

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20602015

研究課題名（和文）神経因性疼痛発現維持機構の解明を目的としたプロテオミクス研究

研究課題名（英文）Proteomic analysis for mechanisms of neuropathic pain

研究代表者

片野 泰代 (KATANO TAYO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60469244

研究成果の概要（和文）：

慢性疼痛では、脊髄後角シナプスの反応様式の変化や構成が増大する可塑的变化が生じ、その一つとして NR2B の 1472 番目の Tyr 残基(Y1472)のリン酸化必要であることを明らかにしてきた。本解析では NR2BY1472 を Phe に置換したノックインマウスを比較対照とし、脊髄後角での Y1472 リン酸化の下流経路の解明として、CaMKII を介したリン酸化シグナルの解明と、後シナプス肥厚部 (PSD) 画分のプロテオミクス解析により関連分子の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：

Chronic pain is maintained by plastic change to synapse in the spinal dorsal horn. We previously clarified that the phosphorylation of Y1472 NR2B is important for neuropathic pain. In the present study, we determined the phosphorylation cascade through activation of CaMKII and identified two molecules as changing volume of protein after SNI in the postsynaptic density fraction by proteomic analysis using Y1472F KI mice, which have a knock-in mutation of the Tyr1472 site to phenylalanine, as comparison subject.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：NR2B, プロテオミクス, リン酸化

1. 研究開始当初の背景

侵害刺激は、脊髄後角でシナプスを形成する一次求心性線維と二次ニューロンを介し脳へ伝達され、「痛み」として直ちに認識される。このような急性痛は生理的感覚であり生体における警告信号として機能する一方、慢性疼痛は発症原因となった末梢組織損傷

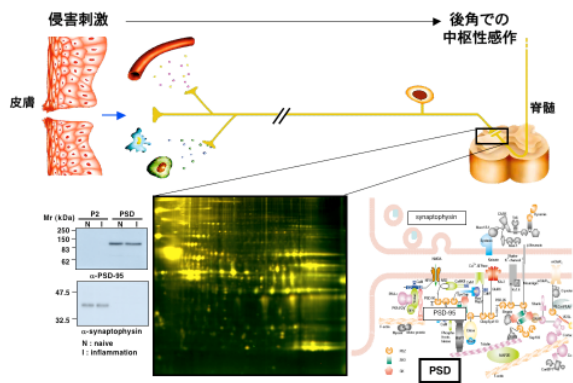
の治癒後も疼痛のみが残存、悪化する異常感覚であり生理的意義を認めない。また本病態はしばしば難治性となることから、臨床上深刻な問題となっている。

難治性疼痛の一つである神経因性疼痛（現在、神経障害性疼痛と改名）では、触覚刺激が痛みとして認識されるアロディニアや痛

覚閾値が顕著に低下する痛覚過敏が生じる。これは痛みの伝達経路である脊髄後角での刺激に対する反応様式の変化や構成が増大する可塑的变化の結果であると考えられている。この中枢性感作は海馬における記憶・学習によって引き起こされる可塑的变化と類似した現象であると考えられており共通の機序が報告されている。我々は脊髄における慢性疼痛を、興奮性グルタミン酸受容体の一つ NMDA 受容体サブユニット NR2B の 1472 番目のチロシン残基 (Y1472) のリン酸化酵素である Src family の一つ Fyn のノックアウトマウスおよび NR2B の Y1472 をフェニルアラニンに置換した変異体 NR2B Y1472F のノックイン(KI)マウス (東京大学医科学研究所山本雅教授より供与) の両方で神経障害性疼痛の発症に抵抗性を示すことを明らかにしている。これらの結果は NR2B Y1472 のリン酸化が神経障害性疼痛発現維持に必要であることを示している。

神経伝達に関わる多くの機能性分子はシナプス部に濃縮して存在し、二次ニューロン側の後シナプス肥厚部 (PSD) では、NMDA 受容体など 100 を超える機能性分子と機能的複合体を形成し、シナプス伝達を調節する (図 1)。

