

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19603019
 研究課題名（和文）神経因性疼痛モデルにおける電位依存性チャネルの発現変化と病態への関与
 研究課題名（英文）Comparative study of the expression of voltage-gated ion channel mRNAs in a rat neuropathic pain model
 研究代表者
 福岡 哲男（FUKUOKA TETSUO）
 兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号：90399147

研究成果の概要：局所麻酔薬は、神経の電位依存性ナトリウムチャネル(Nav)に働いて、痛みの伝達をブロックする。Navには1.1から1.9迄の9つがある。より選択的で副作用の少ない局所麻酔薬開発の基礎研究として、知覚神経系におけるこれらの遺伝子の分布の違いを個々の細胞レベルで明らかにし、病態に応じた局所麻酔薬のターゲット分子として、Nav1.3, 1.7, 1.8, 1.9が重要であることを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経解剖学、ペインリサーチ

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：DRG、Nav、Kv、腰部交感神経節、脊髄、神経因性疼痛

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は活動電位によってその電氣的興奮を細胞の隅々に伝播し、シナプスを介して次の神経細胞に興奮を伝達する。活動電位は主に電位依存性ナトリウムチャネル(Nav)によって生じるが、その発現閾値や持続時間・発現頻度を決定する上で重要な役割を果たしているのが電位依存性カリウムチャネル(Kv)であり、現在のところ哺乳類では9個のNavと15個以上のKvがクローニングされている。個々の神経細胞にはこれらのチャネルが様々な組み合わせで発現していると

考えられ、その組み合わせのパターンが何種類あるかは不明である。一方、これまで電気生理学的手法によって様々な神経細胞における活動電位の性質が調べられてきたが、ナトリウム電流についてはテトロドトキシン感受性か耐性かの2種類、カリウム電流についても6種類程度が報告されているに過ぎない(Gold, 1996, J. Neurophysiol.)。これは、個々の電位依存性チャネルを完全に区別するに足るアゴニスト、アンタゴニストが存在しないためであり、薬理的・電気生理学的研究の限界と考えられる。

2. 研究の目的

末梢神経に含まれ、疼痛に関係する一次知覚神経線維と交感神経節後線維、更には脊髄ニューロンに発現している Nav と Kv を詳細に解明する。次にこれらのチャネル同士の共存について調べ、その共存パターンがどのような生理学的意義を持つのかについて検討する。さらに神経因性疼痛状態において、これらのチャネルの発現がどのように変化するか、もし、その発現の変化が病的痛覚過敏状態のメカニズムと考えられた場合は、チャネルの拮抗薬や選択的アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて薬理的にそのチャネルの機能を解析する。これにより、選択的に異常な痛み（活動電位）だけを抑えるための分子ターゲットが解明できると考えている。派生的には、末梢神経には一次知覚神経線維の他に交感神経節後線維や運動神経線維も含まれている。もし、これらの線維間で Nav や Kv の発現パターンに違いがあれば、末梢神経レベルで特定の神経線維のみをブロックするための分子ターゲットが同定でき、新たな創薬に繋がるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1). 一次知覚神経細胞、交感神経節後細胞、脊髄細胞における Nav、Kv の発現

ラット後根神経節 (DRG) 由来の cDNA から Nav1.1-1.9, Kv1.1-4.3 迄の cRNA probe を作成し、Northern blot analysis 及び in situ hybridization 法 (ISHH) により DRG ニューロンや交感神経節後細胞、脊髄細胞におけるこれらのイオンチャネルの発現を包括的に調べる。プローブは各チャネルに対して 2-3 種類デザインして作成することになるので、膨大な数になるために時間が掛かるが、それらの中から最も感度の高いものを選んで用いる。

(2). DRG ニューロンにおけるサブタイプ毎の Nav、Kv の発現と共存

連続切片に対する ISHH 法によって、DRG ニューロンのサブタイプを特定し、それらにおける Nav、Kv の分布の違いを明らかにする。サブタイプのマーカーとしては、有髄線維を染める neurofilament の他、比較的広く用いられている IB4, TrkA, TrkC, GFR α 1 等を用いる。また Nav や Kv 同士の共存を調べることにより、DRG ニューロンにおける native な電位依存性チャネルの組み合わせを突き止める。上記の Nav、Kv のプローブが十分使えるものであれば、ここまでのデータは間違いなく集積できる見込みである。

(3). 末梢神経障害による Nav、Kv 発現の変化

L5 脊髄神経結紮 (L5SPNL) モデルを作成し、L4 及び L5DRG における Nav、Kv の発現変化を部位別・時間経過に注目して ISHH 法(及び

実用的な抗体が見つければ免疫組織化学法でも)を駆使して詳細に解析する。更に L5SPNL モデルで疼痛抑制作用と DRG ニューロンの自発発火抑制作用が報告されている GDNF をクモ膜下投与することにより、Kv の変化がリバースできるか否かを調べる。後者については有意な変化が見られるかどうかは不明であるが、成功すればまとめた結果を発表できる雑誌のレベルが高くなることは間違いない

4. 研究成果

(1) ラット後根神経節 (DRG) 由来の cDNA から Nav1.1-1.9, Kv1.1-4.3 迄の cRNA probe を合計 21 種類作成し、in situ hybridization 法 (ISHH) により DRG ニューロンや交感神経節後細胞、脊髄細胞におけるこれらのイオンチャネルの発現を包括的に調べた。

