 層の浅い層(後角側)には、主に侵害刺激が入力することが知られており、痛みの伝達に重要な領域である。そして、BEGAIN は脊髄後角の浅い層に限局して層状に局在しており、その発現エリアは主に後角側の III 層のマーカー蛋白である IB4 と大部分で重なる

事がわかった。また、BEGAINはIB4陽性エリアよりもより深い層でも発現が認められており、その発現は前角側のIII層のマーカ蛋白であるPKCとも共同在することがわかった(図3)。

図3. BEGAINは脊髄後角III層に発現する

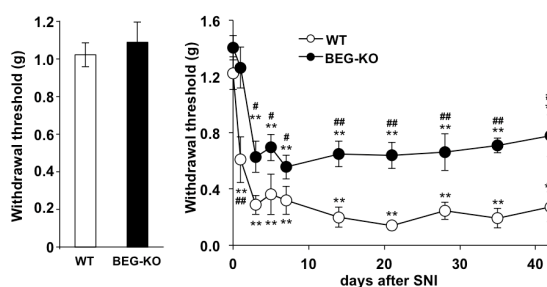


(4) 機械的アロディニアの評価

作出したBEGAIN-KOおよび野生型マウスでSNIモデルを作製し、術後の機械的アロディニアを経時的に評価した。野生型では、術後一日で疼痛閾値が有意に低下し、その低下は3日ではほぼ安定し、42日後まで維持された。他方BEGAIN-KOマウスではSNI後3日目で有意な閾値低下が認められ、わずかに上昇しながら野生型同様に42日目まで維持された。しかしながら、BEGAIN-KOでは野生型マウスに比べその疼痛閾値は有意に抑制されていた(図4)。

その一方で無処置マウスでは、熱および機械的刺激の両方で、野生型とBEGAIN-KOマウスの間で刺激閾値に有意差はなく、BEGAINの疼痛への関与はアロディニアなど病態依存的なもののみであることがわかった(図4)。

図4. アロディニアはBEGAIN-KOで抑制



アロディニアは触覚を痛覚と認識する異常感覚であり、BEGAINはその異常感覚にのみ関与することを示唆している。またPKC陽性領域には侵害刺激以外の触覚刺激も入力することが知られている。これは、前角側のIII層発現するBEGAINがアロディニア特異的に作用する可能性を示している。

本申請課題で得られた成果から、プロテオミクス解析によって同定したBEGAINが新規の神経障害性疼痛の関連分子であることが明らかになった。今後さらなる分子機能の解析によって、慢性疼痛における可塑的变化の機序解明が期待できる。

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3件)

Nguyen, H. T., Katano, T., Matsumura, S., Pham M. V., Muratani, T., Minami, T. and Ito, S., Role of c-Jun N-terminal kinase in late nerve regeneration monitored by in vivo imaging of thyl- yellow fluorescent protein transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.*, 43, 548-560, 2016., 10.1111/ejn.13139 (査読有)

片野泰代, 伊藤誠二 脊髄に起因する痛み~脊髄の構造と慢性化をおこす中枢性感作~ Chronic pain is induced by central sensitization in spinal dorsal horn. *Practice of Pain Management*, 第18号, (Vol.6, No.1), 22-25, 2015. (査読無)

Unezaki, S., Katano, T., Hiyama, T.Y., Nguyen, H. T., Yoshii, S., Noda, M., and Ito, S. Involvement of Na_v sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. *Eur. J. Neurosci.* 39, 720-729, 2014., 10.1111/ejn.12436 (査読有)

[学会発表](計3件)

片野泰代, 福田正史, 山崎真耶, 阿部学, 渡辺雅彦, 古江秀昌, 矢尾育子, 西田和彦, 奥村宣明, 中澤敬信, 山本雅, 崎村健司, 高尾敏文, 伊藤誠二 脊髄後角における新規慢性疼痛関連分子の同定 2015年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 冬のシンポジウム 2015/12/18 一橋大学一橋講堂 (東京・千代田区)

Katano, T., Watanabe, M., Yamazaki, M., Abe, M., Yao, I., Sakimura, K. and Ito, S. Localization of neuropathic pain-related protein, BEGAIN in the spinal dorsal horn. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2015/10/17-21, Chicago, U.S.A.

Katano, T., Yao, I., Yamazaki, M., Abe, M., Fukuda, M., Okumura, N., Takao, T., Sakimura, K. and Ito, S. Involvement of neuropathic pain-related protein-B (NPRP-B), a novel functional molecule, in inflammatory and

neuropathic pain in vivo. The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience 2013/11/9-13, San Diego, U.S.A.

〔図書〕(計1件)

Katano T., Ito, S. Chapter 5: Multifunctional roles of nitric oxide (NO) in neurons. *Studies on pediatric disorders*. Human Press, Springer, 71-84頁 (全494頁), 2014.

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野 泰代 (KATANO, Tayo)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：60469244

(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

()

研究者番号：