

機関番号：34417
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20602012
 研究課題名（和文） 慢性疼痛の診断・治療指標候補の一酸化窒素の神経可塑性変化における活性化機構
 研究課題名（英文） Activated mechanism in the neuroplasticity change of nitric oxide, which is a diagnosis and the candidate of the treatment index
 研究代表者
 阿部 哲也（ABE TETSUYA）
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号：20411506

研究成果の概要（和文）：神経系の損傷や機能異常によって引き起こされる神経因性疼痛は、世界中で100万人への影響の報告がある深刻な機能障害である。NMDA受容体のNR2Bサブユニットにおける1472番目のチロシン(Y1472)のFynを介したリン酸化が、脊髄後角ニューロンでのNMDA受容体のシナプス後膜肥厚での維持と、一酸化窒素産生の活性化に関与していた。今回、そのY1472をフェニルアラニンに置換したY1472F-KIマウスで、L5脊髄神経切断による神経因性疼痛が出現しないことを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Neuropathic pain produced by damage to or dysfunction of the nervous system is a common and severely disabling state that affects million of people worldwide. Fyn kinase-mediated phosphorylation of NR2B subunits of NMDA receptors at Tyr1472 in the dorsal horn may have dual roles in the retention of NMDA receptors in the postsynaptic density and in activation of nitric oxide synthase. Y1472F-KI mice with a knock-in mutation of the Tyr1472 site to phenylalanine did not exhibit neuropathic pain induced by L5 spinal nerve transection.

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	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
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：疼痛学

キーワード：慢性疼痛、一酸化窒素、神経可塑性、脊髄、後根神経節、グルタミン酸、NMDA受容体

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は、心身医学的アプローチが最も必要とされる症状で、bio-psycho-socio-behavioral model とすると理解しやすい。すなわち、「身体面」「心理面」「社会面」「行動面」の各要因のシステム異常として把握し、個人を取りまく社会や環境も含めた全体のシステムの異常として診断・治療にあたる。身体的要因はさらに器質的要因と機能

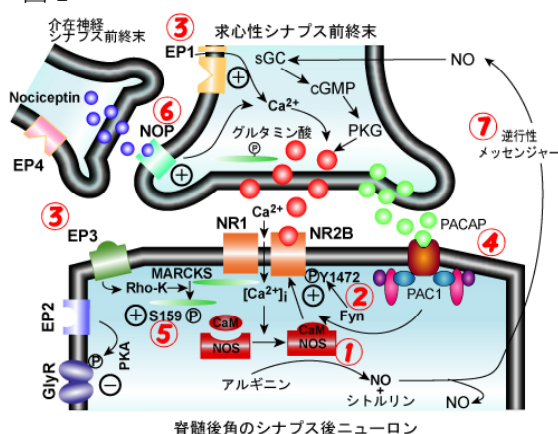
的要因の関係性の診断が重要である。そのためにも、慢性疼痛患者の「身体面」での変化が解明される必要があり、これを研究目的としている。

我々の研究グループは、神経因性疼痛のあるものは末梢神経からの異常入力为主要因で脊髄後角のグルタミン酸遊離→神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の活性化→一酸化窒素(NO)の産生増加→神経疼痛発症・維持

という機能的かつ可逆的变化で生じるという以下の研究成果(図1)を得た。神経損傷という器質的变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变化を示すという興味ある結果を得た。第5腰椎脊髄神経(L5)の単独切断による神経因性疼痛モデル(L5-SNTモデル)をマウスで確立しており、数多くの遺伝子改変マウスに適用している。その結果、神経因性疼痛出現に①nNOSの活性化が必要不可欠な重要条件で、その活性化に②NMDA受容体NR2Bサブユニットのチロシン1472残基でのリン酸化、③PGE受容体サブタイプEP1, EP3, EP4、④pituitary adenylylase cyclase activating-peptide(PACAP)、⑤myristoylated alanine-rich C-kinase substrate(MARCKS)のセリン159残基でのリン酸化、⑥nociceptinが重要な役割を担っている、さらに⑦NO自身が逆行性メッセンジャーとしてシナプス前終末に働きnNOS活性にフィードバックをかけていることを明らかにしてきた。1年以上持続した神経因性疼痛が神経再生で完治したという報告は我々の研究成果を支持するものである。

