

平成21年 6月5日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19603018
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛に関わる脊髄後角神経回路の神経可塑性発現機構における一酸化窒素の役割
 研究課題名（英文） A role of the nitric oxide in the plasticity expression mechanism of the spinal neural circuit which maintains a neuropathic pain.
 研究代表者
 松村 伸治（MATSUMURA, SHINJI）
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70276393

研究成果の概要： 神経因性疼痛時脊髄後角神経回路において、脊髄後角のシナプス終末に存在するプロスタグランジン E₂の受容体の一つである EP1 受容体活性化に伴うグルタミン酸遊離により NMDA 受容体が Fyn を介したチロシンのリン酸化により活性化され、神経型一酸化窒素（NO）合成酵素の細胞膜へ移動を伴う酵素活性の増大により NO 産生が上昇し、その産生の維持には PKA と PKC の活性化が協同して行われていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛

キーワード：神経因性疼痛、脊髄、神経可塑性、一酸化窒素、グルタミン酸、NMDA 受容体、イメージング、マウス

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は神経を含む組織損傷後、傷そのものが治癒後も長期にわたり持続する激痛とされ、多くの症例では一旦確立されてしまった疼痛は様々な治療に対し抵抗性である。神経因性疼痛は非常に多くの生体因子が関与し、DNA マイクロアレイ等を用いた網羅的な研究が試みられているが、発生機序まで深く掘り下げることができていない。申請者らは、その発生機序に大きな役割を担うと考えられる脊髄後角での神経可塑性を伴う感覚情報伝達系の機能異常に焦点を当て、研究を遂行してきた。一次求心性線維の

神経細胞は後根神経節（DRG）に存在し、痛覚は小型の神経細胞に由来する無髄のC線維を介して脊髄後角浅層（I-II層）に伝えられる。一方、触覚は中型と大型神経細胞由来の有髄の太いAβ線維を介して脊髄後角の深層（III-V層）に伝達される。炎症や組織損傷に伴う慢性痛は熱などの侵害性刺激に対する感受性が亢進する痛覚過敏反応と触覚刺激などの非侵害性刺激により誘発される痛覚（アロディニア）を引き起こす。生理的な条件下で触覚刺激がAβ線維を介することから、アロディニアはAβ線維を介すると考えられ、Aβ線維の神経回路網の再構築がアロディニ

アの発生機構と提唱されてきた。新生児期にカプサイシン処置をしたマウスでは特異的にC線維が除去されPGE₂のアロディニアが起こらなくなるのに対し、PGF_{2α}のアロディニアは影響されなかった。さらに、前者はモルヒネで抑制されたことから、申請者らはアロディニアの発症にはカプサイシン感受性のC線維と非感受性のAβ線維2つの経路が存在する全く新しい考えを示した。さらに、神経因性疼痛モデルとしてL5脊髄神経切断モデルを確立し、脊髄後角浅層における一酸化窒素(NO)産生の増加が、なかでも神経型NO合成酵素(nNOS)活性化による増加が、神経因性疼痛の維持に重要であることを明らかにした。神経損傷という器質的変化に因る神経因性疼痛がNO産生という機能的変化により維持されており、鎮痛薬によりその産生は可逆的変化を示すという興味ある結果を得た。この神経因性疼痛におけるnNOSの活性化とMyristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)のリン酸化は関連しており、RhoキナーゼがMARCKSのSer159を特異的にリン酸化していることがわかった。MARCKSは脳から抽出されたPKCの主な基質で、この基質のリン酸化がアクチンの動態に関与し、細胞骨格の再構築により、シナプスにおいて受容体やタンパク質などの移動や神経伝達物質の遊離に影響をおよぼしていることが知られている。また、神経因性疼痛とNMDA受容体サブユニットのNR2BのTry1472におけるリン酸化がNR2B選択的アンタゴニストCP-101,606により減弱すること、Srcファミリーチロシンキナーゼの1つであるFynキナーゼのノックアウトマウスでは神経因性疼痛及びNR2Bリン酸化が出現しないこと、NR2Bリン酸化とnNOS活性が神経因性疼痛によって増大することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究ではまず神経因性疼痛のex vivoモデルの作製を試みた。摘出脊髄標本を用い、ex vivoの神経因性疼痛モデルとして成り立つかを検討した。NADPH diaphorase活性による酵素組織学適方法によるnNOS活性測定だけでなく、リアルタイムNOイメージング法により、実際に産生されるNOについても摘出脊髄全載標本で記録した。そのNOを指標として、申請者らが行動薬理実験で神経因性疼痛に関連する事を明らかにした各種オピオイド、グルタミン酸アナログの神経可塑性に対する効果を細胞および神経回路レベルで検討した。さらに、NMDA受容体へのnNOSの移動による物理学的な調節の神経因性疼痛への関与の解析を試みた。グルタミン酸受容体やそのリン酸化等の修飾によるシナプス下における可塑性の分子機構を検討した。

