

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791068

研究課題名（和文）コリン作動性神経による後根神経節における侵害受容性刺激伝達の調節機能

研究課題名（英文）Cholinergic regulation of nociception in dorsal root ganglion

研究代表者

J・P Bellier (J・P BELLIER)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教

研究者番号：80346022

研究成果の概要（和文）：酵素コリンアセチルトランスフェラーゼのスパイスバリエント (pChAT) が後根神経節 (DRG) に存在することが知られている。DRG 内で pChAT により合成されるアセチルコリン (Ach) がどのような機能を有しているかについて、DRG を持つモデルラットを使い、コリン作動性物質を用いて研究した。その結果、侵害受容に対するコリン作動性調節機能は、DRG で働いていることが示唆された。また、ヒト DRG についても調べたが、ヒトにおいてもコリン作動性機能マーカーある pChAT が鎮痛作用に関して重要な働きをしていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：The presence of a splice variant of the enzyme choline acetyltransferase (pChAT) has been demonstrated in the dorsal root ganglion neurons. The role of acetylcholine synthesized by pChAT in DRG has been investigated in rat model of neuropathic pain with the use of agonist of cholinergic system. Ours experimental results suggest that a cholinergic regulation of nociception take place at the level of primary sensory neurons. Moreover cholinergic marker was investigated in human DRG. Our results suggest that pChAT might be a relevant target for analgesia in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：アセチルコリン, acetylcholine, 後根神経節, dorsal root ganglion, pChAT, pain, 神経障害痛モデルラット, rat neuropathic pain model

1. 研究開始当初の背景

1) アセチルコリン (acetylcholine; Ach) は酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (Choline acetyltransferase; ChAT) によってコリンとアセチル CoA から作られる。Ach は神経伝達物質であり、中枢神経系において認識や記憶に関与する。また Ach は運動神経の末端から放出される。末梢神経系において Ach は自律神経機能や副交感神経に関与する。

(2) 最近 Ach の合成酵素 (ChAT) に選択的スプライシングによるアイソフォームの存在が末梢神経系のニューロンに見出された。この新アイソフォームを pChAT (末梢性 ChAT; peripheral type of ChAT) と呼び、従来型を cChAT (従来 ChAT; conventional type of ChAT) と呼ぶ。

(3) 後根神経節 (DRG) の研究には、組織学、トランスクリプトーム学および生化学的解析の手法を用いた。DRG に従来型 cChAT の遺伝子が転写されて mRNA ができることはない。しかし DRG に pChAT の遺伝子が転写されて mRNA ができることがある。DRG 内で pChAT により合成されるアセチルコリン (Ach) がある。

(4) テトラヒドロbiopterin (BH4) は次の酵素の補因子である。

- L-トリプトファンを 5-ヒドロキシトリプトファンに変換するトリプトファン水酸化酵素。セロトニンの前駆体は 5-ヒドロキシトリプトファンである。
- L-チロシン を (DOPA) に変換するチロシン水酸化酵素 (TH)。ドーパミンの前駆体は L-ドーパである。
- 窒素を一酸化窒素 (NO) に変換する一酸化窒素合成酵素。

セロトニン、ドーパミンと一酸化窒素 (NO) は、神経因性痛、痛覚過敏と神経性炎症を調節する。

2. 研究の目的

仮定：DRGニューロンによってAch統合が

GCH1の酵素活性を強くする。これは侵害重要性の変調によって起きる可能性がある。

- (1) 神経傷害痛のラットモデルにおける痛覚受容に対するAchの影響を検討する。
- (2) DRGでGCH1発現に対するAchの効果を評価する。
- (3) ヒトのDRGにも同様なシステムが存在するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 神経障害痛モデルと侵害受容感覚の解析。

神経障害痛のモデルラットの作成。坐骨神経結紮モデルを使用 (機械的アロディニアおよび温度過敏性疼痛)。神経障害疼痛モデルラットおよび正常ラットの侵害受容感覚の分析 (広範な感覚をカバーするよう計画)。

