

令和元年6月14日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09001

研究課題名(和文) 中枢性感作における脊髄疼痛伝達回路での神経障害性疼痛関連分子BEGAINの役割

研究課題名(英文) Role of BEGAIN for central sensitization in the spinal dorsal horn

研究代表者

片野 泰代 (KATANO, Tayo)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60469244

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)：本研究では、神経障害性疼痛関連分子として同定したbrain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN)の分子機能、細胞内局在、および発現細胞について脊髄後角で解析をおこなった。

その結果、BEGAINは脊髄後角でシナプスに局在し、NMDA受容体への機能調節を介して慢性疼痛病態の異常感なくであるアロディニアの発症に関与することが示された。さらにBEGAIN蛋白の発現領域が脊髄後角のIii-Illlo層に局限しているのに対し、BEGAINのmRNAの発現は広く前角にも及び、ほぼ全てのニューロンに認められること示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、機能が不明であったBEGAINという蛋白質を、慢性疼痛の発症維持に関与する分子として、詳細な分子機序について解析をおこなった。そしてBEGAINは、脊髄のニューロンにおいてシナプスに局在し、NMDA受容体との機能的相互作用を介し、疼痛病態での異常感覚の発生に関与することを明らかにした。慢性疼痛に関わるタンパク質の同定と機能解析は、将来の創薬につながる可能性があることから、BEGAINの研究成果と今後のより詳細なBEGAINの分子基盤における成果は、疼痛発症機序の解明という学術的意義だけでなく、慢性疼痛患者を対照とした創薬研究の創出という社会的意義も大きいものである。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular function of brain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN) in the spinal dorsal horn, we performed electrophysiological recording of NMDA receptor, immunohistochemistry for BEGAIN and synaptic marker proteins, PSD-95 and synaptophysin, and in situ hybridization for BEGAIN in the spinal cord. In these analyses, we identified the relationship between BEGAIN and NMDA receptor as a delay of time to peak of EPSC in SG neurons of BEGAIN knockout mouse and the synaptic localization of BEGAIN in the spinal laminae Iii-Illlo. These results and previous results by us indicate that BEGAIN is involved in the mechanical allodynia in neuropathic pain concerned with the action of NMDA receptor. Furthermore, broad distribution of BEGAIN-positive neurons in not only spinal dorsal horn but also spinal ventral horn was demonstrated by in situ hybridization.

研究分野：神経科学 疼痛学

キーワード：慢性疼痛 脊髄後角 BEGAIN NMDA受容体 神経障害性疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛では、中枢性感作と呼ばれる神経の可塑的变化が起こることから、感受性が亢進し、痛覚過敏や触覚を強い痛みと感じるアロディニアなどの「異常」な感覚が長期間持続する。

これまでに我々は、中枢性感作に関与する後シナプスのタンパク質群に着目し、NMDA 受容体サブユニット GluN2B の Y1472 のリン酸化が神経障害性疼痛に関与すること、同部位をフェニルアラニンに置換した Y1472F ノックイン(KI)マウスではアロディニアが有意に抑制することを明らかにした。そして Y1472F-KI マウスを用いたプロテオミクス解析で、野生型マウスの神経障害性疼痛(Spared Nerve Injury, SNI)モデル群でのみ増加する分子 brain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN)と CASK interacting protein 1(Caskin1)を見いだした。

2. 研究の目的

痛覚過敏やアロディニアなどの異常感覚の発症機序に、BEGAIN および Caskin1 がどのように関与するのかを明らかにするために、これら 2 分子のノックアウト(KO)マウスを作成し、BEGAIN-KO マウスでは生理的疼痛の伝達には影響を与えず、神経障害性疼痛の発症を有意に抑制することを明らかにしている。

よって本申請課題では、BEGAIN の (1) NMDA 受容体との機能的相互作用、(2) シナプス局在、および (3) 脊髄後角での BEGAIN 陽性細胞を明らかにすることで、生理的疼痛とは異なる異常感覚発症時の脊髄神経回路での BEGAIN の分子基盤を明らかにすることをめざす。これらの解析から、近年注目される脊髄内疼痛回路における BEGAIN の疼痛関連分子としての位置づけを明らかにし、脊髄後角での異常感覚の発症機構の解明を目指す。

他方、Caskin1 の *in vivo* における機能について明らかにするために Caskin1 の発現部位と、Caskin1-KO マウスを用いた網羅的行動解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄の電気生理学的解析

野生型および BEGAIN-KO マウスを用いて神経障害性疼痛モデルマウスを作成する。神経障害性疼痛モデルは、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する。同マウスより速やかに脊髄を摘出、ピプラトームにより 500 μ m の横断切片を作成、後角 II 層の SG ニューロンから、ブラインドパッチ法にて NMDA 受容体の EPSC を測定する。野生型および BEGAIN-KO マウス間での EPSC の差異について解析を行う。