3. 研究の方法

神経因性疼痛は、感覚情報伝達系の機能異常による神経可塑性の発現が、その発生機序の一つとされている。その可塑性は、近年、海馬の長期増強(LTP)などの可塑的変化との共通性が明らかになってきた。海馬では、NOはLTP誘導に関与し、NMDA受容体活性化に伴いNOの合成が始まる。NOは逆行性伝達物質でシナプス前細胞の伝達物質放出量調節を行う。NOはガスゆえ合成後直ちに細胞膜を通過し周囲の細胞に到達し、他の分子とすぐに結合して消滅するために寿命が数秒程度の短時間で標的に選択的な伝達物質として働いている。脊髄後角で一次感覚入力の興奮性神経伝達物質はグルタミン酸であり、神経因性疼痛におけるシナプスの可塑性に重要な役割を担う。我々はその下流のnNOSによるNO産生が神経因性疼痛の維持に関与していることを明らかにしてきた。野生型マウスや、各種欠損マウスを用いて、L5脊髄神経切断モデルを作製し寿命の短いNOそのものはリアルタイムNOイメージングで追跡し、nNOS活性をNADPH diaphorase活性のニトロブルーの発色で酵素組織化学的に観察し解析を行い、我々が明らかにしてきた各種神経因性疼痛誘発因子や鎮痛薬がNO産生や合成酵素の活性化とどのような関係があるか調べた。