- a) 機械的アロディニア評価のための Von Frey テスト。
- b) 寒冷アロディニア評価のためのアセトンテスト。
- c) 温熱痛覚過敏評価のための Hargreaves テスト。

(2) 侵害受容感覚のコリン作動性制御。

コリン作動性神経の拮抗薬を正常あるいは神経障害モデルラット DRG に注入し、痛覚レベルを測定。使用薬剤は以下のとおり。Ach 合成阻害剤 (NVP) およびニコチン受容体アゴニスト (nicotine, epibatidine)。

(3) DRGのコリン作動性システムを分析する。(酵素、代謝物と受容体)

- a) リアルタイムRT-PCR法により、コリンアセチル基転移酵素 (ChAT) とニコチン性アセチルコリンレセプター (nAChR) の mRNA 発現を定量化する。
- b) ウェスタンブロットと免疫組織化学によって、ChAT と nAChR のタンパク質の発現を解析。
- c) 放射測定アッセイ法によって、ChAT の酵素活性を分析する。化学発光法によるアセチルコリン (Ach) の定量。

(4) DRGのテトラヒドロプテリン合成代謝を分析する。

a) リアルタイムRT-PCR法により、グアニル酸シクロヒドロラーゼ (GCH1) のmRNA発現を定量化する

b) ウェスタンブロットと免疫組織化学によって、ChATとnAChRのタンパク質の発現解析。

c) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって、GCH1の酵素活性とテトラヒドロプテリンを分析する。

(5) ヒトpChATの特異的な抗体を産生させる。

抗原性のペプチドのスクリーニングとセレクションを行う。マウスとウサギの免疫化をする。抗体の免疫組織化学的と生化学的な評価をする。

4. 研究成果

(1) 神経障害痛モデルと侵害受容感覚の解析：

神経障害痛のモデルラット作り。侵害受容感覚の定性および定量的評価方法を確立した。

(2) 侵害受容感覚のコリン作動性制御：

色々なコリン作動性神経の拮抗薬を正常あるいは神経障害モデルラットDRGに注入する。DRGに拮抗薬を直接注入したが再現性は非常に疑問だった。次ぎに、エマルジョンで薬物送達システムを試すとともに痛覚レベルを測定した。

Achの拮抗薬のみ、もしくはDAHPのみをラットに注入した場合には効果は見出せなかった。しかし、Achの拮抗薬とGCH1の拮抗薬 (DAHP) を一緒にてラットに注入した場合には痛覚の消失が観測された (図1)。

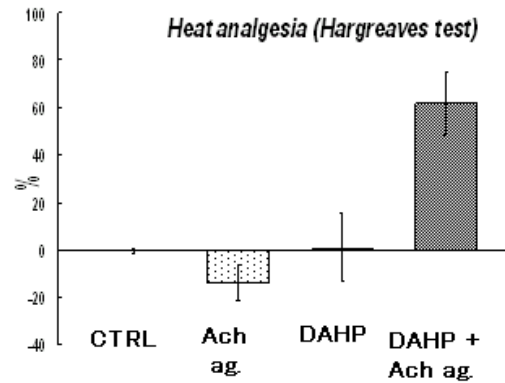


図1：痛覚消失によるAchの拮抗薬とGCH1の拮抗薬 (DAHP) の効果。

(3) DRGのコリン作動性システムとテトラヒドロピオプテリンの合成解析：

Achの拮抗薬をラットに送達GCH1mRNA発現を定量化した。GCH1mRNA発現によるAchの拮抗薬の効果はなかった (図2)。しかし、GCH1の酵素活性によりAchの拮抗薬の効果が現された。Achの拮抗薬はGCH1の酵素活性を増加させる (図3)。その結果は、GCH1の酵素活性がAchによって制御されることを示唆する。