(2) BEGAIN の免疫染色による定量とシナプス局在の解析

野生型および BEGAIN-KO マウスを麻酔下にて 4% PFA にて灌流固定後、凍結横断切片を作成する。切片は、抗 BEGAIN、抗 PSD-95 (後シナプスマーカー) および抗 synaptophysin (前シナプスマーカー) 抗体を用いて免疫染色を実施、共焦点レーザー顕微鏡にて撮影をおこなった。可視化したシグナルは Manders' overlap coefficient を用いた解析を実施し、BEGAIN のシナプスマーカーとの共同在を定量的に解析する。

(3) BEGAIN mRNA に対する *in situ* hybridization 法による BEGAIN 陽性細胞の同定

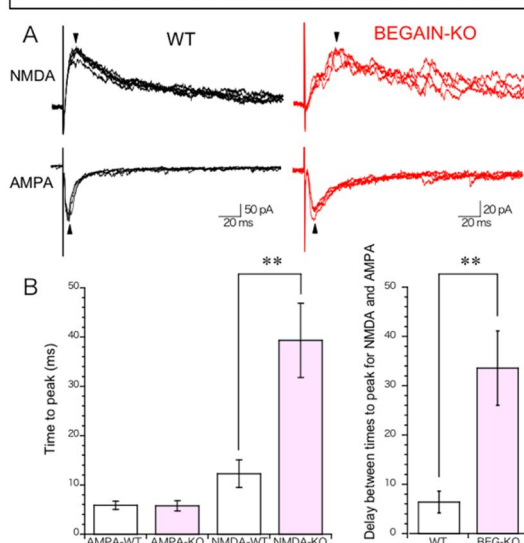
野生型マウス脊髄の横断切片を用いて、BEGAIN の *in situ* hybridization を実施する。BEGAIN の mRNA の検出は、BEGAIN の翻訳領域の全長を鋳型とした RNA プロープを使用し実施する。陰性対象として、Sense プロープおよび、BEGAIN-KO マウスを使用する。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛モデルマウス脊髄の電気生理学的解析

野生型および BEGAIN-KO マウスの神経障害性疼痛(SNI)モデルで、NMDA 受容体の EPSC を脊髄後角 SG ニューロンから測定した。BEGAIN-KO の SNI モデルマウスでは、機械的アロディニアが野生型マウスに比べ、有意に抑制されている。そのことから、BEGAIN-KO マウスにおける SNI モデルでの NMDA 受容体の Amplitude は、減弱しているのではと予想した。しかしながら、NMDA 受容体の EPSC は、frequency および Amplitude のいずれにも差異を認めなかった。一方、NMDA 受容体 EPSC の time to peak が BEGAIN-KO マウスでは有意に遅延することがわかった (図 1) 他方、AMPA 受容体の EPSC には影響を

図 1 BEGAINはNMDA受容体機能に関与する

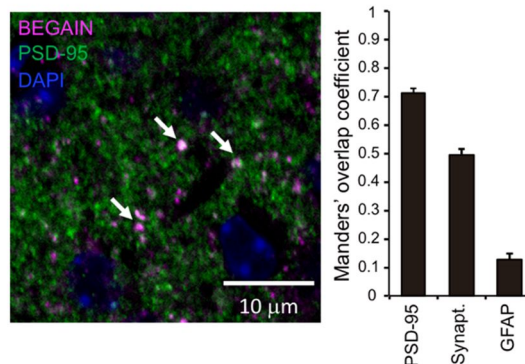


及ぼさなかった。

(2) BEGAIN のシナプス局在の解析

脊髄の Iii-IIIo 層で検出される BEGAIN の局在を詳細に調べるために、シナプスのマーカー蛋白との多重免疫染色を実施した。そして、脊髄後角から検出した BEGAIN、PSD-95 および synaptophysin (Synapt.) のシグナルを Manders' overlap coefficient 解析をおこなった。およそ 70% の BEGAIN が PSD-95 と、およそ 50% が Synapt. と共局在することがわかった。他方、グリア細胞のマーカーである GFAP とは殆ど共局在しなかった。これらの結果から、BEGAIN はニューロンに存在し、且つシナプスで発現するタンパク質分子であることが示された(図2)。

