

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791462

研究課題名（和文）Sema3Aの疼痛抑制作用における神経成長因子の関与の解明

研究課題名（英文）

The roles of neurotrophic factors on the anti-nociceptive effect of Sema3A

研究代表者

紙谷 義孝（KAMIYA YOSHINORI）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：90381491

研究成果の概要（和文）：神経障害性疼痛における Sema3A の鎮痛効果のメカニズムを解明については、後根神経節に Sema3A 受容体の活性型変異体を発現させると Sema3A の髄腔内投与の際と同様に鎮痛効果があること、神経障害性疼痛時の脊髄後角及び後根神経節では Sema3A シグナルの下流分子の発現変化及びそのパターンが異なっていることを明らかに出来た。抗がん剤パクリタキセルの投与による疼痛モデルラットでは、脊髄後角及び後根神経節では神経成長因子の一つである nerve growth factor (NGF) の発現が約 1.4 倍に増加しており、後根神経節で NGF の受容体の一つである TrkA の発現が約 3 倍に増加していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：I and my colleagues revealed that expression of the active form variant of the Sema3A receptor (plexinA1) in the dorsal root ganglion could prevent neuropathic pain behavior in SNL model rat as same as intrathecal administration of recombinant Sema3A protein, and the expression pattern of down stream molecules of the Sema3A signaling was confirmed to be different in spinal cord dorsal horn and a dorsal root ganglion of the neuropathic pain model rat.

In paclitaxel-induced pain model rats, we revealed that (NGF) content was increased to about 1.4-fold in the dorsal horn of the spinal cord and the expression of the TrkA, which is one of the NGF receptor was increased about three-fold in dorsal root ganglia as compared to control rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
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：麻酔科学・疼痛科学

キーワード：神経因性疼痛・神経ガイダンス因子・神経成長因子・疼痛軽減作用・疼痛メカニズム

1. 研究開始当初の背景

「痛みと神経ガイダンス因子の関係」に取

り組んでいる研究グループは国際的にも非常に少ないのが現状だが、成熟動物の組織障害に伴う知覚神経の変化に対する Sema3A の作用については少しずつではあるが知識の集積が進みつつある。また、Sema3A の古典的な反発性神経ガイダンス因子以外の作用の一つとして、神経の軸索輸送を促進することが本学分子神経薬理学教室において明らかにされた。一方、抗がん剤の中にはビンカルカロイド、パクリタキセルなどのチューブリン重合抑制作用を有するものがあり、これらは末梢神経障害に関連した疼痛を生じる事が知られている。同時にこれらの薬剤は軸索輸送を障害することが知られているが、それらと神経成長因子との関係もはっきりとはしていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では神経因性疼痛および術後疼痛モデルラットを用いて、くも膜下腔に投与された反発性神経ガイダンス因子の一つであるセマフォリン 3A (Sema3A) がどのような性質の後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) 細胞および脊髄後角の神経終末に対して保護的に働くのか明らかにするために、これらの部位における神経系成長因子類の分泌、およびそれらの受容体発現に対する Sema3A 投与の影響を組織学的に検討し、Sema3A の疼痛抑制効果が軸索輸送の促進による神経成長因子類の神経細胞保護効果の増強が関与しているかを検討することを目的とする。

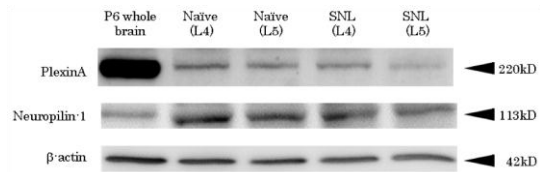
3. 研究の方法

本研究において、平成 21 年度には神経因性疼痛モデルラットでの疼痛閾値の変化、DRG、脊髄後角(術後疼痛モデルラットでは障害部位も)における神経成長因子およびその受容体の発現量および分布の組織学的・生化学的变化を検討し、Sema3A の投与によりそれらがどのように変化するかを調べる。平成 21 年度後半からはパクリタキセル投与により末梢神経障害性疼痛モデルラットを作成し、行動学的に疼痛閾値が低下しているかを確認する。平成 22 年度には薬剤性末梢神経障害性疼痛モデルラットに対し、DRG、脊髄後角における神経成長因子およびその受容体の発現量および分布の変化を組織学的・生化学的に検討し、さらに後肢測定に逆行性神経標識剤を注入し、継続的に DRG、脊髄後角における標識剤の分布を組織学的に正常ラットと比較・検討することにより軸索輸送が低下しているかど