上述の役者が脊髄後角にあるシナプスで具体的にnNOS活性化機構に関与しているかを解析するために、個体レベルの実験をさらに詳細に遂行し、感覚神経活動入力に対するシナプス後突起における応答、突起形成へのNOの役割を詳細に検討することが、慢性疼痛の診断治療のバイオマーカーとしての重要な候補であるNOの解析に重要であるという考えに至った。さらに単純な系である後根神経節(DRG)ニューロンと脊髄(SC)後角神経細胞の神経回路を形成する共培養系(DRG-SC共培養系)を確立することを試みた。

図1 申請者の研究グループの研究成果から予想される脊髄後角における神経因性疼痛発症機構の模式図



2. 研究の目的

様々な疼痛に関わる因子が脊髄後角にあるシナプスで具体的にnNOS活性化機構に関与しているかを詳しく解析するために、個体レベルの実験をさらに詳細に遂行すると伴

に、DRGニューロンと脊髄後角ニューロンの共培養系を確立し、シャーレ内に感覚神経からの信号を伝達する場としてのシナプスを再現する試みを行う。細胞内NOイメージング、細胞内Ca²⁺イメージングを行い、カプサイシン刺激や電気刺激によるシナプス前ニューロンからの刺激に対するシナプス後ニューロンでのNO産生やCa²⁺動態を計測する。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プロスタグランジン(PG)、オピオイド、グルタミン酸アゴニストおよびアンタゴニストのnNOS活性化に対する効果を細胞および神経回路レベルで検討する。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や、NMDA受容体やnNOSが活動する場である樹状突起スパイン形態変化とnNOS活性との関係の解析を行う。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する。

3. 研究の方法

慢性疼痛は、器質的、機能的異常所見が乏しいことが多く、また投薬治療に対しても抵抗性を示す難治性の病態である。慢性疼痛のモデルとして、神経損傷による神経因性疼痛がある。神経因性疼痛において、疼痛反応が持続する要因として、脊髄での一次求心性線維の発芽による神経伝達経路の再構築、損傷された末梢神経の発芽や神経腫からの持続的な疼痛信号の出力に加え、我々が発見した脊髄NMDA受容体-NO経路の活性化による中枢性感作が挙げられる。前二者が器質的变化であるのに対し、後者は機能的変化である。つまり、可逆的であり、保存的治療による改善が期待するということである。そこで臨床応用を考えた場合、疼痛の客観的指標が望まれるが、NOは気体の神経伝達物質であり、産生された局所で短時間のみ作用することから、リアルタイムでの中枢性感作の状態を反映すると考えられる。以前の研究で、組織学的にNADPHジアホラーゼ活性がNO産生量と神経因性疼痛の両方のマーカーとなる可能性のあることを示している。

脊髄神経がDRG、後根を介して入力する脊髄横断面をレベル毎に検討するためにChungモデルを改変したL5-SNTモデルを確立しており、本研究では野生型マウスや、各種遺伝子改変マウスでこのモデルを作製した。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の活性化は酵素化学的に解析した。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を組織レベルで調べ、NOの神経因性疼痛への診断的応用について検討した。

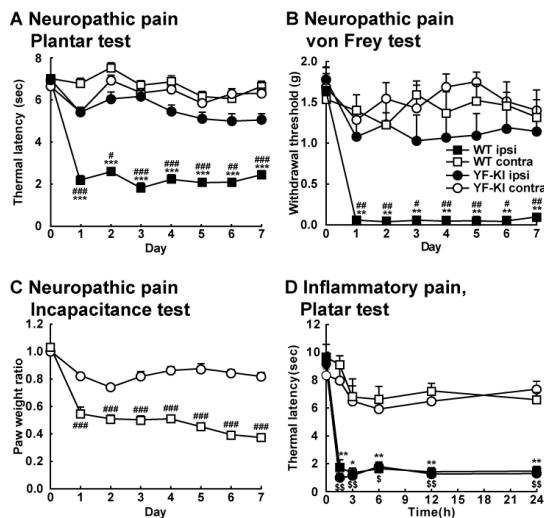
さらに、nNOS 活性化機構に重要な役割を果たしている NMDA 受容体の NR2B サブユニットの Y1472 のリン酸化の神経因性疼痛維持機構について検討した。