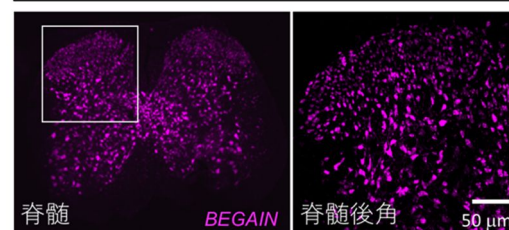
図2 BEGAINはシナプスに局在する



(3) BEGAIN 陽性細胞の同定

これまでに、免疫染色によって明らかにした BEGAIN の脊髄での局在は、脊髄後角の Iii-IIIo 層に限局していることから、BEGAIN 陽性細胞は脊髄の介在ニューロンに特異的に発現すると考えた。他方、BEGAIN は免疫染色でも細胞内分画を行った western blotting の結果でもシナプスに局在することを示しており、脊髄後角においても神経の細胞体を免疫染色で可視化することはできない。よって、BEGAIN 陽性細胞を同定するために、BEGAIN の mRNA に対する *in situ* hybridization を実施した。その結果、BEGAIN の mRNA は脊髄の後角の特定層だけではなく、前角にも広く均一に発現していることがわかった(図3)。これらの結果から、BEGAIN は細胞特異的に翻訳調節が行われている可能性が示された。

図3 BEGAIN陽性細胞は脊髄全体に存在する



これまでの結果と、本申請課題内の1と2の成果から、BEGAIN が脊髄後角 Iii-IIIo 層の後シナプスにおいて NMDA 受容体を含む複合体機能に関与し、神経障害性疼痛を生じるものと結論づけた。そして、BEGAIN が新規の神経障害性疼痛関連分子であるとし論文発表をおこなった (*eNeuro*, 2016)。さらに、BEGAIN を同定したプロテオミクス解析にて、BEGAIN 同様神経障害性疼痛モデル群で有意に増加する分子として同定していた Caskin1 が侵害刺激の感受性および、不安様行動に関与することも明らかにし、論文発表をおこなった (*Mol. Brain*, 2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Katano, T., Takao, K., Abe, M., Yamazaki, M., Watanabe, M., Miyakawa, T., Sakimura, K., Ito, S. Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. *Mol. Brain* 査読有 11 (1):63, 2018. DOI: 10.1186/s13041-018-0407-2.

片野泰代 プロテオミクス解析による脊髄後角後シナプス肥厚部からの新規神経障害性疼痛関連分子の同定 *生化学* 査読有 90 (6), 810-814, 2018. DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900810

Katano, T., Fukuda, M., Furue, H., Yamazaki, M., Abe, M., Watanabe, M., Nishida, K., Yao, I., Hata, Y., Okumura, N., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Sakimura, K., Takao, Y. and Ito, S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro* 査読有 3, e0110-16 (1-18), 2016. DOI:10.1523/ENEURO.0110-16.2016.

〔学会発表〕(計6件)

Katano, T., Takao, K., Abe, M., Yamazaki, M., Watanabe, M., Miyakawa, T., Sakimura, K. and Ito, S. Protein Distribution and functional characterization of CASK-interacting protein 1 (Caskin1) in mice. 48th annual meeting of the Society for Neuroscience, San

Diego, CA, USA, November 3-7, 2018.

片野泰代、高雄啓三、阿部学、山崎真弥、渡辺雅彦、宮川剛、崎村建司、伊藤誠二 CASK-interacting protein 1 (Caskin1)の中樞神経系における機能的特徴の解析第 41 回日本神経科学大会、兵庫（神戸ポートアイランド）2018 年 7 月 26-29 日

Katano, T., Fukuda, M., Yamazaki, M., Abe, M., Watanabe, M., Yao, I., Okumura, N., Nakazawa, T. Yamamoto, T., Sakimura, K., Takao, T. and Ito, S. Identification of novel neuropathic pain-related proteins. BRI The 8th International Symposium, Niigata, February 11-12, 2018.

Katano, T. and Ito, S. Search of BEGAIN binding protein in the brain. 47th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November 11-15, 2017.

片野泰代、福田正史、山崎真弥、阿部学、渡辺雅彦、矢尾育子、奥村宣明、中澤敬信、山本雅、崎村建司、高尾敏文、伊藤誠二 脊髄後角における神経障害性疼痛関連分子 BEGAIN の同定 第 40 回日本神経科学大会、千葉（幕張メッセ）2017 年 7 月 20-23 日

片野泰代、渡辺雅彦、崎村建司、伊藤誠二 海馬におけるマウス BEGAIN の生化学的解析 第 89 回日本生化学会大会、仙台（仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス）2016 年 9 月 25-27 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 誠二

ローマ字氏名：(ITO, Seiji)

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：その他部局等

職名：客員教授

研究者番号（8桁）：80201325

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：西田 和彦

ローマ字氏名：(NISHIDA, Kazuhiko)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：80448026

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。