うかを確認する。平成 23 年度は薬剤性末梢神経障害性疼痛モデルラットを用いて神経因性疼痛および術後疼痛モデルを作成し、Sema3A 投与による疼痛閾値の変化、神経成長因子およびその受容体の発現量および分布の組織学的・生化学的变化を平成 21 年度に検討したのと同様の手法を用いて検討し、軸索輸送が systemic に抑制された状態での Sema3A の効果を検討する。

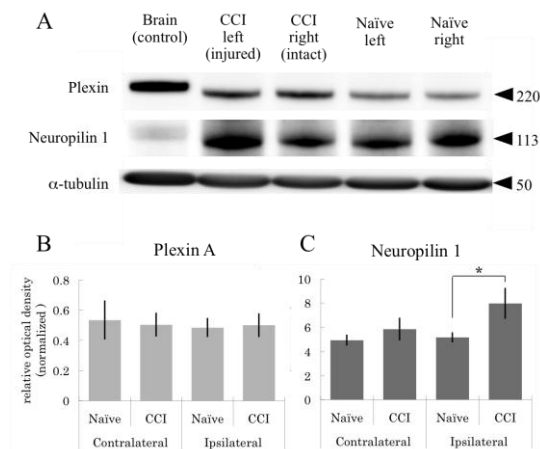
4. 研究成果

平成 21 年度は第 5 腰神経切断による神経因性疼痛モデル (SNL) ラットにおいて、Sema3A の受容体である Plexin A、Neuropilin 1 の脊髄後角及び DRG における発現の確認、発現量の比較を Western Blotting を用いて行った。Naïve rat 及び SNL ラット双方において両受容体は脊髄後角、DRG いずれにおいても発現しており、Neuropilin 1 の発現量は SNL による変化を認めなかったものの、PlexinA の発現量は SNL ラットにおいて、DRG では増加、脊髄後角では低下していることが明らかになった。



(SNL ラットにおける Sema3A 受容体の神経障害における脊髄での変化)

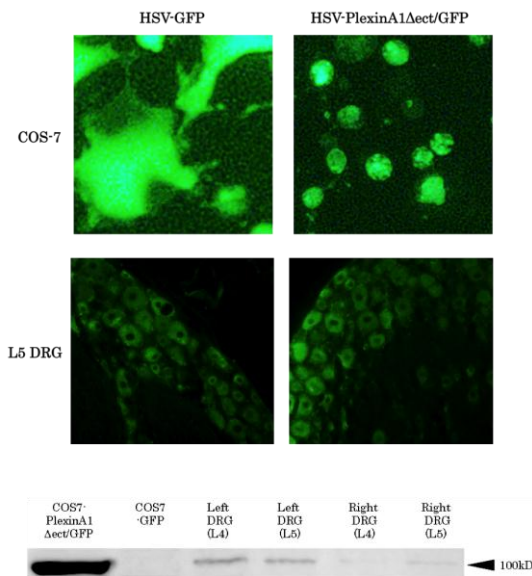
また、別の神経因性疼痛モデルである CCI ラットを用いて、脊髄での Sema3A 受容体である Neuropilin-1、Plexin-A1 に対するウェスタンブロットによるタンパク定量を行うと、Neuropilin-1 だけが障害側で有意に増加していることが明らかになった。



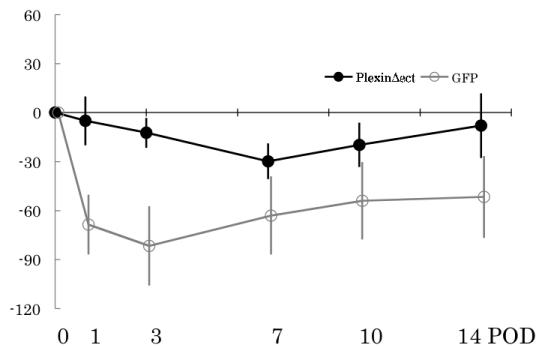
(CCI ラットにおける Sema3A 受容体の神経障害における脊髄での変化)

CCI ラットを用いた実験結果は、Intrathetically administered *Sema3A* protein attenuates neuropathic pain behavior in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neurosci Res.* 2011 Jan; 69(1): 17-24. として発表した。