図 1. 脊髄 PSD 画分のプロテオミクスによる機能性分子の探索



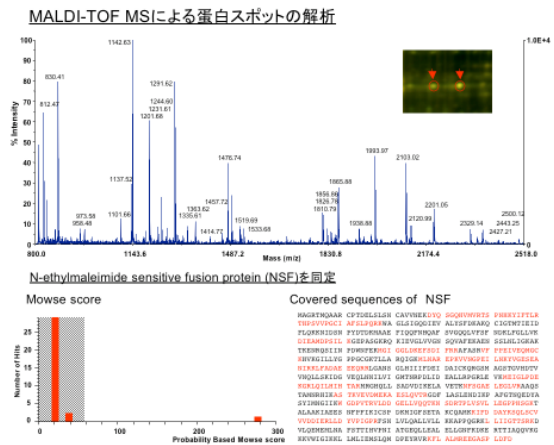
これらの分子構成、発現量および翻訳後修飾は、慢性疼痛を含む病態を反映し変化することから、神経障害性疼痛モデル PSD 画分を用いたプロテオミクス解析により、その機能性分子の探索・同定が可能になると考えられる。

プロテオミクス解析は DNA マイクロアレイを用いて行う網羅的な発現量解析では得られないリン酸化、糖鎖付加およびプロテアーゼによる切断といった翻訳後修飾を検出することができる。シナプス PSD 画分にはリン酸化酵素、脱リン酸化酵素、プロテアーゼを始めとする多くの酵素群が存在し、生じ

る修飾は蛋白間の相互作用や受容体の活性化などを調節することから病態維持などの神経可塑性に関わる重要な機序となる。

我々は既にラット炎症性疼痛モデルを用いた解析で、脊髄 PSD 画分から炎症性疼痛の関連分子を検出同定し (図 1, 2)、その機能解析を行った実績をもっている。

図 2. 質量分析器による機能性分子の同定



本解析では、無処置群と炎症性疼痛モデル群の PSD 画分に含まれる蛋白の発現量を、2次元電気泳動法(2-DE)をベースとした比較解析システムである蛍光標識2次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)法にて変化の認められた分子を探索し、ターゲットとした。同定した分子の発現量変化は未精製画分では確認出来なかったことから、PSD 画分に焦点を絞った解析の有効性が示されている。近年、ifenprodil および CP101,606 などの NR2B 選択的阻害剤が LTP や神経障害性疼痛を阻害することを申請者らのグループは明らかにしているが、その下流シグナルや他の機能性分子に関しての解析は十分ではない。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛を含む慢性疼痛の発症に NMDA 受容体に関与することが明らかにされ、その治療薬として、NMDA 受容体を遮断することを目的としたケタミンによる治療が注目される一方、ケタミンはオピオイド受容体や GABA 受容体にも作用するなど広い作用機序を有する分その副作用が問題となっている。また神経障害性疼痛をはじめとする多くの慢性疼痛は難治性であり、いずれの鎮痛薬も奏功しない症例が報告されている。その原因として慢性疼痛発現維持機構の解明が十分ではなく、有効な治療薬の開発がなされていないことがあげられる。よって、本解析では慢性疼痛機序の解明を目指す

ともに、疼痛経路に選択的かつ限局した作用をもつ副作用の少ない創薬のターゲットとなりうる新規分子の探索を行うことを目的としている。今回これまでの報告および我々の成果を生かし野生型および NR2B Y1472F KI マウスの神経障害性疼痛モデルを比較解析に用いることによって NR2B のリン酸化を介した限局したカスケード分子の検出と、その機能解析を行うことからこの目的を果たす成果が得られる。これらの成果を、病態メカニズム解明の一助とし、将来創薬ターゲットになりうる分子の同定から、難治性疼痛の創薬へと発展させることを目指す。

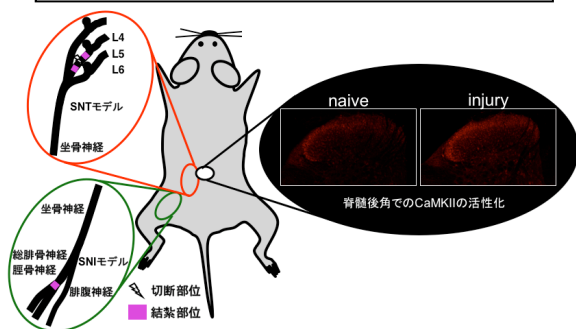
3. 研究の方法

(1) モデルの確立

本解析では慢性疼痛発現維持機構を明らかにするために、マウス神経障害性疼痛モデルを作製し中枢性感作にともなって変化する脊髄後角でのリン酸化酵素など機能性分子の働きとその作用、および PSD 画分から新規の機能性分子探索を目的としプロテオミクス解析を行うものである。