4. 研究成果

(1) NMDA 受容体 NR2B サブユニットの 1472 番目アミノ酸チロシンがリン酸化されない NR2B Y1472F-KI マウスでは痛みが消失する

NR2B Y1472F-KI マウスで L5 脊髄神経切断モデルを作製し、従来の痛覚試験を用いて、神経因性疼痛が生じていないことを確認した。従来の痛覚試験とは、熱刺激に対する潜時を測定する plantar 試験 (図 2A) と機械的刺激に対する疼痛閾値を測定する von Frey 試験 (図 2B) である。足を骨折したり挫いたときには、痛くないように体重を健側にかけて等重で患側には体重をかけないようにすることは体験することである。両足を独立した体重計にのせ、それぞれの足にかかる荷重を測定する incapacitance テストはより客観的な測定器であり、これでも神経因性疼痛が生じていないことを確認した (図 2C)。一方、炎症性疼痛モデルでは NR2B Y1472F-KI マウスは野生型マウス同様に痛覚過敏反応が生じた (図 2D) ことから、NR2B の Tyr1472 のリン酸化は神経因性疼痛に関与するが、炎症性疼痛には関与しないことが明らかとなった。

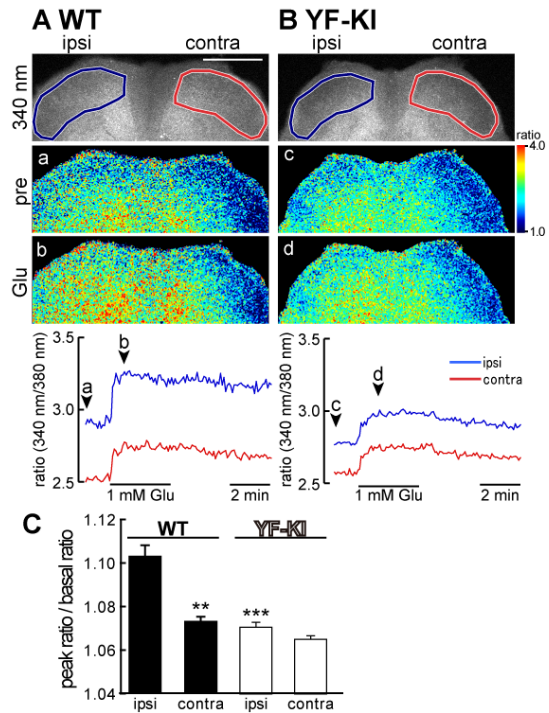
図 2



(2) NR2B Y1472F-KI マウスの脊髄後角では神経因性疼痛時の細胞内カルシウムイオン濃度動態が減衰する

健常な NR2B Y1472F-KI マウスの脊髄後角に於ける NMDA 受容体の発現とグルタミン酸に対する Ca^{2+} 応答性、その応答に対する NMDA 受容体拮抗薬の効果に差がみられなかった。一方、神経因性疼痛モデルでは NR2B Y1472F-KI マウスは野生型マウスに比べて Ca^{2+} 応答性が減弱した (図 3)。

図 3



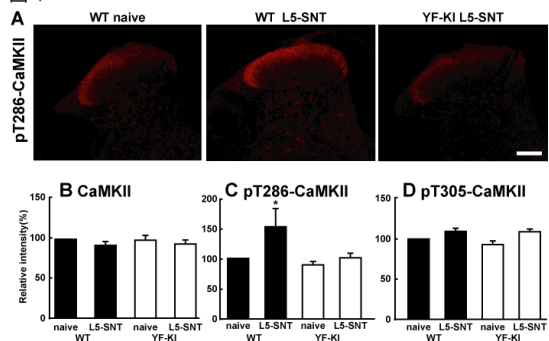
(3) NMDA 受容体 NR2B サブユニットの Tyr1472 リン酸化の下流で CaMKII が神経因性疼痛維持に働いている