平成 22 年度は第 5 腰神経切断による神経因性疼痛モデル (SNL) ラットにおいて、*Sema3A* シグナリングの活性化が抗疼痛効果を有する事を確認するため、恒常的に活性化している *PlexinA* の変異体を、ヘルペスウイルスベクターを用いて予め後根神経節 (DRG) に発現させておき、疼痛行動を測定したところ、*Sema3A* タンパクを SNL ラットのくも膜下腔に投与したときと同様に疼痛行動が抑制されていた。ヘルペスウイルスは DRG においてタンパクを発現させるため、DRG における *Sema3A* シグナリングの活性化が抗疼痛効果を発揮することが示唆された。

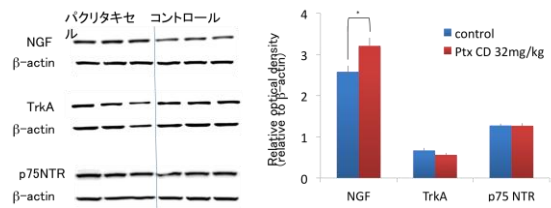


(*PlexinA1* の変異体をヘルペスウイルスベクターを使って後根神経節に発現させた図)



(変異体 *PlexinA1* を発現させたラットでは、SNL による機械的刺激に対する逃避閾値が上昇した)

同時にパクリタキセル (Ptx) 投与による神経因性疼痛モデルラット作成のための条件検討を行い、一般的に用いられる量の 4 倍に当たる 32mg/kg/4 週間で、80% 以上のラットで機械的刺激、アセトンを用いた寒冷刺激に対して過敏性を示し、この dose でのモデル作成を行うこととした。Ptx による疼痛モデルラットの脊髄及び DRG における NGF 及びその受容体である *TrkA* の発現量をウエスタンブロッティングで定量したところ、Naïve ラットと比較して脊髄においては *TrkA* の発現量に変化はなかったものの、NGF の発現量の増加が認められた。



(パクリタキセルによる神経障害では脊髄後角における NGF の発現量だけが有意に増加する)

平成 23 年度はパクリタキセル (Ptx) 投与による神経因性疼痛モデルラットを用いて、脊髄及び DRG における NGF 及びその受容体である *TrkA*、BDNF 及びその受容体である *TrkB* の発現量をウエスタンブロッティングで定量した。Ptx 投与ラットではコントロールラットと比較して、DRG では NGF 及び *TrkA* が、脊髄においては NGF の発現量の増加が認められた

(DRG: NGF 1.4 倍、*TrkA* 3.2 倍、脊髄: NGF 1.4 倍、*TrkA* 1.2 倍)。今後 *TrkA* の局在と、Ptx 投与によって影響を受けている神経ないしは神経支持組織の同定を免疫染色並びに *in situ hybridization* を用いて進めている。一方 CCI ラットを用いて神経障害によって変化する *Sema3A* signaling の下流の因子の定量を行い、CCI 2 週間後のラットの脊髄後角においては CDK5 の有意な減少が見られ、DRG においては CRMP2 の有意な増加、リン酸化の相対的な低下を認めた。神経障害による *Sema3A* 関連分子の発現変化を捉えた研究は今までになく、今後は障害からの時期によってこれらタンパクの発現や posttranslational modification (リン酸化等) がどのように変化していくのか、どの細胞においてこれらの変化が起こっているのかを明らかにし、*Sema3A* による疼痛緩和作用がこれらの減少と直接関与しているのかを動物実験で明らかにしていく予定である。

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1件)

①Hayashi M, Kamiya Y, Itoh H, Higashi T, Miyazaki T, Funakoshi K, Yamashita N, Goshima Y, Andoh T, Yamada Y, Goto T. Intrathecally administered Sema3A protein attenuates neuropathic pain behavior in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. Neurosci Res. 2011 Jan; 69(1): 17-24.

[学会発表] (計2件)

①林路子, 紙谷義孝, 宮崎智之, 田澤利治, 後藤隆久. SNL(Spinal Nerve Ligation)モデルラットにおける神経ガイダンス因子-Semaphorin3A のくも膜下投与の効果. 日本ペインクリニック学会第44回大会. 2010年7月2日、国立京都国際会館

②紙谷義孝, 林路子, 宮崎智之, 後藤隆久. 坐骨神経絞扼による神経因性疼痛モデルラットにおける神経ガイダンス因子 Semaphorin3A のくも膜下投与の効果. 第32回日本疼痛学会. 2010年7月2日、国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHINORI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：90381491

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：