申請者らのグループでは Kim & Chung モデルを改変した L5 脊髄神経を結紮後切断する L5-SNT(spinal nerve truncation)モデル(図3)をマウスで確立し、アロディニアおよび痛覚過敏の出現を確認するとともに、脊髄後角での機能性分子における生化学的変化を明らかにしてきた。今回新たな機能性分子探索の試みとしてプロテオミクス解析を行うにあたり、Woolf らのグループによって 2000 年に報告された SNI(spained nerve injury)モデルを採用した(図3)。

図3. 神経障害性疼痛モデルと末梢神経損傷に伴う脊髄後角での生化学的変化



マウスで得られる組織量は、通常ラットの10分の1であり、かつ腰部脊髄後角のみを解析対象にした場合、一匹より得られる組織量が数ミリグラムと極めて少ない。大量のモデル動物からの組織の摘出が必要となることから、まずモデル作製の簡便化を検

討する。SNI モデルでは SNT モデルより遠位での総腓骨神経と脛骨神経の完全結紮モデルであり、本神経は大腿部の筋膜を切開する事により容易に露出することができ、その作製は簡便である。作製されたモデルは、von Frey filament を用いた機械的刺激に対する逃避閾値を測定し、アロディニアの発症を観察する。処置 7 日後まで疼痛が持続するのを確認し、解析モデルとする。

(2) リン酸化シグナルカスケード解析

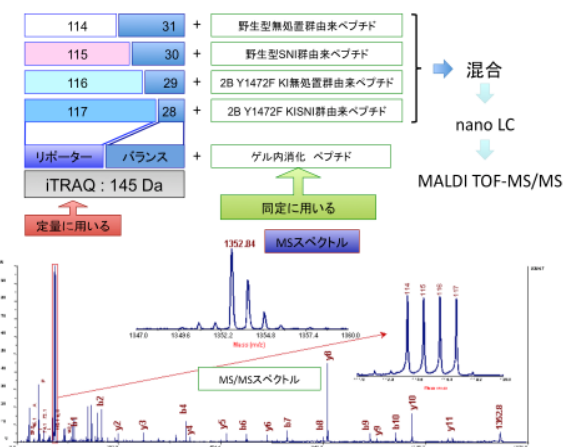
SNI モデル作製後 7 日目で認められる脊髄後角での生化学的変化を免疫染色および western blot を用いて解析する。さらに、標的分子にたいする特異的阻害剤をマウス腰部脊髄腔内に投与し、分子の in vivo での痛み発現における効果を評価する。

(3) プロテオミクス解析

未知の神経障害性疼痛の機能性分子の探索を目的としたプロテオミクス解析に必要なマウス匹数(各群およそ 100-150 匹)を準備する。野生型と Y1472F KI マウスの無処置群および SNI モデル群より得られた腰部脊髄後角から PSD 画分を精製する。解析に用いる PSD 画分は図 1 左で示したように PSD-95 が濃縮し、synaptophysin が検出されない画分であることを確認し以後の解析に用いる。

本画分は TritonX-100 の不溶性画分として精製していることから、2 次元電気泳動のような可溶性が問題となる実験系では解析できない分子が多く存在することになる。よって、本解析では、SDS-PAGE サンプル処理液で PSD 画分を完全に可溶化し、ゲルで分画後、ゲル内消化、回収した全てのペプチドに対して isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) 標識を行う。標識されたペプチドの、網羅的な比較定量および蛋白同定は、質量分析計を用いて行う(図4)。

図4. iTRAQ を用いた比較定量解析

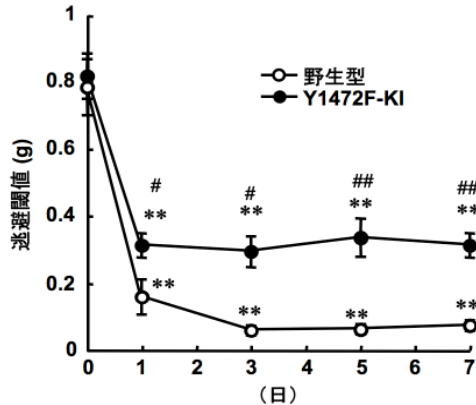


4. 研究成果

(1) SNI モデルでの行動解析

これまでに、野生型と Y1472F KI マウスの両方で、SNI モデルを作製した。末梢神経損傷によって生じる閾値の低下は SNI モデル作製 1 日後より認められ、その閾値低下は Y1472F KI で有意に抑制された (図 5)。