4. 研究成果

(1) ex vivo標本を用いたnNOS活性に関するシグナル経路の検討

幼若マウスから脊髄を丸ごと取り出した摘出脊髄標本を用いex vivo標本を作製した

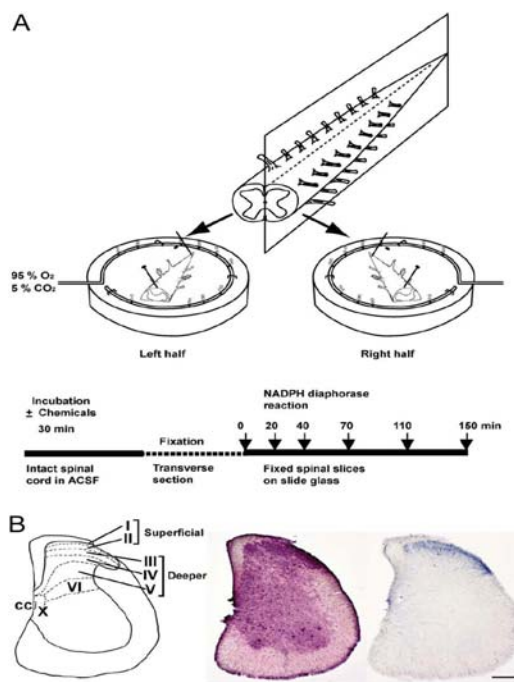


図 1

(図1)。マウス摘出脊髄標本を用いるメリットとしては①既知濃度の薬物を適用することにより薬物の有効濃度を知ることができる。②脊髄内の神経回路がほとんど無傷のまま保たれる。③スライス標本に比べ、組織標本化したときに良い状態の標本が得られる。④脊髄を正中線に沿って半裁した半裁標本を用いることにより薬物処理した標本とコントロールが1個体から得ることができ個体間による誤差を極力抑えることが可能。⑤幼若マウスは脊髄サイズが小さく髄鞘形成が不十分のため外液からの酸素摂取が容易であり長時間の *in vitro* 実験に適している。などが挙げられる。

この標本に NMDA を投与し、nNOS 活性を NADPH diaphorase 活性のニトロブルーの発色で酵素組織化学的に観察したところ、酵素組織学の反応の特徴である経時的に染色濃度が濃くなり (図2A)、NMDA の濃度に依存して nNOS の酵素活性が増大する (図2B)。これはスライス標本で DAF-FM による NO 産生のリアルタイムイメージングの結果 (図3) と一致した。

ノシセプチン (N/OFQ) は神経因性疼痛維

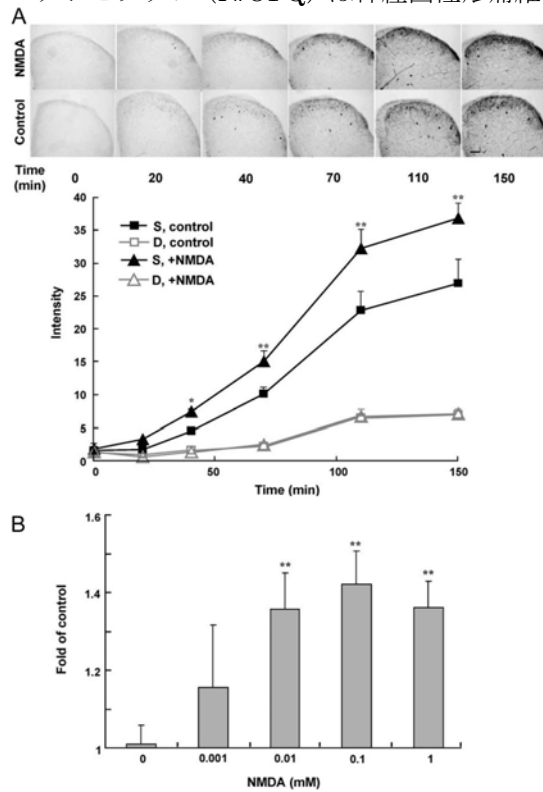


図2

持に関するペプチドとして我々の研究グループが同定したペプチドである。ノシセプチンが nNOS 活性にどのように関与するか調べた。ノシセプチンによる nNOS 活性の増大に NMDA 受容体のどのタイプが関与しているかを調べるために NR2A^{-/-}, NR2D^{-/-} および NR2A/D^{-/-} ノックアウトマウスを用いて調べたところ、NR2A^{-/-}, NR2A/D^{-/-} マウスでノシ