NR2B Y1472F KI マウスでは神経因性疼痛に伴って上昇する Ca^{2+} /カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の Thr286 のリン酸化が障害されていたが、Thr305 のリン酸化は影響されなかった (図 4)。CaMKII は 12 量体で構成される。強い Ca^{2+} の流入により Thr286 の自己リン酸化を引き起こし、シナプス下膜に移動して NMDA 受容体のサブユニットに直接会合することが知られている。

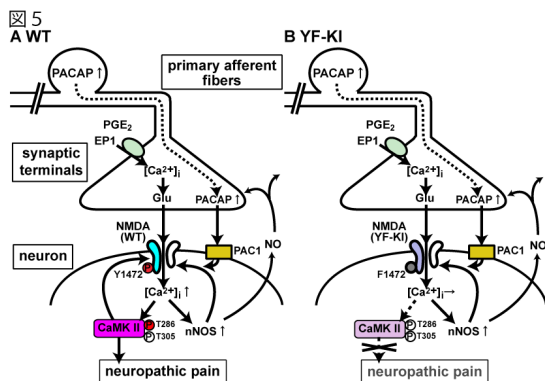
NR2B Y1472F KI マウスでは、脊髄後角の PKC γ の増減、PKC γ の Thr674 のリン酸化、nNOS 活性化、ミクログリアの活性化が、野生型マウスと同様に観察された。

シナプス後下膜には NMDA 受容体を通して流入した Ca^{2+} 濃度勾配があり、これによって活性化された nNOS と CaMKII が、細胞質からシナプス後膜肥厚ヘトランスロケーションしてくる。これらが、シナプス後膜肥厚で

図 4



の NMDA 受容体の情報伝達の一翼を担い、神経因性疼痛の維持に関与すると考えられた (図 5)。



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 Matsumura S, Takagi K, Okuda-Ashitaka E, Lu J, Naritsuka H, Yamaguchi M, Ito S. Characterization of nestin expression in the spinal cord of GFP

transgenic mice after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 170, 921-953, 2010, 査読有

② Matsumura S, Kunori S, Mabuchi T, Katano T, Nakazawa T, Abe T, Watanabe M, Yamamoto T, Okuda-Ashitaka E, Ito S. Impairment of CaMKII activation and attenuation of neuropathic pain in mice lacking NR2B phosphorylated at Tyr1472. *Eur. J. Neurosci.*, 32, 798-810, 2010, 査読有

③ Kunori S, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Katano T, Audoly LP, Urade Y, Ito S. A novel role of prostaglandin E2 in neuropathic pain: blockade of microglial migration in the spinal cord. *Glia*, 59, 208-209, 2010, 査読有

④ Ohnishi T, Matsumura S, Ito S. Translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by ATP is mediated by P2X and P2Y receptors. *Molecular Pain*, 5, 40_1-40_16, 2009, 査読有

⑤ Kunori S, Matsumura S, Mabuchi T, Tatsumi S, Sugimoto Y, Minami T, Ito S. Involvement of prostaglandin F 2 alpha receptor in ATP-induced mechanical allodynia. *Neuroscience*, 163, 362-371, 2009, 査読有

⑥ 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

⑦ 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

⑧ 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 巻 第 5 号, 19-25, 2008. 査読無

[学会発表] (計 1 件)

① Matsumura S, Kunori S, Nakazawa T, Abe T, Yamamoto T, Katano T, Watanabe M, Okuda-Ashitaka E, Ito S, Attenuation of neuropathic pain by impaired Ca²⁺ signaling in mutant mice lacking the Tyr-1472 phosphorylation site of the NR2B, Society for Neuroscience, 2010 年 11 月 15 日, San Diego, 米国

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：埋植用鎮痛製剤

発明者：荒木吉朗、海堀昌樹、松村伸治、伊藤誠二、権雅憲

権利者：学校法人関西医科大学

種類：特許

番号：特願 2010-127252

出願年月日：2010 年 6 月 2 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://image.tnoc.kmu.ac.jp/bmrc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 哲也 (ABE TETSUYA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：20411506

(2) 研究分担者

松村 伸治 (MATSUMURA SHINJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70276393

福永 幹彦 (FUKUNAGA MIKIHICO)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90257949

(3) 連携研究者
該当者なし