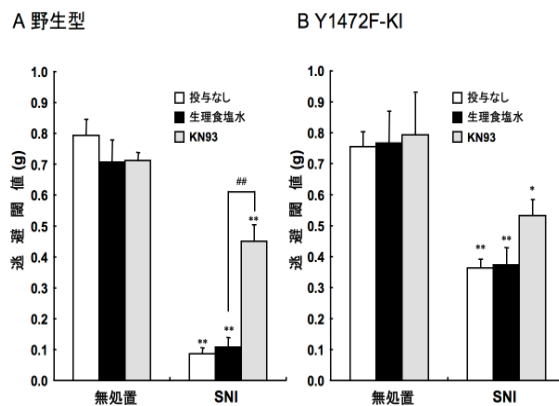
図 5. Y1472F KI マウスでは神経障害性疼痛の発症が抑制される



(2) SNI モデルにおける脊髄後角でのリン酸化検出

SNI モデル作製の 7 日後における脊髄後角の解析では、NR2B Y1472 のリン酸化と、PSD に多く存在するリン酸化酵素である CaMKII の自己リン酸化が亢進することを示した (図 3)。CaMKII はカルシウム・カルモデュリンに依存して活性化し、自己リン酸化を生じる。自己リン酸化した CaMKII はカルシウム・カルモデュリン非依存的に活性化が維持されるようになることから、記憶・学習のような長期増強に関与することが知られている。難治性の疼痛は、脊髄後角で記憶・学習のようなシナプスの可塑的变化が生じていると考えられる。その一つの変化として、AMPA 受容体のサブユニット、GluR1 の 831 番目のセリンのリン酸化が亢進することを見いだした。

図 6. CaMKII 阻害剤 (KN93) は神経障害性疼痛を抑制



3) CaMKII 阻害による疼痛抑制

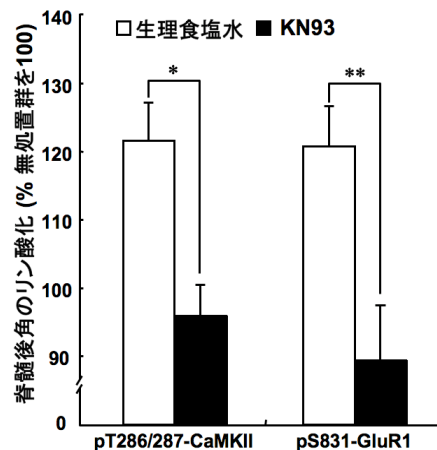
CaMKII 阻害剤である KN93 の腰部髄腔内投与によって、末梢神経傷害によって生じた疼痛閾値の低下が抑制されることを明らかにした。また、この効果は野生型マウスでは認められたが、Y1472F KI マウスでは殆ど認められなかった (図 6)。

(4) CaMKII 阻害は S831GluR1 のリン酸化を抑制

さらに、我々は、KN93 の腰部髄腔内投与で、SNI モデルで亢進する CaMKII の自己リン酸化と、S831GluR1 のリン酸化の両方が抑制されることを明らかにした (図 7)。

このことから、GluR1 は脊髄後角で活性化した CaMKII の標的分子であり、GluR1 を含む AMPA 受容体の活性化が、NR2B を含む NMDA 受容体の下流で、Y1472 のリン酸化を介して、CaMKII によって調節されることを示し、本成果を論文として発表した。

図 7. CaMKII 阻害剤 (KN93) は CaMKII 活性化と GluR1 リン酸化を抑制



(5) 神経障害性疼痛関連分子の同定

神経障害性疼痛における Y1472NR2B の、リン酸化下流での関連分子を探索するために、野生型と Y1472F KI マウスの両マウスの無処置群と SNI 群の 4 群から腰部脊髄後角 PSD 画分を精製し、iTRAQ 法を用いた網羅的プロテオミクス解析を行った。本解析で腰部脊髄後角 PSD より 220 の分子を同定し、SNI により発現の増加する分子 (野生型 30、KI 型 22) 群を見いだした。その中から特に、NR2B Y1472 のリン酸化に重要な分子として 2 分子 (neuropathic pain related protein-A, -B) を同定した。今後、KO マウスを作製し、本分子の機能を明らかにするとともに、創薬の標的分子としての有用性を評価する。