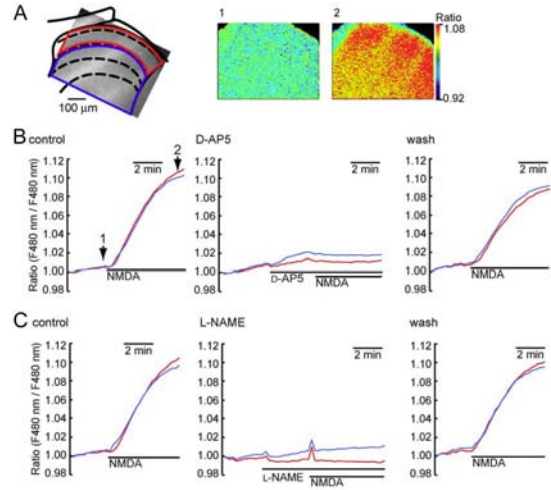


図3

セプチンによる nNOS 活性増大作用が消失した (図4)。

さらにシグナル経路を追跡するために、PKC

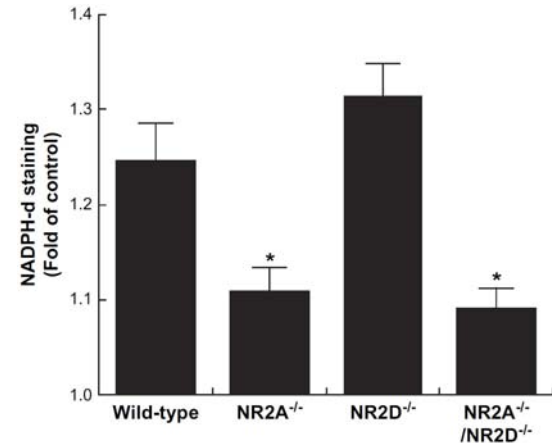


図4

阻害薬 (calphostin C および Ro 31-8220)、PKA 阻害薬 (H-89)、CaMKII 阻害薬 (KN-62)、Src 阻害薬 (PP2) を用いてノシセプチンの nNOS 活性増大作用に対する効果を調べたところ (図5)、ノシセプチンの効果は、PKC, CaMKII, src を含むシグナル

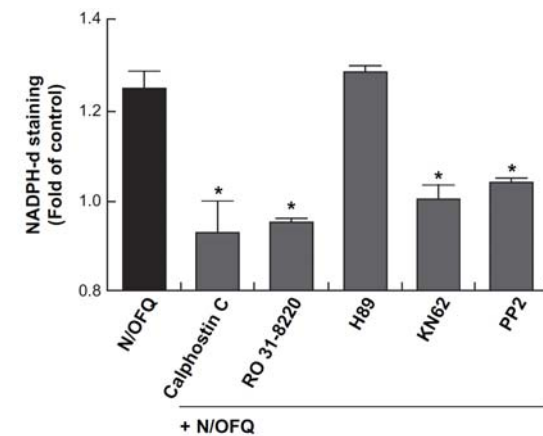


図5

経路を介していることが明らかとなった。

また、NMDA 受容体を介する nNOS の活

性化により産生された NO が逆行性メッセンジャーとして作用していることを明らかにし、モデル (図 6) を提唱した。

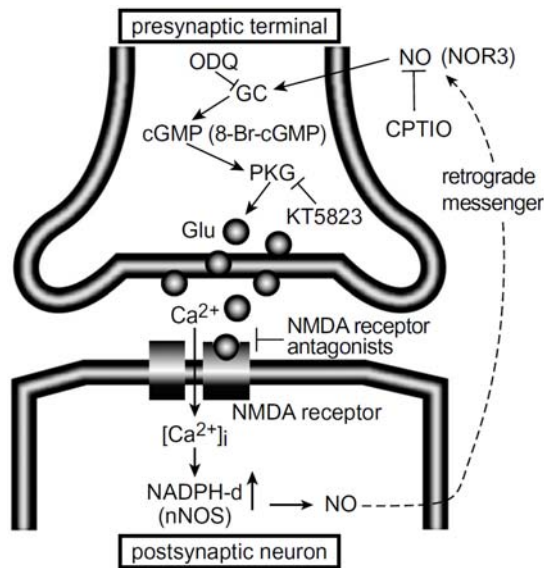


図 6

(2) 細胞内トランスロケーションによる一酸化窒素合成酵素の活性化

NOS は 3 種類のアイソフォームが知られており、いずれもオキシゲナーゼドメインと還元酵素ドメインの 2 つからなる。興味深いことに nNOS ではタンパク間相互作用に関与する PDZ ドメインを持っている。一方、グルタミン酸受容体の一つ NR2B には PDZ 結合部位が存在し、nNOS との相互作用が予想された。そこで、nNOS の持つ PDZ ドメインに着目し、PDZ ドメインに蛍光タンパクをつけたタンパクを培養細胞に発現させると、通常細胞質内に分布しているが、nNOS 蛍光タンパクは NMDA と PACAP の共刺激で細胞膜に移動し、以前に抗 nNOS 抗体で確認した細胞膜への移動が再現できた。このモデルを用い、PACAP の下流のシグナルを検討したところ、NMDA と PACAP の同時投与