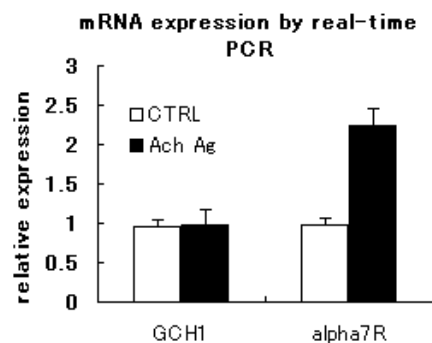


図2：GCH1mRNA発現によるAchの拮抗薬の効果。

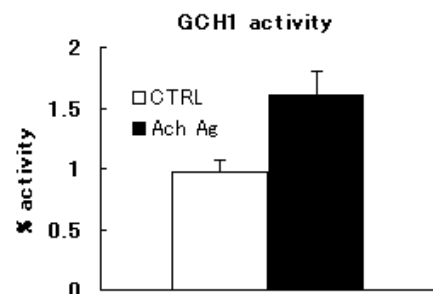
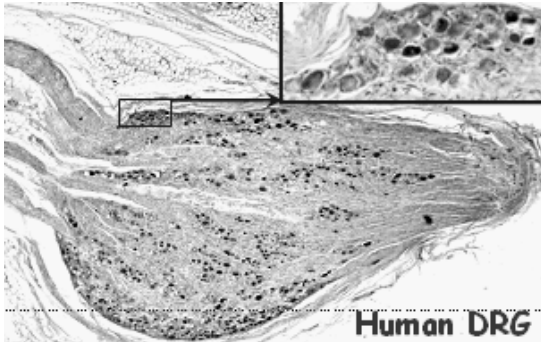


図3：GCH1の酵素活性によるAchの拮抗薬の効果。

(4) ヒトのDRGのコリン作動性マーカー：
マウスを用いて抗原性ペプチドのスクリーニングを行い、最も抗原性のペプチドを決めた。この抗原性ペプチドをマウスとウサギに住入して抗体を産生させた。得られた抗体を用いてヒトのDRGの免疫組織染色を行った(図4)。



(図4)：人間DRGにヒトpChAT抗体の免疫組織染色。

ウエスタンブロット、免疫沈降およびペプチド吸収テストを用いて特異抗体検査を行った。この結果、ヒトのDRGにおいても同様なコリン作動性システムが機能していることが示唆された、これは臨床的な意味において、極めて重要な知見である。

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3件)

- ① Saito A, Sato T, Okano H, Toyoda K, Bamba H, Kimura S, Bellier JP, Matsuo A, Kimura H, Hisa Y, Tooyama I, Axotomy alters alternative splicing of choline acetyltransferase in the rat dorsal motor nucleus of the vagus nerve, *Journal of Comparative Neurology*, 査読有, 513, 2009, 237-248
- ② Abdelalim EM, Masuda C, Bellier JP, Saito A, Yamamoto S, Mori N, Tooyama I, Distribution of natriuretic peptide receptor-C immunoreactivity in the rat brainstem and its relationship to cholinergic and catecholaminergic neurons, *Neuroscience*, 査読有, 155, 2008, 192-202
- ③ D'Este L, Kimura S, Casini A, Matsuo A, Bellier JP, Kimura H, Renda TG, First visualization of cholinergic cells

and fibers by immunohistochemistry for choline acetyltransferase of the common type in the optic lobe and peduncle complex of *Octopus vulgaris*, *Journal of Comparative Neurology*, 査読有, 509, 2008, 566-579

[学会発表] (計2件)

- ① J.P Bellier, S Kimura, Y Sakaue, H Kimura. Immunohistochemical localization of the peripheral type choline acetyltransferase in colon and dorsal root ganglion of human. 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会事務局. 2009年9月ピアザ淡海滋賀県立県民交流センター
- ② A Casini, L D'Este, S Kimura, J.P Bellier, H Kimura, T.G Renda. Immunolocalization of choline acetyltransferase of common type (cChat) in the nervous system of *Octopus vulgaris*. XXXIII Congress of the Italian Society of Histochemistry. 2009年6月. Roma Italia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

J・P Bellier (J・P BELLIER)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教

研究者番号：80346022

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者