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 Katano, T., Nakazawa, T., Nakatsuka, T., Watanabe, M., Yamamoto, T., Ito, S. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacology* (査読あり) 60, 609-616, 2011.
- ② Okazaki, T., Otani, H., Shimazu, T., Yoshioka, K., Fujita, M., Katano, T., Ito, S., Iwasaka, T. Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (査読あり) 50, 534-544, 2011.
- ③ Kunori, S., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Katano, T., Audoly, L.P., Urade, Y., Ito, S. A novel role of prostaglandin E2 in neuropathic pain: blockade of microglial migration in the spinal cord. *Glia* (査読あり) 59: 208-218, 2011.
- ④ 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.* (査読あり) 32, 798-810, 2010.
- ⑤ Lu, J., Katano, T., Okuda-Ashitaka, E., Oishi, Y., Urade, Y., Ito, S. Involvement of S-nitrosylation of actin in inhibition of neurotransmitter release by nitric oxide. *Mol. Pain* (査読あり) 5: 58, 1-12, 2009.
- ⑥ Katano, T., Furue, H., Okuda-Ashitaka, E., Tagaya, M., Watanabe, M., Yoshimura, M., 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.* (査読あり) 27, 3161-3170, 2008.
- ⑦ Ohnishi, T., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, S., Katano, T., Nishizawa, M., Ito, S. Characterization of signaling pathway for the translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by PACAP. *J. Neurochem.* (査読あり) 105, 2271-2285, 2008.

- ⑧ 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., Ito, S. Involvement of stem cell factor and its receptor tyrosine kinase c-kit in pain regulation. *Neuroscience* (査読あり) 153, 1278-1288, 2008.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 片野泰代、中澤敬信、渡辺雅彦、山本雅、伊藤誠二 神経因性疼痛における脊髄後角でのリン酸化シグナルカスケード、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010/12/7、神戸 国際会議場
- ② Ito, S., LU, J., Katano, T., Fujiwara, S., Nishimura, W., Urade, Y., and Minami, T. A search for biomarkers in the cerebrospinal fluid in predicting response to the treatment of postherpetic neuralgia. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010/11/16, San Diego, U.S.A.
- ③ Matsumura, S., Kunori, S., Nakazawa, T., Abe, T., Yamamoto, T., Katano, T., Watanabe, M., Okuda-Ashitaka, E. and Ito, S. Attenuation of neuropathic pain by impaired Ca²⁺ signaling in mutant mice lacking the Tyr-1472 phosphorylation site of the NR2B. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010/11/15, San Diego, U.S.A.
- ④ 地崎竜介、松田公志、畝崎佐和子、片野泰代、矢尾育子、伊藤誠二 精巣特異的 *movo* 遺伝子の精子形成に関する研究 第 39 回関西アンドロロジーカンファレンス、2009/10/10、大阪 千里ライフサイエンスセンター
- ⑤ 陸景珊、片野泰代、芦高恵美子、大石陽、裏出良博、伊藤誠二 アクチンの S-ニトロシル化 (S-NO) を介した神経伝達物質の遊離調節機構 第 82 回日本生化学会大会、2009/10/23、神戸 神戸国際会議場
- ⑥ 陸景珊、片野泰代、伊藤誠二 難治性疼痛における一酸化炭素 (NO) 標的分子の解析 筋・骨格系と内臓の痛み研究会、2009/01/22、名古屋 生理学研究所

[図書] (計 1 件)

- ① 片野泰代、伊藤誠二 三輪書店理学療法 MOOK3 疼痛の理学療法 第 2 版 第 2 号、2008 「慢性痛における生化学的変化」 31-40 頁.

〔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 他 4 名
権利者：関西医科大学
種類：特許
番号：特願 2010-127252
出願年月日：2010/6/2
国内外の別：国内

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・助教
研究者番号：60469244

(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