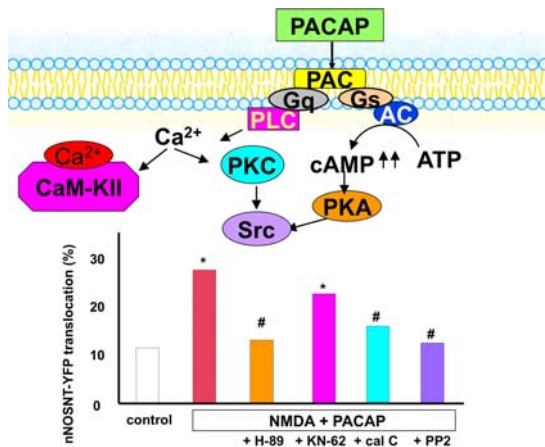


図 7

により細胞膜へと移動が観察される細胞の

割合が増大したが、その移動は PKA, PKC, Src の阻害薬で抑制された (図 7)。PKA の作用はアデニレート・シクラーゼの活性化物質フォルスコリン、PKC の活性化分子 PMA で置換することができ、nNOS のトランスロッキングには PKC と PKA が必要であることを示した。また、PACAP の作用は VIP で置換できないので PACAP は PAC1 を介していることが示唆された。

トランスロケーションは NMDA 受容体拮抗薬の MK-801 や D-APV で抑制された。このことは、nNOS の細胞膜へのトランスロケーションが NMDA 受容体の活性化に伴う NO 産生に関与することを示唆している。

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 30 件)

1. Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., Mabuchi, T., Katano, T., Ohnishi, T., Matsumura, S., Ohnaka, M., Kaneko, S., Abe, T., Hirata, T., Fujiwara, S., Minami, T. and Ito, S. Involvement of stem cell factor and its receptor tyrosine kinase c-kit in pain regulation. *Neuroscience* 153, 1278-1288, 2008. 査読有
2. Ohnishi, T., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, S., Katano, T., Nishizawa, M. and Ito, S. Characterization of signaling pathway for the translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by PACAP. *J. Neurochem.* 105, 2271-2285, 2008. 査読有
3. Matsui, K., Nishizawa, M., Ozaki, T., Kimura, T., Hashimoto, I., Yamada, M., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Ito, S. and Okumura, T. Natural Antisense Transcript Stabilizes Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA in Rat Hepatocytes. *Hepatology* 47, 686-697, 2008. 査読有
4. Watanabe, K., Ito, S. and Yamamoto, S. Studies on membrane-associated prostaglandin E synthase-2 with reference to production of 12L-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT). *Biochem Biophys Res Commun.* 367, 782-786, 2008. 査読有
5. Moriuchi, H., Koda, N., Okuda-Ashitaka, E., Daiyasu, H., Ogasawara, K., Toh, H., Ito, S., David F. Woodward and Watanabe, K. Molecular Characterization of a Novel Type of Prostamide/Prostaglandin F Synthase, Belonging to the Thioredoxin-like Superfamily. *J. Biol. Chem.* 283, 792-801,