(2) DRG ニューロンにおける Nav 発現については、neurofilament, IB4, TrkA, TrkC 等のマーカーとの共存関係を調べ、これらチャネルの特徴的分布が解明できた。この結果は今後の電気生理学的研究に重要な指標となるデータとして評価され、Journal of Comparative Neurology に掲載された。

(3) 交感神経節後ニューロンにおける Nav 発現についても調べ、Nav1.7 が主たるチャネルで他に Nav1.1-1.6 が弱く発現し、軸索切断後、Nav1.3 のみが増加するという予備的結果が得られており、現在その最終確認中である。臨床における交感神経ブロックの標的分子を解明するもので、ペインクリニック領域において重要なデータであると考えている。これらのデータについては現在英文雑誌に投稿中である。

(4) 脊髄における Nav 発現についても、Nav1.1-Nav1.7 が層別に異なる分布をしており、神経切断後に増えるものと減るものがあるというデータが得られている。この研究はクモ膜下投与された局所麻酔薬がどの Nav に効いているのかを解釈する上で、特に麻酔の臨床において重要な意味を持つと考えている。これについても現在英文論文を執筆中である。

(5) DRG ニューロンにおける Kv 発現については、Nav2.1, 4.2 を除く全てが発現しており、大型ニューロンと小型ニューロンで発現が異なるという結果が得られている。数が多い Kv の包括的発現比較はこれまで報告が無く、今後の電気生理学的研究に及ぼす影響は大きいと考えられる。今後は上記 Nav 同様、neurofilament と IB4 との共存を調べて論文にまとめる予定である。

8つの電位依存性ナトリウムチャネル

(Nav1.1-1.3, 1.6-1.9, Nav2)のriboprobeを作成し、ラットDRGにおけるニューロンのサブタイプ別の発現の違いを明らかにし、J. Comp. Neurol.に発表した。

次に脊髄における層別の発現の違いを調べ、これまで正常脊髄には存在しないと云われていたNav1.3が侵害受容に深く関係する後角膠様質に選択的に発現することを見いだした。この成果は米国神経科学学会でポスター発表するとともに、現在英文論文を作成中である。

更に、腰部交感神経節における発現の比較と、軸索切断後の変化についてもデータを得ており、DRGニューロンや脊髄運動神経ニューロンに存在しないNav1.3が正常でも発現しており、末梢神経レベルで選択的交感神経ブロックが得られる可能性を示唆する成果が得られ、軸索切断後にはこのサブタイプのみが発現増加することを見いだした。慢性疼痛状態の一部には交感神経活動が関与していることは経験的にも良く知られており、この研究結果はそのメカニズムを解明する上で、重要な所見であると考えられる。これらのデータについても、現在英文論文作成中である。

これらの結果は、疼痛の治療に広く用いられている局所麻酔薬の分子ターゲットを特定したという点で、斬新な研究成果であり、今後、更に神経因性疼痛モデルでの変化について研究を続ける予定である。

最後に、15つの電位依存性カリウムチャンネル(Kv1.1-4.3)についても全てriboprobeを作成し、正常ラットDRG、脊髄、腰部交感神経節における詳細な発現の違いを確定した。これらについてはデータが膨大であるため、現在解析中であり、順次英文論文にする予定である。

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8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., 10, 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., 12, 28, 2892-902. 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(Pt 5):1241-1251. 査読有
- ⑤ Obata, K., Katsura, H., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Akira, S. and Noguchi, K. (2008) Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. J. Neurochem., 105, 2249-2259. 査読有
- ⑥ Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. J. Clin. Invest., 117, 1979-1987. 査読有
- ⑦ Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Activation of fibroblast growth factor receptor by axotomy, through downstream p38 in dorsal root ganglion, contributes to neuropathic pain. Neuroscience, 150, 202-211. 査読有
- ⑧ Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2007) Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation. J. Neurochem., 102, 1614-1624. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 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 Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington, DC., U. S. A.
- ② 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 Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington, DC., U. S. A.
- ③ 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.

- ④ Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007) P2Y12 receptor expressed in spinal microglia contributes to neuropathic pain. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, 11.3-7, San Diego, U. S. A.
- ⑤ 小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一 (2007) 神経因性疼痛における脊髄マイクログリアに発現する P2Y12 受容体の関与. 第 30 回日本神経科学大会, 9.10-12, 横浜.
- ⑥ 戴 毅, 王 勝蘭, 福岡哲男, 富永真琴, 野口光一 (2007) Protease-activated receptor2 による TRPA1 活性の増強. 第 29 回日本疼痛学会, 7.7, 横浜.
- ⑦ 小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一 (2007) 神経因性疼痛における脊髄マイクログリアに発現する P2Y12 受容体の関与. 第 29 回日本疼痛学会, 7.7, 横浜.
- ⑧ 王 勝蘭, 戴 毅, 福岡哲男, 富永真琴, 野口光一 (2007) Bradykinin による TRPA1 活性の増強. 第 29 回日本疼痛学会, 7.7, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 哲男 (FUKUOKA TETSUO)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90399147

(2) 研究分担者

小林 希実子 (KOBAYASHI KIMIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70418961

(3) 連携研究者

なし