2008. 査読有
6. Habara, K., Hamada, Y., Yamada, M., Tokuhara, K., Tanaka, H., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S. and Okumura, T. Pitavastatin up-regulates the induction of iNOS through enhanced stabilization of its mRNA in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* 18 , 19-27, 2008. 査読有
 7. Tokuhara, K., Hamada, Y., Tanaka, H., Yamada, M., Ozaki, T., Matsui, K., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S. and Okumura, T. Rebamipide, anti-gastric ulcer drug, up-regulates the induction of iNOS in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* 18 , 28-36, 2008. 査読有
 8. Tanaka, T., Uchida, Y., Kaibori, M., Hijikawa, T., Ishizaki, M., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Tokuhara, K., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S. and Okumura, T. Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, FR183998, has protective effect in lethal acute liver failure and prevents iNOS induction in rats. *J Hepatol.* 48 , 289-299, 2008. 査読有
 9. Yoshida, H., Know, A., Kaibori, M., Tsuji, K., Habara, K., Yamada, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, Ito, S. and Okumura, T. Edoxone prevents iNOS expression by inhibiting its promoter transactivation and mRNA stability in cytokine-stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* 18 , 105-112, 2008. 査読有
 10. Katano, T., Furue, H., Okuda-Ashitaka, E., Tagaya, M., Watanabe, M., Yoshimura, M. and Ito, S. N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein(NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation. *Eur. J. Neurosci.* 27, 3161-3170, 2008. 査読有
 11. 松村伸治、阿部哲也、芦高恵美子、伊藤誠二：痛みにおける NO の関与 *Bio Clinica* , 第 23 卷 第 5 号, 19-25, 2008. 査読無
 12. 荘園雅子、南敏明、伊藤誠二：アクロメリン酸と痛み ペインクリニック , 第 29 卷 第 3 号, 351-364, 2008. 査読無
 13. Xu, L., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, S., Mabuchi, T., Okamoto, S., Sakimura, K., Mishina ,M. and Ito, S. Signal pathways coupled to activation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord by nociceptin/orphanin FQ. *Neuropharmacology* 52, 1318-1325, 2007. 査読有
 14. Kaneko, S., Ueda-Yamada, M., Ando, A., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, M., Uyama, M. and Ito, S. Cytotoxic effect of spermine on retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 , 455-463, 2007. 査読有
 15. Takagi, K., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Okuda, K., Watanabe, J., Takahashi, H., Iwakura, Y. and Ito, S. Interleukin-1 is not essential for expression of inducible NOS in hepatocytes induced by lipopolysaccharide in vivo. *Nitric Oxide* 16, 433-441, 2007. 査読有
 16. Xu, L., Mabuchi, T., Katano, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Sakimura, K., Mishina ,M. and Ito, S. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric oxide* 17, 18-24, 2007. 査読有
 17. Kaneko, S., Ando, A., Okuda-Ashitaka, E., Maeda, M., Fruta, K., Suzuki, M., Matsumura, M. and Ito, S. Ornithine transport via cationic amino acid transporter-1 is involved in ornithine cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 464-471, 2007. 査読有
 18. Yamazaki, Y., Matsunaga, H., Nishikawa, M., Ando, A., Kaneko, S., Okuda, K., Wada, M., Ito, S. and Matsumura, M. Senescence in cultured trabecular meshwork cells. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 808-811, 2007. 査読有
 19. Unezaki, S., Horai, R., Sudo, K., Iwakura, Y. and Ito, S. Ovol2/Movo, a homologue of *Drosophila ovo*, is required for angiogenesis, heart formation and placental development in mice. *Genes Cells* 12, 773-785, 2007. 査読有
 20. Ozaki, T., Kaibori, M., Matsui, K., Tokuhara, K., Tanaka, H., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S. and Okumura, T. Effect of thiol-containing molecule cysteamine on the induction of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *JPEN.J. Parenteral Enteral Nutr.* 31(5), 366-372, 2007. 査読有
 21. Kaneko, S., Okuda-Ashitaka, E., Ando, A., Nishimura, K., Igarashi, K., Maeda, M., Furuta, K., Suzuki, M., Matsumura, M. and Ito, S. Polyamines up-regulate the mRNA expression of cationic amino acid transporter-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Am.J. Physiol.* 293, C729-C737, 2007. 査読有
 22. Yamada, M., Nishizawa, M., Nakatake, R., Habara, K., Yoshida, H., Ozaki, T., Matsui,

- K., Hamada, Y., Kamiyama, Y., Ito, S. and Okumura, T. Characterization of alternatively spliced isoforms of the type I interleukin-1 receptor on iNOS induction in rat hepatocytes. Nitric Oxide-Biol Chem 17, 98-105, 2007. 査読有
23. Soen, M., Minami, T., Tatsumi, S., Mabuchi, T., Fruta, K., Maeda, M., Suzuki, M. and Ito, S. A synthetic kainoid, (2S,3R,4R)-3-carboxymethyl-4-(phenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-1) serves as a novel analgesic for neuropathic pain. Eur. J. Pharmacol. 575, 75-81, 2007. 査読有
24. Sasaki, A., Mabuchi, T., Serizawa, K., Takasaki, I., Andoh, T., Shiraki, K., Ito, S. & Kuraishi, Y. Different roles of nitric oxide synthase-1 and -2 between herpetic and postherpetic allodynia in mice. Neuroscience 150, 459-466, 2007. 査読有
25. 芦高恵美子、阿部哲也、松村伸治、伊藤誠二：脊髄後角における NMDA 受容体リン酸化と神経因性疼痛 慢性疼痛, 第 26 巻 第 1 号, 41-47, 2007. 査読無
26. 片野泰代、伊藤誠二：シナプス後肥厚部の NMDA 受容体のリン酸化と神経因性疼痛 生体の科学, 第 58 巻 第 2 号, 139-143, 2007. 査読無
27. 伊藤誠二：慢性疼痛研究の最近の進歩～機能的変化による慢性疼痛の維持機構～ペインクリニック, 第 28 巻 第 2 号, 199-207, 2007. 査読無
28. 伊藤誠二：慢性疼痛の発生維持機構について ペインクリニック, 第 28 巻 別冊春号, 326-328, 2007. 査読無
29. 伊藤誠二：痛覚の発生機序の最前線 Urology View, 第 5 巻 第 5 号, 8-14, 2007. 査読無
30. 南敏明、芦高恵美子、伊藤誠二：プロスタグランジンとノシセプチン 麻酔, 第 56 巻 増刊号, S172-S178, 2007. 査読無

[学会発表] (計 5 件)

1. Ito, S., Unezaki, S., Mabuchi, T., Saito, A. and Yoshii, S. Effect of neurotrophic factors on nerve regeneration monitored by in vivo imaging in the thy1-YFP transgenic mice. Society for Neuroscience. Sunday, Nov 16, 2008, Washington DC, USA.
2. Matsumura, S. Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., Yamaguchi, M. and Ito, S. Differentiation and migration of progenitor cells for maintenance of neuropathic pain in the model using nestin promoter-GFP transgenic mice. Society for Neuroscience, Sunday, Nov 4 2007, San Diego,

USA.

3. Ito, S., Xu, L., Mabuchi, T., Katano, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Sakimura, K. and Mishina, M. Nitric oxide is involved in activation of neuronal nitric oxide synthase as a retrograde messenger in the spinal cord. Society for Neuroscience, Sunday, Nov 4 2007, San Diego, USA.
4. Okuda-Ashitaka, E. Xu, L., Matsumura, S., Mabuchi, T., Sakimura, K., Mishina, M. and Ito, S. Signal pathways coupled to activation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord by nociceptin/orphanin FQ. Society for Neuroscience Sunday, Nov 4 2007, San Diego, USA.
5. Ohnishi, T., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, S. and Ito, S. Molecular mechanism for the translocation of nNOS to the plasma membrane by PACAP. Society for Neuroscience, Sunday, Nov 4 2007, San Diego, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 伸治 (MATSUMURA SHINJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70276393

(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